

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE UMA ASSEMBLEIA DE
ANFÍBIOS ANUROS NA MATA ATLÂNTICA E DESCRIÇÃO DE UMA
ESPÉCIE NOVA**

ALEXANDER TAMANINI MÔNICO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE UMA ASSEMBLEIA DE
ANFÍBIOS ANUROS NA MATA ATLÂNTICA E DESCRIÇÃO DE UMA
ESPÉCIE NOVA**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

ALEXANDER TAMANINI MÔNICO

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M735d

Mônico, Alexander Tamanini.

Distribuição espaço-temporal de uma assembleia de anfíbios anuros na Mata Atlântica e descrição de uma espécie nova / Alexander Tamanini Mônico – 2017.

86f.: il.

Orientador: Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Anfíbios. 3. Mata Atlântica. I. Carvalho, Rute B. Clemente. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

ALEXANDER TAMANINI MÔNICO

DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE UMA ASSEMBLEIA DE ANFÍBIOS ANUROS NA MATA ATLÂNTICA E DESCRIÇÃO DE UMA ESPÉCIE NOVA

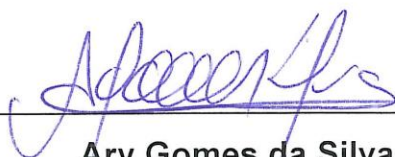
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2017,

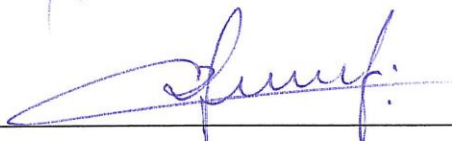
Banca Examinadora:



Sarah Maria Vargas – UFES



Ary Gomes da Silva – UVV



Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho – UVV

Orientadora

“No Brasil, dificilmente pode-se dizer que os sapos apenas coaxam.

Em um concerto de vozes, eles apresentam todas as suas variedades de tons rugido, grunhido, trinado, chocalho, apito.

A chamada de um batráquio grande e marrom soa como um golpe de martelo sobre um barril ...

Boa parte das espécies conhecidas mora aqui e o naturalista se depara com algo surpreendente a cada passo. Cada criatura é diferente, com uma inesgotável riqueza de formas. O Brasil é a terra dos sapos”.

Konrad Guenther - A naturalist in Brazil (1931)

AGRADECIMENTOS

Acredito que escrever os agradecimentos acaba sendo mais difícil que a análise dos dados até porque tantas pessoas contribuíram para esse trabalho, as quais eu devo gratidão. Vou tentar não esquecer ninguém, eu prometo!

Inicialmente, agradeço ao constante e eterno incentivo da minha família, não só durante o mestrado como em todas as minhas decisões. A minha mãe, meu pai, meu irmão, meu afilhado (o maior sapólogo de 4 anos que eu conheço), e principalmente ao meu primo/irmão Alysson, que mesmo tendo nos deixado no meio dessa jornada, me ensinou o valor da saudade, mas ainda mais o valor da simplicidade, da alegria e da cumplicidade. Onde quer que ele esteja, sinto sua luz. Aos meus tios (Lauzete e Gilmar) que me acolheram durante o mestrado em Vila Velha.

Aos meus grandes orientadores, Dr^a Rute Clemente-Carvalho (orientadora) e o Dr. Rodrigo Barbosa Ferreira (coorientador) por todos os ensinamentos, pela paciência, por me fazerem amar ainda mais a natureza e os sapos.

À banca, por aceitar contribuir e engrandecer nosso trabalho.

Aos guardas e funcionários da Reserva Biológica Augusto Ruschi (Tomaz, Caique, Darsio, Thiago, Ivanilson) que sempre nos auxiliaram, trocaram conversas esperando anoitecer, ou até mesmo, ofereceram um cafezinho no exaustivo final de noite em campo. Ao senhor Sérgio Mendes, por permitir que realizássemos algumas coletas em sua propriedade (o sítio “Quinta do Mendes), por preservar, se preocupar com o meio ambiente e por confiar em nossa pesquisa.

À minha equipe de campo, agradeço a confiança de poder ter compartilhado esses momentos com todos vocês, Barbara (minha orientanda preferida), Wesley, Tati e Diego. Devia listar Tom e Elaine também, mas em breve falarei deles.

A todos do Instituto Nacional da Mata Atlântica (antigo Museu de Biologia Professor Mello Leitão), em especial aos amigos Thiago Silva-Soares e Fernanda Cristina Ferreira Lírio, os herpetólogos da coleção de zoologia que muito contribuíram em minhas atividades, e a Marilande Angeli, pelas palavras de incentivo.

Ao John, o melhor companheiro para as noites de trabalho, um amigo que escutou todas as minhas reclamações e o máximo que ele fez foi ronronar feliz ao meu lado.

Agradeço também a Elaine Costa Campinhos, que além de ter me ajudado nos campos, no laboratório, ter dividido os trabalhos das disciplinas, escutado todos os meus “não vai dar certo”, hoje é uma irmã pra mim, que me dá forças, me fez engordar de tanto comer besteiras (e ao mesmo tempo, me faz comer muita salada pra ajudar na dieta dela) e me fazer chorar de rir (inclusive dos problemas).

Ao Tom, Welinton Diones Lauvers, aquele parceiro de todos (exatamente todos) os campos, que eu pude/posso contar sempre. Obrigado pela energia, pela confiança, pelas noites dentro dos brejos frios embaixo de chuva, e por nunca desanimar. Pelos lanches, por me ajudar a lembrar dos materiais, pelas horas e horas de conversa e ideias para desenvolver.

Aos meus professores, pelos ensinamentos e incentivo, e aos colegas do mestrado, Dandara, Julia, Felipe, Tati, Flora, Giuliano e Rayara, pela companhia. Aos demais amigos e colegas que compartilharam um pouco dessa turbulência, dando apoio, ou sempre perguntando sobre o trabalho, e que são inspiração para mim. Em especial a Ana Paula Freire Castro e Thais Volpi (que me ajudaram com os mapas), Diogo Andrade Koski, Silvia Ramira e tantos outros. Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Prosup - CAPES) pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO GERAL	05
REFERÊNCIAS I.....	07
2. CAPÍTULOS	08
2.1 Capítulo 1 - Distribuição espaço-temporal de uma assembleia de anfíbios anuros na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil	09
<i>Resumo</i>	10
<i>Abstract</i>	11
<i>Introdução</i>	12
<i>Material e métodos</i>	13
<i>Resultados</i>	16
<i>Discussão</i>	19
<i>Conclusão</i>	23
<i>Agradecimentos</i>	24
<i>Literatura citada</i>	25
<i>Legendas das figuras</i>	31
<i>Figuras</i>	32
<i>Legendas das tabelas</i>	38
<i>Tabelas</i>	39
<i>Apêndice I</i>	44
2.2 Capítulo 2 - A new species of <i>Phyllodytes</i> (Anura: Hylidae) from Espírito Santo State, Southeastern Brazil	47
<i>Abstract</i>	48
<i>Resumo</i>	48
<i>Introduction</i>	48
<i>Matherial and methodos</i>	50
<i>Description of the new species</i>	52
<i>Remarks</i>	58
<i>Acknowledgements</i>	60
<i>References</i>	61
<i>Figure captions</i>	65
<i>Figures</i>	66
<i>Table captions</i>	72
<i>Tables</i>	73
<i>Appendix I</i>	75
<i>Appendix II</i>	76
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

RESUMO

MÔNICO, A.T., M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2017. **Distribuição espaço-temporal de uma assembleia de anfíbios anuros na Mata Atlântica e descrição de uma espécie nova.** Orientador: Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho, e Coorientador: Rodrigo Barbosa Ferreira.

Estudos envolvendo ocupação de habitats e temporalidade pelos anfíbios contribuem na compreensão das respostas desses organismos frente às mudanças nas condições ambientais. O objetivo do capítulo 1 foi identificar os padrões de distribuição espaço-temporal da assembleia de anuros da Reserva Biológica Augusto Ruschi, no município de Santa Teresa, região montanhosa do Espírito Santo, sudeste do Brasil. As amostragens foram desenvolvidas entre julho de 2015 e junho de 2016, com duração de três noites e um dia por expedição mensal. As espécies foram identificadas através do registro visual e acústico, para determinação da temporada reprodutiva e ocupação de substratos utilizados para vocalização e oviposição. Foram registradas 66 espécies de anuros, distribuídas em 12 famílias. O sítio de vocalização mais utilizado foi a vegetação arbustiva próximo a corpo d'água no interior de mata e a maioria das espécies depositam seus ovos diretamente em poças permanentes. Foram registradas 58 espécies em atividade vocal, sendo que a maioria perdurou por menos que três meses, diferente do padrão apontado para a região tropical. A atividade dos anuros esteve associada ao período quente e de maior umidade relativa do ar (meses de setembro a março). Outros autores evidenciaram padrões semelhantes de atividade reprodutiva ao registrado no presente trabalho em áreas de Mata Atlântica. No capítulo 2, descrevemos uma

nova espécie de gênero *Phyllodytes* para o estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil. A nova espécie habita bromélias em um afloramento rochoso no município de Santa Teresa, 930 m acima do nível do mar. *Phyllodytes gravathae* sp. nov. difere de seus congêneres por características quantitativas e qualitativas. A análise de componentes principais demonstra que a nova espécie é morfologicamente distinta, além disso, o alto nível de divergência genética e isolamento geográfico justificam o novo status de espécie.

Palavras chaves: Anura, diversidade, espécie bromelígena, sítio de oviposição, sítio de vocalização.

ABSTRACT

MÔNICO, A.T., M.Sc, University of Vila Velha – ES, february 2017. **Space and temporal distribution of an anuran assemblage in Atlantic Rain Forest and description of a new species.** Advisor: Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho, and Co-advisor: Rodrigo Barbosa Ferreira.

Studies of spatial and temporal variation of amphibian assemblages contribute to the understanding of the responses to changes in environmental conditions. The goal of chapter 1 was identify patterns of spatial and temporal distribution of the anuran assemblage of Augusto Ruschi Biological Reserve, Santa Teresa municipality, located in a mountainous region of Espírito Santo, southeastern Brazil. Fieldwork was conducted between July 2015 and June 2016, during three nights per month. The species were identified through visual and acoustic characteristics. We recorded 66 species of anurans distributed in 12 families. Shrub vegetation near water in the interior of the forest was the most used calling microhabitat, where most species lay eggs directly in permanent pools. We observed 55 species in calling activity, which happened no more than three months. This result is different of the pattern observed for tropical region. The activity of the anurans was associated to the warm period and the highest relative humidity of the air (September to March). Many authors have detected similar patterns of reproductive activity to that observed here. In chapter 2, we describe a new species of *Phyllodytes* genus from Espírito Santo state, southeastern Brazil. The new species is found living in bromeliads on a rocky outcrop at Santa Teresa municipality, 930 m above sea level. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is distinguished from its congeners *P. luteolus*, *P. melanomystax* and *P. kautskyi* by quantitative and qualitative traits. The principal components analysis of linear body

measurements demonstrates the new species is morphologically distinct, in addition, high level of genetic divergence and geographic isolation justify the new species status. The region of Santa Teresa harbor high richness of anurans, which highlights the need of conservation efforts of this ecosystem.

Key words: Anura, diversity, bromeligenous species, breeding sites, calling sites.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As florestas da região neotropical contêm uma elevada diversidade de espécies de anuros (Duellman, 1999). Dentre os domínios morfoclimáticos brasileiros, a Mata Atlântica é o que possui a maior diversidade de anfíbios, com aproximadamente 530 espécies, sendo mais de 85% consideradas endêmicas dessa formação (Haddad et al. 2013). O município de Santa Teresa, estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil, abriga uma das maiores biodiversidades de anuros do planeta, apresentando 102 espécies de anuros (Rödder et al. 2007), sendo que destas, 97 ocorrem no entorno da Reserva Biológica Augusto Ruschi (Teixeira et al. 2007).

Barbault (2011) afirma que aspectos relacionados à história natural das espécies podem fornecer importantes parâmetros que auxiliam na compreensão de interações ecológicas em uma assembleia de anuros. As restrições correspondentes a cada espécie quanto à utilização de substratos para abrigo e reprodução atuam como fatores primários na análise da estrutura da assembleia de anfíbios de determinada localidade. Para tanto, o capítulo 1 do presente trabalho estuda os padrões de distribuição espaço-temporal das espécies que compõem a assembleia de anfíbios anuros da Reserva Biológica Augusto Ruschi, em Santa Teresa, ES, com a hipótese de que os anuros apresentam sobreposição na temporada de vocalização e na escolha do sítio de oviposição e que os machos de diferentes espécies apresentam segregação espacial quanto à escolha do sítio de vocalização.

Além disso, apesar da anurofauna de Santa Teresa ter sido intensivamente estudada nas últimas décadas, novas espécies estão sendo recentemente descritas (eg. *Adelophryne glandulata* Lourenço-de-Moraes et al. 2012, *Crossodactylus timbuhy* Pimenta et al. 2014, *Dendropsophus bromeliaceus* Ferreira et al. 2015 e

Fritziana tonimi Walker et al. 2016) nessa localidade. Estas espécies foram encontradas através da busca em substratos não comuns ao estudo dos anfíbios (eg. busca apurada no interior da serapilheira, como *A. glandulata*; ou em bromélias, como *D. bromeliaceus*) ou em espécies que historicamente eram identificadas como outra unidade taxonômica (eg. *C. timbuhy*, onde os indivíduos eram identificados como *C. dispar*, ou *F. tonimi*, tradicionalmente identificada como *F. goeldii*). Nesse sentido, o capítulo 2 apresenta a descrição de uma nova espécie do gênero *Phyllodytes*, tradicionalmente identificada como *P. luteolus*. A descrição da nova espécie baseia-se nos princípios da taxonomia integrativa (Padial et al. 2010), que explora uma variedade de características além da morfologia adulta, atuando como uma nova abordagem no estudo da diversidade dos anfíbios. O conjunto de metodologias proposto tendo sido eficaz na identificação de novas espécies, além de revalidar táxons previamente descritos e resolver problemas taxonômicos em outros gêneros de anuros (Glaw et al. 2010, Padial & De La Riva 2009, Peloso et al. 2014, Walker et al. 2016).

REFERÊNCIAS I

- BARBAULT, R. 1991. Ecological constraints and community dynamics: linking community patterns to organismal ecology. The case of tropical herpetofaunas. *Acta Oecologica*, v. 12, n. 1, pp. 139-163.
- DUELLMAN, W. E. 1999. Distribution Patterns of Amphibians in South America. In *Patterns of Distribution of Amphibians* (W. E. Duellman, ed.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, p. 255-327.
- GLAW, F.; KÖHLER, J.; DE LA RIVA, I.; VIEITES, D. R. & VENCES, M. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs: combination of molecular genetics, bioacoustics and comparative morphology reveals twelve additional species of *Boophis*. *Zootaxa*, v. 2383, p. 82.
- HADDAD, C.F.B.; TOLEDO, L.F.; PRADO, C.A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J.L. & SAZIMA, I. 2013. *Guia de anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia*. São Paulo, Editora Anolis Books, 544p.
- PADIAL, J. M. & DE LA RIVA, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 155, pp. 97-122.
- PADIAL, J. M., MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I. & VENCES, M. 2010. Review: The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v. 7, pp. 1-14.
- PELOSO, P. L.; STURARO, M.J.; FORLANI, M. C.; GAUCHER, P.; MOTTA, A. P. & WHEELER, W. C. 2014. Phylogeny, taxonomic revision, and character evolution of the genera *Chiasmocleis* and *Syncope* (Anura, Microhylidae) in Amazonia, with descriptions of three new species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 386, pp. 1-112.
- RÖDDER, D.; TEIXEIRA, R.L.; FERREIRA, R.B.; DANTAS, R.B.; PERTEL, W. & GUARNIERE, G.J. 2007. Anuran hotspots: the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo, southeastern Brazil. *Salamandra*, v. 43, pp. 91-110.
- TEIXEIRA, R.L.; FERREIRA, R.B.; DANTAS R.B. & W. PERTEL. 2007. Diversidade de Anfíbios Anuros no Entorno da Reserva Augusto Ruschi, Sudeste do Brasil, p 95-100. In: VIEIRA, L.A. & ASSIS, A.M. (Ed.). *Planejando Paisagens Sustentáveis no Corredor Central da Mata Atlântica: uma experiência na região serrana do Espírito Santo*. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo, 200p.
- WALKER, M.; GASPARINI, J.L. & HADDAD, C.F.B. 2016. A new polymorphic species of egg-brooding frog of the genus *Fritziana* from southeastern Brazil (Anura: Hemiphractidae). *Salamandra*, v. 52, n. 3, pp. 221-229.

2.1 CAPÍTULO I

As normas utilizadas no texto são referentes à Revista Brasileira de Zoologia.

Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/rbzool/iinstruc.htm>.

1 **Distribuição espaço-temporal de uma assembleia de anfíbios anuros na Mata Atlântica**
2 **do Sudeste do Brasil**

3 Alexander Tamanini Monico¹, Rodrigo Barbosa Ferreira¹ e Rute Clemente-Carvalho^{1,2}

4 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Rua
5 Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brasil.

6 ² Department of Biology, Queen's University, 116 Barrie St, K7L 3N6, Kingston, Ontario,
7 Canada.

8 Autor para correspondência. E-mail: alexandermonico@hotmail.com.

9 RESUMO. Estudos envolvendo ocupação de habitats e temporalidade pelos anfíbios
10 contribuem na compreensão das respostas desses organismos frente às mudanças nas
11 condições ambientais. O objetivo do presente trabalho foi identificar os padrões de
12 distribuição espaço-temporal da assembleia de anuros da Reserva Biológica Augusto Ruschi,
13 no município de Santa Teresa, região montanhosa do Espírito Santo, sudeste do Brasil. As
14 amostragens de campo foram desenvolvidas entre julho de 2015 e junho de 2016, com
15 duração de três noites e um dia, por expedição mensal. As espécies foram identificadas
16 através do registro visual e acústico, para determinação da temporada reprodutiva e ocupação
17 de substratos utilizados para vocalização e oviposição. Foram registradas 66 espécies de
18 anuros, distribuídas em 12 famílias. O sítio de vocalização mais utilizado foi a vegetação
19 arbustiva próximo a corpo d'água no interior de mata, enquanto a maioria das espécies
20 depositam seus ovos diretamente em poças permanentes. Foram registradas 58 espécies em
21 atividade vocal, sendo que a maioria perdurou por menos que três meses, diferente do padrão
22 apontado para a região tropical. Em novembro, que correspondeu ao início das chuvas de
23 verão, foi registrada a maior riqueza de espécies. A atividade dos anuros esteve associada ao
24 período quente e de maior umidade relativa do ar (meses de setembro a março). Muitos
25 autores evidenciaram padrões semelhantes de atividade reprodutiva ao registrado no presente
26 trabalho. A área amostrada abriga uma elevada riqueza de anuros, bem como toda a região de
27 Santa Teresa, fortalecendo a necessidade da conservação desse *hotspot* de biodiversidade.
28 Palavras chave: Anura, sítio de oviposição, sítio de vocalização, diversidade, reprodução,
29 Santa Teresa.

30 ABSTRACT. Studies of spatial and temporal variation of amphibian assemblages contribute
31 to the understanding of the responses to changes in environmental conditions. The goal of this
32 study was identify patterns of spatial and temporal distribution of the anuran assemblage of
33 Augusto Ruschi Biological Reserve, Santa Teresa municipality, located in a mountainous
34 region of Espírito Santo, southeastern Brazil. Fieldwork was conducted between July 2015
35 and June 2016, during three nights per month. The species were identified through visual and
36 acoustic characteristics. We recorded 66 species of anurans distributed in 12 families. Shrub
37 vegetation near water in the interior of the forest was the most used calling microhabitat,
38 where most species lay eggs directly in permanent pools. We observed 55 species in calling
39 activity, which happened no more than three months. This result is different of the pattern
40 observed for tropical region. The greatest species richness was observed in November, which
41 is the beginning of summer rains. The activity of the anurans was associated to the warm
42 period and the highest relative humidity of the air (September to March). Many authors have
43 detected similar patterns of reproductive activity to that observed here. The sampled area
44 harbor high richness of anurans, which highlights the need of conservation efforts of this
45 ecosystem.

46 **Key words:** Anura, breeding sites, calling sites, diversity, reproduction, Santa Teresa.
47

48 INTRODUÇÃO

49 O Brasil é considerado o país com a maior diversidade de anuros do planeta,
50 apresentando 988 espécies descritas (SEGALLA *et al.* 2016). Dentre os domínios brasileiros, a
51 Mata Atlântica é o que possui a maior diversidade de anfíbios, com aproximadamente 530
52 espécies, sendo mais de 85% consideradas endêmicas dessa formação (HADDAD *et al.* 2013).
53 Algumas dessas espécies estão listadas como ameaçadas de extinção, e muitas outras são
54 “dados deficientes” por não haver informações a respeito das populações das mesmas
55 (SILVANO & SEGALLA 2005; HADDAD *et al.* 2013). Dessa forma, os registros de supostos
56 declínios em populações de anfíbios no Brasil torna-se preocupante (HEYER 1988;
57 WEYGOLDT 1989). Para propor ações de conservação dos anfíbios é necessário entender suas
58 necessidades ecológicas como uso do habitat e temporalidade (VERDADE *et al.* 2012).

59 Inserido na região central da Mata Atlântica, o estado do Espírito Santo apresenta 133
60 espécies de anfíbios (ALMEIDA *et al.* 2011). A região de Santa Teresa é o principal foco de
61 inventários de anfíbios no Espírito Santo (RÖDDER *et al.* 2007; ALMEIDA *et al.* 2011). Isso
62 remete ao fato do município apresentar uma das maiores biodiversidades de anuros do
63 planeta, apresentando 102 espécies de anuros (RÖDDER *et al.* 2007), sendo que destas, 97
64 ocorrem no entorno da Reserva Biológica Augusto Ruschi (TEIXEIRA *et al.* 2007). Apesar dos
65 muitos trabalhos realizados no município de Santa Teresa, e no estado do Espírito Santo em
66 geral, há algumas lacunas de conhecimento, como por exemplo, estudos envolvendo ocupação
67 de habitats e micro-habitats e variação temporal. Aspectos relacionados à história natural das
68 espécies podem fornecer informações importantes que contribuem para a compreensão das
69 interações ecológicas em uma assembleia de anfíbios anuros. Por exemplo, as restrições
70 ecológicas de cada espécie influenciam na utilização de substratos e micro-habitats para
71 abrigo e reprodução, e que conseqüentemente atuam como fatores primários na análise da
72 estrutura da assembleia de anfíbios de determinada localidade (BARBAULT 2011). As

73 mudanças nas condições ambientais ao longo do ano, permitindo que haja uma estação seca e
74 uma chuvosa, influenciam diretamente na reprodução das diferentes espécies (BARBAULT
75 2011) e conseqüentemente nas relações ecológicas entre elas.

76 Com a hipótese de que os anuros apresentam sobreposição na temporada de
77 vocalização e na escolha do sítio de oviposição e que os machos de diferentes espécies
78 apresentam segregação espacial quanto à escolha do sítio de vocalização, o objetivo do
79 presente trabalho foi identificar os padrões de distribuição espaço-temporal das espécies que
80 compõem a assembleia de anfíbios anuros da Reserva Biológica Augusto Ruschi, no
81 município de Santa Teresa, Espírito Santo, e ainda apresentar informações a respeito da
82 história natural das espécies locais, tais como sítios de vocalização e oviposição.

83

84 **MATERIAL E MÉTODOS**

85 **Área de estudo**

86 A Reserva Biológica Augusto Ruschi (RBAR - Figura 1) está localizada ao sudeste do
87 município de Santa Teresa, região serrana do Estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil. A
88 RBAR (S 19°45'00" e 20°00'00"; O 40°27'00" e 40°38'00") abrange uma área de 3.598 ha,
89 onde estão mais de 100 nascentes e córregos perenes que contribuem para a formação da
90 Bacia Hidrográfica da região (IBAMA, 2000).

91 De acordo com a classificação de Köppen-Geiger (PEEL *et al.* 2000), o clima de Santa
92 Teresa é do tipo Cwa-Cfa (subtropical úmido, mesotérmico), com pequena deficiência hídrica
93 em alguns meses do ano (FERREIRA *et al.* 2016). A cobertura vegetal é caracterizada como
94 sendo do tipo Ombrófila Densa, pertencendo à Província Atlântica (RIZZINI 1979). A RBAR
95 é coberta por vegetação primária, em sua maior parte, entretanto, em quase todo o seu entorno
96 prevalecem plantações de café e eucalipto (PINTO *et al.* 1993; GATTI *et al.* 2014; FERREIRA *et*
97 *al.* 2016).

98

99 **Levantamento de Dados**

100 As amostragens de campo foram desenvolvidas entre julho de 2015 e junho de 2016.
101 Três coletores realizaram uma expedição mensal de três dias, totalizando 36 dias de
102 amostragem. Os dois primeiros dias de observação se iniciavam ao entardecer, por volta das
103 17h e se encerravam quando a atividade dos anuros diminuía, por volta das 24h. O terceiro dia
104 de observação ocorria no período diurno, das 13h as 17h, em áreas próximas a riachos da
105 região. Cada ida a campo perdurou em média sete horas de observação por dia, exceto no
106 último dia mensal, que correspondeu a 12 horas, gerando 26 horas por expedição, resultando
107 em 312 horas por coletor, o que totalizou 936 horas de esforço amostral. As espécies foram
108 identificadas através do registro visual e acústico.

109 Os dados das espécies foram registrados através de forma visual e acústica em três
110 transectos com cerca de 3 km cada. A cada noite de amostragem foi verificado um transecto e
111 a ordem de amostragem foi assistemática. Os pontos de amostragem concentraram-se
112 principalmente em áreas próximas a riachos e córregos no interior de mata, cachoeiras e poças
113 temporárias ao longo dos transectos, e em charcos, áreas brejosas e um lago no entorno da
114 sede administrativa da RBAR. O lago possui uma extensão com uma área de taboal e outras
115 plantas aquáticas.

116 Para registro sobre uso de habitat e micro-habitat como sítio de vocalização, os
117 ambientes de observação foram classificados em: (A) afloramento rochoso em cachoeira, (B)
118 bromélia, (C) cavidades subterrâneas, (D1) margem de corpo d'água no interior de mata, (D2)
119 margem de corpo d'água em área aberta, (E1) serapilheira abaixo das folhas, (E2) serapilheira
120 acima das folhas, (E3) serapilheira empoleirado em galhos, (F1) vegetação herbácea no
121 interior de mata, (F2) vegetação arbustiva no interior de mata, (F3) vegetação arbórea no
122 interior de mata, e (G) vegetação herbácea em área aberta. Já para registros de habitat e

123 micro-habitat como sítio de oviposição, bem como de história natural das espécies, os
124 ambientes de observação foram classificados em: (I) serapilheira, (II) riacho no interior de
125 mata, (III) poça temporária no interior da mata, (IV) poça permanente, (V) vegetação sob
126 poça temporária no interior da mata, (VI) bromélias, (VII) afloramento rochoso em cachoeira,
127 e (VIII) vegetação sob riacho no interior da mata. Para cada espécie registrada foi estimado o
128 número de indivíduos em cada microambiente por contagem direta.

129 A temporada de vocalização de cada espécie foi determinada com base no registro de
130 machos adultos vocalizando seguindo metodologia descrita em PRADO & POMBAL (2005),
131 sendo as espécies reunidas em três grupos quanto à ocorrência temporal: O) espécies que
132 adotaram o padrão de vocalização ocasional (machos vocalizando em, no máximo, um
133 período inferior a três meses); S) espécies que apresentaram padrão semi-constante (machos
134 vocalizando entre quatro e nove meses); e C) espécies que apresentaram o padrão do tipo
135 constante (machos vocalizando em, pelo menos, 10 meses), inclusive em meses frios.

136 As variáveis climáticas (temperaturas mínima, média e máxima e umidade relativa do
137 ar) foram coletadas mensalmente em campo com um termohigrômetro
138 (instruthermKlimaloggPro - 303039.0.00), as quais foram usadas para análises do efeito dos
139 fatores abióticos sobre a assembleia. Os dados referentes ao índice de precipitação
140 pluviométrica foram extraídos da unidade meteorológica do Instituto Estadual de Meio
141 Ambiente do Espírito Santo (IEMA) presente na RBAR.

142

143 **Espécimes-testemunho**

144 Um espécime testemunho foi coletado para cada espécie registrada. Cada indivíduo foi
145 eutanasiado com pomada de Lidocaína 10% e fixado em formol 10%. Posteriormente os
146 animais foram permanentemente preservados em álcool 70%. As coletas foram realizadas
147 com a devida autorização do órgão competente, o Instituto Chico Mendes de Conservação da

148 Biodiversidade, ICMBio (Autorização 49.871-1). Todos os espécimes foram depositados na
149 “Coleção de Anfíbios do Setor de Zoologia”, do Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA
150 - antigo Museu de Biologia Professor Mello Leitão), Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. A
151 lista de material depositado está disposta no Apêndice I.

152

153 **Análise de dados**

154 Para verificar a eficiência amostral foi construída uma curva de rarefação, estimada
155 com 500 aleatorizações geradas a partir da matriz de dados de abundância de cada mês
156 amostrado (12 amostragens). A curva de rarefação e estimativas de riqueza de espécies foram
157 calculadas no programa EstimateS versão 9.1 (COLWELL 2004).

158 Duas matrizes de similaridade foram geradas utilizando o índice de Jaccard, para os
159 dados de presença/ausência de anuros em habitats e micro-habitats utilizados como: sítios de
160 vocalização e sítios de oviposição. Esses foram elaborados através da Análise de
161 Agrupamento (ou “cluster”; CLARKE 1993), utilizando 500 replicações, e considerando
162 relações significativas as com $p < 0,05$. Todas as rotinas foram realizadas no programa Past
163 (CLARKE & GORLEY 2006).

164 A correlação entre a riqueza e abundância de anfíbios e as variáveis ambientais
165 (temperatura mínima, média e máxima, umidade relativa do ar e precipitação) foram testadas
166 através do coeficiente de correlação de Pearson (r). As análises de correlação foram realizadas
167 no software R versão 3.0.3 (R CORE TEAM 2014).

168

169 **RESULTADOS**

170 **Composição de espécies**

171 Foram registradas 66 espécies de anfíbios anuros ao longo dos três transectos
172 amostrados na Reserva Biológica Augusto Ruschi. Essas espécies estão distribuídas em 12

173 famílias, sendo Hylidae a mais representativa com 36 espécies (55%); seguida de
174 Brachycephalidae com sete espécies; Hemiphractidae, Leptodactylidae e Odontophrynidae
175 com quatro espécies; Hylodidae e Microhylidae com três espécies; e as demais com apenas
176 uma espécie cada (Tabela 1). A curva de rarefação de espécies para a área amostrada não
177 atingiu uma assíntota (Figura 2), sendo a riqueza estimada, de acordo com o índice Chao 2, de
178 84 (71 ± 127) espécies.

179

180 **Distribuição espacial**

181 O sítio de vocalização mais utilizado foi ‘vegetação arbustiva no interior de mata’
182 (F2). Nesse micro-habitat ocorreram 16 espécies, sendo que seis destas foram exclusivas a
183 esse sítio de vocalização (Tabela 1). Contrariamente, ‘afloramento rochoso em cachoeira’ (A)
184 foi o menos utilizado com apenas uma espécie. *Hypsiboas semilineatus* e *Phyllomedusa*
185 *burmeisteri* foram as mais generalistas, ocupando cinco dos diferentes tipos de sítios de
186 vocalização (42%). Enquanto 21 espécies (32%) foram encontradas em apenas um micro-
187 habitat.

188 A análise de agrupamento relativo aos sítios de vocalização não demonstrou formação
189 de grupos com alta similaridade (Figura 3). O grupo mais similar foi formado pelas espécies
190 de hilídeos que utilizam ‘margem de corpo d’água em ambiente de mata’ (D1) ou em ‘área
191 aberta’ (D2) associadas a ‘vegetação herbácea’ (F1 e G) ou ‘arbustiva’ (F2).

192 A maioria das espécies (N=21; 33%) depositam seus ovos diretamente em ‘poça
193 permanente’ (IV) (Tabela 1), sendo 20 espécies (32%) exclusivas a esse sítio; 15 espécies em
194 ‘poça temporária no interior da mata’ (III); 10 espécies diretamente na ‘serapilheira’ (I); nove
195 espécies em ‘riacho no interior da mata’ (II); seis espécies na ‘vegetação sob a superfície
196 d’água em poças temporárias’ (V); quatro espécies em ‘bromélia’ (VI); e apenas uma espécie
197 na ‘vegetação sob o riacho no interior de mata’ (VIII) e uma no ‘afloramento rochoso em

198 cachoeira' (VII). A análise de agrupamento não demonstrou a formação de grupos com alta
199 similaridade (Figura 4).

200

201 **Distribuição temporal**

202 Do total de 66 espécies registradas, 58 espécies foram encontradas em atividade de
203 vocalização. Não foi registrada atividade vocal de oito espécies (*Adelophryne glandulata*,
204 *Bokermannohyla caramaschii*, *Ischnocnema nasuta*, *I. gr. parva* 1, *I. aff. venancioi*,
205 *Leptodactylus latrans*, *Ololygon kautskyi* e *Physalaemus maculiventris*) durante o período
206 amostrado.

207 Todas as espécies apresentam atividade predominantemente noturna, exceto *Hylodes*
208 *aff. lateristrigatus*, cujos machos vocalizaram durante o dia nos meses de outubro de 2015 a
209 janeiro de 2016. Além disso, um macho de *Dendropsophus elegans* foi registrado vocalizando
210 esporadicamente, possivelmente em resposta territorial, no período diurno em fevereiro de
211 2016.

212 Das 58 espécies registradas em atividade vocal, 39 (67%) apresentaram padrão
213 ocasional de vocalização; 18 (31%) com padrão semi-constante; e apenas uma (2%) espécie
214 teve o padrão constante de vocalização. Nove espécies (14%) apresentaram reprodução
215 explosiva, concentradas em poucos dias. *Myersiella microps* apresentou atividade reprodutiva
216 unicamente em uma noite do mês de outubro de 2015 durante um forte temporal, onde
217 inúmeros indivíduos vocalizaram abrigados na serapilheira. Oito espécies (*Chiasmocleis*
218 *lacrimae*, *C. schubarti*, *D. berthaltutzae*, *D. decipiens*, *D. microps*, *D. seniculus*, *Itapotihyla*
219 *langsdorffii* e *Trachycephalus mesophaeus*) (12%) apresentaram comportamento de
220 reprodução explosiva no mês de novembro de 2015, que correspondeu ao período de início
221 das chuvas de verão, com uma quantidade expressiva de machos nos sítios de vocalização.

222 Enquanto *D. haddadi*, *Oloolygon x-signatus*, *Proceratophrys boiei* e *P. laticeps* também
223 vocalizaram apenas nesse período, porém, com poucos machos.

224

225 **Correlação entre a riqueza e abundância e os fatores abióticos**

226 A maior abundância de machos em atividade vocal ocorreu nos períodos de setembro
227 de 2015 a fevereiro de 2016 (Tabela 2), quando a temperatura e a umidade relativa do ar
228 foram mais elevadas (Figura 5A e 5B). Exceção ao mês de dezembro que não apresentou essa
229 tendência. De março a junho de 2016, que corresponderam aos meses mais frios, associado ao
230 período pós-reprodução de uma quantidade expressiva de espécies, foi registrada a menor
231 riqueza (Figura 6A) e também a menor abundância (Figura 5A), com machos de oito espécies
232 vocalizando em março, cinco em abril e apenas uma nos meses de maio e junho (Tabela 2).

233 A correlação de Pearson indicou que não houve correlação significativa entre as
234 variáveis da assembleia e as variáveis ambientais – a riqueza não teve correlação significativa
235 com a temperatura máxima ($r= 0,603$; $p= 0,227$; Figura 6A), a abundância de indivíduos com
236 precipitação ($r = -0,425$; $p= 0,169$; Figura 5A), a umidade relativa do ar com a riqueza ($r=$
237 $0,495$; $p= 0,102$; Figura 6B) ou riqueza com a abundância ($r= 0,224$; $p= 0,109$; Figura 5B) de
238 anfíbios da assembleia.

239

240 **DISCUSSÃO**

241 A composição da anurofauna registrada no presente trabalho corresponde a 68% das
242 espécies registradas no entorno da RBAR (TEIXEIRA *et al.* 2007), 64% das listadas para o
243 município de Santa Teresa (RÖDDER *et al.* 2007) e 50% das listadas para o estado do Espírito
244 Santo (ALMEIDA *et al.* 2011). FERREIRA *et al.* (2016) avaliando a RBAR registrou outras sete
245 espécies (i.e. *Brachycephalus* sp., *Crossodactylodes bokermanni*, *C. izecksohni*, *Euparkerella*
246 *tridactyla*, *Ischnocnema* gr. *parva* 2, *Phasmahyla exilis* e *Zachaenus carvalhoi*). A ausência

247 da maioria dessas espécies no presente estudo deve-se a diferença nos métodos amostrais,
248 feito por meio de buscas apuradas em parcelas de 25 m². Como apontado pela curva de
249 acumulação de espécies, a extensão do período de amostragem possivelmente registraria
250 espécies não encontradas.

251 Dentre as espécies registradas, *Vitreorana eurygnatha* consta na lista de anfíbios
252 ameaçados do estado do Espírito Santo (GASPARINI *et al.* 2007) com o status de ‘vulnerável’.
253 *Oloolygon arduous*, *O. heyeri* e *O. kautskyi* constam como ‘dados deficientes’ tanto na lista
254 estadual quanto na nacional de anfíbios ameaçados. Nenhuma das espécies encontradas está
255 na lista de nacionalmente ameaçada (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE 2014). Além destas, as
256 espécies recém-descritas (eg. *Adelophryne glandulata*, *Crossodactylus timbuhy*, *Fritziana*
257 *tonimi*, *Gastrotheca megacephala*) não foram avaliadas nas referidas listas.

258 Vegetação arbustiva em margem de corpo d’água no interior de mata foi o sítio de
259 vocalização mais utilizado pelas espécies do presente estudo. A utilização deste sítio é
260 permitida principalmente por organismos com presença dos discos adesivos, ou seja, por
261 hilídeos (DIXON & HEYER 1968; HÖDL 1977). Hilídeos maiores (eg. *Gastrotheca*
262 *albolineata*, *Itapotihyla langsdorffii* e *Trachycephalus mesophaeus*) utilizam determinados
263 substratos arbóreos ou arbustivos, enquanto os hilídeos menores (eg. espécies do gênero
264 *Dendropsophus* e *Oloolygon*) a vegetação mais herbácea. A alta riqueza de hilídeos no presente
265 trabalho, bem como em toda região neotropical, pode ser influenciada pela ocupação de
266 substratos verticais próximos aos corpos d’água.

267 As espécies mais generalistas no uso de sítio de vocalização são hilídeos (i.e.
268 *Hypsiboas semilineatus* e *Phyllomedusa burmeisteri*), corroborando assim com outros
269 estudos. ZOCCA *et al.* (2014) também indicou outro hilídeo de tamanho grande (i.e.
270 *Hypsiboas albomarginatus*) como a espécie mais generalista. Contrariamente, FERREIRA *et al.*
271 (2012) registraram hilídeos de tamanho pequeno (e.g. *D. branneri*, *D. elegans* e *D. minutus*)

272 como as espécies mais generalistas. A estratégia generalista de ocupação de diversos sítios de
273 vocalização pode indicar maior plasticidade ambiental o que pode favorecer essas espécies a
274 ocupação de áreas degradadas.

275 Poças permanentes e temporárias no interior de mata foram os sítios de oviposição
276 com maior número de espécies (52%), bem como o maior número de espécies exclusivas
277 (47%), onde 18 espécies utilizaram as poças temporárias e 14 espécies utilizaram as poças
278 permanentes. BERTOLUCI & RODRIGUES (2002) encontraram o mesmo padrão em uma
279 assembleia de anuros na Mata Atlântica do estado de São Paulo, onde a maioria das espécies
280 utilizam poças permanentes e charcos como ambientes reprodutivos. Alguns autores apontam
281 que em ambientes temporários existem menos predadores de girinos, o que pode, de forma
282 vantajosa, atrair um maior número de espécies de anuros para esses sítios em relação às poças
283 permanentes (WOODWARD 1983; SMITH 1983; SKELLY 1997). Entretanto, o presente
284 trabalho não direciona a essas condições, onde 20 espécies utilizaram ambientes permanentes
285 e 14 ambientes temporários.

286 A maioria das espécies vocalizou durante até três meses, seguindo o padrão de
287 reprodução ocasional. ZIMMERMAN & BOGAR (1988) afirmam que esse padrão pode ser
288 considerado vantajoso em relação ao padrão prolongado, uma vez que os ovos, girinos e
289 imagos são expostos a predação por menos tempo. No entanto, o padrão esperado era de
290 reprodução prolongada, que é o mais comum nas regiões tropicais (WELLS 1977), que
291 permitem que fêmeas sejam mais seletivas (HADDAD & SAZIMA 1992).

292 A maior riqueza de espécies e a maior abundância de machos em atividade de
293 vocalização se deram nos meses de maiores temperaturas e umidade (setembro de 2015 a
294 fevereiro de 2016). Diversos autores evidenciaram padrões semelhantes (e.g. POMBAL JR
295 1997; BERNARDE & DOS ANJOS 1999; PRADO & POMBAL JR 2005). Alguns deles sugerem
296 que os principais fatores determinantes do aumento da atividade das espécies são a

297 precipitação, temperaturas altas e umidade (eg. POMBAL JR *et al.* 1994; POMBAL JR 1997;
298 BERTOLUCI & RODRIGUES 2002, PRADO & POMBAL JR 2005), e ainda que a precipitação é o
299 fator que mais contribui no aumento da riqueza e abundância de espécies (DUELLMAN &
300 TRUEB 1994; ROSSA-FERES & JIM 1994; GOTTSBERGER & GRUBER 2004; CONTE & ROSSA-
301 FERES 2006; SANTOS *et al.* 2007). JIM (2003) afirma que a temperatura é um importante fator
302 para o início da atividade de algumas espécies. Neste sentido, o presente trabalho evidenciou
303 que nos meses com temperaturas mais elevadas houve um maior número de espécies
304 vocalizando.

305 A abundância de machos em atividade vocal também foi explicada pelas temperaturas
306 máximas, ou seja, em meses mais quentes houve um maior número de machos em atividade
307 vocal. Alguns estudos mostram que essa variável associa-se ao fotoperíodo, que atua como
308 ativador de processos fisiológicos associados a reprodução (HATANO *et al.* 2002; CANAVERO
309 & ARIM 2009). A maioria das espécies semi-constantes e ocasionais ocorreu em outubro de
310 2015 a fevereiro de 2016, coincidindo com a estação quente e chuvosa. A menor atividade,
311 considerando-se número de espécies e número de machos em atividade de vocalização, foi
312 observada nos meses de abril a junho de 2016, que foram os meses com menores temperaturas
313 durante toda a amostragem, associado ao período pós-reprodução da maioria das espécies. As
314 temperaturas mais baixas, que podem indicar o término da temporada chuvosa, podem atuar
315 como um fator limitante na reprodução de anuros em regiões serranas de Mata Atlântica
316 (ETEROVICK & SAZIMA 2000; FERREIRA *et al.* 2012).

317 Das 17 espécies registradas em atividade de vocalização por PRADO & POMBAL
318 (2005), cinco (30%) espécies apresentaram o padrão constante de vocalização; sete (40%)
319 com padrão semi-constante; e cinco ocasionais. Já das 20 espécies registradas por FERREIRA
320 *et al.* (2012), 13 (65%) apresentaram padrão semi-constante; sete (35%) com padrão
321 ocasional; e nenhuma com padrão constante. Notam-se divergências em relação ao padrão

322 local de algumas espécies, por exemplo, *H. semilineatus* apresentou padrão constante no
323 trabalho de PRADO & POMBAL (2005), semi-constante no presente trabalho, e ocasional em
324 FERREIRA *et al.* (2012).

325

326 **CONCLUSÃO**

327 A alta diversidade na Reserva Biológica Augusto Ruschi reforça para a ideia da região
328 de Santa Teresa ser um dos maiores *hotspots* de anuros da Mata Atlântica. A composição é
329 similar a outras áreas de Mata Atlântica capixaba, principalmente, da região montanhosa.
330 Além disso, o registro de espécies recentemente descritas (*Adelophryne glandulata*), espécies
331 novas (*Ischnocnema* gr. *parva* 1) ou novas ampliações geográficas (*I. aff. venancioi*) mostram
332 que, mesmo em áreas intensivamente coletadas, amostragens de longo prazo contribuem para
333 o melhor conhecimento da anurofauna local.

334 A atividade dos anuros esteve associada ao período quente e de maior umidade
335 relativa do ar (setembro a março), sendo a temperatura o principal componente na variação
336 temporal dos anuros. Os maiores valores de riqueza e abundância foram registrados junto com
337 os maiores índices de temperatura, resultando em diferentes padrões de períodos de
338 ocorrência entre famílias. As espécies representantes da família Hylidae tiveram um período
339 de reprodução mais longo que as das demais famílias. A umidade relativa do ar foi um fator
340 secundário na atividade das mesmas, porém, a temperatura mínima associada a amplitude
341 térmica foi significativa para a diminuição da riqueza e abundância das espécies. A
342 precipitação não foi relacionada aos padrões da assembleia. Entretanto, é importante reforçar
343 que a seca atípica durante o período amostrado pode ter causado alterações na dinâmica
344 populacional da assembleia de anfíbios anuros locais, não correlacionando a pluviosidade com a
345 riqueza e abundância, porém, sabe-se que estes são animais fortemente dependentes das condições
346 ambientais (eg. pluviosidade, temperatura e umidade relativa do ar).

347 A maior diversidade de anuros das espécies na região neotropical é dominada por hilídeos,
348 o que também foi observado na área amostrada, favorecendo com que o sítio de vocalização mais
349 utilizado fosse a vegetação arbustiva próximo aos corpos d'água, enquanto o sítio de oviposição
350 mais usado foi diretamente em poça permanente.

351 Por fim, é possível concluir que os anfíbios anuros apresentam sobreposição na temporada
352 de vocalização e na utilização dos sítios de oviposição e que os machos apresentam segregação
353 espacial quanto à escolha do sítio de vocalização.

354 A Reserva Biológica Augusto Ruschi abriga uma elevada riqueza de anuros, bem
355 como a região de Santa Teresa em si, fortalecendo a necessidade da conservação desse
356 *hotspots* de biodiversidade. A preservação da integridade das características da área,
357 envolvendo seus substratos e micro-habitats, é fundamental na manutenção da assembleia de
358 anfíbios anuros local, sobretudo das espécies que possuem alta especificidade quanto ao
359 substrato utilizado.

360

361 **AGRADECIMENTOS**

362 Agradecemos ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela
363 autorização para coleta do material testemunho (n° da licença 48.058-2) e acesso a Unidade
364 de Conservação onde foi realizada a pesquisa. À Welinton Diones Lauvers, Barbara Moschen
365 Montibeller e Tatiane de Mello do Carmo pela ajuda no trabalho de campo. Agradecemos
366 também aos amigos do Museu de Biologia Professor Mello Leitão (atual Instituto Nacional da
367 Mata Atlântica) pelo apoio. A.T. Mônico agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de
368 Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado.

369 **LITERATURA CITADA**

- 370 ALMEIDA, A.P.; J.L. GASPARINI & P.L.V. PELOSO. 2011. Frogs of the state of Espírito Santo,
371 southeastern Brazil - The need for looking at the coldspots. **Check List** 7(4): 542-560.
- 372 BARBAULT, R. 1991. Ecological constraints and community dynamics: linking community patterns
373 to organismal ecology. The case of tropical herpetofaunas. **Acta OEcologica**, 12(1): 139-
374 163.
- 375 BERNARDE, P.S. & L. DOS ANJOS. 1999. Distribuição espacial e temporal da anurofauna no
376 Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná, Brasil (Amphibia: Anura).
377 **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRGS. Série Zoologia** 12: 127-140.
- 378 BERTOLUCI, J. & M.T. RODRIGUES. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic
379 Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia** 23: 161-167.
- 380 CANAVERO, A. & M. ARIM. 2009. Clues supporting photoperiod as the main determinant of
381 seasonal variation in amphibian activity. **Journal of Natural History** 43: 2975-2984.
- 382 CLARKE, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community
383 structure. **Australian Journal of Ecology** 18(1): 117-143.
- 384 CLARKE K.R. & R.N. GORLEY. 2006. **Primer v6: user manual/tutorial**. PRIMER-E,
385 Plymouth, pp. 75-88.
- 386 CONTE, C.E. & C. ROSSA-FERES. 2006. Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna
387 (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de**
388 **Zoologia** 3: 162-175.
- 389 COLWELL, R.K. 2016. **EstimateS 9.1.0: Statistical Estimation of Species Richness and**
390 **Shared Species from Samples**. Disponível em: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>
391 (17 Dez 2016).
- 392 DIXON, J.R. & W.R. HEYER. 1968. Anuran succession in a temporary pond in Colima,
393 Mexico. **Bulletin of the Southern California Academy of Science**, 67: 129-137.

- 394 DUELLMAN, W. E. & L. TRUEB. 1994. **Biology of Amphibians**. Baltimore and London, The
395 Johns Hopkins University Press, 670p.
- 396 ETEROVICK, P.C. & I. SAZIMA. 2000. Struture of an Anuran community in a montane
397 Meadow in Southeastern Brasil: Effects of seasonality, Habitat, and Predation.
398 **Amphibia-Reptilia**, **21**(1): 439-461.
- 399 FERREIRRA, R.B.; K. H. BEARD, & L.M. CRUMP. 2016. Breeding Guild Determines Frog
400 Distributions in Response to Edge Effects and Habitat Conversion in the Brazil's
401 Atlantic Forest. **Plos One** **11**(6): 1-13.
- 402 FERREIRA, R.B.; R.B. DANTAS & J.F.R. TONINI. 2012. Distribuição espacial e sazonal de
403 anfíbios em quatro poças na região serrana do Espírito Santo, sudeste do Brasil:
404 influência de corredores florestais. **Iheringia, série zoologia**, **102**(2): 163-169.
- 405 GASPARINI, J.L.; A.P. ALMEIDA, C.A.G. CRUZ & R.N. FEIO. 2007. Os anfíbios ameaçados
406 de extinção no Estado do Espírito Santo, p. 75-86. In: PASSAMANI, M. & S.L.
407 MENDES (Ed.). **Espécies da fauna ameaçadas de extinção no Estado do Espírito**
408 **Santo**. Vitória, Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 140p.
- 409 GATTI, A.; B. SEGATTO; C.C. CARNELLI & D.O. MOREIRA. 2014. Mamíferos de médio e
410 grande porte da Reserva Biológica Augusto Ruschi, Espírito Santo. **Natureza on line**,
411 **12**(2): 61-68.
- 412 GOTTSBERGER, B. & E. GRUBER. 2004. Temporal partitioning of reproductive activity in a
413 Neotropical anuran community. **Journal of Tropical Ecology**, **20**: 271-280.
- 414 HADDAD, C.F.B. & I. SAZIMA. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi, p. 188-211. In:
415 MORELLATO, L.P.C. (Ed.). **História natural da Serra do Japi: ecologia e**
416 **preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Campinas: Editora da
417 UNICAMP/FAPESP, 321p.

- 418 HADDAD, C.F.B.; L.F. TOLEDO; C.A. PRADO; D. LOEBMANN; J.L. GASPARINI & I. SAZIMA.
419 2013. Guia de anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia. São Paulo, Editora
420 Anolis Books, 544p.
- 421 HATANO, F.H.; C.F.D. ROCHA & VAN SLUYS, M. 2002. Environmental factors affecting
422 calling activity of a tropical diurnal frog (*Hylodes phyllodes*: Leptodactylidae).
423 **Journal of Herpetology** **36**: 314-318.
- 424 HEYER, W. R. 1988. On frog distribution patterns East of the Andes, p. 245-273. In:
425 VANZOLINI, P.E. & W.R. HEYER (Ed.). **Proceedings of a workshop on Neotropical**
426 **distribution patterns**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 488p.
- 427 HÖDL, W. 1977. Call differences and calling site segregation in anuran species from Central
428 Amazonian floating meadows. **Oecologia** **28**(4): 351-363.
- 429 IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS. 2000.
430 **Plano de Manejo da Reserva Biológica Augusto Ruschi**. Vitória, Diretoria de
431 Ecossistemas 280p.
- 432 IPEMA, INSTITUTO DE PESQUISAS DA MATA ATLÂNTICA. 2005. **Conservação da Mata**
433 **Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura Florestal e Unidades de**
434 **Conservação**. Vitória, Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 152p.
- 435 JIM, J. 2003. Aspectos gerais da anurofauna da região de Botucatu, p. 75-89. In: UIEDA, W. &
436 L.M. PALERARI (Ed.). **Flora e fauna: um dossiê ambiental**. São Paulo, Editora
437 da UNESP, 240p.
- 438 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2014. **Lista Nacional Oficial de espécies da fauna**
439 **ameaçadas de extinção**. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, pp 121-126.
- 440 PEEL, M.C.; B.L. FINLAYSON & T.A. MCMAHON. 2007. Updated world map of the Köppen-
441 Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences** **11**: 1633–1644.

- 442 PINTO, L.P.; C.M.R. COSTA; K.B. STRIER & G.A.B. FONSECA. 1993. Habitat, density and
443 group size of primates in a Brazilian tropical forest. **Folia Primatologica** **61**: 135-142.
- 444 POMBAL JR, J.P. 1997. Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça
445 permanente na Serra de Paranapiacaba, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de**
446 **Biologia**, **57**: 583-594.
- 447 POMBAL JR, J.P.; I. SAZIMA & C.F.B. HADDAD. 1994. Breeding behavior of the pumpkin
448 toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**,
449 **28**: 516-519.
- 450 PRADO, G.M. & J.P. POMBAL JR. 2005. Distribuição espacial e temporal dos anuros em um
451 brejo da Reserva Biológica de Duas Bocas, sudeste do Brasil. **Arquivos do Museu**
452 **Nacional**, **63**: 685-705.
- 453 R CORE TEAM, 2014. **R**. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. [Acesso em
454 09/11/2016].
- 455 RIZZINI, C.T. 1979. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e**
456 **florísticos**. São Paulo, HUCITEC, 374p.
- 457 RÖDDER, D.; R.L. TEIXEIRA; R.B. FERREIRA; R.B. DANTAS; W. PERTEL & G.J.
458 GUARNIERE. 2007. Anuran hotspots: the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo,
459 southeastern Brazil. **Salamandra** **43**: 91-110.
- 460 ROSSA-FERES, D. C. & J. JIM. 1994. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros
461 na região de Botucatu, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia** **54**: 323-334.
- 462 SANTOS, T.G.; D.C. ROSSA-FERES & CASATTI, L. 2007. Diversidade e distribuição espaço-
463 temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil.
464 **Iheringia, Série Zoologia**, **97**: 37-49.

- 465 SEGALLA, M.V.; U. CARAMASCHI; C.A.G. CRUZ; T. GRANT; C.F.B. HADDAD; P.C.A.
466 GARCIA; B.V.M BERNECK, & J.A. LANGONE. 2016. Brazilian Amphibians: list of
467 species. **Herpetologia Brasileira** 5(2): 34-46.
- 468 SILVANO, D.L. & M.V. SEGALLA. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil.
469 **Megadiversidade**, 1(1): 79-86.
- 470 SKELLY, D.K. 1997. Tadpole communities. **American Scientist** 85: 36-45.
- 471 SMITH, D.C. 1983. Factors controlling tadpole population of the chorus frog (*Pseudacris*
472 *triseriata*) on Isle Royale, Michigan. **Ecology** 64: 501-510.
- 473 TEIXEIRA, R.L.; R.B. FERREIRA; R.B. DANTAS & W. PERTEL. 2007. Diversidade de
474 Anfíbios Anuros no Entorno da Reserva Augusto Ruschi, Sudeste do Brasil, p 95-100.
475 In: Vieira, L.A. & Assis, A.M. (Ed.). **Planejando Paisagens Sustentáveis no**
476 **Corredor Central da Mata Atlântica: uma experiência na região serrana do**
477 **Espírito Santo**. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo, 200p.
- 478 VERDADE, V.K.; PH. VALDUJO; A.C. CARNAVAL; L. SCHIESARI; L.F. TOLEDO; T. MOTT;
479 G.V. ANDRADE; P.C. ETEROVICK; M. MENIN; B.V.S. PIMENTA; C. NOGUEIRA; C.S.
480 LISBOA; C.D. DE PAULA & D.L. SILVANO. 2012. A leap further: the Brazilian
481 Amphibian Conservation Action Plan. **Alytes - International Journal of**
482 **Batrachology** 29(1-4): 28-43.
- 483 WELLS, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. **Animal Behavior** 25: 666-
484 693.
- 485 WEYGOLDT, P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in
486 the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations?
487 **Studies of Neotropical Fauna and Environment** 24(4): 249-255.
- 488 WOODWARD, B.D. 1983. Predator-prey interactions and breeding-pond use of temporary-
489 pond species in a desert anuran community. **Ecology** 64: 1549-1555.

- 490 ZIMMERMAN, B.L. & J.P. BOGART. 1988. Ecology and Calls of Four Species of Amazonian
491 Forest Frogs. **Journal of Herpetology** **22**(1): 97-108.
- 492 ZOCCA, C.Z.; J.F.R. TONINI & R. B. FERREIRA. 2014. Uso do espaço por anuros em
493 ambiente urbano de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia**
494 **Mello Leitão** **35**: 105-117.
- 495

496 Legendas das figuras

497 Figura 1. Mapa do município de Santa Teresa, Estado do Espírito Santo, com delimitação da
498 área do presente estudo, a Reserva Biológica Augusto Ruschi (Elaboração própria).

499 Figura 2. Curva de acumulação de espécies de anfíbios anuros registradas nos meses de julho de
500 2015 a junho de 2016 na Reserva Biológica Augusto Ruschi, município de Santa Teresa, estado
501 do Espírito Santo. O traçado preto mostra a riqueza registrada na área e o tracejado representa os
502 desvios padrão de cada valor médio.

503 Figura 3. Análise de agrupamento demonstrando a similaridade dos sítios de vocalização
504 utilizados quanto à composição das espécies. Legenda na Tabela 1.

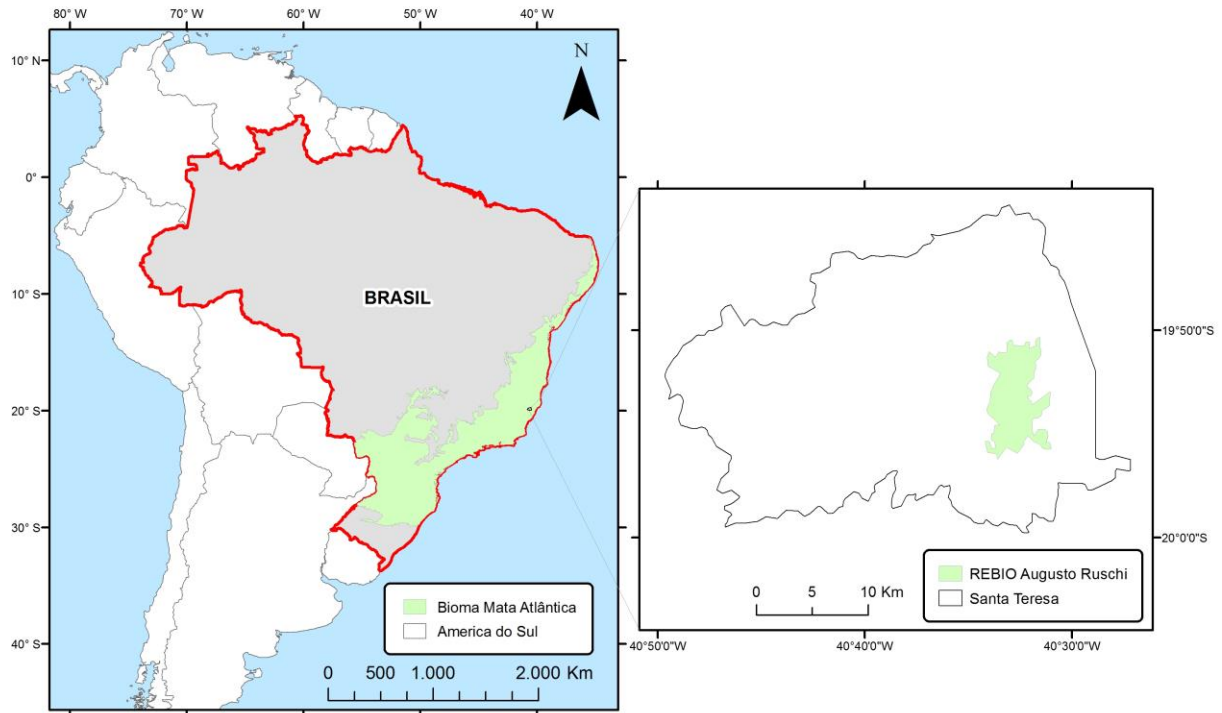
505 Figura 4. Análise de agrupamento demonstrando a similaridade dos sítios de oviposição
506 utilizados quanto à composição das espécies. Legenda na Tabela 1.

507 Figura 5. Série temporal da abundância de anfíbios anuros quanto (A) as temperaturas (mínima,
508 média e máxima), (B) umidade relativa do ar e precipitação registradas nos meses de julho de
509 2015 a junho de 2016 na Reserva Biológica Augusto Ruschi, município de Santa Teresa, estado
510 do Espírito Santo.

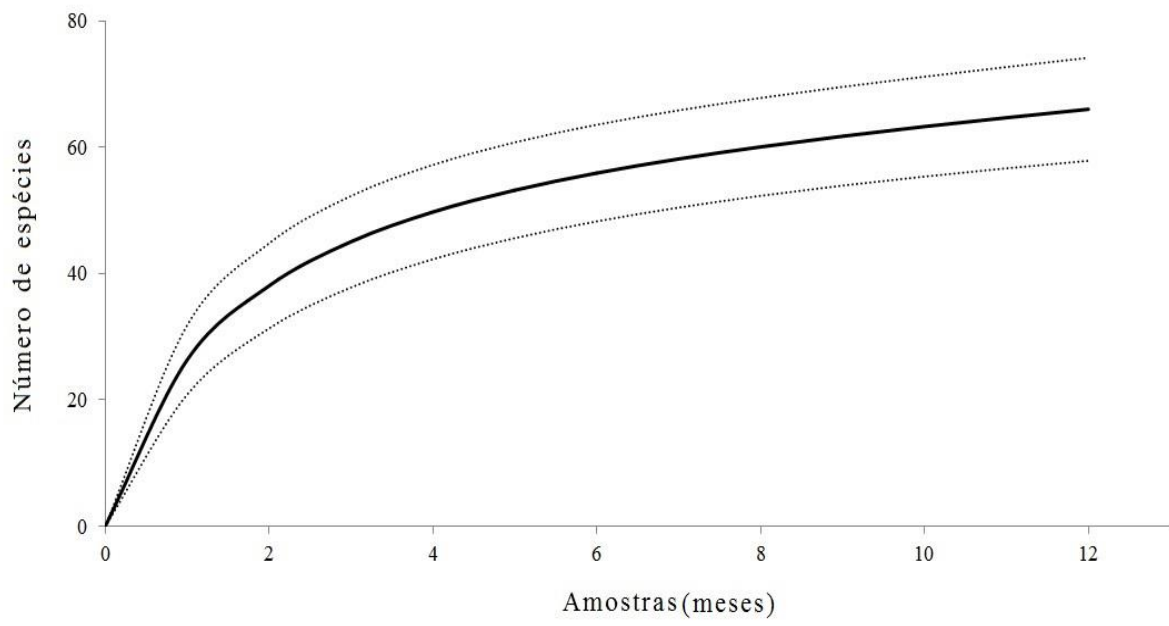
511 Figura 6. Série temporal da riqueza de anfíbios anuros quanto (A) as temperaturas (mínima, média
512 e máxima), (B) umidade relativa do ar e precipitação registradas nos meses de julho de 2015 a
513 junho de 2016 na Reserva Biológica Augusto Ruschi, município de Santa Teresa, estado do
514 Espírito Santo.

515 Figuras

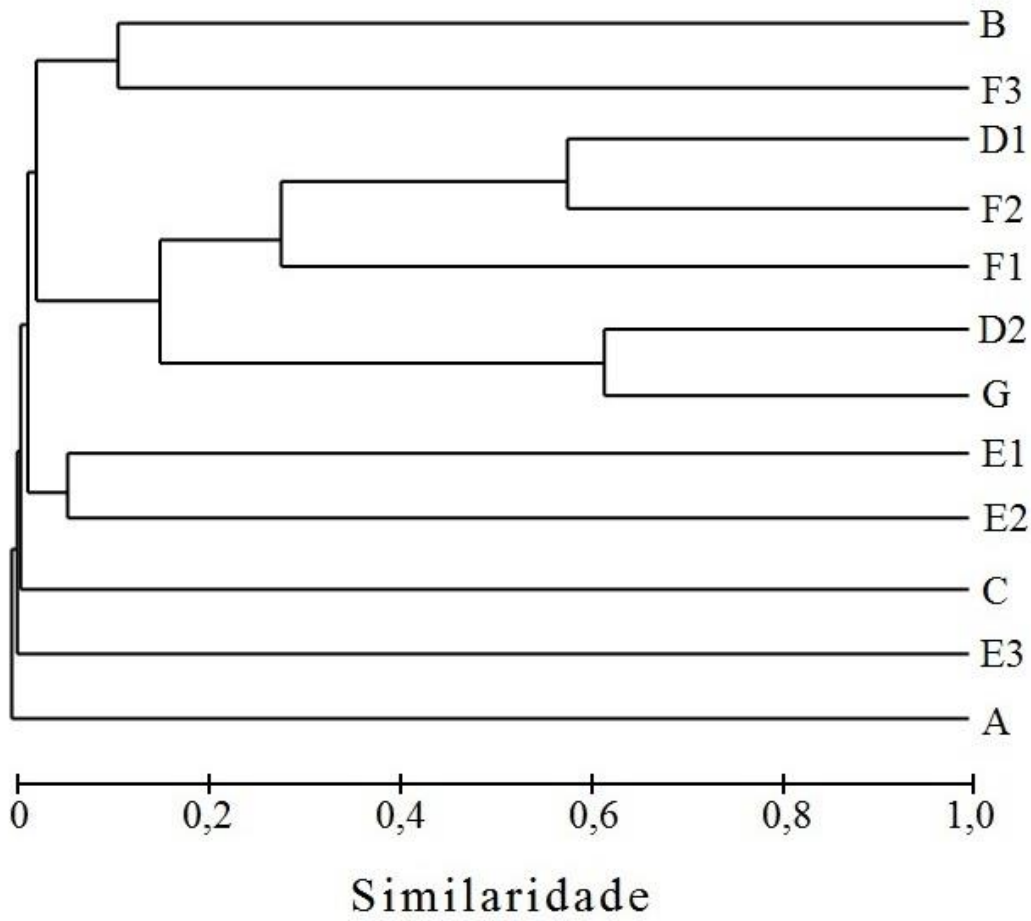
516 Figura 1.



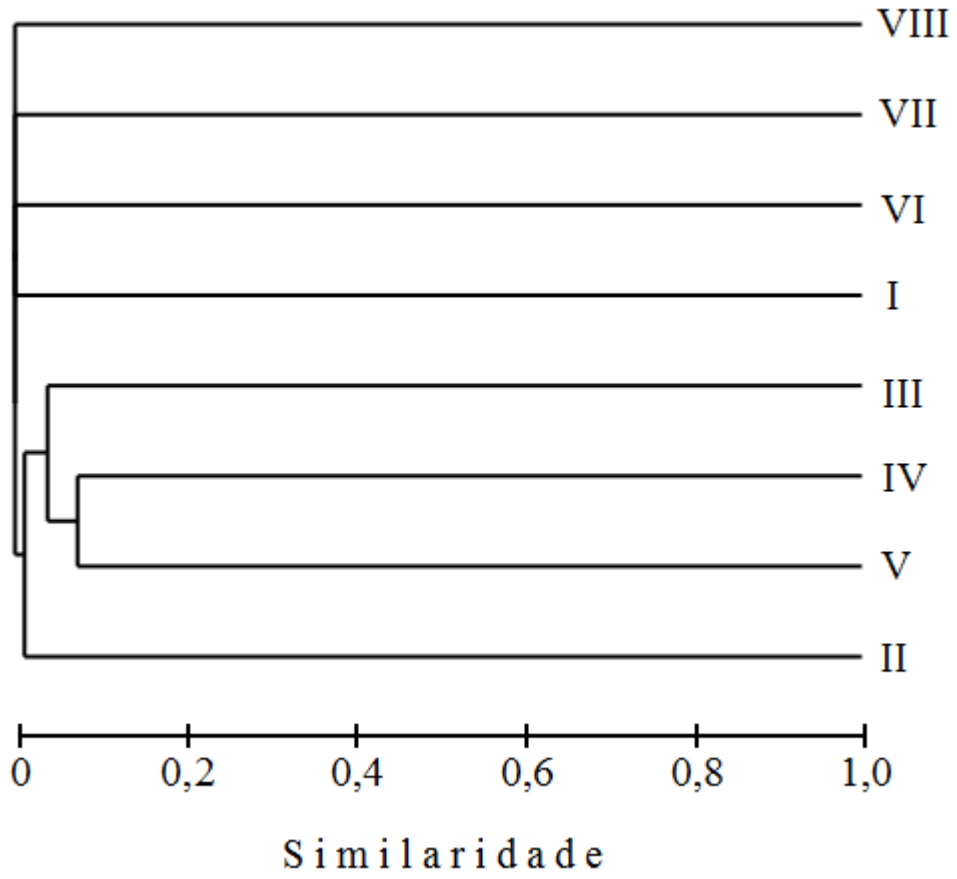
517 Figura 2.



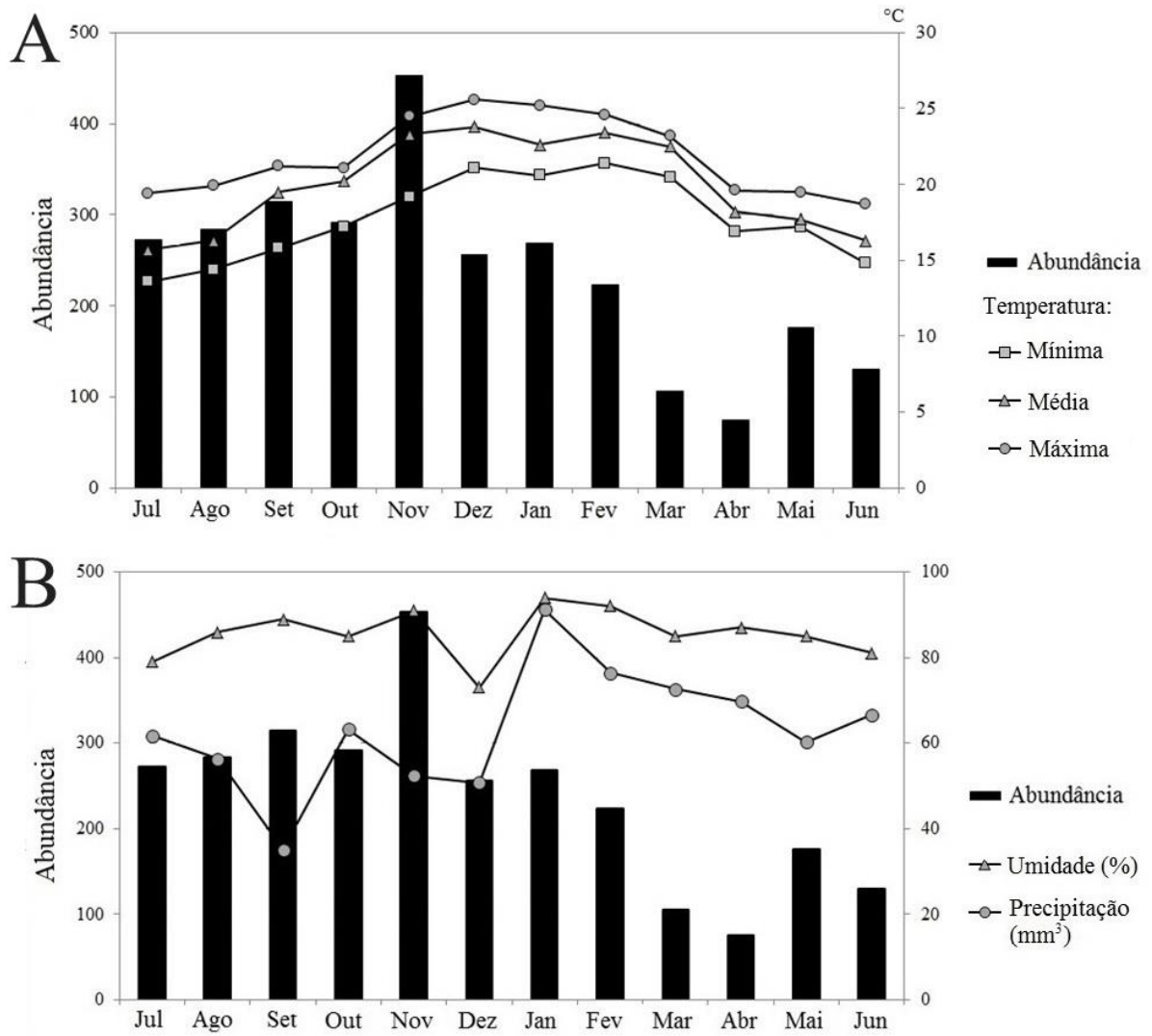
518 Figura 3.



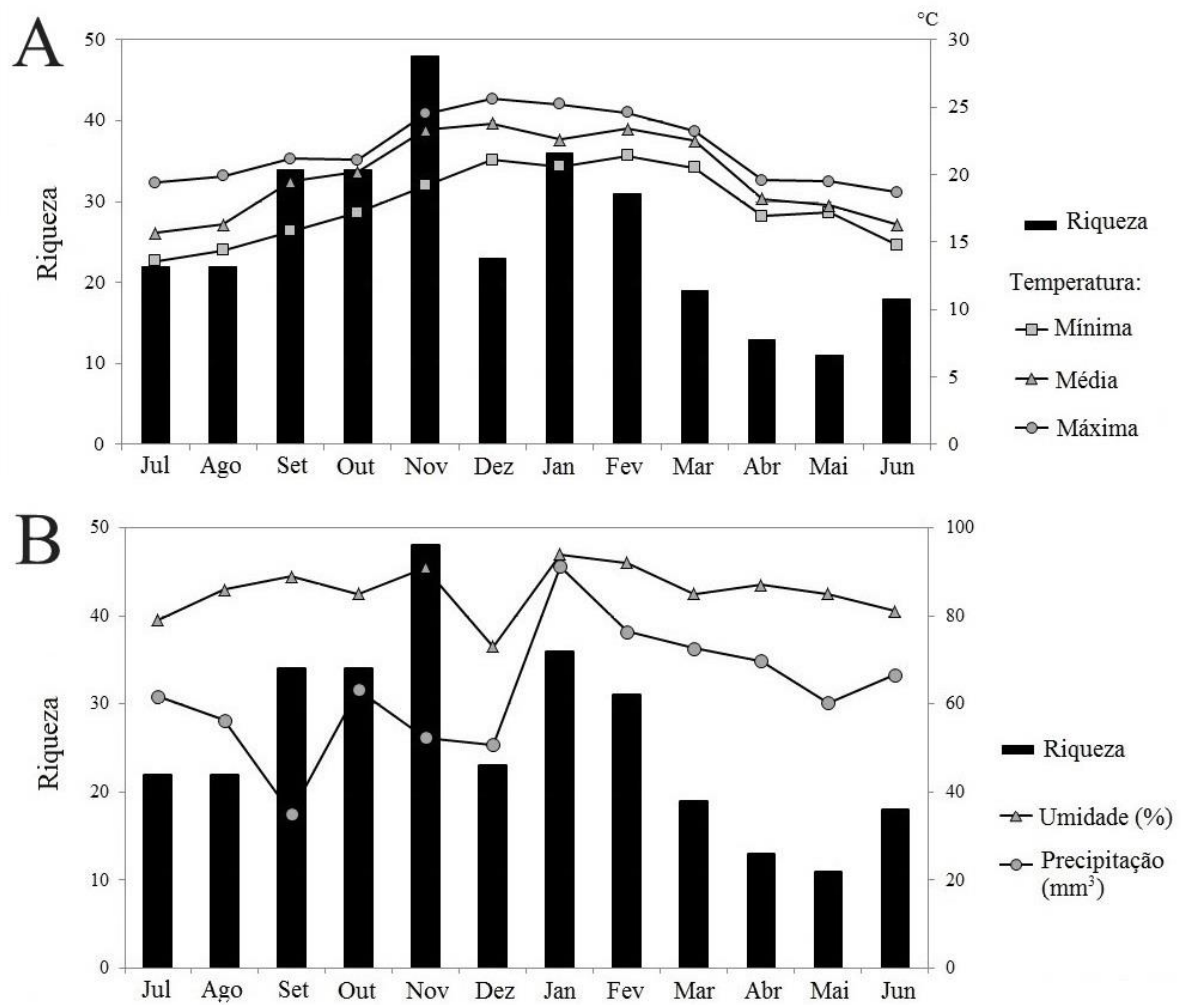
519 Figura 4.



520 Figura 5.



521 Figura 6.



522 Legenda das tabelas.

523 Tabela 1. Lista de espécies, sítio de vocalização e oviposição dos anuros da Reserva Biológica

524 Augusto Ruschi, em Santa Teresa, Espírito Santo. *Vocalização*: A) afloramento rochoso em

525 cachoeira, B) bromélia epífita, C) cavidade subterrânea, D1) margem de corpo d'água no

526 interior de mata, D2) margem de corpo d'água em área aberta, E1) abrigado na serapilheira,

527 E2) exposto na serapilheira, E3) empoleirado em galhos na serapilheira, F1) vegetação

528 herbácea no interior de mata, F2) vegetação arbustiva no interior de mata, F3) vegetação

529 arbórea no interior de mata, G) vegetação herbácea em área aberta. *Oviposição*: I)

530 serapilheira, II) riacho no interior de mata, III) poça temporária no interior da mata, IV) poça

531 permanente, V) vegetação sobre poça temporária no interior da mata, VI) bromélia, VII)

532 afloramento rochoso em cachoeira, e VIII) vegetação sobre riacho no interior da mata. *

533 Espécies que armazenam seus ovos fecundados no dorso.

534 Tabela 2. Abundância mensal das espécies em atividade vocal entre julho de 2015 a junho de

535 2015 na Reserva Biológica Augusto Ruschi, em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil.

536 [Abundância de indivíduos vocalizando: 'A' corresponde a $a < 5$; 'B' corresponde a $a \geq 5$

537 e ≤ 10 ; 'C' corresponde a $a \geq 10$ e ≤ 30 ; e 'D' > 30 . Padrão vocal: 'O' indica ocasional

538 (até 3 meses); 'S' indica semi-constante (de 4 a 9 meses); 'P' indica constante (mais que 9

539 meses)].

540 Tabela 1.

Espécies de anuros por família	Sítios	
	Vocalização	Oviposição
Brachycephalidae		
<i>Ischnocnema abdita</i>	E2	I
<i>Ischnocnema</i> aff. <i>guentheri</i>	E2	I
<i>Ischnocnema nasuta</i>	E2	I
<i>Ischnocnema oea</i>	E3	I
<i>Ischnocnema</i> gr. <i>Parva</i>	E2	I
<i>Ischnocnema</i> aff. <i>venancioi</i>	E2	I
<i>Ischnocnema verrucosa</i>	E3	I
Bufonidae		
<i>Rhinella crucifer</i>	D2	IV
Centrolenidae		
<i>Vitreorana eurygnatha</i>	D1, F1, F2	VIII
Craugastoridae		
<i>Haddadus binotatus</i>	E3	I
Cycloramphidae		
<i>Thoropa miliaris</i>	A	VII
Eleutherodactylidae		
<i>Adelophryne glandulata</i>	E1	I
Hemiphractidae		
<i>Fritziana</i> aff. <i>fissilis</i>	B	* VI
<i>Fritziana tonimi</i>	B	* VI
<i>Gastrotheca albolineata</i>	F3	*
<i>Gastrotheca megacephala</i>	B, F3	*
Hylidae		
<i>Aplastodiscus cavicola</i>	C, D1, F2	II
<i>Aplastodiscus weygoldti</i>	D1, F1, F2, F3	II
<i>Bokermannohyla caramaschii</i>	F2, F3	II
<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	D1, F2	V
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	D2, G	IV
<i>Dendropsophus branneri</i>	D2, G	IV
<i>Dendropsophus decipiens</i>	D1, F2	V
<i>Dendropsophus elegans</i>	D2, G	IV
<i>Dendropsophus giesleri</i>	D1, F1, F2	V
<i>Dendropsophus haddadi</i>	D1, F2	V
<i>Dendropsophus microps</i>	D1, F1, F2	V
<i>Dendropsophus minutus</i>	D2, G	IV
<i>Dendropsophus seniculus</i>	D1, F2	V
<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	D2, F1, G	IV
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	D2, F1, G	IV
<i>Hypsiboas crepitans</i>	D2, F1, G	IV
<i>Hypsiboas faber</i>	D1, D2, G	IV
<i>Hypsiboas pardalis</i>	D1, D2, F2, G	IV
<i>Hypsiboas semilineatus</i>	D1, D2, F1, F2, G	II, IV
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	D1, F2	III
<i>Ololygon alter</i>	G	IV
<i>Ololygon arduos</i>	B	VI
<i>Ololygon argyreornatus</i>	D1, F1, F2	III
<i>Ololygon cuspidatus</i>	G	IV

Espécies de anuros por família	Sítios	
	Vocalização	Oviposição
<i>Ololygon eurydice</i>	G	III
<i>Ololygon flavoguttata</i>	D1, F2	II
<i>Olylogon fuscovarius</i>	D2	IV
<i>Ololygon hayii</i>	D1, F1	III
<i>Ololygon heyeri</i>	D1, F1	III
<i>Ololygon kautskyi</i>	D1, F2	III
<i>Ololygon</i> gr. <i>Perpusillus</i>	D1, F1	III
<i>Ololygon x-signatus</i>	D1, F1	III
<i>Phyllodytes kautskyi</i>	B	VI
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	D1, D2, F1, F2, G	IV, V
<i>Phyllomedusa</i> aff. <i>rohdei</i>	D1, D2, F2, G	III, IV, V
<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	F2, F3	III
Hylodidae		
<i>Crossodactylus</i> aff. <i>guadichaudii</i>	D1, E3	II
<i>Crossodactylus timbuhy</i>	D1, E3	II
<i>Hylodes</i> aff. <i>lateristrigatus</i>	D1, E2	II
Leptodactylidae		
<i>Leptodactylus latrans</i>	D2	IV
<i>Physalaemus crombiei</i>	D1, E2	III
<i>Physalaemus cuvieri</i>	D2, E2	IV
<i>Physalaemus maculiventris</i>	D1, E2	III
Microhylidae		
<i>Chiasmocleis lacrimae</i>	D1, E1	III
<i>Chiasmocleis schubarti</i>	D1, E1	III
<i>Myersiella microps</i>	E1, E2	I
Odontophrynidae		
<i>Proceratophrys boiei</i>	D2, E2	IV
<i>Proceratophrys laticeps</i>	D1, D2, E2	IV
<i>Proceratophrys paviotti</i>	D2, E2	IV
<i>Proceratophrys schirchii</i>	D1, E2	II

Tabela 2.

Espécie de anuro por família	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Padrão Vocal
Brachycephalidae													
<i>Ischnocnema abdita</i>	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	O
<i>Ischnocnema aff. guentheri</i>	A	A	C	B	-	-	B	B	-	-	-	-	S
<i>Ischnocnema oea</i>	-	-	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	O
<i>Ischnocnema verrucosa</i>	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	O
Bufo													
<i>Rhinella crucifer</i>	-	-	-	A	B	-	-	-	-	-	-	-	O
Centrolenidae													
<i>Vitreorana eurygnatha</i>	-	-	-	-	-	-	B	A	-	-	-	-	O
Craugastoridae													
<i>Haddadus binotatus</i>	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	O
Cycloramphidae													
<i>Thoropa miliaris</i>	-	-	-	B	A	A	-	-	-	-	-	-	O
Hemiphractidae													
<i>Fritziana fissilis</i>	A	C	C	C	B	A	A	A	A	-	-	-	S
<i>Fritzianatonimi</i>	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	O
<i>Gastrotheca albolineata</i>	-	A	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	O
<i>Gastrotheca megacephala</i>	A	A	B	A	-	-	A	A	-	-	-	-	S
Hylidae													
<i>Aplastodiscus cavicola</i>	D	D	C	C	A	A	A	A	-	-	-	-	S
<i>Aplastodiscus weygoldti</i>	D	D	C	C	-	-	-	-	A	D	D	D	S
<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	-	-	C	-	A	-	C	C	-	-	-	-	S

Espécie de anuro por família	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Padrão Vocal
<i>Dendropsophus branneri</i>	-	C	C	C	C	A	A	C	-	-	-	-	S
<i>Dendropsophus decipiens</i>	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Dendropsophus elegans</i>	A	B	B	A	A	-	A	A	-	-	-	-	S
<i>Dendropsophus giesleri</i>	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Dendropsophus haddadi</i>	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Dendropsophus microps</i>	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Dendropsophus minutus</i>	A	-	A	A	C	-	A	A	C	-	-	-	S
<i>Dendropsophus seniculus</i>	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	A	A	A	A	C	D	C	C	-	-	-	-	S
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	A	-	A	A	-	A	C	A	A	A	-	-	S
<i>Hypsiboas crepitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	O
<i>Hypsiboas faber</i>	-	-	A	A	A	B	A	B	A	A	-	-	S
<i>Hypsiboas pardalis</i>	A	A	B	A	A	A	-	-	-	-	-	-	S
<i>Hypsiboas semilineatus</i>	A	B	A	C	A	D	A	-	-	-	-	-	S
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon alter</i>	-	A	A	B	A	A	A	B	A	-	-	-	S
<i>Ololygon arduous</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	O
<i>Ololygon argyreornatus</i>	-	-	-	C	D	-	A	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon cuspidatus</i>	A	A	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon eurydice</i>	-	-	-	A	B	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon flavoguttata</i>	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon fuscovarius</i>	-	-	-	A	A	-	A	A	-	-	-	-	S
<i>Ololygon hayii</i>	-	C	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon heyeri</i>	-	-	-	-	B	A	A	-	-	-	-	-	O

Espécie de anuro por família	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Padrão Vocal
<i>Ololygon gr. perpusillus</i>	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Ololygon x-signatus</i>	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Phyllodytes kautskyi</i>	-	-	A	-	-	A	A	-	-	-	-	-	O
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	-	-	-	-	C	-	A	A	-	-	-	-	O
<i>Phyllomedusa aff. rohdei</i>	-	-	-	-	C	-	A	-	-	-	-	-	O
<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	O
Hylodidae													
<i>Crossodactylus aff. gaudichaudii</i>	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Crossodactylus timbuihy</i>	-	-	B	C	A	C	C	-	-	-	-	-	S
<i>Hylodes lateristrigatus</i>	-	-	-	A	A	A	B	-	-	-	-	-	S
Leptodactylidae													
<i>Physalaemus crombiei</i>	D	D	C	D	D	D	C	B	B	A	-	-	P
<i>Physalaemus cuvieri</i>	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	O
Microhylidae													
<i>Chiasmocleis lacrimae</i>	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Chiasmocleis schubarti</i>	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Myersiella microps</i>	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O
Odontophrynidae													
<i>Proceratophrys boiei</i>	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Proceratophrys laticeps</i>	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Proceratophrys paviotti</i>	-	-	C	-	B	-	-	-	-	-	-	-	O
<i>Proceratophrys schirchii</i>	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	O
Total de espécies	13	16	22	25	40	17	28	18	8	5	1	1	

Apêndice 1. Voucher do material testemunho do presente estudo.

- Adelophryne glandulata* Lourenço-de-Moraes, Ferreira, Fouquet & Bastos, 2014: MBML 9560
- Aplastodiscus cavicola* (Cruz & Peixoto, 1985): MBML 9620
- Aplastodiscus weygoldti* (Cruz & Peixoto, 1985): MBML 9540
- Bokermannohyla caramaschii* (Napoli, 2005): MBML 9552
- Chiasmocleis lacrimae* Peloso, Sturaro, Forlani, Gaucher, Motta & Wheeler, 2014: MBML 9598
- Chiasmocleis schubarti* Fritzingher, 1826: MBML 9579
- Crossodactylus timbuhy* Pimenta, 2014: MBML 9539
- Dendropsophus berthaltutzae* (Bokermann, 1962): MBML 8589
- Dendropsophus branneri* (Cochran, 1948): MBML 9611
- Dendropsophus decipiens* (Lutz, 1925): MBML 9590
- Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824): MBML 9543
- Dendropsophus giesleri* (Mertens, 1950): MBML 8795
- Dendropsophus haddadi* (Bastos & Pombal, 1996): MBML 8775
- Dendropsophus minutus* (Peters, 1872): MBML 9593
- Dendropsophus seniculus* (Cope, 1868): MBML 9591
- Fritziana* aff. *fissilis* (Miranda-Ribeiro, 1920): 9697
- Fritziana tomini* Walker, Gasparini & Haddad, 2016: MBML 9668
- Gastrotheca megacephala* Izecksohn, Carvalho-e-Silva & Peixoto, 2009: MBML 9672
- Haddadus binotatus* Spix, 1824: MBML 9621
- Hylodes* aff. *lateristrigatus* Baumann, 1912: MBML 9595
- Hypsiboas albomarginatus* (Spix, 1824): MBML 9610
- Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824): MBML 9673
- Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824): MBML 9624
- Hypsiboas faber* (Wied-Neuwied, 1825): MBML 9576
- Hypsiboas pardalis* (Spix, 1824): MBML 9577
- Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824): MBML 9554
- Ischnocnema abdita* Canedo & Pimenta, 2010: MBML 9549
- Ischnocnema* cf. *guentheri* (Steindachner, 1864): MBML 9629
- Ischnocnema oea* (Heyer, 1984): MBML 9559
- Ischnocnema verrucosa* (Reinhardt e Lütken, 1862): MBML 9569
- Ischnocnema* gr parva 1: MBML 9550
- Itapotihyla langsdorffii* (Duméril & Bibron, 1841): MBML 8585
- Myersiella microps* Duméril & Bibron, 1841: MBML 9561
- Ololygon alter* (Lutz, 1973): MBML 9612
- Ololygon arduos* (Peixoto, 2002): MBML 9657
- Ololygon argyreornatus* (Miranda-Ribeiro, 1926): MBML 9544
- Ololygon eurydice* (Bokermann, 1968): 9602
- Ololygon flavoguttatus* (Lutz & Lutz, 1939): MBML 9649
- Ololygon hayii* (Lutz, 1973): MBML 9555
- Ololygon heyeri* (Peixoto & Weygoldt, 1986): MBML 8581
- Ololygon kautskyi* (Carvalho-e-Silva & Peixoto, 1991): MBML 9594
- Phyllomedusa burmeisteri* Boulenger, 1882: MBML 9581
- Phyllomedusa rohdei* Mertens, 1926: MBML 9580
- Physalaemus crombiei* Heyer & Holf, 1989: MBML 9542
- Physalaemus cuvieri* Fritzingher, 1826: MBML 9579

- Physalaemus maculiventris* Lutz, 1925: MBML 9567
Proceratophrys paviotii Cruz, Prado & Izecksohn, 2005: MBML 9585
Proceratophrys schirchi (Miranda-Ribeiro, 1937): MBML 9677
Rhinella crucifer (Wied-Neuwied, 1821): MBML 9575
Thoropa miliaris Spix, 1824: MBML 9571
Trachycephalus mesophaeus (Hensel, 1867): MBML 8793
Vitreorana eurygnatha (Lutz, 1925): MBML 9678

2.2 CAPÍTULO II

As normas utilizadas no texto são referentes à Revista Zootaxa. Disponível em:
<http://www.mapress.com/zootaxa/support/author.html>.

A new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from Espírito Santo State, Southeastern
Brazil

ALEXANDER T. MÔNICO¹, ARIOVALDO A. GIARETTA², ELAINE C. CAMPINHOS¹, JOÃO L. GASPARINI³, JULIANA YAMADA⁴, SERGIO F. DOS REIS⁵ & RUTE B. G. CLEMENTE-CARVALHO^{1,6}

1 Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, 29102-920, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

2 Laboratório de Taxonomia, Sistemática e Evolução de Anuros Neotropicais, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Ituiutaba, Rua 20, nº 1600, 38304-302, Ituiutaba, MG, Brazil.

3 Laboratório de Vertebrados Terrestres, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Litorâneo, 29932-540, São Mateus, ES, Brazil.

4 Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

5 Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

6 Department of Biology, Queen's University, 116 Barrie St, K7L 3N6, Kingston, ON, Canada.

**Corresponding author. E-mail: rute_beatriz@hotmail.com*

Abstract

We describe a new species of genus *Phyllodytes* from Espírito Santo state, southeastern Brazil. The new species is found lives in bromeliads on a rocky outcrop at Santa Teresa municipality, 930 m above sea level. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is distinguished from its congeners *P. luteolus*, *P. melanomystax* and *P. kautskyi* by quantitative and qualitative traits. Principal Component Analysis of linear body measurements demonstrates the new species is morphologically distinct. In addition, high levels of genetic divergence and geographic isolation justify the new species status.

Key words: Atlantic forest, bromeligenous frogs, genetic distances, *Phyllodytes gravathae*, taxonomy.

Resumo

Descrevemos uma nova espécie de gênero *Phyllodytes* para o estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil. A nova espécie habita bromélias em um afloramento rochoso no município de Santa Teresa, 930 m acima do nível do mar. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** difere de seus congêneres *P. luteolus*, *P. melanomystax* e *P. kautskyi* por características quantitativas e qualitativas. A análise de componentes principais demonstra que a nova espécie é morfologicamente distinta. Além disso, altos níveis de divergência genética e isolamento geográfico justificam o novo status de espécie.

Palavras-chave: Mata Atlântica, anfíbio bromelígena, distância genética, *Phyllodytes gravathae*, taxonomia.

Introduction

Phyllodytes is a genus endemic to the Atlantic forest of southeastern and northeastern Brazil (Frost, 2016; Caramaschi *et al.* 1992). The ecological particularity

characteristic of the genus *Phyllodytes* is the association with bromeliads, where they lay eggs and tadpoles develop (Giaretta, 1996). These tank plants are an ideal microhabitat for amphibians (Neil 1951, Domingos *et al.* 2014) due to their architecture and the presence of water between the leaves. Amphibians call, breed and may actually spend their entire life cycle inside the tank plants. The distribution of *Phyllodytes* species is therefore conditional to the distribution of the tank plants.

Until very recently, the taxonomic diversity of *Phyllodytes* amounted to 11 species, although in the last years new species were described (Caramaschi *et al.* 1992; Peixoto & Cruz, 1988; Peixoto *et al.* 2003; Cruz *et al.* 2006) as a result of herpetological surveys or taxonomic reviews (Caramaschi & Peixoto, 2004). Currently, two species of *Phyllodytes* are known from Espírito Santo state, Southeastern Brazil – *P. luteolus* and *P. kautskyi*. These species occur in spatially isolated populations with an assumed wide distribution and broad altitudinal range (from 0 to 650 m above sea level) (Simon & Gasparini, 2003). For instance, *P. luteolus* is distributed across lowland areas such as restinga (sandbanks and its associated vegetation) and tabuleiro forest (Mata de Tabuleiro), whereas *P. kautskyi* is distributed in montane rainforest areas and in a small area of tabuleiro forest (Simon & Peres, 2012). *P. luteolus* can be distinguished from *P. kautskyi* by the body size and habitat selection: *P. kautskyi* is found primarily in epiphytic bromeliads on trees branches, whereas *P. luteolus* inhabits bromeliads which occur in patches separated by bare sand (Sampaio *et al.* 2002).

Here, we evaluate several populations of *Phyllodytes* previously identified as *P. luteolus*. Differences in ecological and morphological attributes, geographic disjunction, and magnitude of genetic distances indicate that the population of Santa Teresa municipality (930 m above sea level) is a different species in relation to the lower land *P. luteolus*. We describe this new species of *Phyllodytes* based on morphology,

osteology, and genetic distances. We also provide a description of the advertisement call of the new species.

Material and methods

Specimens were collected, anaesthetized and killed with 5% lidocaine. After obtaining the tissue, fixed in formalin and preserved in 70% ethanol, the specimens were deposited in the amphibian collection of Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA), Santa Teresa, Espírito Santo, Brazil and collection 'Célio F.B. Haddad', Rio Claro, São Paulo, Brazil (Appendix I).

The bones and cartilages were cleared and double-stained with alcian blue and alizarin red following protocol modified from Taylor & Van Dyke (1985). The terminology used for internal and external morphologies followed Duellman & Trueb (1994) and Lynch & Duellman (1997), respectively.

Thirteen metric traits were measured with digital calipers following Duellman (1970) and Cei (1980). Patterns of variation and covariation in body measurements between *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** (n=14) and *P. luteolus* (n= 16). The abbreviations used are: snout-vent length (SVL); head length (HL), from tip of snout to angle of jaw; head width (HW), width of head between angles of jaw; eye diameter (ED); interorbital distance (IOD), between anterior corner of eyes; internostril distance (IND), between inner margins of nostrils; eye-nostril distance (END), from anterior corner of the eye to posterior margin of nostril; thigh length (THL); tibia length (TBL); foot length (FL), between the central region and larger foot; arm length (AL); forearm length (FAL) and hand length (HAL), between the wrist and the longer finger. These measurements were taken from *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** and from most similar (morphology/genetically) and geographically close *P. luteolus*. Considering the

multivariate morphological datasets to discriminate between these both species by applying two functions: 1) "randomforest" (RF) (randomForest package (Liaw & Wiener, 2002)) and 2) "dapc" (adegenet package (Jombart, 2008 Jombart et al., 2010)), both functions available in R (R Development Core Team, 2011). The RF algorithm constructs many (*e.g.* 500) classification trees using bootstrap samples of the data (each split using the best predictors randomly chosen at each node) than generating classifiers and aggregating results by voting to classes (Liaw & Wiener, 2002). The randomForest results include an estimate of distances among the objects, which can be subject to a Multidimensional Scaling Analysis (MDS), which can be displayed graphically with the "proximity.plot" function of the rfPermute package (Archer, 2014)). The discriminant analysis (DA) depends of a larger number of objects than variables and the application of DA on a few axes (preserving about 95% of the variance) of a Principal Component Analysis, as performed by the "dapc", improves the imbalance between objects and variables (Jombart et al. 2010).

Morphometric and acoustic variables indicated as important in species discrimination by randomforest and dapc were tested for statistical significance of the differences among population/species through the Exact Wilcoxon Mann Whitney Rank Sum Test using the package coin (Hothorn et al., 2008; function wilcox_test) in R. As these tests were done between species pairs, the significance level "*p*" were adjusted considering the number of pairings through the method of "Holm" (p.adjust function in R).

Calling males were recorded with a digital recorder coupled to an external bidirectional microphone. We analyzed four calls per individual using frequencing rate of 48 kHz and 16 bits of resolution in the mono pattern. Bioacoustic variables were analyzed with Raven Pro 1.4 software, 64-bit version (Bioacustics Research Program

2011). Call vouchers and analyzed sound files are housed in INMA and AAG-UFU collection, respectively.

We obtained tissue samples from four individuals of the new species, three individuals of *P. luteolus* (type locality), and one individual of *P. kautskyi* (Appendix II). We extracted the genomic DNA from muscle or liver using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). We amplified a fragment of the mitochondrial gene 16S rRNA (376bp) using the primers and parameters given in Palumbi et al (1991). PCR products were visualized in 1% agarose with SYBR Safe (Life Inc.) and purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The cleaned-up PCR products were outsourced to CBMEG-UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil) for sequencing using a BigDye terminator kit (Applied Biosystems, Inc., Grand Island, NY, USA). The sequences were subjected to BLAST searches (Altschul *et al.* 1997) in GenBank to verify if the target had been amplified. We aligned the sequences using ClustalW (Thompson *et al.* 1994) implemented in BioEdit software (Hall 1999). We calculate the uncorrected pairwise genetic distances (*p*-distance) among individuals using Mega 6 (Tamura *et al.* 2013). GenBank accession numbers of the individuals used to calculate the *p*-distance are in Appendix II.

Description of the new species

***Phyllodytes gravathae* sp. nov.**

Figures 1–2

Holotype. MBML 10493, adult male, collected at Sítio Quinta do Mendes (19°48'05.81"S, 40°33'09.45"W, 930m a.s.l.), Santa Teresa municipality, Espírito Santo state, Brazil, on 18/11/2015, by A.T. Mônico.

Paratypes. MBML 7730 - 7732, MBML 7785, MBML 10487-10492.

Diagnosis. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is a medium sized species (SVL 20.7-25.3mm; \pm 23.31; SD=1.4) (Table 1) characterized by the following characters: (1) presence of a discrete supratympanic brown stripes which extend from the eyes to the axilla; (2) pointed snout; (3) tympanum evident; (4) in life, general color yellowish with small dark-brown spots in dorsum; (5) presence of maxillary teeth; (6) finger discs present, expanded, round.

Description of holotype. The holotype of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** has a robust body; head wider than long; head length approximately 35% of SVL; snout pointed in dorsal view (Figure 2); nostrils small, elliptical, directed dorsolaterally; canthus rostralis distinct and straight; eyes large with diameter approximately 28% of head length, directed anterolaterally; eye nearly protruding in dorsal and lateral views; interorbital space and dorsum of snout flat; tympanum evident; vocal sac poorly developed; mouth nearly sigmoid; vomerine odontophores present; each side of mandible with 4 odontoids, first and third of medium size, and others large, subequal. Forearms slightly more robust than upper arms; length of upper arm plus forearm 36% of SVL; hands large, with length 28% of SVL; hands approximately as long as upper arm; fingers slender, in order of length I < II < IV < III; subarticular tubercles present, small in the fingers. Thigh shorter than tibia; total leg length 97% of SVL; foot length shorter than thigh length; toes slender, in order of length I < II < V < III < IV; toe discs present, slightly shorter than finger discs; webbing very small, about 1/5 of the size of the toe, present only between toes 3-4 and 4-5; subarticular tubercles undefined in foot. Skin smooth on dorsal surface; skin on chest, belly and thigh with round tubercles arranged in rows.

Measurements of holotype (in mm). SVL 25.2; HL 8.4; HW 9.6; ED 2.6; IOD 5.6; IND 1.7; END 3.5; THL 12.3; TBL 13.6; FL 9.3; AL 5.8; FAL 4.3; T4L 7.1.

Color of holotype in life. General color of the body yellow; presence of a discrete brown stripe above the tympanum, which extends until the end of the head (Figure 1).

Color of holotype in preservative. General background color faded yellow; dorsum and dorsal surface of the limbs with small black spots; venter of body and limbs pale cream; presence of discrete brown supratympanic stripes (Figure 2).

Osteology. The double-stained material revealed the following characters in *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** Skin smooth without dermal bones; premaxillae broad, not fused medially; numerous and small odontoids present; alary process of maxillae cartilaginous, narrowly separated from the nasal; maxillae arched; numerous small odontoids present; quadratojugal, pterigoid, palatine present; vomer present, not fused, partially cartilaginous; parasphenoid robust fused with sphenethmoid; sphenethmoid fused with frontoparietal laterally; frontoparietal absent of ossification medially; squamosal elongated in lateral view; mandible with odontoids, four on each side, with first and third of medium size and second and fourth large; operculum present and ossified; stapes present, ossified; tympanic annulus present, cartilaginous. Pectoral girdle with sternum and omosternum present, cartilaginous; scapula, suprascapula and clavicle present. Vertebral column composed of seven presacral, non-imbricate vertebrae; first presacral vertebra (atlas) lacks transverse process; second to seventh presacral vertebrae has developed and slender transverse process.

Humerus approximately as long as radius–ulna; radius and ulna fused but distinguishable. Manus with distal carpals II to V fused with centrale; radiale and ulnare fused, about the same size; prepollex elements very reduced, with one element; phalangeal formula 1-2-4-3; tip of the terminal phalangeal elements arrow-shaped. Hindlimbs with tibia and fibula fused; femur slightly shorter than tibia fibula; tibiale and fibulare fused. Pes with distal tarsal element I absent, II-III fused, central present.

One very reduced prehallical element; phalangeal formula 1-2-4-5-3; tips of the terminal phalangeal elements of toes arrow-shaped.

Advertisement call. The advertisement call of the new species is long, composed by the regular repetition of pulsed notes. Call features values detailed according to the two emphasized bands in Table 2. In general (N=17 males) advertisement calls last from 2.3 to 4.4 s, call intervals from 17 to 58 s, between 8–17 notes per call, call rate between 2.5 and 5.3 call/s (mean = 4, SD = 0.63), notes from middle call from 0.10 to 0.26 ms, final notes lasting from 0.11 to 0.28 ms, note interval at mid call portion from 0.10 to 0.17 ms, final intervals from 0.13 to 0.25, initial pulses lasting from 0.004 to 0.005 ms, frequency peak between 1312-3609 Hz, frequency intervals with 5% of the energy from 750 to 2412, 95% energy from 2250 to 5062. Calls often starting weak and reaching maximum amplitude after the 3–4th note, remaining stable afterward. Pulses often well defined and spaced at beginning and concatenated at mid and final portions of each notes.

Variation. Morphometric variation is presented in Table 1. In our sample, mean size of females are slightly smaller than males; however, not significant (p : 0,282, t : -1,125, gl : 12). Phenotypic variation is small in the type series mostly related to the size of the eye strips, and in the pattern of small black spots in dorsum. Patterns of variation and covariation in body measurements between *Phyllodytes gravathae* **sp nov.** (N=14) and *P. luteolus* (N= 16) were evaluated with Principal Component Analysis. The first two components explain approximately 88% of the variation within and among species (Figure 3A). There is no overlap between the 95% confidence ellipses describing variation in body measurements between *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** and *P. luteolus* (Figure 3B).

Comparisons with other species. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is a medium size frog which has tank bromeliads as typical habitat. The behavior of using tank bromeliads as a habitat is shared by all known *Phyllodytes* species. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** has a plain dorsal and ventral color, with some variation in dorsum characterized by small black spots. The plain color also is observed in *P. acuminatus*, *P. brevirostris*, *P. edelmoi*, *P. kautskyi*, *P. luteolus*, and *P. melanomystax*. *P. gyrinaethes*, *P. maculosus*, *P. punctatus*, *P. tuberculosus*, and *P. wuchereri* differs from the new species by the presence of dorsal pattern (Caramaschi & Peixoto, 2004; Cruz *et al.* 2006; Peixoto *et al.* 2003; Magalhães *et al.* 2015). *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is also distinguished from *P. melanomystax* by the lack of a black lip stripe (“moustache”). The new species is much smaller than *P. kautskyi* and *P. maculosus* (mean SVL in *P. gravathae* is 23mm, mean in *P. kautskyi* is 38 mm, mean in *P. maculosus* is 44 mm; Peixoto & Cruz, 1988; Cruz *et al.* 2006). *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is similar in size to *P. brevirostris*, *P. luteolus*, *P. melanomystax* and *P. tuberculosus* (Peixoto *et al.* 1988; Peixoto *et al.* 2003). *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** has four odontoids on mandible with different sizes, differing from *P. acuminatus*, *P. gyrinaethes*, *P. luteolus*, *P. maculosus*, *P. tuberculosus*, and *P. wuchereri* that have two large anterior odontoids on each side of the mandible, and *P. brevirostris* and *P. melanomystax* that have equals odontoids (Cruz *et al.* 2006). *P. edelmoi*, *P. kautskyi*, and *P. punctatus*, have only one larger odontoid (Cruz *et al.* 2006).

Natural history. *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** is found occupying the bromeliad *Alcantarea extensa* (L.B. Sm.) J.R. Grant (Bromeliaceae) (Figure 4A) in an area the vicinity of Reserva Biológica Augusto Ruschi, Santa Teresa, municipality, Espírito Santo state, Brazil. The rocky outcrop is located in a private conservation area, Sítio

Quinta do Mendes, at approximately 930m a.s.l. (above sea level), surrounded by an eucalyptus spinney (Figure 4B and 4C).

As is common in *Phyllodytes*, *P. gravathae* **sp. nov.** seems to be especially abundant, with a maximum of 2 individuals per bromeliad (Figure 5). The tank plants also can be occupied by *Dendropsophus bromeliaceus*, *Oloolygon arduos* and *Thoropa miliaris*, however at lower density. Males of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** vocalize in the central and middle armpits of the plants, beginning on twilight (5pm), decreasing the activity on evening (1am). We also observed sporadically males vocalizing on daylight. The amplex occurs in the leaf axils (Figure 5). Males keep vocalizing even while they are standing over the female. Eggs are uniform, with two poles one black and one light yellow.

Distribution. The new species occurs only in the type locality, a rocky outcrop in the buffer zone of the Augusto Ruschi Biological Reserve, in the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo state, Southeastern Brazil. (Figure 6).

Etymology. The specific name ‘*gravathae*’ ” is a noun in apposition and is a Tupi-Guarani word that means “bromeliad plant”. The name is used here due the particular ecological relationship between the amphibian and bromeliad plant.

Molecular analysis. The aligned sequences contained 356 base pairs (bp) of the 16S gene rRNA. The observed number of point mutations between samples of *Phyllodytes gravathae* **sp nov.** was very low, ranging from zero to three. However, *Phyllodytes gravathae* **sp nov.**, *P. kautskyi* and *P. luteolus* differed by 67 and 15 point mutations, respectively. The observed genetic distance (*p*-distance) between *Phyllodytes gravathae* **sp nov.**, and *P. kautskyi* and *P. luteolus* is 19% and 4.3%, respectively. The uncorrected *p*-distance calculated for the 16S rRNA gene between *Phyllodytes gravathae* **sp nov.** and *P. kautskyi* and *P. luteolus* is of significance here. Different

authors (Gehara *et al.* 2014; Clemente-Carvalho *et al.* 2011) have identified that the threshold previously suggested by Fouquet *et al.* (2007) is valuable to indicate putative levels of intra and interspecific variation, and also signals the existence of independent evolutionary lineages.

Remarks

In environments where freshwater is scarce, bromeliads constitute the most appropriate microhabitats for *Phyllodytes*. Recently, herpetological surveys, which included bromeliads as a microhabitat, have resulted in discovery of new species of *Phyllodytes* and also other taxa (Caramaschi *et al.* 1992; Peixoto & Cruz, 1988; Peixoto *et al.* 2003; Cruz *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2015). Habitat fragmentation and deforestation have been documented since colonization of Brazil as a contributing factor to habitat reduction (Tonini *et al.* 2010), and consequently the reduction of the microhabitats of *Phyllodytes*. The area where the new species were found is subject of deforestation and habitat fragmentation due agricultural activities. Despite the proximity of the Reserva Biológica Augusto Ruschi, the rocky outcrop is isolated due the presence of coffee crops and eucalyptus plantations (Mônico, *pers. com.*), and is so the population of the new species. Furthermore, local people traditionally used to collect bromeliads and cultivate the tank plant on their gardens (Ferreira *et al.* 2015). This behavior may have influenced negatively the amphibian populations.

Here, we add to the known diversity of *Phyllodytes* by describing for the first time one species that was collected in the mountain slopes of the Atlantic Rain Forest in Espírito Santo state, southeastern Brazil. The discovery of this new species highlights the importance of preserving the area in the vicinities of the Reserva Biológica Augusto Ruschi. Also, the conservation of the integrity of the area's characteristics, involving its

environment and substrates (eg. bromeliads), is fundamental in maintaining all biological diversity.

Acknowledgements

We are grateful to Sergio Mendes, area owner, for allowing us access and relying on our research. We are grateful to Instituto Nacional da Mata Atlântica and C.F.B. Haddad who kindly loaned specimens and tissue for our work. We are grateful to A.G. da Silva who helped on bromeliad identification. We are in debit to Welinton D. Lauvers, Barbara M. Montibeller, Tatiane M. Carmo and Fernanda C. F. Lírio (the first biologist to study the locality), who helped in field surveys. A. P. Almeida who kindly shared the call records of *P. luteolus* from the type locality. A.T. Mônico and E.C. Campinhos received their fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Espírito Santo (FAPES), respectively. R.B.G. Clemente-Carvalho was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo – FAPES (grant 0611/2015). A.A. Giaretta researches funding and a grant by he Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 446935/2014).

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.*, 25, 3389–3402.
- Archer, E. 2014. rfPermute: Estimate Permutation p-values for Random Forest Importance Metrics. R package version 1.6.1.
- Caramaschi, U., Silva, H.R., & Britto-Pereira, M.C. (1992) A new species of *Phyllodytes* (Anura, Hylidae) from Southern Bahia, Brazil. *Copeia* 1992(1), 187–191.
- Caramaschi, U. & Peixoto, O.L. (2004) A new species of *Phyllodytes* (Anura:Hylidae) from the state of Sergipe, Northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 25, 1–7.
- Cei, J.M. (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie) Monographs*, 2, 1–609.
- Clemente-Carvalho, R.B.G, Alves, A.C.R., Perez, S.I., Haddad, C.F.B. & Reis, S.F. (2011) Morphological and molecular variation in the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, 45(1), 94–99.
- Cruz, C.A.G., Feio, R.N. & Cardoso, M.C.S. (2006) Description of a new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic rain forest of the states of Minas Gerais and Bahia, Brazil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64(4), 321–324.
- Duellman, W.E. (1970) The hylids frogs of Middle America. *Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas*, 1–753.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1994) Biology of amphibians. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press.

- Domingos, F.M.C.B., Arantes, I.C., Cavalcanti, D.R. & Jotta, P.A.C.V. (2014) Shelter from the sand: microhabitat selection by the bromelicolous tree frog *Scinax cuspidatus* (Anura, Hylidae) in a Brazilian resting. *North-Western Journal of Zoology*, 11(1), 27–33.
- Ferreira, R.B., Faivovich, J., Beard, K.H. & Pombal, J.P.Jr. (2015) The first bromeligenous species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) from Brazil's Atlantic Forest. *PLoS ONE*, 10(12): e0142893. doi: 10.1371/journal.pone.0142893.
- Frost, D.R. (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed 01 January 2017).
- Gehara, M., Crawford, A.J., Orrico, V.G.D., Rodríguez, A., Lötters, S., *et al.*, (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. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103958>.
- Giaretta, A.A. (1996) Reproductive specializations of the bromeliad Hylid frog *Phyllodytes luteolus* (Amphibia, Anura). *Journal of Herpetology*, 30: 96-97.
- Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hothorn, T., Hornik, K. van de Wiel, M.A. & Zeileis, A. (2008) Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. *Journal of Statistical Software*, 28(8), 1–23.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405.

- Jombart T., Devillard, S. & Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *Genetics*, 11, 1–15.
- Liaw A. & Wiener, M. (2002) Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2(3), 18–22.
- Lynch, J.D. & Duellman, W.E. (1997) Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in western Ecuador. *U. Kansas Spec. Publ.*, 23, 1–236.
- Magalhães, F. de M., Juncá, F.A. & Garda, A.A. (2015) Tadpole and vocalisations of *Phyllodytes wuchereri* (Anura: Hylidae) from Bahia, Brazil. *Salamandra*, 51, 83–90.
- Neil, W.T. (1951) A bromeliad herpetofauna in Florida. *Ecology*, 32, 140–143.
- Peixoto, O.L. & Cruz, C.A.G. (1988) Descrição de duas espécies novas do gênero *Phyllodytes* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 48(2), 265–272.
- Peixoto, O.L., Caramaschi, U. & Freire, E. M. (2003) Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the state of Alagoas, Northeastern Brazil. *Herpetologica*, 59(2), 235–246.
- R Core Team. (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sampaio, M.C., Perisse, L.E., Oliveira, G.A. & Rios, R.I. (2002) The contrasting clonal architecture of two bromeliads from sandy coastal plains in Brazil. *Flora*, 197, 443–451.
- Simon, J.E. & Gasparini, J.L. (2003) Descrição da vocalização de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto e Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Ser)*, 16, 47–54.

- Simon, J.E. & Peres, J. (2012) Revisão da distribuição geográfica de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto & Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Ser)*, 29, 17–30.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729. <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor, W.R. & Van Dyke, G.C. (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9, 107–119.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22 (22), 4673–4680. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tonini, J.F.R., Carão, L.M., Pinto, I.S., Gasparini, J.L.; Leite, Y.L.R. & Costa, L.P. (2010) Non-volant tetrapods from Reserva Biológica de Duas Bocas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 10(3), 339–351.

Figure captions

Figure 1. Adult male of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** in life. Holotype MBML 10493, from Sítio Quinta do Mendes, Santa Teresa municipality, Espírito Santo state, Brazil. SVL 25.18 mm. (Photo by A.T. Mônico, 18/11/2015).

Figure 2. Preserved adult male (MBML 10493) of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** (A) dorsal and (B) ventral views. Scale bar 1 cm.

Figure 3. Principal Components Analysis (PCA). (A) Scatter plot of the first and second canonical variates scores. (B) Vectors portraying the principal directions of variation in metric traits in the plane of the first two variates.

Figure 4. (A) The tank bromeliad *Alcantarea extensa* (L.B. Sm.) J.R. Grant (Bromeliaceae) in the type locality on the vicinity of Reserva Biológica Augusto Ruschi, Santa Teresa, municipality, Espírito Santo state, Brazil. (B) and (C) The rocky outcrop located in a private conservation area, Sítio Quinta do Mendes, at approximately 930m a.s.l. (above sea level), surrounded by an eucalyptus spinney. (Photo: A and C by A.T. Mônico, B by Sérgio Mendes).

Figure 5. Male over female during the amplexus.

Figure 6. Map showing the type locality of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** White represents South America, Brazil in grey. The star indicates the type locality in Município de Santa Teresa, in the state of Espírito Santo.

Figures

Figure 1



Figure 2



Figure 3

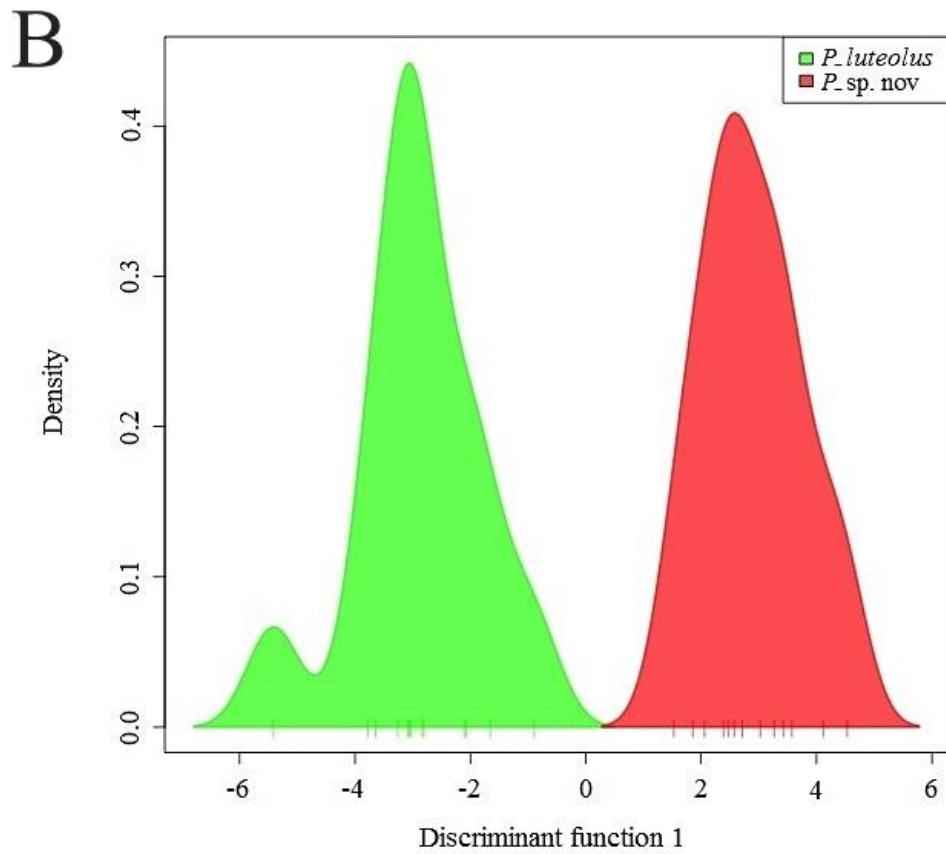
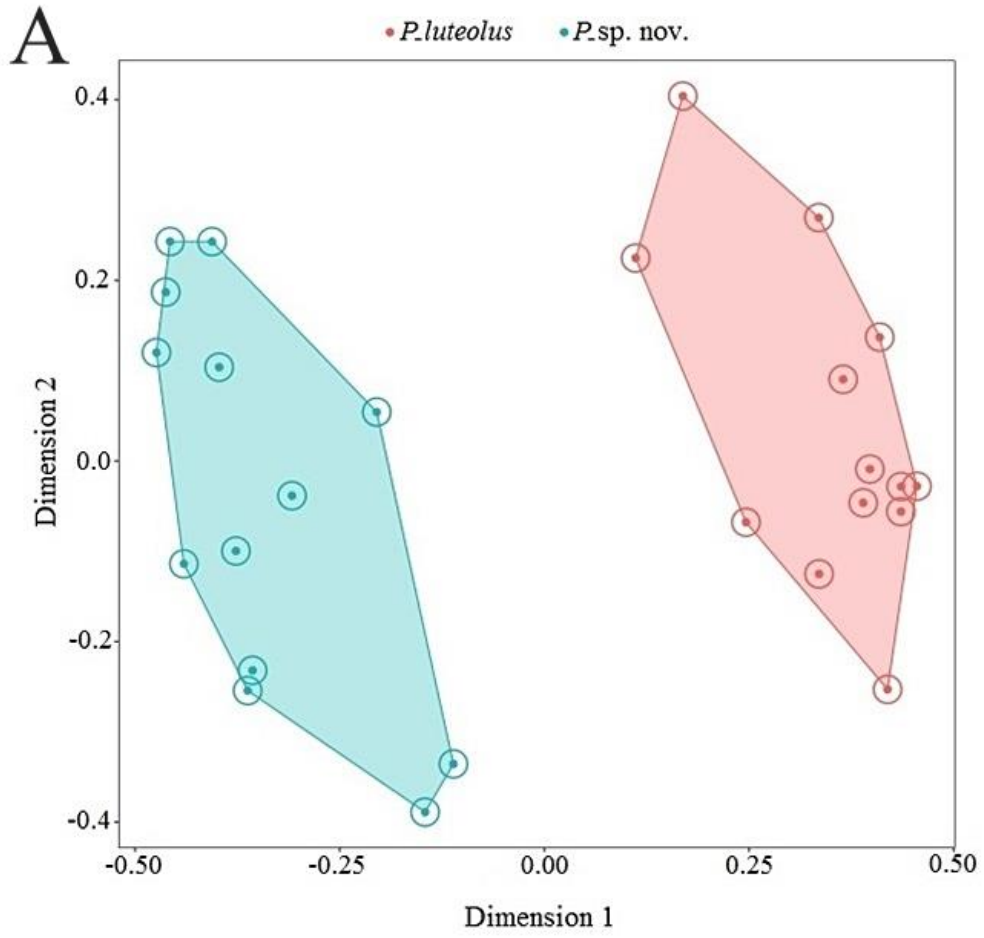


Figure 4

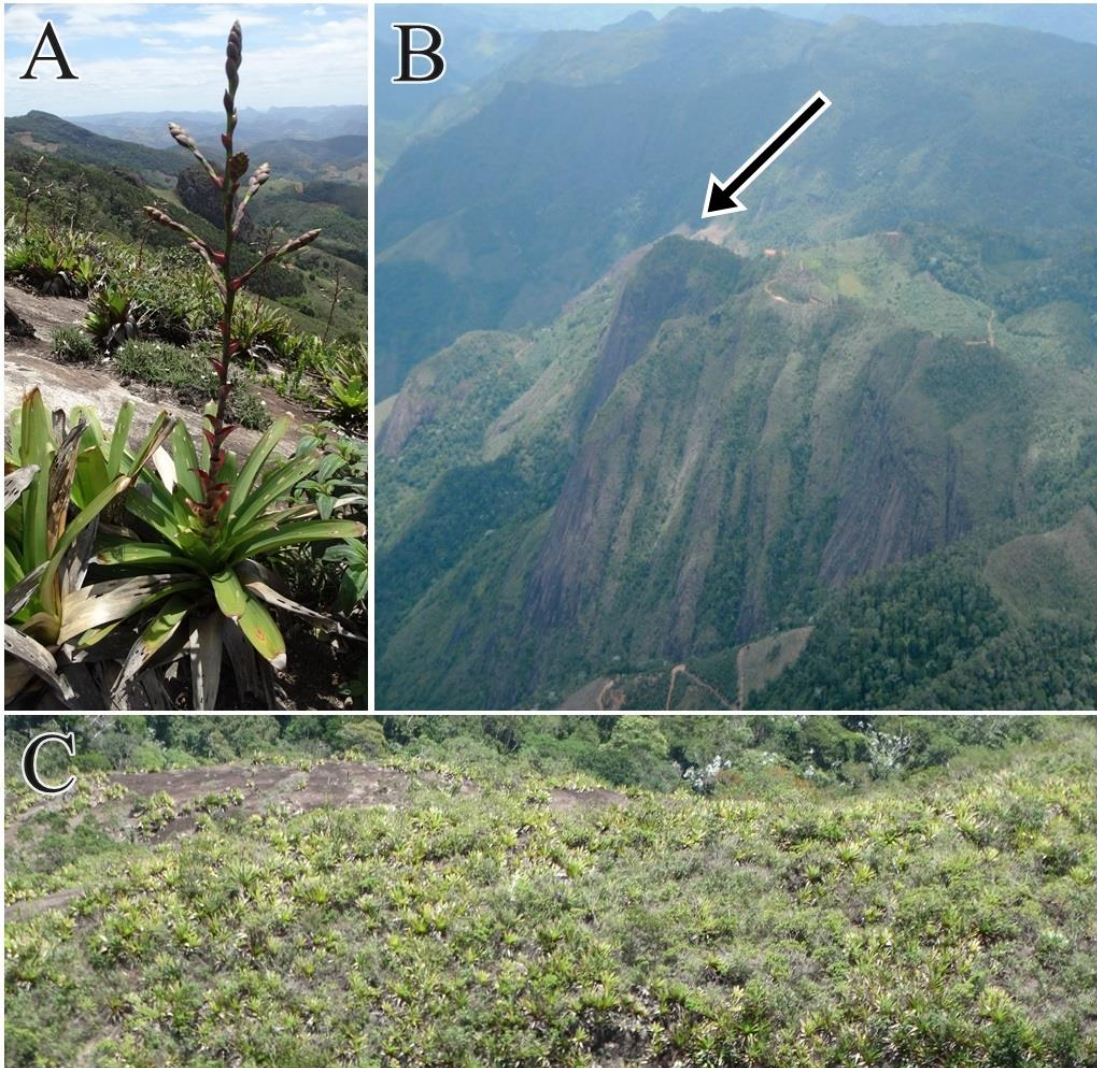


Figure 5



Figure 6

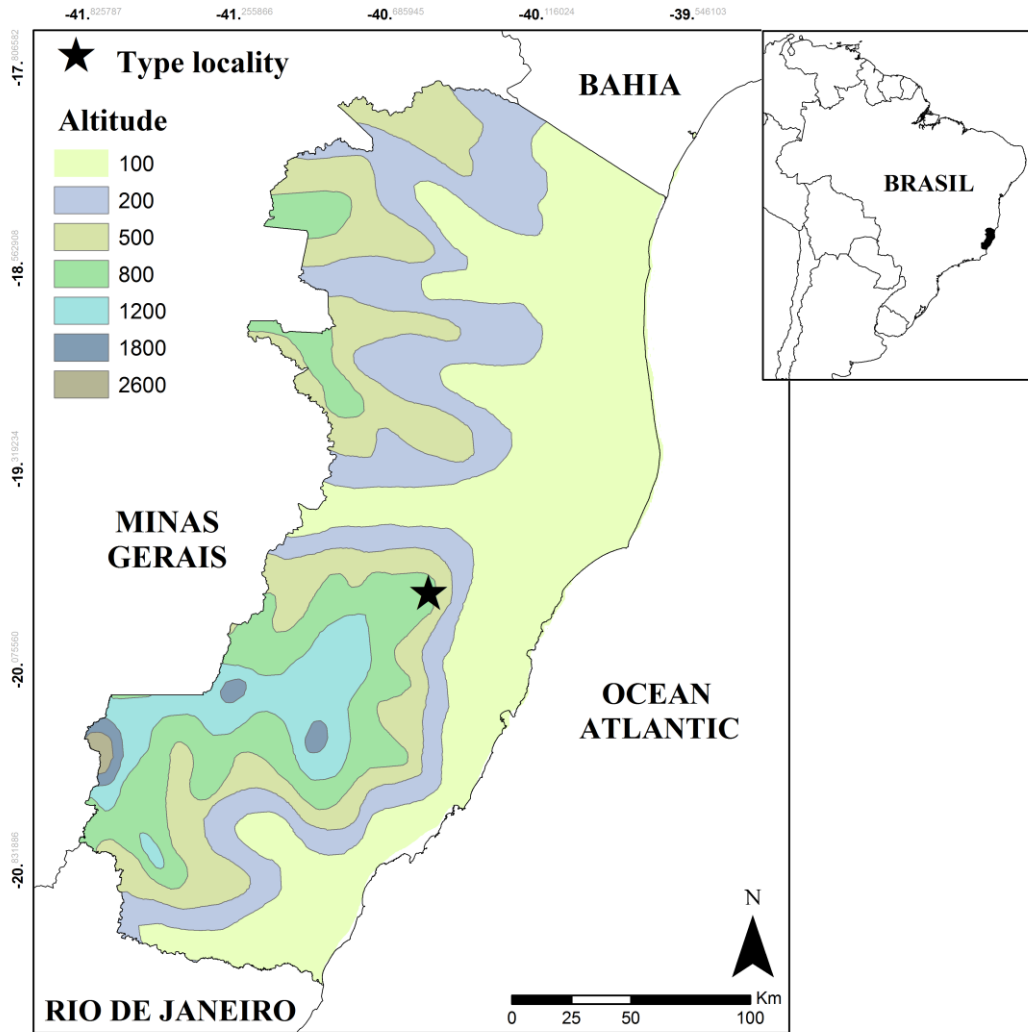


Table captions

Table 1. Measurements in millimeters of the adults of type series of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** Measurement abbreviations are listed in the Material and Methods.

Table 2. Values to call features of *Phyllodytes gravathae* **sp. nov.** Males were classified according to two categories of emphasized frequency, those with peaks at the lower (< 1700 Hz) band and those higher (> 2700 Hz) band. Temperatures = 17.2° - 21.4°C.

Table 1.

	Males (N = 5)			Females (N = 3)		
	X	SD	Range	X	SD	Range
SVL	23.8	1.4	21.4 - 25.3	22.9	1.4	20.7 - 24.5
HL	7.9	0.62	7 - 8.9	7.4	0.63	6.6 - 8
HW	9.1	0.64	8.2 - 10.2	9	0.78	8.1 - 9.9
ED	2.5	0.03	2.3 - 2.8	2.3	0.14	2.2 - 5.5
IOD	5.5	0.47	4.6 - 6.2	5.1	0.4	4.4 - 5.4
IND	1.6	0.18	1.4 - 1.9	1.5	0.18	1.3 - 1.8
END	3.0	0.36	2.47 - 3.51	2.7	0.23	2.4 - 2.9
THL	10.9	0.73	9.8 - 11.6	10.4	0.51	9.6 - 1-9
TBL	12.3	0.62	11.7 - 13	11.7	0.62	10.9 - 12.4
FL	8.7	0.36	8.4 - 9.3	8.2	0.76	7.2 - 9.1
AL	5.4	0.26	5.1 - 5.8	5.3	0.25	5.1 - 5.7
FAL	4.1	0.15	3.8 - 4.3	4.3	0.3	3.9 - 4.6
T4L	6.6	0.31	6.2 - 7.1	6.2	0.4	5.6 - 6.8

Table 2.

Features	Lower Emphasized Band Individuals N = 5 males Mean (SD)	Higher Emphasized Band Individuals N = 12 males Mean (SD)	Pooled Samples N=17 males Mean (SD)
Call Duration (s)	3.28 (0.67)	3.21 (0.48)	3.23 (0.52)
Call Interval (s)	52 (3.5)	45 (14.1)	46 (12)
Note Number	13 (1.87)	13 (2.50)	13 (2.28)
Note Rate (Notes/s)	4.0 (0.38)	4.0 (0.72)	4.0 (0.63)
Middle Note Duration (s)	0.15 (0.01)	0.15 (0.04)	0.15 (0.04)
Last Note Duration (s)	0.17 (0.02)	0.17 (0.05)	0.17 (0.04)
Middle Note Interval (s)	0.13 (0.01)	0.13 (0.02)	0.13 (0.018)
Last Note Interval (s)	0.17 (0.03)	0.18 (0.03)	0.18 (0.03)
Initial Pulse Duration (s)	0.0045 (0.0003)	0.005 (0.000)	0.0046 (0.03)
Frequency Peak Hz*	1405 (159)	3161 (240)	2644 (852)
F5% Hz	951 (311)	1521 (516)	1354 (528)
F5% Hz	3139 (679)	3625 (531)	3482 (601)

Appendix I. Examined specimens of *Phyllodytes*.

Phyllodytes gravathae **sp. nov.**: MBML 7730 - 7732, MBML 7785, MBML 10487-10493.

Phyllodytes luteolus: MBML 869, MBML 870 (Linhares), MBML 1788, MBML 5293, MBML 5294, MBML 5296, MBML 5297, MBML 5300 - 5302, MBML 5542, MBML 5543, MBML 5573, MBML 5621 (Guarapari), MBML 713, MBML 714, MBML 717 - 720, MBML 1679, MBML 1802 (São Mateus).

Phyllodytes kautskyi: MBML 2570, MBML 6571, MBML 7219, MBML 7220.

Phyllodytes melanomystax: MBML 6820, MBML 6821, MBML 6959, MBML 6961.

Appendix II. GenBank accession numbers of DNA sequences (16S rRNA) used in molecular analysis.

Phyllodytes gravathae **sp. nov.** – upon acceptance

Phyllodytes kautskyi – upon acceptance

Phyllodytes luteolus – upon acceptance

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada diversidade de espécies, a adição de espécies novas e seus registros na região de Santa Teresa reforçam ainda mais a importância de preservação da Mata Atlântica nesta área. A ocorrência de registros de espécies com novas áreas de distribuição, mesmo em locais intensivamente amostrados anteriormente, tem contribuído para o melhor conhecimento da anurofauna local.

O presente trabalho identificou aspectos da história natural da maioria das espécies de anuros. A atividade desses organismos esteve associada ao período quente e de maior umidade relativa do ar durante o ano (setembro a março). Os maiores valores de riqueza e abundância foram registrados junto com os maiores índices de temperatura, resultando em diferentes padrões de períodos de ocorrência entre famílias. Além disso, podem-se haver padrões locais de atividade vocal diferentes em uma mesma espécie.

O sítio de vocalização mais utilizado foi a vegetação arbustiva próximo aos corpos d'água, enquanto o sítio de oviposição mais usado foi diretamente em poça permanente. Assim, verificou-se que os anuros apresentam sobreposição na temporada de vocalização e na utilização dos sítios de oviposição.

Durante a realização do projeto uma espécie nova foi coletada. A descrição desta contribui para fortalecer a necessidade da preservação das áreas florestais do entorno da Reserva Biológica Augusto Ruschi. Além disso, mostra que o uso da taxonomia integrativa é eficaz na identificação de novas espécies, podendo auxiliar como solução para espécies com problemas taxonômicos.

A preservação da integridade das características da área estudada, bem como de sua zona de amortecimento, envolvendo seus substratos e ambientes, é

indispensável na manutenção da assembleia de anfíbios anuros local, sobretudo das espécies que possuem alta especificidade quanto ao habitat utilizado.