

**Evolução da anatomia vocal associada à diversidade acústica em *Bokermannohyla*
Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell & Wheeler, 2005 (Anura, Hylidae,
Cophomantini)**

Candidato: Davi Lee Bang

Orientador: Dr. Flávio Alicino Bockmann

Co-orientador: Dr. Ariovaldo Antonio Giaretta

Resumo

A evolução de fenótipos de diferentes organismos tem sido amplamente estudada tendo em vista métodos comparativos filogenéticos, que permitem comparar esses fenótipos sob a luz de uma filogenia. Os anuros apresentam fenótipos comportamentais complexos, sendo um deles, importante em mecanismos de especiação, a comunicação vocal, que consiste principalmente na emissão de sinais estereotipados como o canto de anúncio. Com isso, existe um número considerável de estudos para fins de se entender a evolução de vocalizações em diferentes grupos de anuros. Todavia, considerando que a produção de sinais acústicos ocorre a partir da vibração de estruturas anatômicas (laringe e componentes associados) do aparato vocal quando na inalação e exalação de ar, a complexidade de um canto de anúncio pode ser influenciada de acordo, podendo haver respostas evolutivas correlacionadas em função de seleção sexual ou natural. No entanto, estudos que abarquem caracterizações da anatomia vocal são escassos e, por consequência, também não existem estudos macro evolutivos levando em consideração a eventual correlação entre aparato vocal e a diversidade de sinais acústicos. Mais ainda, a delimitação de homologias entre cantos de anúncio não se faz tão trivial em vista do critério assumido na literatura, o que aponta para a necessidade de avaliar todos os aspectos envolvidos no comportamento de vocalização. O gênero modelo – *Bokermannohyla* – apresenta considerável diversidade acústica, chamando a atenção para a aplicabilidade dos métodos comparativos para tentar entender padrões evolutivos na comunicação vocal do gênero e os possíveis mecanismos subjacentes a eles. Com isso, a presente proposta tem objetivo de caracterizar em detalhes o aparato vocal e sinais acústicos associados no gênero para ser possível delimitar homologias com mais clareza. A partir disso, tentar detectar padrões evolutivos tendo em vista a eventual correlação entre estruturas do aparato vocal e cantos de anúncio, para avaliar se diferenças ou semelhanças no primeiro expressam mudanças evolutivas ou conservadorismo no último ao longo da estruturação filogenética do gênero.

Palavras-chave: Anuros neotropicais. Aparato vocal. Evolução fenotípica. Bioacústica. Métodos comparativos filogenéticos.

Introdução

Métodos comparativos filogenéticos

Métodos comparativos filogenéticos (MCFs) têm sido amplamente utilizados nos campos da biologia evolutiva durante as últimas décadas (Garamszegi, 2014). A definição de MCFs é tida como uma abordagem analítica usada para comparar diferentes organismos ou objetos com o propósito de elucidar padrões e mecanismos de suas diversidades em termos de história evolutiva. No que diz respeito a organismos biológicos, os MCFs têm sido utilizados para avaliar como eles se adaptam aos seus próprios ambientes através de diferentes pressões seletivas (e.g. natural e sexual) (Harvey & Pagel, 1991; Harvey & Purvis, 1991). Nesse sentido, os MCFs permitem a comparação de diversos caracteres contínuos ou descontínuos em uma dada filogenia e esses métodos podem fornecer informações sobre a história evolutiva de diferentes tipos de características (comportamentais, genéticas, fisiológicas, ontogenéticas, ecológicas e/ou morfológicas; Harvey & Purvis, 1991). De fato, com a vasta diversidade de espécies e suas características, a tarefa mais desafiadora parece ser a de tentar encontrar explicações evolutivas para essa diversidade fenotípica (Garamszegi et al., 2014). Diferenças ou semelhanças fenotípicas, contudo, podem representar variações resultantes da descendência de um ancestral em comum desses organismos (Felsenstein, 1985), refletindo a interdependência filogenética (e.g. sinal filogenético) entre os táxons (Goicoechea et al., 2010; Gingras et al., 2013; Garamszegi et al., 2014). Essa dependência, por sua vez, pode gerar correlações espúrias entre as características fenotípicas que podem sugerir adaptações e respostas evolutivas, frente a pressões seletivas, que na verdade não existem (Harvey & Pagel, 1991; Harvey & Purvis, 1991).

Os MCFs então permitem o controle do efeito filogenético sobre as características fenotípicas, possibilitando a diferenciação entre homoplasias (e.g. origens independentes de uma dada característica) e homologias (e.g. características que se originam de um ancestral em comum). Os MCFs ainda permitem reconstruir estados ancestrais de caracteres e mapear as direções de mudanças evolutivas através de procedimentos estatísticos e probabilísticos (Garamszegi et al., 2014); dentre outras possibilidades como testar modelos evolutivos que melhor explicam a evolução dos caracteres (Diniz-Filho, 2000) e avaliar se mudanças evolutivas podem ocorrer de forma correlacionada entre dois ou mais caracteres fenotípicos, ou entre fenótipo e ambiente. Portanto, os MCFs representam uma boa estimativa da robustez de topologias, uma vez que esses métodos dependem de inferências *a posteriori* sobre hipóteses filogenéticas.

Anuros, anatomia vocal e sinais acústicos

Os anuros são considerados o grupo mais diverso dentro de tetrápodes, parcialmente pelo fato de que esses animais exibem uma gama de modos reprodutivos distintos, bem como características morfológicas e comportamentais que permitiram com que eles tivessem sucesso em diferentes tipos de habitats (Haddad & Prado, 2005; Wells, 2007). Nesse sentido, os anuros apresentam um comportamento complexo para reprodução e reconhecimento específico (Wells, 2007) que se baseia principalmente na comunicação vocal (sinais acústicos). Esses sinais são amplamente reportados de anuros, uma vez que o comportamento de vocalizar é muito comum em quase todos os seus representantes e funcionam como um mecanismo primário de comunicação.

Vocalizações em anuros são fundamentalmente produzidas pelo aparato vocal, i.e., cartilagens da laringe e músculos associados (Bradbury & Vehrencamp, 1998; Ryan &

Guerra, 2014), que vibram passivamente quando o ar é exalado ativamente por contrações dos músculos abdominais (Bradbury & Vehrencamp, 1998; Ryan & Guerra, 2014). A vibração da laringe é desempenhada, essencialmente, pelas cordas vocais; outras estruturas cartilaginosas (e.g. aritenóides) podem vibrar de forma associada (Martin, 1971). O ar que passa através da laringe alcança a cavidade bucal através das fendas vocais e desloca o assoalho da boca para baixo, momento em que o saco vocal, formado por tecidos expansíveis, é inflado pelo ar. Após cada processo, o assoalho bucal é recolhido, fazendo com que o ar retorne aos pulmões, permitindo que o processo de respiração seja reciclado, ao invés de uma nova inspiração a cada ciclo de produção de som (Bradbury & Vehrencamp, 1998). Em algumas espécies, entretanto, a fenda vocal é ausente (Napoli, 2005; Zaher et al., 2005) e o deslocamento do assoalho bucal é comparativamente menor do que em representantes com saco vocal externo. É válido notar que alguns componentes da anatomia vocal de uma dada espécie podem variar de acordo com a estrutura da laringe, como o sapo túngara (*Engystomops pustulosus*), que possui massas fibrosas diferenciadas conectadas à laringe e às cordas vocais, permitindo que essa espécie produza um canto complexo (Gridi-Papp et al., 2006; Ryan & Guerra, 2014).

Os anuros podem exibir um repertório de sinais acústicos complexo dependendo do contexto social (Wells, 2007): o principal sendo o canto de anúncio, que serve tanto para comunicar a presença e a qualidade do macho emissor a uma fêmea, como também na manutenção do espaçamento entre machos vizinhos. A emissão de cantos de anúncio funciona como um mecanismo de isolamento reprodutivo pré-zigótico (Wells, 2007), sendo útil para o entendimento de processos de reconhecimento específico, e consequentemente em processos de especiação (Ryan & Rand, 1993; Guerra & Ron, 2008). As espécies,

portanto, podem diferir em termos de características acústicas e podem ser consideradas como linhagens independentes, mesmo que outras características (e.g. forma externa) se mantenham conservadas (Carvalho & Giaretta, 2013).

A maioria dos estudos sobre anatomia vocal demonstra que as diferenças intra- (McClelland et al., 1998) ou interespecíficas (Boul & Ryan, 2014) no aparato vocal estão relacionadas com diferentes pressões seletivas. Uma vez que a anatomia da laringe e componentes associados podem influenciar a complexidade acústica, é de se esperar que haja respostas evolutivas na anatomia da laringe por seleção sexual ou pressões ambientais, visto que as propriedades dos cantos de anúncio podem influenciar a preferência das fêmeas (Martin, 1971; Wilczynski et al., 1993; Gridi-Papp et al., 2006; Wells, 2007; Ryan & Guerra, 2014) e condições externas (e.g. habitats abertos ou florestais) podem influenciar em como esses cantos são transmitidos no ambiente (Ryan et al., 1990; McClelland et al., 1998; Wells, 2007). Portanto, seleção sexual ou pressões ambientais podem explicar diferenciações em estruturas anatômicas do aparato vocal e conseqüentemente diferenciações em cantos de anúncio correlacionados, para que as espécies possam emitir esses cantos com características adequadas às preferências das fêmeas (Martin, 1971; Schmid, 1978), ao mesmo tempo em que eles têm que ser transmitidos de forma clara no ambiente (Ryan et al., 1990). Todavia, trabalhos que abarquem a descrição da anatomia vocal e a eventual correspondência com sinais acústicos são escassos, normalmente sendo restritos a grupos de anuros não brasileiros (com exceção de Jansen et al., 2016).

Um número considerável de estudos tem aplicado os MCFs para se detectar padrões macroevolutivos sobre sinais acústicos de anuros (Cocroft & Ryan, 1995; Robillard et al., 2006; Erdtmann & Amézquita, 2009; Goicoechea et al., 2010; Gingras et al., 2013)

(embora não existam estudos aplicando os MCFs considerando a eventual correlação entre anatomia vocal e sinais acústicos). Estes sinais apresentam diferentes graus de complexidades, e podem ser dependentes de uma gama de variáveis, como discutido acima. Por conseguinte, para fins de realizar comparações interespecíficas precisas entre sinais acústicos e estruturas da anatomia vocal entre grupos, é necessário delimitar previamente as homologias entre essas características antes da aplicação dos MCFs ou para se reconstruir hipóteses filogenéticas. De forma geral, cantos de anúncio são homólogos se considerados como um único ciclo de ar produzido pela contração de músculos e consequente vibração da laringe e componentes associados (Martin & Gans, 1972; McLister et al., 1995; Robillard et al., 2006). Contudo, mesmo considerando essa definição biomecânica, delimitar homologias entre cantos não se faz tão trivial dada à complexidade mecânica associada à produção de sons. Faz-se necessária, portanto, uma associação dos cantos com as estruturas anatômicas envolvidas em sua produção para se assumir homologias com mais clareza, uma vez que esses cantos são produtos finais do comportamento de produção de som (Robillard et al., 2006) e a aplicação de critérios de homologia em uma dada característica comportamental requeira uma avaliação cuidadosa dos diferentes aspectos envolvidos no todo (Wenzel, 1992).

O táxon modelo – o gênero Bokermannohyla Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell & Wheeler, 2005

O gênero neotropical *Bokermannohyla* atualmente compõe uma tribo conhecida por Cophomantini, da qual também se incluem os gêneros *Aplastodiscus*, *Hyloscirtus*, *Boana* e *Myersiophyla*. O gênero *Bokermannohyla* foi proposto a partir de dados moleculares (nucleares e mitocondriais) por Faivovich et al. (2005), e atualmente não existe nenhuma

sinapomorfia anatômica reconhecida do gênero, o que aponta para a necessidade de se empreender estudos morfológicos mais aprofundados. O gênero compreende mais de 30 espécies distribuídas principalmente nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado do Brasil e é atualmente subdividido em quatro grupos considerados monofiléticos de acordo com Faivovich et al. (2005): o grupo de *B. circumdata*, de *B. claresignata*, de *B. martinsi* e o de *B. pseudopseudis*.

Espécies do gênero *Bokermannohyla* exibem uma diversidade e complexidade consideráveis de cantos de anúncio (Figura 1) em termos de estrutura e padrões (Napoli & Pimenta, 2009; Carvalho et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Nali & Prado, 2014; Taucce et al., 2015; Giaretta et al., 2016; Rocha et al., 2016). É interessante notar que podem ser observadas espécies com morfologia externa relativamente conservada (e.g. *B. napolii* e *B. luctuosa*; Carvalho et al., 2012), mas com cantos distintos, o que chama a atenção para diferenciações, como na anatomia da laringe (Wilczynski et al., 1993), que possam explicar diferenças acústicas. Por outro lado, semelhanças na anatomia de laringe poderiam explicar padrões (qualitativos) de vocalizações similares em algumas espécies que possuem tamanhos, morfologia externa e/ou ocupação de habitat diferentes [*B. carvalhoi* e *B. nanuzae*; *B. ibitiguara* e *B. sazimai*; *B. pseudopseudis* e *B. sapiranga* (Carvalho et al., 2012, 2013)]. Esses fatores indicam que o táxon em questão é um bom modelo para o estudo de padrões e processos macroevolutivos associados à anatomia de laringe e cantos de anúncio correspondentes.

Mais ainda, também é válido mencionar que algumas espécies de *Bokermannohyla* [e.g. *B. caramaschii* e *B. izecksohni*; (Jim & Caramaschi, 1979; Napoli, 2005)] são conhecidas por não possuírem fendas vocais e têm suas vocalizações desconhecidas; fato

que não implica necessariamente que essas espécies não vocalizem. A caracterização do aparato vocal dessas espécies se faz interessante para avaliar se existe alguma diferenciação anatômica que possa influenciar (ou impedir) a produção vocal nelas. De forma complementar, a caracterização do aparato vocal de espécies com cantos conhecidos, como *B. circumdata* e *B. luctuosa* (Carvalho et al., 2012), permitiria, em um contexto comparativo, avaliar se há semelhanças no aparato vocal dessas espécies em relação à *B. caramaschii*, uma vez que as duas primeiras espécies possuem fenda vocal e a última não; ressalta-se ainda que as três espécies são consideradas como próximas filogeneticamente (Napoli, 2005; Carvalho et al., 2012) e morfologicamente semelhantes. Outra abordagem interessante seria a caracterização do aparato vocal de espécies que não são registradas há tempos (e.g., *B. claresignata* e *B. langei*) desde suas descrições originais e que também não possuem cantos conhecidos. Essas caracterizações permitiriam a tentativa de extrapolar e realizar inferências (Harvey & Purvis, 1991), através dos MCFs, sobre possíveis padrões acústicos dessas espécies (que não possuem canto conhecido) relacionados às suas respectivas anatomias vocais quando comparadas àquelas espécies com anatomia vocal e vocalizações que serão eventualmente conhecidas ao longo do estudo.

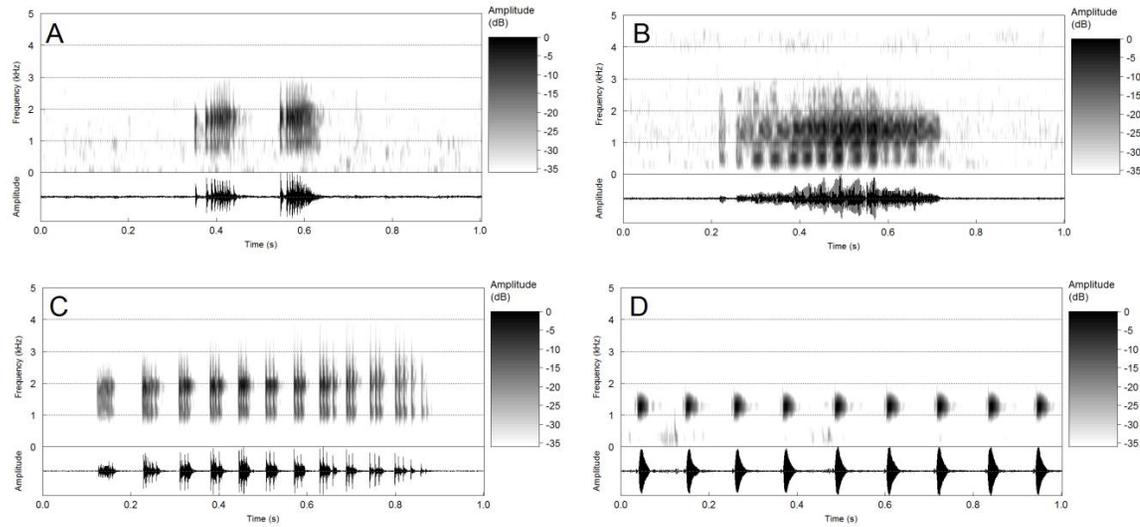


Figura 1. Exemplos da diversidade acústica dentro de *Bokermannohyla*. (A) *B. carvalhoi* que apresenta canto com duas notas e diferentes níveis de modulação de amplitude (MA) dentro delas; (B) *B. circumdata* com canto com uma única nota e MA complexa dentro dela; (C) *B. ibitiguara* que apresenta canto com padrão multi-nota e diferentes graus de MA dentro delas; (D) *B. oxente* que apresenta cantos sem pulso e sem MA e estrutura espectral tonal. Figuras confeccionadas no ambiente R, utilizando-se do pacote *seewave* (veja na seção “Acústica” em Material e Métodos).

Objetivos

Os objetivos gerais da presente proposta são: caracterizar detalhadamente a anatomia vocal e a diversidade de vocalizações no gênero *Bokermannohyla*, visando produzir um conjunto de dados robusto, detalhado e padronizado para aplicação dos MCFs. Especificamente, buscamos: 1) delimitar homologies entre componentes da anatomia vocal e entre unidades acústicas (canto de anúncio) correspondentes para 2) mapear essas características em uma filogenia a fim de detectar padrões filogenéticos e, a partir disso, 3) avaliar se as diferenças ou semelhanças no aparato vocal entre espécies (ou grupos) expressam mudanças evolutivas ou conservadorismo em cantos de anúncio observados ao longo da estruturação filogenética do gênero; 4) avaliar e quantificar o quanto variações interespecíficas da anatomia de laringe e dos cantos de anúncio dentro do gênero podem ser

atribuídas à interdependência filogenética entre os táxons (e.g. sinal filogenético); 5) avaliar a amplitude da variação anatômica da laringe de *Bokermannohyla* por meio de comparações com estruturas anatômicas de espécies que compõem gêneros filogeneticamente relacionados ao táxon modelo; e 6) a partir da caracterização do aparato vocal dos grupos de *Bokermannohyla*, tentar inferir quanto a possíveis padrões acústicos daquelas espécies que não possuem cantos conhecidos por serem raras ou pouco conhecidas, a partir de eventuais semelhanças com o aparato vocal de espécies que serão caracterizadas em detalhe.

Justificativa

A presente proposta representa a primeira tentativa de caracterizar a anatomia vocal em *Bokermannohyla* para avaliar o quanto ou como a laringe, e estruturas associadas, das espécies podem explicar as diferenças ou semelhanças nas vocalizações entre espécies do gênero; e por associar esses dois fatores (anatomia vocal e cantos de anúncio), tentar estabelecer homologias entre essas características de forma mais precisa. Com essa associação, também será possível aplicar os MCFs levando em consideração eventuais correlações existentes entre anatomia vocal e cantos de anúncio, o que tornará mais robusto o entendimento da evolução da comunicação acústica no táxon modelo. Portanto, os resultados da presente proposta têm potencial de contribuir para o entendimento da história evolutiva do gênero e, ainda, poderão levantar questões pertinentes acerca dos possíveis processos subjacentes envolvidos na evolução da comunicação acústica no táxon em questão.

Uma vez que a presente proposta também irá resultar em um conjunto de dados acústicos robustos, detalhados e padronizados de *Bokermannohyla*, será também útil para

fornecer informações para outros campos de pesquisas que utilizem delas. Por exemplo, cantos de anúncio são utilizados em trabalhos de taxonomia, bem como em estudos comportamentais sobre como indivíduos respondem a diferentes pressões seletivas (e.g. tipos de ambientes diferentes). As eventuais inferências dos padrões acústicos de espécies raras, pouco conhecidas e que não são registradas há tempos, poderia auxiliar em esforços conservacionistas que envolvem o monitoramento da “paisagem acústica” (*acoustic landscape*; Obrist et al., 2010) em potenciais áreas naturais dessas espécies que são inacessíveis.

Material e Métodos

Amostragem

Parte dos dados se encontra coletada, estando uma delas (espécimes e gravações) atualmente depositada na Coleção de Anuros (coordenada pelo co-orientador do candidato) da Universidade Federal de Uberlândia (AAG-UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil (ver Resultados Preliminares). Outra parte dos dados será cedida por pesquisadores, com os quais já foram estabelecidas parcerias formais (Dr. Felipe de Sá Fortes Leite – Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, Departamento de Zoologia, Florestal, MG; Dr. Thiago Ribeiro de Carvalho – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Rio Claro, SP). Com isso, será possível ter acesso a espécimes e arquivos sonoros da Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH), UNESP-Rio Claro, bem como daqueles depositados, pelo Dr. Felipe Leite, na Coleção de Anfíbios (UFMG-AMP) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Também será feita solicitação de arquivos sonoros para outros

pesquisadores e instituições (e.g. Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP).

Esforços adicionais de amostragem serão realizados em campo para obter mais dados para espécies de *Bokermannohyla* que ainda carecem de informações (que são escassas para sete espécies do gênero: *B. ahenea*, *B. caramaschii*, *B. claresignata*, *B. clepsydra*, *B. gouveai*, *B. izecksohni*, *B. langei*, *B. ravidia*), para as quais o esforço amostral será privilegiado. Esses esforços serão realizados, prioritariamente, nas localidades-tipos de cada espécie e em temporadas quentes e chuvosas (verão; comumente de outubro a março de cada ano) (veja Cronograma), que corresponde ao período reprodutivo da maioria das espécies de anuros.

Anatomia vocal

Para analisar a anatomia de laringe, espécimes preservados de *Bokermannohyla* serão tomografados utilizando nano/micro-CT Scan fabricado pela GE - General Electric Sensing & Inspection Technologies GmbH, Alemanha, modelo Phoenix v|tome|x s240, disponível no Centro para Documentação da Biodiversidade (CDB) do Departamento de Biologia - FFCLRP - USP. As imagens serão editadas com auxílio do programa VGStudio Max, versão 3.0. Além disso, espécimes serão corados e diafanizados (*sensu* Taylor & Van Dyke, 1981) e dissecados. As estruturas do aparato vocal serão expostas e fotografadas com auxílio de estereomicroscópio acoplado a uma câmera fotográfica digital para obtermos dados de medida das estruturas do aparato vocal. No caso de serem encontradas estruturas que mereçam investigação mais detalhada (diferenças morfológicas, alometria, ou estruturas desconhecidas), elas serão analisadas a partir de cortes histológicos. Nessa análise, a laringe e componentes associados serão embebidos em resina e cortados

utilizando-se de micrótomo. Cortes histológicos serão analisados sob microscópios. As metodologias para os estudos histológicos, morfométricos e volumétricos seguirá basicamente as dos seguintes estudos: Wilczynski et al. (1993) e McClelland et al. (1996).

De forma a obter uma noção mais ampla da amplitude de variação anatômica do aparato vocal de *Bokermannohyla*, serão também estudados, de forma exploratória, espécimes pertencentes aos gêneros filogeneticamente relacionados à *Bokermannohyla* que compõe a tribo Cophomantini: *Aplastodiscus* e *Boana*, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla* (Faivovich et al., 2005). Espécimes dos dois últimos gêneros possuem distribuições restritas a países adjacentes ao Brasil (Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia), impedindo a coleta de informações sobre essas espécies. Tentativas de solicitações desses dados serão realizadas a coleções científicas que constem espécimes desses gêneros não brasileiros. O estudo da anatomia vocal de algumas espécies filogeneticamente distantes também será realizado, como por exemplo, nos gêneros *Scinax*, *Ololygon*, *Phyllomedusa* e *Pithecopus* (Duellman et al., 2016).

Acústica

Gravações de cada espécie serão realizadas com gravadores digitais (Marantz PMD 661, 670, 671; taxa de amostragem de 44,1 ou 48,0 kHz e resolução de 16 bits) com microfone direcional acoplado (Sennheiser K6/ME66 ou K6/ME67). Os cantos serão amostrados de forma a abranger e detectar os três possíveis níveis de variação dentro de uma espécie: dentro de indivíduos, entre indivíduos e entre populações. Portanto, quando possível, os dados de cada espécie incluirão mais de uma população (localidade) e sempre mais de um indivíduo. As gravações serão analisadas utilizando o software Raven Pro 1.5 (Bioacoustics Research Program, 2012). Figuras sonoras serão produzidas no pacote

seewave v. 1.7.6 (Seuer et al., 2008) na plataforma R v. 3.3.1 (R Development Core Team, 2014).

Métodos comparativos filogenéticos

As hipóteses filogenéticas (hipóteses de trabalho) que concernem às relações interespecíficas em *Bokermannohyla* serão aquelas de Faivovich et al. (2005) e Faivovich et al. (em preparação). Será realizada uma tentativa de coletar informações da anatomia de laringe e cantos do máximo de espécies possíveis de *Bokermannohyla*, representando todos os subgrupos reconhecidos atualmente no gênero. Os MCFs serão aplicados por meio dos seguintes pacotes na plataforma R: “*ape*” (Paradis et al., 2004), “*geiger*” (Harmon et al., 2008), “*phangorn*” (Schliep, 2011), “*picante*” (Kembel et al., 2010), “*caper*” (Orme et al., 2013), “*phylobase*” e “*phytools*” (Revell, 2012).

Estimativas de sinal filogenético de caracteres contínuos serão avaliadas por meio dos testes de “K de Blomberg” (Blomberg et al., 2003) no pacote *picante* (Kembel et al., 2010) e “lambda de Pagel” (Pagel, 1999) nos pacotes *geiger* e *caper*. Subsequentemente, será avaliado qual modelo evolutivo melhor se adequa à evolução dessas características contínuas (e.g., movimento browniano ou Orstein-Uhlenbeck; Diniz-Filho, 2000) por meio do pacote *geiger*. A partir disso, será possível fazer o controle da dependência filogenética entre as características utilizando-se de “*Phylogenetic Generalized Least Squares*” (PGLS), no pacote *caper*. O PGLS permite testar, por exemplo, se existe correlação entre duas ou mais variáveis levando em conta o efeito da filogenia. Com isso, o PGLS também permite testar se diferenças interespecíficas de anatomia de laringe e características acústicas são dependentes de fatores que podem explicar essas diferenças (e.g. tamanho de um indivíduo e/ou temperatura; Gerhardt, 1991). O sinal filogenético de dados descontínuos será avaliado

por aleatorização de topologias (Maddison & Slatkin, 1991), por meio dos pacotes *ape*, *geiger*, *phangorn* e *phylobase*. Para avaliar os modelos evolutivos que mais se adequam à transformação de caracteres descontínuos, dois modelos serão utilizados: ER (“*equal-rates model*”) e ARD (“*all-rates-differerent model*”).

A eventual associação entre caracteres descontínuos e contínuos será avaliada a partir de testes de ANOVA filogenética que serão aplicados a variáveis potencialmente associadas (e.g. tamanho da laringe e a presença/ausência de pulsos em um dado sinal acústico; sensu Garland et al. 1993), por meio do pacote *phytools*.

Resultados preliminares

Dados (espécimes e arquivos sonoros) que constam na coleção AAG-UFU correspondem a 100 espécimes e 145 gravações de 11 espécies de *Bokermannohyla*; na coleção UFMG correspondem a 145 gravações de 13 espécies.

Forma de análise dos resultados

Os resultados obtidos a partir das caracterizações do aparato vocal e de vocalizações de espécies de *Bokermannohyla* serão analisados das seguintes formas: a) homologias entre cantos de anúncio serão interpretadas e estabelecidas de acordo com as estruturas anatômicas correspondentes; b) através do mapeamento dessas características em uma filogenia, padrões filogenéticos e as implicações deles na sistemática do gênero serão discutidos, bem como serão levantadas questões sobre possíveis processos que promoveram os padrões observados; b) serão investigados os graus de associação (qualitativo e quantitativo) entre estruturas anatômicas do aparato vocal das espécies e os cantos de anúncio respectivos (e.g. medida e massa de cordas vocais vs. frequência dominante do

canto), que serão investigadas sob uma perspectiva filogenética dentro do gênero; c) pela avaliação do sinal filogenético entre os fenótipos dos táxons, de maneira a deduzir se esses são resultados de descendência em comum ou de especializações em função de outras variáveis (e.g. seleção sexual); e) uma vez documentadas as amplitudes de variação da anatomia vocal das espécies de *Bokermannohyla*, essas serão comparadas com os padrões encontrados em gêneros aparentados, de modo a determinar suas polaridades (plesiomorfias e apomorfias); f) padrões acústicos inferidos daquelas espécies raras, que não possuem cantos conhecidos, serão inferidos de acordo com a estrutura filogenética dos atributos vocais do gênero.

Cronograma

Planejamento de atividades da presente proposta.

Ano	2018				2019				2020				2021			
	1º Sem.		2º Sem.		1º Sem.		2º Sem.		1º Sem.		2º Sem.		1º Sem.		2º Sem.	
Trimestre	1ºT	2ºT														
Disciplinas e obtenção de créditos	X	X	X	X	X	X	X	X								
Coleta de dados (espécimes e gravações)	X			X	X				X			X	X			
Análise e interpretação de dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Qualificação									X							
Estágio no exterior						X	X	X								
Redação da tese											X	X	X	X	X	X

Referência especial ao item “estágio no exterior” que se justifica para fins de aprofundamento analítico/metodológico e teórico no que concerne à anatomia vocal de anuros da presente proposta. Esse estágio se realizaria sob a supervisão do Prof. Dr. Michael J. Ryan (“*The Ryan Lab, Department of Integrative Biology, University of Texas at Austin – College of Natural Sciences*”), o qual é referência internacional sobre diversos aspectos comportamentais na comunicação de anuros, principalmente em estudos sobre

anatomia vocal. O contato com o professor em questão já foi estabelecido e o mesmo consentiu quanto à realização do estágio em seu laboratório caso o estágio no exterior seja aprovado.

O item “coleta de dados” se realizará sob licença concedida ao laboratório do co-orientador do candidato pelo ICMBio/SISBIO (#30059-10).

Referências Bibliográficas

- BIOACOUSTICS RESEARCH PROGRAM. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software, versão 1.5. Ithaca, New York: The Cornell Lab of Ornithology. Disponível em: <http://www.birds.cornell.edu/raven>, 2014.
- BLOMBERG, S.P.; GARLAND, T. & IVES, A.R. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. **Evolution**, v. 57, n. 4, p. 717–745, 2003.
- BOUL, K. E. & RYAN, M. J. Population Variation of Complex Advertisement Calls in *Physalaemus petersi* and Comparative Laryngeal Morphology. **Copeia**, v. 2004, n. 3, p. 624–631, 2004.
- BRADBURY, J. W. & VEHRENCAMP, S. L. **Principles of animal communication**. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1998.
- CARVALHO, T. R. & GIARETTA, A. A. Taxonomic circumscription of *Adenomera martinezi* (Bokermann, 1956) (Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) with the recognition of a new cryptic taxon through a bioacoustics approach. **Zootaxa**, v. 3701, n. 1, p. 207–237, 2013.
- CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A. & MAGRINI, L. A new species of the *Bokermannohyla circumdata* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with bioacoustic data on seven species of the genus. **Zootaxa**, v. 3321, p. 37–55, 2012.
- CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; TEIXEIRA, B. F. V. & MARTINS, L. B. New bioacoustic and distributional data on *Bokermannohyla sapiranga* Brandão *et al.*, 2012 (Anura: Hylidae): revisiting its diagnosis in comparison with *B. pseudopseudis* (Miranda-Ribeiro, 1937). **Zootaxa**, v. 3746, p. 383–392, 2013.
- COCROFT, R. B. & RYAN, M. J. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. **Animal Behaviour**, v. 49, p. 283–303, 1995.
- DINIZ-FILHO, J. A. F. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 162, 2000.
- DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B. & HEDGES, B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4104, n. 1, p. 001–109, 2016.
- ERDTMANN, L. & AMÉZQUITA, A. Differential evolution of advertisement call traits in dart-poison frogs (Anura:Dendrobatidae). **Ethology**, v. 115, p. 801–811, 2009.

- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A. & WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 1–240, 2005.
- FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **American Naturalist**, v. 125, p. 1–15, 1985.
- GARAMSZEGI, L. Z. (ed.) **Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology: Concepts and Practice**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 552pp. 2014.
- GARLAND JR., T.; DICKERMAN, A. W.; JANIS, C. M. & JONES, J. A. Phylogenetic analysis of covariance by computer simulation. **Systematic Biology**, v. 43, n. 3, p. 265–292, 1993.
- GERHARDT, H. C. The evolution of vocalization in frogs and toads. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, p. 293–324, 1994.
- GERHARDT, H. C. Acoustic spectral preferences in two cryptic species of grey treefrogs: implications for mate choice and sensory mechanisms. **Animal Behavior**, v. 70, p. 39–48, 2005.
- GIARETTA, A. A.; BRANDÃO, T. F.; & MARTINS, L. B. On the advertisement call of *Bokermannohyla oxente* Lugli and Haddad, 2006 (Anura, Hylidae). **Neotropical Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 159–162, 2016.
- GINGRAS, B.; MOHANDESAN, E.; BOKO, D. & FITCH, W. T. Phylogenetic signal in the acoustic parameters of the advertisement calls of four clades of anurans. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, 134, 2010.
- GOICOECHEA, N.; DE LA RIVA, I., & PADIAL, J. M. Recovering phylogenetic signal from frog mating calls. **Zoologica Scripta**, v. 39, p. 141–154, 2010.
- GRIDI-PAPP, M.; RAND, A. S. & RYAN, M. J. Complex call production in the túngara frog. **Nature**, v. 441, p. 38, 2006.
- GUERRA, M. A. & RON, S. R. Mate choice and courtship signal differentiation promotes speciation in an Amazonian frog. **Behavioral Ecology**, v. 19, p. 1128–1135, 2008.
- HADDAD, C. F. B. & PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **Bioscience**, v. 55, n. 3, p. 207 – 217, 2005.
- HARMON, L. J.; WEIR, J. T.; BROCK, C. D.; GLOR, R. E. & CHALLENGER, W. Geiger: investigating evolutionary radiations. **Bioinformatics**, v. 24, p. 129–131, 2008.
- HARVEY, P. H. & PAGEL, M. D. **The Comparative Method in Evolutionary Biology**. New York: Oxford University Press, 239pp, 1991.
- HARVEY, P. H. & PURVIS, A. Comparative methods for explaining adaptations. **Nature**, v. 351, p. 619–624, 1991.
- JANSEN, M.; PLATH, M.; BRUSQUETTI, F. & RYAN, M. J. Asymmetric frequency shift in advertisement calls of sympatric frogs. **Amphibia-Reptilia**, v.37, n. 2, p. 137–152, 2016.
- JIM, J. & CARAMASCHI, U. Uma nova espécie da região de Botucatu, São Paulo, Brasil (Amphibia, Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 39, p. 717–719, 1979.

- KEMBEL, S. W.; COWAN, P. D.; HELMUS, M. R.; CORNWELL, W. K.; MORLON, H.; ACKERLY, D. D.; BLOMBERG, S. P. & WEBB, C. O. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. **Bioinformatics**, v. 26, p. 1463–1464, 2010.
- KIME, N. M.; RYAN, M. J. & WILSON, P. S. A bond graph approach to modeling the anuran vocal production system. **Journal of the Acoustic Society of America**, v. 133, n. 6, p. 4133–4144, 2013.
- KÖHLER, J.; JANSEN, M.; RODRÍGUEZ, A.; KOK, P. J. R.; TOLEDO, L. F.; EMMRICH, M.; GLAW, F.; HADDAD, C. F. B.; RÖDEL, M-O. & VENCES, M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, n. 1, p. 001–124, 2017.
- MADDISON, W. & SLATKIN, M. Null models for the number of evolutionary steps in a character on a phylogenetic tree. **Evolution**, v. 45, n. 5, p. 1184–1197, 1991.
- MARTIN, W. F. Mechanics of Sound Production in Toads of the Genus *Bufo*: Passive Elements. **Journal of Experimental Zoology**, v. 176, p. 273–294, 1971.
- MARTIN, W. F. & GANS, C. Muscular Control of the Vocal Tract During Release Signaling in the Toad *Bufo valliceps*, v. 137, p. 1–28, 1972.
- MCCLELLAND, B. E.; WILCZYNSKI, W. & RYAN, M. J. Correlation between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 1907–1919, 1996.
- MCCLELLAND, B. E.; WILCZYNSKI, W. & RYAN, M. J. Intraspecific variation in laryngeal and ear morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 63, p. 51–67, 1998.
- MCLISTER, J. D.; STEVENS, E. D. & BOGART, J. P. Comparative contractile dynamics of calling and locomotor muscles in three hylid frogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1527–1538, 1995.
- NALI, R. C. & PRADO, C. P. A. Complex Call with Different Messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a Gladiator Frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 48, n. 3, p. 407–414, 2014.
- NAPOLI, M. F. A new species allied to *Hyla circumdata* (Anura: Hylidae) from Serra da Mantiqueira, Southeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 61, n. 1, p. 63–69, 2005.
- NAPOLI, M. F. & PIMENTA, B. V. S. A new species of the *Bokermannohyla circumdata* group (Anura: Hylidae) from the coastal forests of Bahia, northeastern Brazil. **Copeia**, v. 2009, n. 4, p. 674–683, 2009.
- OBRIST, M.K.; PAVAN, G.; SUEUR, J.; RIEDE, K.; LLUSIA, D. & MÁRQUEZ, R. Bioacoustics approaches in biodiversity inventories. In: Manual on field recording techniques and protocols for all taxa biodiversity inventories and monitoring. (J. Eymann, J. Degreef, C.L. Häuser, J.C. Monje, Y. Samyn & D. VandenSpiegel, eds.). **Abc Taxa**, v. 8, p. 68–99, 2010.
- ORME, D., FRECKLETON, R.; THOMAS, G.; PETZOLDT, T.; FRITZ, S.; ISAAC, N. & PEARSE, W. Caper: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, p. 145–151, 2013.
- PARADIS, E.; CLAUDE, J. & STRIMMER, K. Ape: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, p. 289–290, 2004.
- PASSMORE, N. I. The relevance of the specific mate recognition concept to anuran reproductive biology. **Monitorie Zoologico Italiano**, v. 15, p. 93–108, 1981.

- PAGEL, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. **Nature**, v. 401, p. 877–884, 1999.
- PORTIK, D. M. & BLACKBURN, D. C. The evolution of reproductive diversity in Afrobatrachia: A phylogenetic comparative analysis of an extensive radiation of African frogs. **Evolution**, v. 70, n. 9, 2017–2032, 2016.
- REVELL, L. J. Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, p. 217–223, 2012.
- ROBILLARD, T.; HÖBEL, G. & GERHARDT, C. Evolution of advertisement signals in North American hylid frogs: vocalizations as end-products of calling behavior. **Cladistics**, v. 22, p. 533–545, 2006.
- ROCHA, P. C.; THOMPSON, J. R.; LEITE, F. S. F. & GARCIA, P. C. A. The advertisement call of *Bokermannohyla flavopicta* Leite, Pezzuti, & Garca, 2012 (Anura: Hylidae) from the mountains of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 4061, n. 3, p. 277–280, 2016.
- RYAN, M. J.; COCROFT, R. B. & WILCZYNSKI, W. The Role of Environmental Selection in Intraspecific Divergence of Mate Recognition. **Evolution**, v. 44, n. 7, p. 1869–1872, 1990.
- RYAN, M. J. & GUERRA, M. A. The mechanism of sound production in túngara frogs and its role in sexual selection and speciation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 28, p. 54–59, 2014.
- RYAN, M. J. & RAND, A. S. Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. **Evolution**, v. 47, n. 2, p. 647–657, 1993.
- SCHMID, E. Contribution to the morphology and histology of the vocal cords of Central European anurans (Amphibia). **Zoologische Jahrbucher Anatomie**, v. 5, p. 133–150, 1978.
- SCHLIEP, K. P. phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592–593, 2011.
- SUEUR, J.; AUBIN, T. & SIMONIS, C. Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. **Bioacoustics**, v. 18, p. 213–226, 2008.
- TAYLOR, W. R. & VAN DYKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 1985, n. 9, v. 2, p. 107–119, 1981.
- TAUCCE, P. P. G.; PINHEIRO, P. D. P.; LEITE, F. S. F. & GARCIA, P. C. A. Advertisement call and morphological variation of the poorly known and endemic *Bokermannohyla juiju* Faivovich, Lugli, Lourenço and Haddad, 2009 (Anura: Hylidae) from Central Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3915, n. 1, p. 99–110, 2015.
- WELLS, K. D. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. University of Chicago Press, Chicago, p. 1400, 2007.
- WENZEL, J. W. Behavioral homology and phylogeny. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 23, p. 361–381, 1992.
- WILCZYNSKI, W.; MCCLELLAND, B. E. & RAND, A. S. Acoustic, auditory, and morphological divergence in three species of neotropical frog. **Journal of Comparative Physiology**, v. 172, p. 425–438, 1993.
- ZAHER, H.; AGUIAR, A. & POMBAL JR., J. P. *Paratelmatobius gaigeae* (Cochran, 1938) re-discovered (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional. Rio de Janeiro**, v. 63, p. 321–328, 2005.