

Título do Projeto:

Investigação taxonômica em populações reconhecidas como *Scinax perereca* Pombal Jr., Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae)

Palavras-chave: Anfíbios, Morfologia, Bioacústica, DNA Barcode, Taxonomia.

Equipe executora:

- Paulo Henrique Silva, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de São José do Rio Preto.
- Lucas Borges de Souza Arruda, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de São José do Rio Preto.
- Lucas Rodrigo dos Santos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de São José do Rio Preto.
- Itamar Alves Martins, Universidade de Taubaté (UNITAU).

Objetivos:

- Determinar e comparar a variação interpopulacional dos caracteres morfológicos e morfométricos de *S. perereca*.
- Determinar e comparar a variação interpopulacional dos caracteres bioacústicos da espécie.
- Determinar e comparar a variação interpopulacional da sequência nucleotídica da região do terminal 5' do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase Subunidade I (DNA barcode)* dos indivíduos de *S. perereca*.
- Determinar a distribuição geográfica de *S. perereca* ao longo do gradiente latitudinal e altitudinal nos domínios da Mata Atlântica.

Justificativa:

A sistemática é a ciência da biodiversidade. Sua tarefa cotidiana consiste no reconhecimento e caracterização dos grupos (táxons) naturais e sua organização em um sistema ao mesmo tempo coerente e prático (VANZOLINI, 1993). A parte analítica da sistemática é chamada de taxonomia e de acordo com a categoria taxonômica envolvida podemos dividi-la em macro e micro-taxonomia. O estudo de populações locais e de sua compartimentação em espécies é o campo da micro-taxonomia (MAYR & ASHLOCK, 1991).

O conceito biológico primordial em taxonomia é o de população local. Este conceito deve ser enfrentado sob dois aspectos, o teórico e o prático. O primeiro consiste de uma população natural, sob o ponto de vista genético (a unidade básica do processo evolutivo). O segundo parte do princípio de quais critérios devem adotar o taxonomista para definir essa unidade básica. A importância destes conceitos para cada caso particular, está diretamente ligada ao grau de uniformidade da distribuição espacial da espécie (VANZOLINI, 1993; MAYR & ASHLOCK, 1991).

Os caracteres utilizados em taxonomia podem ser qualitativos e quantitativos, mas ambos os tipos são sujeitos à variação. A utilização de caracteres morfológicos e morfométricos na taxonomia de anfíbios anuros é o principal método utilizado durante o processo de descrição e caracterização de novas espécies (DUELLMAN, 2001). Apesar da disponibilidade de novas e avançadas técnicas, o uso de caracteres morfológicos ainda é primordial, assim como a aplicação da taxonomia integrada, utilizando morfologia, bioacústica, comportamento, análises genéticas e moleculares (*e.g.* FAIVOVICH, *et al.* 2005; GRANT, *et al.* 2006; PADIAL *et al.* 2010). Funk, *et al.* (2011) consideram que a melhor forma de se identificar a diversidade críptica de anfíbios anuros seria por meio da combinação de métodos morfológicos, bioacústicos e moleculares. A aplicação da taxonomia integrativa (“*sensu*”, PADIAL *et al.*, 2010) permite uma maior eficiência na determinação de novas espécies, principalmente dentro de complexos de espécies crípticas.

Uma das características que mais se destaca no comportamento dos anfíbios anuros, é a comunicação por sinais sonoros, sendo este de fundamental importância na biologia reprodutiva, bem como no comportamento social e provavelmente se originou no início da história evolutiva do grupo (WELLS, 2007).

O estudo das características bioacústicas tem se mostrado muito importante para identificação de anfíbios anuros. Entretanto, com as dificuldades de ordem taxonômica e o conhecimento escasso das vocalizações dos anuros neotropicais, deve haver alguns cuidados, tanto na atribuição de nomes aos diversos táxons, como na análise física dos sons (TOLEDO & HADDAD, 2005).

Os sinais sonoros dos anfíbios anuros, por ser um caractere espécie-específico, têm uma grande importância na taxonomia dos grupos (WELLS, 2007). As vocalizações dos anuros são excelentes caracteres para estudos comparativos (MARTINS & JIM, 2003, 2004). Os diferentes tipos de vocalizações emitidas pelos anuros podem ser úteis para revelar as relações evolutivas ao nível específico, revelando adaptações às pressões ambientais ou heranças filogenéticas (GOICOECHEA *et al.*, 2009). Em geral, espécies estreitamente relacionadas têm em comum algumas características acústicas (MARTINS & JIM, 2003, 2004).

O principal mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies que ocupam o mesmo tipo de ambiente é comunicação sonora. Entretanto, espécies simpátricas podem apresentar vocalizações similares e a especificidade do sinal, emitidas ao seu receptor co-específico, se realiza por meio da conjugação de parâmetros espectrais e temporais do canto (HÖDL, 1977; GERHARDT, 1994; MARTINS & JIM, 2003, 2004). O canto de anúncio (“advertisement call” “*sensu*” WELLS, 1977) definido como “canto funcional” (VIELLIARD, 1987) é importante para o reconhecimento específico na atração de fêmeas e promover espaçamento entre machos, sendo fundamental nas interações intra-específicas para promover a avaliação entre co-específicos vizinhos (WELLS, 2007).

Os anuros Neotropicais apresentam uma grande diversidade de espécies e o relacionamento ecológico e filogenético entre e dentro de grupos taxonômicos ainda não são claros (DE LA RIVA *et al.* 1996a, b; FAIVOVICH *et al.* 2005; FROST *et al.* 2006; GRANT *et al.* 2006). Estudos comparativos das vocalizações de anúncio de anfíbios anuros, baseados em parâmetros quantitativos e qualitativos, podem, até certo ponto, prover informações para a revelação de espécies crípticas (DE LA RIVA *et al.*, 1995; DUELLMAN & TRUEB, 1986) e sobre o relacionamento filogenético e ecológico de grupos particulares (MÁRQUEZ *et al.*, 1993; GRANT *et al.* 2006), representando um ótimo caminho para revelar as diferenças e afinidades taxonômicas (GERHARDT & HUBER, 2002).

A utilização da bioacústica é reconhecidamente uma importante ferramenta para determinar diferenças, similaridades e a posição taxonômica e filogenética entre táxons (COCROFT & RYAN, 1995; GERHARDT & HUBER, 2002), principalmente em espécies com distribuição simpátricas e com grande grau de parentesco (GERHARDT, 1994; RYAN, 2001).

No entanto, considerando apenas dados morfológicos, fisiológicos e comportamentais para descrever a diversidade da vida tem demonstrado limites para realização de tal tarefa, principalmente na resolução de espécies crípticas (STOECKLE & HEBERT, 2008). O desenvolvimento dos métodos da biologia molecular vem aprimorando os sistemas de identificação taxonômica (AVISE, 2004). Dessa forma, o interesse pelo uso de ferramentas moleculares para identificação de espécies aumentou significativamente durante as últimas décadas (BAKER & PALUMBI, 1994).

A eficiência do uso de marcadores genéticos para delimitar espécies, geralmente é mais significativa para populações simpátricas do que em relação as alopátricas (FRANKHAM *et al.*, 2008). Considerando o conceito reprodutivo de espécie biológica (RYDLEY, 2006), deve haver troca de alelos entre populações simpátricas, desde que pertençam a uma mesma espécie (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A estrutura do genoma e o número de alelos compartilhados proporcionam evidências definitivas para determinar o limite que existe entre as populações (SEEBECK & JOHNSON, 1980).

Assim, qualquer marcador que demonstre ausência de fluxo gênico entre duas populações simpátricas, indicará que ambas pertencem a espécies distintas. Por outro lado, marcadores genéticos são frequentemente utilizados para delimitar espécies alopátricas, e geralmente, são as diferenças cromossômicas fixadas que corroboram o *status* de espécie distinta (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Na prática, vários locos gênicos são necessários para tal diagnóstico. Diversos marcadores moleculares têm sido considerados como recursos bastante efetivos para a diagnose de populações intra e interespecíficas de diversos grupos, tais como cariótipos (HEYER, 1974; BALDISSERA *et al.* 1993; FRANCISCO *et al.* 2007), genes codificantes de DNA nuclear e mitocondrial (AVISE, 2004; HEBERT *et al.*, 2003a, 2004a, 2004b; ARMSTRONG & BALL, 2005; MARKMANN & TAUTZ, 2005; MONAGHAN *et al.*, 2005; ROE & SPELING, 2007; SMITH *et al.*, 2008a,b), e os *fingerprints* de DNA (TAYLOR *et al.* 1994; WEBER *et al.* 2008).

Dentre esses marcadores, os mais explorados são genes do DNA mitocondrial (DNAMit). A vantagem do uso desses genes é devida a alta taxa de mutação que são submetidos e a ausência de recombinação gênica (RUBINOFF, 2006). Outra vantagem apresentada pelo DNAMit é a constante relação do conteúdo e do número de genes existentes entre os metazoários, conservando desta forma, a ortologia gênica (RUSSO *et al.*, 2004).

Desde então, ainda há muita controvérsia sobre a escolha dos genes mitocondriais a serem utilizados no processo de identificação dos táxons (MORITZ & CICERO, 2004; MEYER & PAULAY, 2005; WILL *et al.*, 2005). Diversos genes do DNA mitocondrial e do DNA nuclear já foram indicados como potenciais marcadores para tal diagnose de diversos grupos de animais e plantas (HEBERT, *et al.*, 2003a; MONAGHAN *et al.*, 2005; ROE & SPELING, 2007; RACH *et al.*, 2008; PYRON & WIENS, 2011).

Entretanto, o advento de iniciativas para obter um gene padrão para reconhecer espécies, nos últimos anos, permitiu concretizar uma ferramenta eficiente para delimitar uma parcela considerável da biodiversidade conhecida de eucariotos (HEBERT *et al.*, 2003a; BLAXTER, 2004). Esta abordagem genômica explora e compara a diversidade entre as sequências de DNAMit para identificar os organismos. Essas sequências podem ser consideradas como um verdadeiro “código de barras” ou um *DNA barcode*, que encontra-se embutido em todas as células (STOECKLE & HEBERT, 2008).

O *DNA barcode* é definido como um pequeno segmento padronizado de DNAMit, e reconhecido como uma ferramenta poderosa para identificação rápida de espécies (HEBERT *et al.*, 2003a; HEBERT *et al.*, 2003b; BLAXTER, 2004; HEBERT *et al.*, 2004b). Diversos materiais biológicos podem ser utilizados como fonte molecular para a coleta de amostras, como pequenos fragmentos histológicos, ovos, formas larvais ou juvenis, conteúdo estomacal ou até mesmo excretas

(STOECKLE, 2003; STOECKLE & HERBERT, 2008). Para os animais, foi estabelecido como código de barras, *DNA barcode*, uma região padronizada de um gene mitocondrial, com aproximadamente 650 pares de bases (pb), denominado de *Citocromo c Oxidase Subunidade I* (COI) (HEBERT *et al.*, 2003a,b; STOECKLE & HERBERT, 2008).

O uso crescente dessa nova metodologia para resolução de incertezas taxonômicas resultou na criação de um banco de dados, denominado BOLD (*The DNA Barcode of Life System*), cujas sequências do *DNA barcode* de todas as espécies existentes estão sendo compiladas (RATNASINGHAM & HERBERT, 2007). Trata-se de uma plataforma integrada de bioinformática que permite associar diversos tipos de dados as amostras incluídas no sistema, como fotos do espécime, informações de campo, número de tombo, coleção científica na qual o material encontra-se depositado, dados taxonômicos e ecológicos, e informações moleculares, como eletroferogramas das sequências e quais *primers* foram utilizados na amplificação e no sequenciamento (RATNASINGHAM & HERBERT, 2007).

Outras iniciativas vêm sendo contempladas pelo incentivo a disponibilização de conhecimento sobre sequências do COI (*DNA barcode*) de diversos grupos de animais. Sequências obtidas de quase nove mil espécies de peixes estão sendo compiladas no *Fish Barcode of Life* (Fish-BOLD). Enquanto a *All Birds Barcoding Initiative* (ABBI) conta com mais de quatro mil espécies sequenciadas, além de outros, como MammaliaBOL, Bee-BOL, HealthBOL, Mar-BOL (vida marinha), PolarBOL, SharkBOL, SpongeBOL (MURPHY *et al.*, 2013). Recentemente, Murphy *et al.* (2013) propuseram o *Cold Code*, uma iniciativa global para construir um banco de dados sobre o *DNA barcode* destinado a todas espécies de vertebrados conhecidos popularmente como “animais de sangue frio” (ectotérmicos), os anfíbios e répteis.

A eficiência do *DNA barcode* é revelada na identificação bem sucedida de espécies de diversos grupos de artrópodes, peixes, anfíbios, répteis e aves (HEBERT *et al.*, 2003a, 2004a; VENCES *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2005; KERR *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2008a; VENCES *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2012; JEONG *et al.*, 2013). A alta taxa de evolução molecular do gene COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma população (HEBERT *et al.*, 2003a, 2004b; HOGG & HERBERT, 2004; VENCES *et al.*, 2004; SHANDER & WILLASSEN, 2005; WARD *et al.*, 2005; AUSTIN *et al.*, 2006; KERR *et al.*, 2007; FITZPATRICK *et al.*, 2009).

Outro benefício promissor oferecido pela análise do *DNA barcode* é o potencial de revelar espécies crípticas (HEBERT *et al.*, 2003a, 2004a; HAJIBABAEI *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006; CRAWFORD *et al.*, 2012). O estudo realizado por Hebert *et al.* (2004a) indica que as populações de borboletas sob a designação taxonômica *Astrapes fulgurator*, possivelmente, representa um complexo

de aproximadamente dez espécies crípticas. Smith *et al.* (2006) identificaram várias espécies pertencentes ao gênero *Bevolsia* (Diptera: Tachinidae) e também sugeriram a existência de espécies crípticas. Crawford *et al.* (2012) também obtiveram sucesso na identificação de linhagens crípticas, em populações mantidas “*ex situ*” e oriundas de ambientes naturais, de anfíbios anuros da República do Panamá.

O uso do *DNA barcode* para amostragem de anfíbios ainda é limitado (SMITH *et al.*, 2008a). Estes enfatizam que a alta variabilidade nucleotídica nos sítios reconhecidos pelos *primers* dificulta a padronização de um *primer* universal comum a todas as espécies de anfíbios. A carência de dados disponíveis sobre as sequências de COI, quando comparado ao compilado existente em relação a subunidade 16S do RNA ribossômico, também é outro fator que limita a obtenção de resoluções taxonômicas mais precisas (VENCES *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2008a). Alguns trabalhos também têm demonstrado dificuldades em amplificar o gene COI de alguns anfíbios (HAWKINS *et al.* 2007; SMITH *et al.*, 2008a). No entanto, o gene COI apresenta melhores performances em relação ao gene 16S para alguns anfíbios, porém recomenda-se o uso deste e outros genes mitocondriais como marcador molecular complementar (VENCES *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2012). Atualmente, o banco de dados referente ao COI para as espécies desse grupo está em processo contínuo de crescimento (ALONSO *et al.*, 2012; PINTO-SÁNCHEZ *et al.* 2012).

A Classe Amphibia é constituída por cerca de 7300 espécies pertencentes às ordens Gymnophiona, Caudata e Anura (AMPHIBIAWEB, 2014). Deste total, 6458 espécies pertencem a Ordem Anura, constituindo o maior grupo dentre os anfíbios (AMPHIBIAWEB, 2014). No Brasil, são registradas 988 espécies pertencentes à ordem Anura e distribuídas em 19 famílias (SEGALLA *et al.*, 2014).

A família Hylidae é composta por grupos de espécies que representam ótimos modelos para estudos sobre história natural, pois apresentam grandes distribuições geográficas (veja, FROST, 2015), possibilitando a obtenção de informações comparativas entre áreas ou regiões geográficas diferentes (MÁRQUEZ, *et al.*, 1993, MARTINS & JIM, 2003, FAIVOVICH, 2002, FAIVOVICH *et al.* 2005).

A família Hylidae é composta por três subfamílias (Hylinae, Pelodyadrinae e Phyllomedusinae), contendo 946 espécies (FROST, 2015), sendo a subfamília Hylinae a maior em termos de diversidade (n=678 espécies; *sensu*, FROST, 2015) e apresentando diversos clados ou grupos de espécies (*sensu*, FAIVOVICH, *et al.*, 2005).

Dentre os 41 gêneros pertencentes a subfamília Hylinae, o gênero *Scinax* Wagler, 1830, é o mais especioso, apresentando mais de 100 espécies com distribuição geográfica desde o México a Argentina e Uruguai, incluindo Ilhas do Caribe, Trinidad e Tobago e Santa Lucia (FROST, 2015;

NUNES *et al.* 2012). Segundo FAIVOVICH (2002), o gênero *Scinax* é sustentado por dois grandes clados de espécies: clado *Scinax catharinae* e o clado *Scinax ruber*. Entretanto, a posição taxonômica destes grupos de espécies ainda é incerta (NUNES *et al.* 2012).

Scinax perereca foi descrita por Pombal, Haddad & Kasahara (1995). A localidade tipo é designada como Fazendinha São Luis, município de Ribeirão Branco, Estado de São Paulo. Pombal, *et al.* (1995) também relatam o registro desta espécie para o Município de Eldorado, SP, no Vale do Ribeira e para a Estação Ecológica Juréia-Itatins, município de Iguape, SP. A partir da publicação desta espécie (POMBAL, *et al.* 1995a), todos os espécimes do complexo *S. hayii* registrados do Sul e litoral do Estado de São Paulo ao Sul do Brasil, foram arbitrariamente designados como *S. perereca*. O conhecimento sobre a distribuição geográfica de *S. perereca* é muito deficiente. Segundo Frost (2015) a distribuição de *S. perereca* é conhecida para poucas localidades do Estado de São Paulo e Rio Grande do Sul, Província de Misiones na Argentina e provavelmente no sudeste do Paraguai.

Devido às grandes variações morfológicas, morfométricas, canto de anúncio, distribuição geográfica e a escassez de dados moleculares, Haddad & Sazima (1992), Pombal *et al.* (1995a,b), Faivovich (2002), Faivovich *et al.* (2005) sugerem que dentro do complexo de espécies *Scinax hayii*, composto por *S. hayii*, *S. dolloi* e *S. perereca* possam existir mais espécies ainda não determinadas. *Scinax perereca*, apesar de ter sua biologia e vocalização descrita na publicação original, ampliar o conhecimento sobre sua distribuição geográfica e desenvolver estudos com marcadores moleculares são imprescindíveis para avaliar e inferir hipóteses a respeito de sua estrutura populacional e seu devido *status* taxonômico. Portanto, fica evidente a importância de se realizar um estudo desta natureza para melhor compreensão da diversidade de espécies crípticas da Mata Atlântica.

6. Material e Métodos

Os exemplares de *Scinax perereca* serão coletados durante o período de Agosto de 2015 a Dezembro de 2017. Serão amostrados 15 exemplares de *S. perereca* em localidades dos seguintes estados: São Paulo, município de Ribeirão Branco (localidade tipo), Estação Ecológica Juréia-Itatins e Parque Estadual de Ilhabela (litoral Sul do estado); Paraná, Parque Estadual da Graciosa; Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As coletas serão efetuadas em localidades litorâneas e também em altitudes que variam entre 1.200 a 1.600 metros acima do nível do mar.

Serão efetuadas análises morfológicas e morfométricas para os espécimes de diferentes populações de *S. perereca*. Os exemplares das populações analisadas serão individualizados em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). As Unidades Taxonômicas Operacionais são utilizadas para separar ou agrupar populações morfológicamente e geograficamente próximas. Os dados

morfológicos serão obtidos por meio da inferência qualitativa quanto ao formato do focinho (dorsal e perfil), dos tubérculos subarticular, da língua, segundo Heyer *et al.* (1990) e Duellman (2001). O padrão de coloração e a presença de faixas ou manchas na região da cabeça, inter-orbital, região dorsal, fêmur, tíbias e regiões ocultas fêmur/lateral do corpo e fêmur/tíbia serão verificados conforme é sugerido por Napoli (2000). Como auxílio, serão utilizados registros de imagens dos indivíduos vivos e fixados por meio de câmera fotográfica e microscópio digital portátil (MP 400). As imagens registradas serão arquivadas e trabalhadas no programa ImageJ 1.46. Serão mensurados 18 caracteres morfométricos, conforme Duellman (2001) e Heyer *et al.* (1990). Serão efetuadas as seguintes medidas: Comprimento-rostro-cloacal (CRC), Comprimento da cabeça (CC), Largura da cabeça (LC), Diâmetro do olho (DO), Distância inter-orbital (DIO), Distância-olho-narina (DON), Distância narina-focinho (DNF), Distância inter-nasal (DIN), Comprimento da mão (CM), Comprimento do braço (CB), Comprimento do antebraço (CaB), Comprimento do fêmur (CF), Comprimento da tíbia (CT), Comprimento do tarso (Ctar), Comprimento do pé (CP), Diâmetro do disco do terceiro dedo da mão (Dd3) e Diâmetro do disco do quarto dedo do pé (Dd4). As medidas serão efetuadas utilizando-se paquímetro digital com precisão de 0,1 mm e ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio Zeiss. Para complementação do número de exemplares a serem analisados nos estudos de morfometria e morfologia serão consultadas coleções científicas que possuem exemplares de *S. perereca* de localidades significativas para as análises. MZUSP (Museu de Zoologia da USP); ZUEC (Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso” da Universidade Estadual de Campinas); MNRJ (Museu Nacional do Rio de Janeiro); CFBH (Coleção Científica Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP); MHNCI (Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, PR; Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC). Ao decorrer do projeto, espécimes de *S. perereca* depositadas em coleções científicas não citadas acima, também poderão ser analisados.

Os dados de bioacústica serão obtidos por meio do registro do canto de anúncio, em condições naturais de campo, utilizando-se gravador Digital Marantz PMD-671 acoplado a microfone externo Sennheiser semidirecional (ME/67). Oito caracteres bioacústicos serão mensurados: frequência mínima (FMN), frequência máxima (FMX), frequência dominante (FD), duração das notas (DN), taxa de repetição das notas (RN), número pulsos por nota (NP), duração dos pulsos (DP) e taxa de repetição por pulsos (RP). Para cada exemplar registrado em campo serão gravados no mínimo três minutos de vocalização. Pretende-se obter, no mínimo, 30 notas do canto de anúncio de cada exemplar gravado. Todas as vocalizações registradas serão posteriormente arquivadas em padrão mono 16 bit. As análises bioacústicas serão realizadas em micro-computadores, utilizando-se os programas Raven (versão 1.4) e CoolEdit, 2000 com taxa de amostragem de 44.100 Hz, resolução de 16 bit e opções de filtro de 256

e/ou 1024 bandas (FFT – Fast Fourier Transform), para determinação das estruturas espectrais e temporais das vocalizações. Vocalizações de *S. perereca* também serão obtidas por meio de consulta e empréstimo de arquivos sonoros depositados em coleções de pesquisadores brasileiros.

Pequenos fragmentos de tecido muscular esquelético serão extraídos dos exemplares de cada população *S. perereca*, obtidos nas coletas das diferentes localidades amostradas, para extração e análise do DNA. As amostras de tecidos serão transferidas e conservadas em solução de etanol a 95%. O DNA total das amostras será submetido ao método de extração por coluna de rotação contendo membrana de sílica cuja afinidade eletrostática isola os fragmentos de DNA do *pool* da amostra. O protocolo de extração segue *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen) o qual fornece todos os componentes para a obtenção do material genético, tais como lise dos tecidos, precipitação e ligação do DNA a membrana de sílica, lavagem, e o isolamento das moléculas de DNA (VENCES *et al.*, 2012). A amplificação dos 650 (pb) da região terminal 5' do gene *Citocromo Oxidase I* será realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em um termociclador *Mastercycler – Eppendorf*, com a combinação de *primers* utilizados nos seguintes estudos: Smith *et al.* (2008), Che *et al.* (2012) e Vences *et al.* (2005a,b, 2012). Tipicamente, o *mix* da concentração final de PCR consiste em: *Taq DNA Polymerase* (0,03 U/uL), *PCR buffer* 1x contendo $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), *primers* (direto e reverso) e água deionizada (25 uL) (VENCES *et al.*, 2012). Os produtos do PCR serão visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, e purificados através do método EXO-SAP, que utiliza uma *Fosfatase alcalina* de camarão e uma *Exo-nuclease 1*. Os produtos purificados do PCR serão submetidos a reação de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Os eletroferogramas das sequências obtidas serão visualizadas utilizando os programas *Sequence Navigator* e *Sequence Analysis* (Applied Biosystems). Em seguida, as sequências serão alinhadas e editadas, nos programas *Codon Code Aligner 1.4.1* (Codon Code Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA) e *BioEdit*, respectivamente, com o objetivo em obter sequências consenso para cada indivíduo e verificar se há ambiguidades e códons de parada inesperados.

Os registros de distribuição geográfica de *S. perereca* serão efetuados para cada localidade com base na determinação das coordenadas (latitude e longitude) a serem inventariadas nas coleções científicas e em coletas de campo. Todas as localidades serão plotadas em mapas segundo suas coordenadas geográficas e informações altitudinais. Com a finalidade de se visualizar a distribuição das espécies e/ou UTOs dentro de uma realidade topográfica, será utilizado o modelo de elevação digital global (MED ou DEM) GTOPO30, U. S. Geological Survey, EROS Data Center.

Os exemplares adultos de anfíbios anuros coletados como espécimes testemunho sofrerão eutanásia por meio de anestésico Tiopental sódico (50 mg/Kg) ou Xilestesin (cloridrato de lidocaina 2%). Os espécimes

coletados neste estudo serão depositados na Coleção Científica do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté (CCLZU / IAM). As vocalizações registradas serão arquivadas no formato WAVE e depositadas na Coleção Sonora Itamar A. Martins. As amostras de tecidos tomadas dos espécimes para a análise molecular serão depositadas na Coleção Científica de Tecidos do Laboratório de Herpetologia Célio F. B. Haddad (CFBHT), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. As sequências da região amplificada do terminal 5' do gene *Citocromo Oxidase I* (COI) das amostras serão incluídas no BOLD (*The DNA Barcode of Life System*) e na plataforma herpetológica *Cold Code*.

As análises estatísticas serão efetuadas de forma independentes para os dados de morfometria, bioacústica e molecular, sendo esses dados analisados pelos testes estatísticos de análise fundamental discriminante (AFD) e análise de componentes principais (ACP) ambas são técnicas estatísticas de análise multivariada. A análise discriminante é uma função que procura características aptas para destinar objetos a grupos antecipadamente definidos. Essa função pode servir para separar ou alocar objetos em grupos, consequentemente essa análise reduz a probabilidade de má classificação. Os dados serão submetidos a essa análise visando classificar as populações em grupos de caracteres semelhantes ou separá-las. Posteriormente os resultados serão submetidos à análise de componentes principais (ACP), essa técnica permite a seleção e interpretação de um conjunto de dados com muitas variáveis correlacionadas. As informações morfométricas e bioacústicas apresentam várias características e essas, devem ser observadas e analisadas ao mesmo tempo. Utilizando a ACP será possível observar todas essas características e identificar quais são responsáveis pelas maiores variações nos resultados, ou seja, a ACP maximizará a variação dos dados analisados. *Teste-t student* será efetuado a fim de investigar diferenças significativas entre as medidas morfométricas das UTOs e comparar as variáveis espectrais e temporais do canto de anúncio de *S. perereca*. A utilização do *teste-t student* associado aos testes mais refinados (multivariada) permitirão reconhecer divergências no reconhecimento específico entre e dentre as Unidades Taxonômicas Operacionais. No BOLD, a identificação de espécies será realizada pela comparação das sequências obtidas das amostras de tecido com as sequências incluídas no banco de dados. A diversidade intra-específica e as divergências inter-específicas entre as sequências de nucleotídeos obtidas das populações de *S. perereca* serão calculadas por métodos de distância genética, segundo o modelo evolutivo *Kimura 2 parâmetros* (K2P) (KIMURA, 1980) no programa *Mega 4.0* (TAMURA *et al.*, 2007). As sequências do gene *Citocromo Oxidase I* (DNA barcode) serão alinhadas, juntamente com as sequências existentes no BOLD, e serão agrupadas com as 100 sequências mais similares encontradas no sistema. Em seguida, esses dados serão utilizados para construir uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987), adotando o modelo K2P e o método de *bootstrap* para obter o suporte dos agrupamentos (FELSENSTEIN, 1985). E assim, a

identidade das populações de *Scinax perereca* poderá ser atribuída conforme a correspondência de similaridade obtida entre as sequências (FRÉZAL & LEBLOIS, 2008). Segundo Rubinoff (2006), a identificação correta dos táxons pode ser reconhecida apenas as amostras que apresentarem um índice de similaridade, em média, superior a 98% ($p < 0,02$). A análise dos dados morfológicos será realizada de caráter qualitativo. Novas formas de análises estatísticas poderão ser incorporadas ao longo do desenvolvimento do projeto em virtude dos resultados obtidos.

Referências Bibliográficas

- ALONSO, R., CRAWFORD, A.J. & BERMINGHAM, E. 2012. Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: Peltophryne) based on mitochondrial and nuclear genes. *J. Biogeogr.* (39): 434–451.
- AMPHIBIAWEB. 2014. Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2014. Berkeley, California: *AmphibiaWeb*. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: Oct, 29, 2014).
- AUSTIN, J.D., LOUGHEED, S.C., MOLER, P.E. & BOAG, P.T. 2003. Phylogenetics, zoogeography, and the role of dispersal and vicariance in the evolution of the *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) species group. *Biological Journal of the Linnean Society*. (80): 601-624.
- AVISE, J.C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- BAKER, C.S. & PALUMBI, S.R. 1994 Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*. (265): 1538–1539.
- BALDISSERA-Jr., F.A., OLIVEIRA, P.S.L. & KASAHARA, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* speies (Amphibia: Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Re. Brasil. Genet.* 16(2): 335-345.
- BALL, S.L. & ARMSTRONG, K.F. 2005. A DNA-based identification system for insect pests: a test case with the Lymantriidae. *Can. J. For. Res.* 35, in press.
- BLAXTER, M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (359): 669–679.
- BROWN, S., MCLAUGHLIN, W., JEREZ, I.T. & BROWN, J.K. 2002. Identification and distribution of *Bemisia tabaci* (Gennadius; Homoptera: Aleyrodidae) haplotypes in Jamaica. *Tropic. Agric.* (79): 140-149.
- COCROFT, R.B. & RYAN, M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour*. (49): 283-303.
- CRAWFORD, A.J., CRUZ, C., GRIFFITH, E., ROSS, H., IBÁÑEZ, R., LIPS, K.R., DRISKELL, A.C., BERMINGHAM, E. & CRUMP, P. 2012. DNA barcoding applied to *ex situ* tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Mol. Ecol. Resources.* (12): 1-14.

- DE LA RIVA, I., MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. 1996a. The advertisement calls of three South American poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae), with comments on their taxonomy and distribution. *Journal of Natural History*. (30): 1413–1420.
- DE LA RIVA, I., MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. 1996 b. Advertisement calls of microhylid frogs from Bolívia (amphibia, Anura). *Am. Midl. Nat.* (136): 418–422.
- DE LA RIVA, I., R. MÁRQUEZ & J. BOSCH. 1995. Advertisement calls of eight bolivian hylids (Amphibia, Anura). *J. Herpetol.*, 29(1): 113–118.
- DUELLMAN, W.E. 2001. *The Hylid Frogs of Middle America*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca, 2v., xvi, 1158pp, 92 pls.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. 1986. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill, 670p.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A. & WHEELER, W.C. 2005. Systematic review of the frog family, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. (294): 1–240.
- FAIVOVICH, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* (18): 367–393.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* (39): 783–791.
- FITZPATRICK, S.W., BRASILEIRO, C.A., HADDAD, C.F.B. & ZAMUDIO, K.R. 2009. Geographical variation in genetic structure of Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* (18): 2877–2896.
- FRANCISCO, M.R., GIBBS, H.L., GALETTI, M. LUNARDI, V.O. & GALETTI-Jr., P.M. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding Bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic forest. *Mol. Ecol.* (16): 4908–4918.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2008. *Fundamentos de genética da conservação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280p.
- FRÉZAL, L. & LEBLOIS, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Inf. Gen. Evo.* (8): 727–736.
- FROST, D. R. 2015. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.5 (31 January, 2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- FROST, D.R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C.F.B., DE SÁ, R.O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S.C., RAXWORTHY, C.J., CAMPBELL, J.A., BLOTTO, B.L., MOLER, P., DREWES, R.C., NUSSBAUM, R.A., LYNCH, J.D., GREEN, D.M. & WHEELER, W.C. 2006. The Amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* (297): 1–370.
- FUNK, W.C., CAMINER, M., SANTIAGO R. & RON, S.R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc. R. Soc. B* doi:10.1098/rspb.2011.1653.
- GERHARDT, H.C. & HUBER, F. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans: common problems and diverse solutions*. The University of Chicago press, Chicago, 531p.
- GERHARDT, H.C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Ann. Rev. Syst.* (25): 293–324.

- GRANT, T., FROST, D.R., CALDWELL, J.P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C.F.B., KOK, P.J.R., MEANS, D.B., NOONAN, B.P., SCHARGEL, W.E. & WHEELER, W.C. (2006): Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull Am Mus Nat Hist* (269): 1-262.
- GOICOECHEA, N., DE LA RIVA, I. & PADIAL, J.M. 2009. Recovering phylogenetic signal from frog mating calls. *Zoologica Scripta*, (39): 141-154.
- HADDAD, C.F.B. & SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. p 188-211. In: Morellato, L. P. C. (Org.). *História natural da Serra do Japi. Ecologia e Preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Editora da UNICAMP.
- HAJIBABAEI, M., DeWAARD, J.R., IVANOVA, N.V., RATNASINGHAM, S., DOOH, R.T., KIRK, S.L., MACKIE, P.M. and HEBERT, P.D.N. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (360): 1959–1967.
- HAWKINS, M.A., SITES-Jr., J.W. & NOONAN, B.P. 2007. *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) of the Guiana Shield: using DNA barcodes to assess identity and diversity. Magnolia Press. *Zootaxa*. (1540): 61-67.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., SHELLEY, L.B. & WAARD, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (270): 313–321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & WAARD, J. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Philos. Transac. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* (270): S96–S99.
- HEBERT, P.D.N., STOECKLE, M.Y., ZEMLAK, T.S. & FRANCIS, C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol.* (2): 1-6.
- HEYER, W. R. 1974. Systematics of the pentadactylus Species Group of the Frog Genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). Series: Smithsonian Institution. Smithsonian contributions to zoology, n. 301.
- HEYER, W.R., RAND, A.S., CRUZ, C.A.G., PEIXOTO, O.L. & NELSON, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* (31): 231-410.
- HÖDL, W. 1977. Call differences and calling site segregation in anuran species from Central Amazonian floating meadows. *Oecologia (Berl)* (28): 351-363.
- HOGG, I.D. & HEBERT, P.D.N. 2004. Biological identifications of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.* (82): 1–6.
- KERR, K.C.R., STOECKLE, M.Y., DOVE, C.J., WEIGT, L.A., FRANCIS, C.F. & HEBERT, P.D.N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Resources.* (7): 535-543.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* (16): 111–120.
- JEONG, T.J., JUN, J., HAN, S., KIM, H.T., OH, K. & KWAK, M. 2013. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Mol. Ecol. Resources.* (13): 1-14.
- MARKMANN, M. & TAUTZ, D. 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (360): 1917-1924.

- MARTINS, I.A. & JIM, J. 2003. Bioacoustic analysis of advertisement call in *Hyla nana* and *Hyla sanborni* in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 63(3): 507-516.
- MARTINS, I.A. & JIM, J. 2004. Advertisement Call of the *Hyla jimi* and *Hyla elianeae* (Anura, Hylidae) in Botucatu Region, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B): 645-654.
- MÁRQUEZ, R., DE LA RIVA, I. & BOSCH, J. 1993. Advertisement call of Bolivian species of *Hyla* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica* 25(4): 426-443.
- MAYR, E. & ASHLOCK, P.D. 1991. *Principles of Systematic Zoology*. 2nd edition. Singapore: McGraw-Hill.
- MEYER, C.P. & PAULAY, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Plo Biol.* (3): 1-10.
- MONAGHAM, M.T., BALKE, M., GREGORY, T.R. & VOGLER, A.P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, (275): 237-247.
- MORTIZ, C. & CICERO, C. 2004. DNA Barcoding: promise and pitfalls. (2): 1529-1531.
- MURPHY, R.W., CRAWFORD, A.J., BAUER, A.A.M., CHE, J., DONNELLAN, S.C., FRITZ, U., HADDAD, C.F.B., NAGY, Z.T., POYARKOV, N.A., VENCES, M., WANG, W-Z. & ZHANG, Y-P. 2013. Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. *Mol. Ecol. Resources.* (13): 161-167.
- NAPOLI, M.F. 2000. Taxonomia, variação morfológica e distribuição geográfica das espécies do grupo de *Hyla circumdata* (Cope, 1870) (Amphibia, Anura: Hylidae). Rio de Janeiro. UFRJ, Museu Nacional (Tese), 208p.
- NUNES, I., KWET, A. & POMBAL, J.P.Jr. 2012. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). *Copeia*. (3): 554-569.
- PADIAL, J.M., CASTROVIEJO-FISHER, S., KÖHLER, J., VILÀ, C., CHAPARRO, J.C. & DE LA RIVA I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*. (38): 431-447.
- PADIAL, J. M., MIRALLES, A., DE LA RIVA I. & VENCES, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. (7): 1-14.
- PINTO-SÁNCHEZ, N.R., IBÁÑEZ, R., MADRIÑÁN, S., SANJUR, O.I., BERMINGHAM, E. & CRAWFORD, A.J. 2012. The Great American biotic interchange in frogs: Multiple and early colonization of Central America by the South American genus *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* (62): 954-972.
- POMBAL, J.P., JR., HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. 1995a. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*. (29): 1-6.
- POMBAL, J.P., JR., BASTOS, R.P. & HADDAD, C.F.B. 1995b. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. *Naturalia* (20): 213-225.
- PYRON, R.A. & WIENS, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* (61): 543-583.

- RACH, J., DeSALLE, R., SARKAR, I.N., SCHIERWATER, B. & HADRYIS, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. B.* (275): 237–247.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* (7): 355–364.
- ROE, A.D. & SPERLING, F.A.H. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* (44): 325–345.
- RUBINOFF, D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv. Biol.* (4): 1026–1033.
- RUSSO, C.A.M., MIYAKI, C.Y. & PEREIRA, S.L. 2004. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. Pp 108-116 in: Mاتيoli, S.R., ed. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- RYAN, M.J. 2001. *Anuran communication*. Smithsonian Institution Press, Washington, London, 252p.
- RYDLEY, M. 2006. *Evolução*. Artmed Editora, Porto Alegre, 3ª ed., 752p.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol. Biol. Evol.* (4): 406–425.
- SEEBECK, J.H. & JOHNSON, P.G. 1980. *Potorous longipes* (Marsupialia: Macropidae): a new species from Eastern Victoria. *Aust. J. Zool.* (28): 119-134.
- SEGALLA, M.V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G., GARCIA, P.C.A., GRANT, T., HADDAD, C. F. B & LANGONE, J. 2014. *Brazilian amphibians – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on *date of your online consult*.
- SHANDER, C. & WILLASSEN, E. 2005. What can biological barcoding do for marine biology? *Mar. Biol. Res.* (1): 79–83.
- SMITH, M.A., POYARKOV, N.A. & HEBERT, P.D.N. 2008a. COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Notes* (8): 235–246.
- SMITH, M.A., RODRIGUEZ, J.J., WHITFIELD, J.B., DEANS, A.R., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. 2008b. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (34): 12359-12364.
- SMITH, M.A., WOODLEY, N.E., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (103): 3652-3657
- STOECKLE, M.Y. 2003. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53(9): 1-2.
- STOECKLE, M.Y. & HERBERT, P.D.N. 2008. Barcode of Life. *Scientific American*, INC, 82-88.
- TAYLOR, A.C., SHERWIN, W.B. & WAYNE, R.K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Mol. Ecol.* (3): 277-290.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* (24): 1596-1599.

- TOLEDO, L.F. & HADDAD, C.F.B. 2005. Acoustic repertoire and calling site of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*, 39(3): 455-464.
- VANZOLINI, P. E. 1993. Métodos estatísticos elementares em sistemática zoológica. Editora Hucitec, São Paulo, 130p.
- VENCES, M., KOSUCH, J., RÖDEL, M., LÖTTERS, S., CHANNING, A., GLAW, F. & BÖHME, W. 2004. Phylogeography of *Ptychadena mascareniensis* suggests transoceanic dispersal in a widespread African-Malagasy frog lineage. *Journal of Biogeography* (J. Biogeogr.) (31): 593-601.
- VENCES, M., NAGY, Z.T., SONET, G. & VERHEYEN, E. 2012. DNA barcoding amphibians and reptiles. Pp.79-107 in Kress, W.J. & Erickson, D.L. (eds.) DNA barcodes: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 858: DOI 10.1007/978-1-61779-591-6_5, ©Springer Science Business Media, LLC.
- VENCES, M., THOMAS, M., van der MEIJDEN, A., CHIARI, Y. & VIEITES, D.R. 2005a. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. (2): 5.
- VENCES, M., THOMAS, M., BONETT, R.M., & VIEITES, D.R. 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc.* (360): 1859-1868.
- VIELLIARD, J.M.E. 1987. A diversidade de sinais e sistemas de comunicação sonora na fauna brasileira. I Seminário Musica Ciência Tecnologia: Acústica Musical, p.145-152
- WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. & HEBERT, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.* (360): 1847-1857.
- WEBER, L.I., HILDEBRAND, A.F., PEDRASSI, G., LEVY, A. & COLARES, E.P. 2008. Microsatellite genotyping from faeces in the Neotropical river otter, *Lontra longicaudis* from the south of Brazil. *Iheringia Sér. Zool.*
- WELLS, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim. Behav.* (25): 666-693.
- WELLS, K. D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago. 1148p.
- WILL, K.W., MISHLER, B.D. & WHEELER, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* (54): 844-851.
- XIA, Y., GU, H-F., PENG, R., CHEN, Q., ZHENG, Y-C., MURPHY, R.W. & ZENG, X-M. 2012. COI is better the 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia, Caudata: Hynobiidae). *Mol. Ecol. Notes.* (12): 48-56.

Cronograma Físico:

Atividades MESTRADO/mês	2015											2016											2017	
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Revisão da literatura	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Atividade de campo						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Análise dos resultados										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
Redação da dissertação																	x	x	x	x	x	x		
Exame de qualificação																				X				
Defesa da Dissertação																								X

Origem dos Recursos: Bolsa (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes).