

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**Divergência acústica e morfológica em populações de *Allobates*  
*femorialis* (Anura, Dendrobatidae) do alto Rio Madeira.**

**PEDRO IVO SIMÕES**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (PPG – BTRN) do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia.**

**Manaus - AM  
2006**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**Divergência acústica e morfológica em populações de *Allobates  
femorialis* (Anura, Dendrobatidae) do alto Rio Madeira.**

**PEDRO IVO SIMÕES**

**ORIENTADORA: Dra. ALBERTINA PIMENTEL LIMA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (PPG – BTRN) do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia.**

**Fontes Financiadoras: CAPES (P. N° 12002011003MO) / FURNAS Centrais Elétricas S.A. / Fundação Djalma Batista / The Austrian Science Foundation (P. 15345/2002-2005).**

**Manaus - AM  
2006**

Simões, Pedro Ivo

Divergência acústica e morfológica em populações de *Allobates femoralis* (Anura, Dendrobatidae) do alto Rio Madeira / Pedro Ivo Simões – 2006.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – INPA/UFAM, 2006.

1. Anfíbios 2. Biogeografia 3. Bioacústica 4. Morfologia 5. Variação populacional

CDD 19. ed. 597.604 5

**Sinopse:**

Este estudo avaliou padrões de divergência em caracteres acústicos e de morfologia externa do anuro amazônico *Allobates femoralis* (Fam. Dendrobatidae), evidenciando a influência do leito do Alto Rio Madeira e de eventos tectônicos históricos na determinação desses padrões na região.

**Palavras-Chave:** Anfíbios, *Allobates femoralis*, biogeografia, bioacústica, morfologia externa, variação fenotípica, Hipótese de Rios como Barreiras, Rio Madeira.

**Keywords:** Amphibians, *Allobates femoralis*, biogeography, bioacoustics, external morphology, phenotypic variation, Riverine Hypothesis, Madeira River.

*Aos meus pais, Nelson e Aneli, e à minha irmã, Ana Carolina.*

## AGRADECIMENTOS

- A Albertina P. Lima pela incrível dedicação e determinação ao me orientar durante todas as etapas deste trabalho. Também sou grato por todas as oportunidades a mim oferecidas e pela convivência enriquecedora, em campo e durante meu tempo no instituto.
- A Walter Hödl, por todo o suporte fornecido ao longo do trabalho, pela ajuda nas atividades de campo e cuja inabalável insistência e instinto científico deram origem a alguns dos dados mais interessantes deste estudo. Também por permitir que parte de seu acervo fotográfico ilustrasse este trabalho e pela revisão crítica da versão final da dissertação .
- A Bill Magnusson, pelo imprescindível auxílio durante a análise dos dados, pelas críticas construtivas e sugestões ao longo de todo o trabalho e, acima de tudo, por ser um excelente professor.
- À equipe de campo: Edivaldo (Ed) Vasconcelos , Antônio Coelho, Adailton da Silva e Francisco Barbosa Filho, pela agradável convivência e sem a ajuda dos quais não teria conseguido um número tão representativo de gravações e animais coletados. A Antônio Coelho sou grato também pela cordialidade com que, juntamente com sua família, recebeu-me em Porto Velho.
- Aos barqueiros Manoel de Oliveira, Cristian de Miranda e Juarez Rocha, pela habilidade com que enfrentaram o temperamental Rio Madeira.
- A Raimundo Lima, pelo apoio logístico em Rondônia e por toda atenção concedida ao projeto.
- O presente trabalho esteve incluído no projeto “*Estudos Ambientais no Rio Madeira, no Trecho Cachoeira de Santo-Antônio – Abunã (Rondônia): Inventário de Herpetofauna*”, e contou com financiamento de Furnas Centrais Elétrica S.A.. Agradeço à empresa pelo financiamento, suporte logístico e por permitir que profissionais tão capacitados integrassem a equipe de campo.
- À população ribeirinha do Alto Rio Madeira, em especial àqueles que permitiram nossa estadia em suas propriedades.
- A Adolfo Amézquita, por aceitar co-orientar este trabalho e permitir meu acesso a seu laboratório na Universidad de Los Andes, em Bogotá.
- A Luciana K. Erdtmann, Vicky Flechas, Bibiana Rojas e ao restante do *Grupo de Ecofisiología del Comportamiento y Herpetología* da Universidad de Los Andes, pela ajuda durante as análises acústicas e por tornar minha estadia em Bogotá muito agradável. Também aos funcionários da Universidad de Los Andes, pela presteza com que me atenderam.

- Aos pesquisadores, professores e amigos Mario Cohn-Haft, Claudia Keller e Selvino Neckel, que contribuíram com críticas e sugestões ao projeto de dissertação. À Claudia Keller e ao Mario Cohn-Haft sou grato também pela revisão da versão final desta dissertação.
- Aos amigos do Siglab-INPA (Débora, Juju, Santiago, André, Edwin, Jorge e Arnaldo Carneiro) pelo auxílio com conversões de coordenadas, obtenção de imagens de satélites e tarefas afins.
- Ao pesquisador e amigo Paulo Sérgio Bernarde, pela revisão da versão final da dissertação e pelo constante incentivo.
- Ao pesquisador Célio F. B. Haddad pelas sugestões e pela revisão crítica da versão final da dissertação.
- À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.
- À Austrian Science Foundation, representada pelo Dr. Walter Hödl, por tornar possível meu deslocamento até Bogotá para realizar as análises acústicas, com recursos do projeto N° 15345/2002-2005.
- A licença para coleta de material biológico foi concedida pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios, RAN-IBAMA (Licença de Coleta e Transporte N°131/04-RAN, processo 02010.003199/04-76). Agradeço aos funcionários do centro pela rapidez e eficiência com as quais analisaram o projeto.
- Aos docentes e pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA, pelos ensinamentos e pela convivência, sempre muito frutífera.
- A todos os amigos, próximos ou distantes, que de diversas formas ajudaram (e ajudam) a mover meus projetos e minha vida.
- Em especial, agradeço à Carla Bantel, Daniela Rossoni, Juliana Almeida, Juliana Leoni, Amanda Mortati e Valdely Kinupp, cujas trajetórias de vida, em algum tempo, influenciaram a minha.
- À minha pequena e preciosa família, por todo o suporte e carinho, sempre.

## RESUMO

Desde o século XIX, pesquisadores investigam a hipótese de que os grandes rios amazônicos funcionam como barreiras à dispersão de animais. Entretanto, estudos de caso usando anuros não detectaram este efeito dos rios da região até o momento. Este estudo buscou avaliar a influência do alto Rio Madeira sobre a divergência acústica e morfológica do dendrobatídeo *Allobates femoralis*. Para isso, foram estabelecidas 17 áreas de coleta em ambas as margens do Rio Madeira, no Estado de Rondônia, onde registrei os cantos de anúncio, peso e variáveis morfológicas externas de machos. Encontrei dois morfotipos distintos, que provavelmente representam táxons diferentes. Um, com cantos de anúncio de 2 notas, ocorreu apenas na parte ocidental da margem esquerda do rio, alcançando uma zona de contato parapátrica com o segundo morfotipo, onde atualmente não existem barreiras aparentes à dispersão. O segundo morfotipo, com cantos de 4 notas, ocorreu nos dois lados do rio. Análises de variância multivariadas (MANOVA) mostraram que, mesmo considerados os efeitos do tamanho do corpo, temperatura do ar e distância entre áreas de coleta, existem 3 grupos distintos em relação a características acústicas do canto e morfologia: Grupo 1: populações pertencentes ao morfotipo com cantos de 2 notas; Grupo 2: populações pertencentes ao morfotipo de 4 notas da margem esquerda; e Grupo 3: populações do morfotipo de 4 notas da margem direita. Diferenças nos comprimentos relativos dos dedos palmares e fator de condição em amostras do morfotipo de 4 notas corroboraram esses resultados. Concluí que existe evidência de que o alto Rio Madeira delimite populações distintas de *A. femoralis*. No entanto, uma população incluída nas análises acústicas e outra incluída nas análises morfológicas não corresponderam ao padrão encontrado, sugerindo que o efeito do rio não foi suficiente para resultar em diferenças totalmente fixas entre populações de margens opostas. Além da separação de populações pelo leito do rio, fatores geológicos como o limite entre dois domínios geo-morfológicos na margem esquerda do alto Rio Madeira, parecem ser necessários para explicar a divergência vocal e morfológica entre os morfotipos de *A. femoralis* encontrados na região.

## ABSTRACT

Since the 19th century, researchers have hypothesized that large Amazonian rivers function as barriers to dispersal. However, case studies using anurans detected no river effect to date in the region. This study aimed to determine the influence of the upper Madeira River on acoustic and morphological divergence patterns in populations of the dart-poison frog *Allobates femoralis*. Seventeen collecting sites were established in forested areas on both margins of the upper Madeira River, in the Brazilian State of Rondônia, where I recorded the advertisement calls, weights and external morphological variables of *E. femoralis* males. I encountered two very distinct morphotypes, which probably represent distinct taxa. One, with a 2-note advertisement call, occurs only on the left bank of the upper Madeira River, up to a parapatric contact zone with the second morphotype, where there are presently no apparent barriers to dispersal. The second morphotype, with a 4-note advertisement call, occurs on both sides of the river. Multivariate analysis of variance (MANOVA) showed that, once the effects of body size, air temperature and distances between collecting sites have been removed, there are 3 distinct groups relative to vocalizations and morphology: Group 1: populations belonging to the 2-note call morphotype; Group 2: populations belonging to the 4-note calls morphotype inhabiting the left riverbank; and Group 3: populations belonging to the 4-note calls morphotype inhabiting the right riverbank. Differences between relative finger lengths and body condition among samples of the 4-note morph corroborated those results. We conclude that there is evidence for the upper Madeira River delimiting distinct populations. However, at least one population sample included in the acoustic analysis and another included in the morphological analysis did not correspond to the general divergence pattern, suggesting that the river effect has not been sufficient to result in fixed differences between populations of *A. femoralis* on opposite riverbanks. Therefore, besides the separation of population by the riverbed, geological features such as a limit between two geo-morphological units found on the left bank, are necessary to explain the vocal and morphological divergence between the *A. femoralis* morphotypes found in this region.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A - Coloração dorsal de um indivíduo típico de <i>E. femoralis</i> ; B - Macho utilizando tronco caído como sítio de vocalização, exibindo coloração lateral; C - Macho em atividade de vocalização....	19
<b>Figura 2:</b> <i>E. femoralis</i> vocaliza em sessões como a ilustrada no audioespectrograma.....	20
<b>Figura 3:</b> Imagem ZULU da área de estudo e sua localização relativa no Brasil e Estado de Rondônia. Os pontos correspondem às 19 áreas de coleta visitadas .....	23
<b>Figura 4:</b> A – Dentre uma sessão de cantos, foram selecionados os 10 cantos mais centrais para a análise; B – Dentre os 10 cantos selecionados, foram escolhidos os três mais “limpos”, ou seja, com melhor resolução e menor sobreposição com outros ruídos.....	25
<b>Figura 5:</b> Exemplo de utilização da ferramenta <i>Selection Spectrum</i> do Raven 1.2.....	26
<b>Figura 6:</b> Localização da 20 medidas morfométricas utilizadas utilizadas nas análises de variação em morfologia externa.....	31
<b>Figura 7:</b> Audioespectrogramas e aspecto de coloração dos morfotipos de <i>E. femoralis</i> encontrados na área de estudo.....	35
<b>Figura 8:</b> Imagem ZULU da área de estudo apontando pontos efetivos de coleta. Pontos em cores diferentes indicam a distribuição dos dois morfotipos de <i>E. femoralis</i> encontrados na área .....	36
<b>Figura 9:</b> A - Componentes principais construídos com variáveis acústicas presentes em ambos os morfotipos; B - Mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta.....	38
<b>Figura 10:</b> Componentes principais construídos com variáveis acústicas do morfotipo de 4 notas e mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta.....	40
<b>Figura 11:</b> Vetores de peso de cada variável acústica em espaço bidimensional originados pela análise de componentes principais, mostrando ortogonalidade entre variáveis espectrais e temporais.....	41
<b>Figura 12:</b> Valores médios FMC e DC por ponto de coleta para o morfotipo de 4 notas e mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta.....	42
<b>Figura 13:</b> Disposição das populações amostradas ao longo dos omponentes principais construídos com as variáveis morfométricas.....	45
<b>Figura 14:</b> Vetores de peso das variáveis morfológicas em espaço bidimensional originados pela análise de componentes principais.....	46
<b>Figura 15:</b> Relações entre comprimentos relativos dos dedos para populações de 4 notas da margem direita (D) e esquerda (E) do rio Madeira.....	47
<b>Figura 16:</b> As setas apontam uma localidade no lado direito (Mutum-DA) cujos indivíduos também possuem dedos I relativamente longos.....	48
<b>Figura 17:</b> Variação do fator de condição individual de acordo com morfotipo (A) e lado do rio, somente para o morfotipo de 4 notas (B).....	49
<b>Figura 18:</b> Domínios geomorfológicos da Alto Rio Madeira, com ênfase na área da zona de contato entre moroftipos.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Numeração, designação e coordenada (em coordenadas geográficas ou UTM*) de cada ponto de coleta.....	<b>24</b>
<b>Tabela 2:</b> Siglas e descrições das variáveis acústicas. A terceira e quarta colunas apresentam, respectivamente, o conjunto de variáveis acústicas utilizadas em análises que envolveram todos os animais amostrados e as utilizadas em análises que utilizaram apenas animais pertencentes ao morfotipo com cantos de anúncio constituídos por 4 notas. ....	<b>27</b>
<b>Tabela 3:</b> Siglas e descrições das variáveis morfológicas externas.....	<b>31</b>
<b>Tabela 4:</b> Pesos das variáveis acústicas temporais e espectrais nos dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais realizada para os morfotipos agrupados.....	<b>37</b>
<b>Tabela 5:</b> Pesos das variáveis acústicas temporais e espectrais nos dois primeiros componentes da análise de componentes principais realizada para o morfotipo de 4 notas.....	<b>39</b>
<b>Tabela 6:</b> Pesos das variáveis morfométricas sobre dois primeiros componentes da análise de componentes principais .....	<b>44</b>

# SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
1 INTRODUÇÃO	11
2 MÉTODOS	18
2.1 <i>Allobates femoralis</i>	18
2.2 Área de estudo	20
2.3 Delineamento amostral	21
2.4 Coleta e análise de dados	24
2.3.1 Dados acústicos	24
2.3.2 Dados morfológicos	30
3 RESULTADOS	34
3.1 Análises acústicas	36
3.2 Análises morfológicas	43
4 DISCUSSÃO	50
Referências bibliográficas	57
Apêndice I: Distância relativa entre áreas de coleta	61
Apêndice II: Configurações do <i>software</i> Raven 1.2 utilizadas nas análises acústicas	62
Apêndice III: Número de animais coletados por área de coleta	63

## **1 Introdução**

Desde o Século XIX, pesquisadores têm relatado a coincidência entre grandes rios amazônicos e os limites de distribuição de organismos taxonomicamente relacionados. Alfred Russel Wallace, estudando a distribuição de primatas na Amazônia, constatou que os leitos dos rios Negro e Madeira representavam o limite de ocorrência de algumas espécies, as quais ocasionalmente ocorriam em simpatria apenas em regiões próximas às nascentes destes rios (Wallace, 1852 *apud* Patton *et al.*, 2000). Suas descobertas deram origem à hipótese de que grandes rios amazônicos funcionariam como barreiras à dispersão, permitindo a ocorrência de processos de diversificação genética independentes em populações de uma mesma espécie residentes em margens distintas. Grande parte das implicações de tal hipótese pôde ser deduzida diretamente das descrições fornecidas por Wallace. Todavia, estudos posteriores abordando padrões de distribuição de espécies e padrões de variabilidade morfológica e genética em aves e mamíferos (Capparella, 1987; Ayres & Clutton-Brock, 1992; Peres *et al.* 1996; Cohn-Haft, 2000) propuseram algumas premissas para seu funcionamento.

Outras teorias para a origem da biodiversidade amazônica, como a dos refúgios florestais pleistocênicos (Haffer, 1969, 1974) e a das incursões marítimas do Terciário Superior (Nores, 1999), admitem que os grandes rios desempenhem um papel complementar a eventos vicariantes prévios, servindo como barreiras à dispersão secundária de populações que divergiram em outros locais e por outras causas. Por sua vez, a hipótese de rios como barreiras admite que populações de uma mesma espécie tornaram-se isoladas em margens opostas, durante a ontogênese de um rio, o qual atuaria como fator vicariante até o presente. Dessa forma, o tempo de

divergência dos táxons deve coincidir com a idade de formação das bacias hidrográficas sobre as quais ocorrem. Para a Bacia Amazônica, o desenvolvimento dos grandes rios data de 1 a 10 milhões de anos antes do presente.

Outra premissa da hipótese é a de que um maior grau de diferenciação deve ser observado entre populações de espécies de florestas de terra-firme em detrimento de populações de espécies típicas de ambientes de várzea ou ambientes abertos. Para estas últimas, a barreira seria representada apenas pelo leito do rio, enquanto para as espécies de floresta, a barreira seria representada pelo leito do rio e as áreas de várzea, ou sem cobertura vegetal, adjacentes às margens (Gascon *et al.*, 1998). Por fim, variações devem ser mais pronunciadas entre populações separadas por porções mais largas do rio, mais próximas à sua foz, do que entre populações separadas por trechos mais estreitos, mais próximos à sua nascente (Peres *et al.*, 1996).

### **1.1 *Grandes rios amazônicos e os padrões de divergência de anfíbios anuros***

O estudo de padrões de divergência de anuros amazônicos considerando grandes rios como potenciais barreiras à dispersão de indivíduos de uma espécie é recente e ainda conta com poucos resultados. Os trabalhos mais importantes nesse sentido foram realizados no Rio Juruá, um tributário meridional do Rio Solimões. Até seu início, o Rio Juruá nunca havia sido considerado um limite importante para a distribuição de organismos por nenhuma das hipóteses relativas à origem da biodiversidade amazônica já mencionadas. Estudos envolvendo anuros amazônicos nunca haviam sido realizados, portanto, ao longo de rios com reconhecida

importância como barreira à dispersão ou limite de ocorrência de espécies animais, tais como os rios Amazonas, Solimões, Negro, Tapajós e Madeira.

No rio Juruá, análises de variações em morfometria e em alo-enzimas em populações do anuro *Vanzolinius discodactylus* (Família Leptodactylidae), amostradas em lados opostos do Rio Juruá, mostraram ausência de efeito do rio e da distância geográfica sobre estas variações, não sendo detectada a formação de grupos distintos de acordo com estes fatores (Gascon *et al.*, 1996). Os autores indicaram que as populações de *V. discodactylus* podem ter capacidade de dispersão reduzida e ocupar áreas naturalmente restritas. A redução do fluxo gênico dentro desta espécie pode ocorrer de forma pontual, dificultando a detecção de influência do rio ou distância geográfica sobre a variabilidade genética e morfológica observada entre populações. Padrões de variação populacional em alo-enzimas também foram descritos para quatro outras espécies de anuros (*Engystomops [Physalaemus] petersi*, *Allobates femoralis*, *Scarthyla ostinodactyla* e *Scinax ruber*) habitantes de florestas de terra-firme e várzeas do mesmo rio. Para todas as espécies, foram observadas distâncias genéticas interpopulacionais substanciais na maioria dos *loci* codificadores das aloenzimas estudadas. No entanto, o padrão de distribuição das distâncias genéticas das quatro espécies foi discordante com a hipótese de rios como barreira (Gascon *et al.*, 1998).

Ainda no Rio Juruá, análises moleculares sobre seqüências do citocromo-*b* de *Allobates femoralis* (Família Dendrobatidae) apontaram a inexistência da formação de grupos monofiléticos em margens opostas do rio, rejeitando a hipótese de que Rio Juruá tenha grande importância como fator de vicariância para essa espécie. As maiores taxas de diferenciação foram encontradas entre populações residentes em localidades coincidentes com os lados opostos de uma formação geológica que

atravessa o rio perpendicularmente em seu curso superior (Lougheed *et al.*, 1999). Esta formação representa os vestígios de uma crista rochosa datada do Cenozóico Superior ( $\approx$  15 milhões de anos antes do presente), denominada Arco de Iquitos, e foi sugerida como a causa provável da grande divergência genética observada entre populações mais próximas à nascente e as demais.

O estudo das comunidades de anfíbios de florestas de várzea e terra-firme ao longo do mesmo rio (Gascon *et al.*, 2000) indica que o fator mais relevante para a determinação da similaridade em composição de espécies entre comunidades, na região, é a distância geográfica. Não há evidências de que o rio impeça o movimento de espécies de uma margem para a outra. Com exceção deste estudo, avaliando a composição de comunidades, os testes mencionados acima contaram com um número reduzido de amostras e os autores sugerem que a adequação da hipótese de rios para anfíbios precisaria ser confirmada por mais estudos.

## ***1.2 Populações de anfíbios como modelos para a avaliação de padrões de divergência***

Anfíbios possuem padrões de canto conservativos e geneticamente determinados, que não são adquiridos por processos de aprendizagem e cuja evolução demanda a existência de variação genética herdável (Tárano, 2001). A relação entre variabilidade genética e variabilidade de caracteres acústicos em anfíbios é controversa e espécies distintas podem apresentar diferentes padrões, desde a existência de relação direta e positiva entre estas variações (Heyer, 1997; Summers *et al.*, 1997; Narins *et al.*, 1998) até a inexistência de tal relação (Heyer &

Reid, 2003). No entanto, as características do canto de anfíbios podem estar sujeitas à seleção estabilizadora em diferentes populações de uma mesma espécie, dada sua conexão com processos de seleção sexual (Tárano, 2001; Heyer & Reid, 2003; mas consultar críticas em Ryan & Wilczynski, 1991), podendo ser consideradas medidas adequadas para a inferência de variação interpopulacional. Da mesma forma, a variação de caracteres morfológicos externos em anfíbios pode ser concordante com variação genética em alguns casos (Heyer, 1997; Narins *et al.*, 1998).

O estudo de variações fenotípicas entre populações é a forma mais tradicional de avaliar processos de divergência, dado que populações geralmente desenvolveram características particulares há menos tempo, se comparado às diferenças acumuladas em espécies próximas ou quaisquer táxons de maior ordem. Sendo assim, as populações podem, ainda hoje, ocupar os sítios onde divergências ocorreram e onde seus fatores desencadeadores podem ainda ser evidentes, auxiliando a desvendar processos micro-evolutivos e de especiação (Foster, 1999). Estudos de variações fenotípicas podem ser tomados, também, como uma alternativa financeiramente mais acessível, levando-se em consideração o alto custo de testes que utilizam genética molecular.

### **1.3 Evidências sobre o rio Madeira**

Poucos estudos buscando o teste de hipóteses de origem e manutenção da biodiversidade abrangeram especificamente o Rio Madeira. É conhecido que o rio delimita a distribuição de pelo menos 67 táxons de aves habitantes de sub-bosque (Hellmayr, 1910 *apud* Capparella, 1987). Haffer, quando da menção original de sua



hipótese de refúgios pleistocênicos, propôs que o Rio Madeira estaria entre duas zonas que teriam sido refúgios florestais, as quais denominou “Refúgios Peruanos Orientais”, correspondendo à região a oeste do rio, a partir dos Andes, e “Refúgio Madeira-Tapajós”, correspondendo ao interflúvio dos dois grandes rios que dão nome a esta zona (Haffer, 1996; Cracraft & Prum, 1988). Nores (1999), também se baseando na distribuição de táxons de aves em sua hipótese de incursões marítimas, apontou o vale do Rio Madeira como o limite entre dois arquipélagos denominados “Área Inambari” (correspondendo à área entre os rios Juruá e Madeira) e “Área Rondônia” (Entre os rios Madeira e Tapajós). Roosmalen *et al.* (1998) indicaram que os interflúvios entre os afluentes do Rio Madeira são habitados por espécies distintas de sagüis (*Cebuella* spp. e *Callithrix* spp.). Cohn-Haft (2000), através da análise filogenética molecular de *Hemitriccus zosterops* e *Hemitriccus minor* (Aves: Tyrannidae), detectou a ocorrência de pronunciada diferenciação entre populações residentes em margens opostas do Rio Madeira, mesmo não sendo detectadas variações vocais ou morfológicas pronunciadas. Considera-se, então, o Rio Madeira como um limite para a distribuição de alguns animais e como um provável obstáculo à dispersão e, conseqüentemente, ao fluxo gênico, para outros.

No entanto, não é conhecido se o Rio Madeira delimita formas divergentes de espécies de anfíbios ou se o mesmo seria uma barreira primária ou secundária para populações divergentes. Estudos de variações fenotípicas entre populações de anuros em sua bacia auxiliariam na determinação da importância do Rio Madeira como fator de divergência e contribuiriam para a elucidação de eventos evolutivos que geraram e mantêm a enorme biodiversidade amazônica. Dados levantados por tais estudos seriam relevantes para a identificação de áreas de divergência biológica, que podem ser apreciadas como zonas para a implementação de políticas de conservação.

Dentre as espécies de anuros que habitam florestas de terra-firme do alto Rio Madeira, o dendrobatídeo *Allobates femoralis* é uma das espécies diurnas mais abundantes e de mais fácil amostragem. Os machos dessa espécie apresentam comportamento altamente territorial (Roithmair, 1992, 1994), mas padrões de atividade e movimento de machos fora da estação reprodutiva ou de fêmeas são ainda desconhecidos. Contudo, evidências genéticas sugerem que o movimento de indivíduos, mesmo entre populações próximas, é restrito (Gascon *et al.*, 1998; Loughheed *et al.*, 1999). Seria esperado, portanto, que barreiras geográficas desempenhassem efeitos importantes sobre a diversificação de caracteres entre populações da espécie.

Variações morfológicas em exemplares da espécie, provenientes de diferentes localidades na Amazônia, são descritas há décadas (Lutz & Kloss, 1952). Variações no número de notas dos cantos de anúncio entre populações da espécie também são conhecidas há algum tempo (Hödl, 1987). Entretanto, subespécies ou tipos variantes de *A. femoralis* nunca foram descritos. Ainda não existem, também, relatos precisos sobre os padrões geográficos de variação morfológica e acústica entre populações da espécie ou inferências sobre suas possíveis causas.

O estudo a seguir teve como objetivo geral descrever padrões de variação geográfica de caracteres bioacústicos e morfológicos de *Allobates femoralis* ao longo do alto Rio Madeira, inferindo sobre suas possíveis causas históricas ou ecológicas. Especificamente, procurei determinar se existe influência do alto Rio Madeira sobre os padrões de divergência acústica e morfológica observados nas populações amostradas.

## 2 Métodos

### 2.1 *Allobates femoralis*

*Allobates femoralis* (Boulenger) 1893 é um pequeno anuro pertencente à família Dendrobatidae, presente em grande parte da Bacia Amazônica (Frost, 2004). Antes pertencente ao gênero *Epipedobates*, estudos genéticos e comportamentais indicaram que a espécie está mais relacionada evolutivamente a algumas espécies do gênero *Colostethus* do que a espécies do gênero *Epipedobates* (Zimmermann & Zimmermann, 1988; Santos *et al.*, 2003; Vences *et al.*, 2003), sugerindo o ajuste taxonômico que resultou em sua mudança para o gênero *Allobates*, hoje mais utilizado.

São animais diurnos e terrestres, geralmente encontrados em atividade sobre o folhiço ou entre troncos caídos, em ambientes florestais (Roithmair, 1994; Lescure & Marty, 2000). Possuem coloração dorsal variando do preto ao castanho escuro. Uma única mancha vermelho-alaranjada em forma de meia-lua aparece na região proximal superior de cada coxa. Uma mancha amarelo-alaranjada aparece na região supra-axilar dos membros anteriores. A coloração dos membros posteriores é distinta da do tronco, apresentando um padrão marrom ou marrom-claro (Fig. 1). Na região abdominal aparecem manchas escuras irregulares sobre a coloração branca predominante. O comprimento total médio de indivíduos adultos de *A. femoralis* é de cerca de 25,0 mm. (Rodríguez & Duellman, 1994; Roithmair, 1994).

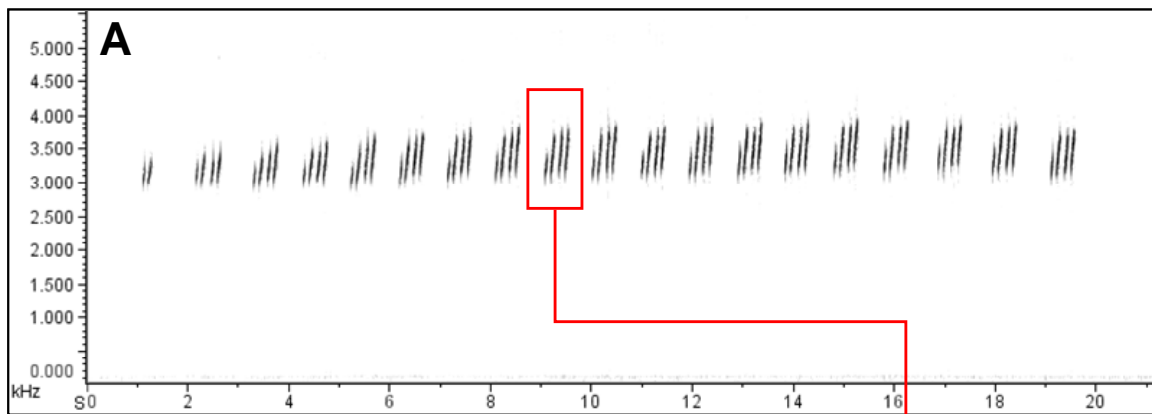
Sua reprodução ocorre durante a estação chuvosa e a postura dos ovos é realizada em folhas sobre o chão, sendo os girinos transportados posteriormente

pelos machos até corpos d'água próximos. Machos de *A. femoralis* são extremamente territoriais durante a época reprodutiva e a área de seus territórios pode variar de 0,25 a 26,0 m<sup>2</sup>. Os machos vocalizam a partir de sítios elevados em relação ao chão da floresta e mantêm os sítios por pelo menos um mês (Roithmair, 1992, 1994; Rodríguez & Duellman, 1994). As vocalizações de anúncio (Fig. 2), utilizadas para a atração de fêmeas e demarcação dos territórios, são constituídas pela repetição regular de um grupo de notas curtas e moduladas em frequência (Hödl, 1987).

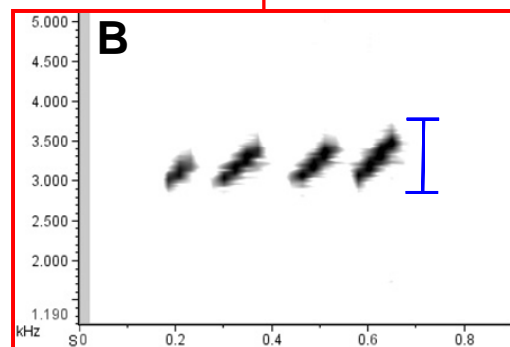
Seu comportamento sedentário, com territórios de diferentes machos distribuídos pelo menos alguns metros entre si, permite que um indivíduo seja gravado e capturado sem que o procedimento interfira gravemente na atividade de indivíduos vizinhos (Hödl, 1987; Roithmair, 1992). Estas características, aliadas à grande abundância da espécie ao longo do alto Rio Madeira e ao movimento aparentemente restrito de indivíduos entre populações, tornam *A. femoralis* uma espécie ideal para estudos de variação interpopulacional em caracteres acústicos e morfológicos.



**Figura 1:** **A** - Coloração dorsal de um indivíduo típico de *A. femoralis*; **B** - Macho utilizando tronco caído como sítio de vocalização, exibindo padrão lateral; **C** - Macho em atividade de vocalização. Fotos: cortesia do Dr. Walter Hödl.



**Figura 2:** **A** - *E. femoralis* vocaliza em sessões como a ilustrada no audioespectrograma acima. Em cada sessão, grupos de notas, denominados cantos, são repetidos de forma regular. No exemplo acima, cada canto é constituído por 4 notas curtas, exceto o primeiro canto, de aquecimento, constituído por 2 notas. **B**- Em menor escala, pode-se perceber a variação em frequência (eixo Y) de cada nota de um canto ao longo do tempo (eixo X).



## 2.2 A área de estudo

A área de estudo abrange o vale do Alto Rio Madeira, entre a cidade de Porto Velho ( $8^{\circ}43'34''S$  /  $63^{\circ}55'24''W$ ) e a foz do Rio Abunã ( $9^{\circ}40'41''S$  /  $65^{\circ}25'58''W$ ), Estado de Rondônia, Brasil (Fig. 3). O relevo da margem direita é constituído por uma fração contínua do Planalto Rebaixado da Amazônia Ocidental, uma unidade geológica tabular com origem em sedimentos pliopleistocênicos. O relevo da margem esquerda é constituído por formações tabulares do mesmo planalto e por fragmentos do Planalto Dissecado Sul da Amazônia, que abrange rochas do Complexo Xingu, associadas a sedimentos pré-cambrianos (DNPM, 1978).

Os tipos de solo predominantes nos interflúvios são o latossolo vermelho-amarelo e solos podzólicos vermelho-amarelos. A vegetação dominante é a floresta ombrófila aberta, podendo ocorrer formações pioneiras sobre planícies e terraços fluviais ao longo do Rio Madeira. O clima da região possui duas estações definidas, existindo períodos de alta e baixa precipitação, que influenciam diretamente o nível das águas fluviais (DNPM, 1978).

O sistema de drenagem que constitui esta porção da bacia do Rio Madeira corre essencialmente sobre vales tectônicos. Ocorrem rupturas de declive ao longo desse trecho do leito do Rio Madeira, determinando o aparecimento de corredeiras e cachoeiras, como as de Morrinhos, Jirau e Teotônio. A origem dessas rupturas é atribuída a falhas tectônicas e os afloramentos rochosos observados nesses pontos são considerados artefatos de erosão diferencial, que expôs rochas do escudo pré-cambriano subjacente (DNPM, 1978; Souza Filho *et al.*, 1999).

### ***2.3 Delineamento amostral***

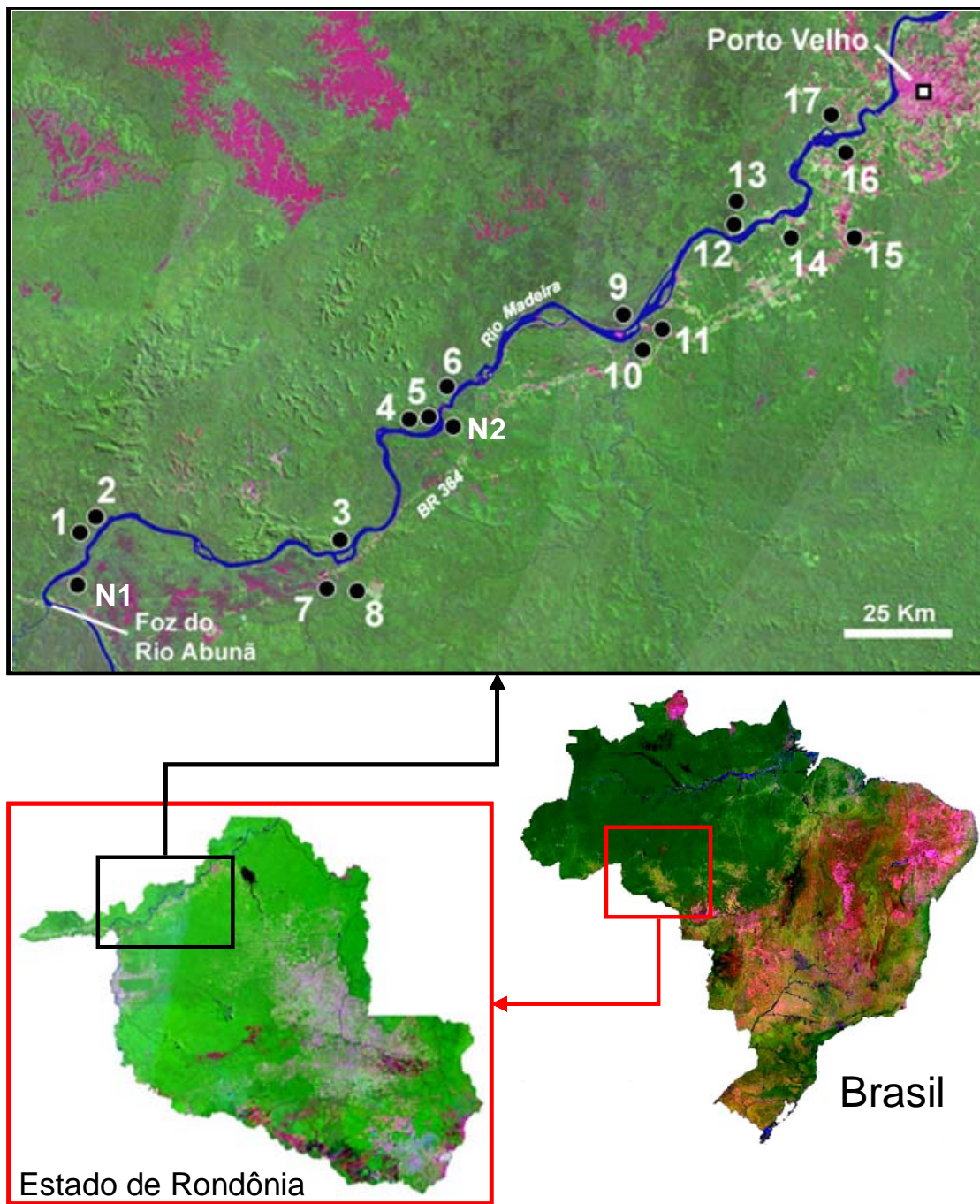
Estabeleci inicialmente 19 áreas de coleta em florestas de terra-firme em ambos os lados do alto Rio Madeira, entre a cidade de Porto Velho e a foz do Rio Abunã (Fig. 3). As populações de *A. femoralis* distribuem-se em manchas, e não continuamente, ao longo das florestas da região. Percorri de carro ou a pé cada área de coleta estabelecida previamente até detectar uma população de *Allobates femoralis* cujos indivíduos estivessem em atividade de vocalização.

Não encontrei populações de *A. femoralis* em duas das áreas visitadas. As duas áreas correspondem a florestas não perturbadas do lado direito do Rio Madeira nas

localidades de Abunã e Cachoeira do Jirau. Percorri um total de 4,0 km de trilhas na área de Abunã e aproximadamente 10,0 km em Cachoeira do Jirau. Nessas duas áreas, encontrei locais apropriados para a reprodução de *A. femoralis*, mas não encontrei nenhum indivíduo. Portanto, este estudo é baseado em amostras provenientes de 17 áreas ao longo da área de estudo (Tabela 1).

Seis das 17 áreas de coleta foram distribuídas próximas a outras áreas de coleta (respeitando um espaçamento mínimo de 1,2 km entre pontos vizinhos e 18,2 km entre pontos não vizinhos) para que variações acústicas ou morfológicas entre populações vizinhas também pudessem ser avaliadas. As distâncias relativas entre as áreas de coleta são fornecidas no Apêndice I.

As atividades de campo, que incluíram a obtenção de dados acústicos e coleta de espécimes, transcorreram entre 20 de novembro a 23 de dezembro de 2004 e de 02 a 31 de janeiro de 2005, durante o período reprodutivo previsto para a espécie (Roithmair, 1994; Gottsberger & Gruber, 2004).



**Figura 3:** Imagem ZULU da área de estudo e sua localização relativa no Brasil e Estado de Rondônia. Os pontos correspondem às 19 áreas de coleta visitadas. Pontos N1 e N2 indicam áreas onde *Allobates femoralis* não foi encontrado.



**Tabela 1:** Numeração, designação e coordenada (em coordenadas geográficas ou UTM\*) de cada ponto de coleta.

Nº	Código da Localidade	Designação da Localidade	Coordenadas
1	Abunã-E	Abunã, lado esquerdo	N=241350.0 / E=8946733.0*
2	Abunã-EA	Abunã, lado esquerdo, ponto auxiliar	N=244680.0 / E=8947231.0*
3	Mutum-E	Mutum-Paraná, lado esquerdo	N=288159.0 / E=8941096.0*
4	Jirau-E	Cachoeira do Jirau, lado esquerdo	N=307537.0 / E=8965975.0*
5	Jirau-EA	Cach. do Jirau, lado esquerdo, p. auxiliar	S 09° 20.084' / W 64° 44.255'
6	BaixoJirau-E	Baixo-Jirau, lado direito	N=311512.0 / E=8970288.0*
7	Mutum-D	Mutum-Paraná, lado direito	N=285320.0 / E=8938402.0*
8	Mutum-DA	Mutum-Paraná, lado direito, ponto auxiliar	N=292945 / E=8933623.0*
9	Jaci-E	Jaci-Paraná, lado esquerdo	N=347060.0 / E=8985968.0*
10	Jaci-DA	Jaci-Paraná, lado direito, ponto auxiliar	S 09° 12.275' / W 64° 21.725'
11	Jaci-D	Jaci-Paraná, lado direito	S 09° 11.656' / W 64° 19.814'
12	Morrinhos-E	Morrinhos, lado esquerdo	S 09° 01.194' / W 64° 13.032'
13	Morrinhos-EA	Morrinhos, lado esquerdo, ponto auxiliar	S 09° 00.595' / W 64° 12.697'
14	Morrinhos-D	Morrinhos, lado direito	N=380056.0 / E=9003273.0*
15	SAntonio-DA	Cachoeira de S. Antônio, lado direito, p. auxiliar	S 08° 51.930' / W 64° 01.174'
16	SAntonio-D	Cachoeira de S. Antônio, lado direito	N=391406.0 / E=9003273.0*
17	SAntonio-E	Cachoeira de S. Antônio, lado esquerdo	N=388782.0 / E=9025410.0*
N1	Abunã-D	Abunã, lado direito	N=240846.0 / E=8939234.0*
N2	Jirau-D	Cachoeira do Jirau, lado direito	S 09° 19.862' / W 64° 43.792'

## 2.4 Coleta e análise de dados

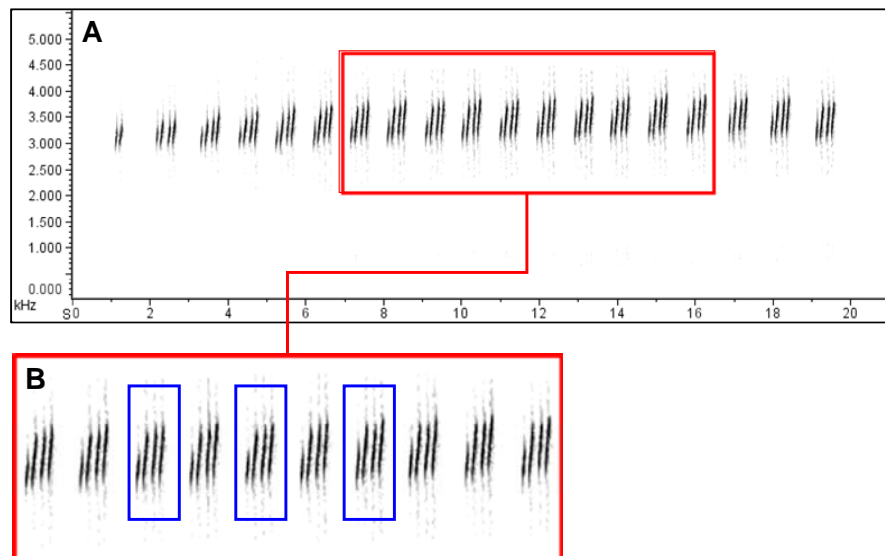
### 2.4.1 Dados acústicos:

#### 2.4.1.1 Obtenção dos dados acústicos:

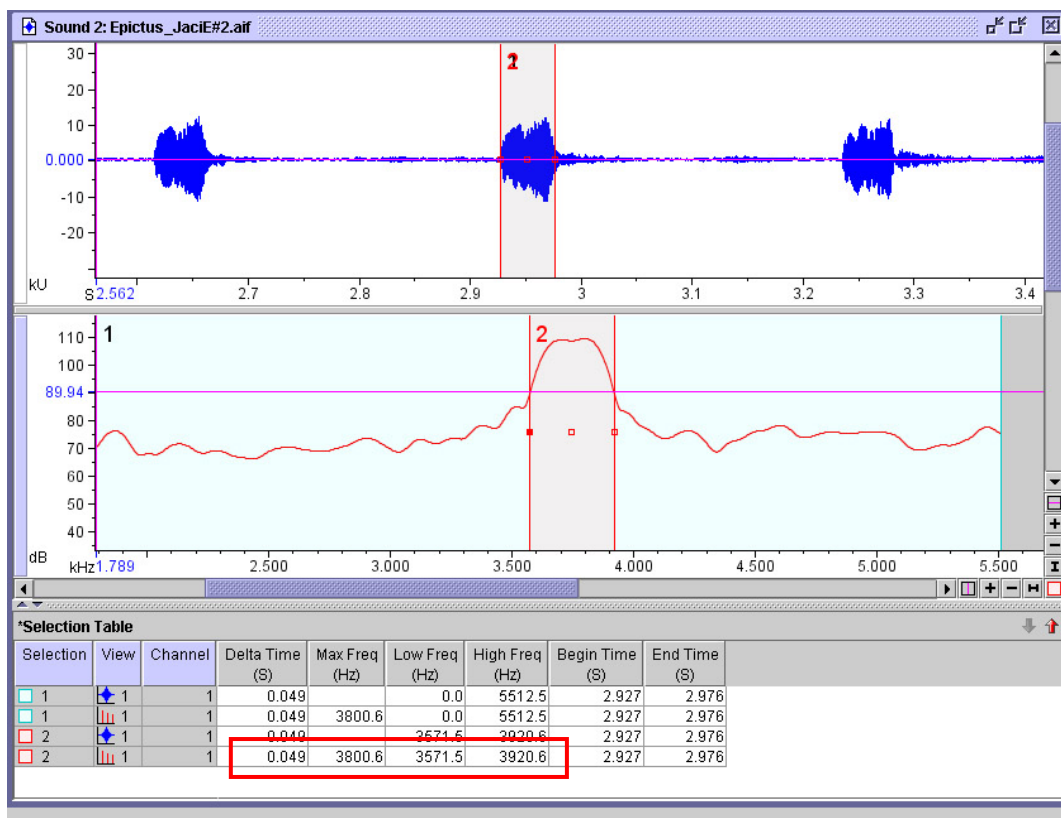
Registrei os cantos de anúncio de machos de *A. femoralis* em fitas cassete, utilizando um gravador Sony WM-D6C e microfone direcional AKG 568 EB, posicionado a 1,0 m do animal em atividade de vocalização. Cada gravação incluiu no mínimo 3 sessões de canto e um máximo de 5. Para cada registro, anotei a temperatura do ar no sítio de vocalização do animal no momento da gravação e o horário de registro.

As gravações em fita cassete foram digitalizadas através do programa computacional *Raven 1.2* (Charif *et al.*, 2004), usando sempre as mesmas configurações (Apêndice II). Para cada animal, selecionei a sessão de canto mais clara dentre todas as que constituíam seu registro total. Busquei selecionar a sessão que apresentasse menos interferência de ruídos ambientais.

Dentre cada sessão, selecionei 10 amostras de cantos, partindo do trecho mais central da sessão. Assim, excluí cantos do início da sessão, que representam cantos de aquecimento que variam em duração e frequência (Gerhardt & Huber, 2002), e cantos do fim da seqüência que poderiam mostrar variações decorrentes de fadiga do animal. Dentre as 10 amostras, selecionei três cantos por indivíduo (Fig. 4), partindo dos dois mais centrais, evitando cantos que sofressem interferência de outros ruídos, por exemplo, sons gerados por outros animais próximos. A seleção dos três cantos foi feita visualmente, através da inspeção dos espectrogramas gerados pelo *Raven 1.2* (Fig. 5).



**Figura 4:** **A** – Dentre uma sessão de cantos, foram selecionados os 10 cantos mais centrais para a análise, evitando variações em tempo e espectro de frequências visíveis nos primeiros e nos últimos cantos como intervalos em branco maiores em relação ao eixo X e manchas com amplitudes verticais muito variáveis, respectivamente; **B** – Dentre os 10 cantos selecionados, foram escolhidos os três mais “limpos”, ou seja, com melhor resolução e menor sobreposição com outros ruídos.



**Figura 5:** Exemplo de utilização da ferramenta *Selection Spectrum* do Raven 1.2. O gráfico em azul é o oscilograma das notas de um canto, onde foi selecionada uma única nota (limites em vermelho). O gráfico em vermelho abaixo do oscilograma representa como a energia da nota, em dB, é distribuída no domínio de frequências. A régua (barra roxa) foi trazida até 20 dB abaixo da frequência de pico da nota contida pela seleção. Uma nova seleção (2) foi criada, sendo limitada pelos pontos onde a régua cruza o gráfico. Através da seleção 2 podem-se estabelecer com segurança as frequências mais baixa e mais alta da nota. Os dados utilizados em análises subsequentes são mostrados em destaque.

Para cada uma das três amostras de cantos selecionadas, obtive variáveis temporais e espectrais, utilizando a ferramenta “*Selection Spectrum*” do Raven 1.2 (Charif *et al.*, 2004) sobre os oscilogramas gerados pelo mesmo programa (configurações no Apêndice II). O número de variáveis obtidas dependeu do número de notas presente no canto, já que dois morfotipos acústicos são encontrados na área de estudo (Tabela 2). A média aritmética dos valores obtidos para os três cantos constituiu o valor final para cada indivíduo utilizado nas análises descritas a seguir.

Optei por não incluir nas análises variáveis relativas às sessões de canto, tais como número de notas ou cantos por sessão, ou duração do intervalo silencioso entre sessões de canto. Durante as atividades de gravação, percebi que estas características pareciam ser fortemente influenciadas por interações vocais entre indivíduos co-específicos vizinhos, por sons emitidos por outros animais (aves, cigarras e outras espécies de anuros) ou mesmo pela tolerância de cada indivíduo gravado à minha presença.

**Tabela 2:** Siglas e descrições das variáveis acústicas. A terceira e quarta colunas apresentam, respectivamente, o conjunto de variáveis acústicas utilizadas em análises que envolveram todos os animais amostrados e as utilizadas em análises que utilizaram apenas animais pertencentes ao morfotipo com cantos de anúncio constituídos por 4 notas.

<b>SIGLA</b>	<b>DESCRIÇÃO DA VARIÁVEL (Unidade)</b>	<b>Todos os morfotipos</b>	<b>Morfotipo de 4 notas</b>
ISC	Intervalo Silencioso entre Cantos (s)		+
DC	Duração do Canto (s)		+
FMC	Frequência Máxima do Canto (Hz)		+
FGC	Frequência Mais Grave do Canto (Hz)		+
FAC	Frequência Mais Aguda do Canto (Hz)		+
D1	Duração da 1ª Nota (s)	+	+
FM1	Frequência Máxima da 1ª Nota (Hz)	+	+
FG1	Frequência Mais Grave da 1ª Nota (Hz)	+	+
FA1	Frequência Mais Aguda da 1ª Nota (Hz)	+	+
IS1	Intervalo Silencioso entre 1ª e 2ª Notas (s)	+	+
D2	Duração da 2ª Nota (s)	+	+
FM2	Frequência Máxima da 2ª Nota (Hz)	+	+
FG2	Frequência Mais Grave da 2ª Nota (Hz)	+	+
FA2	Frequência Mais Aguda da 2ª Nota (Hz)	+	+
IS2	Intervalo Silencioso entre 2ª e 3ª Notas (s)		+
D3	Duração da 3ª Nota (s)		+
FM3	Frequência Máxima da 3ª Nota (Hz)		+
FG3	Frequência Mais Grave da 3ª Nota (Hz)		+
FA3	Frequência Mais Aguda da 3ª Nota (Hz)		+
IS3	Intervalo Silencioso entre 3ª e 4ª Notas (s)		+
D4	Duração da 4ª Nota (s)		+
FM4	Frequência Máxima da 4ª Nota (Hz)		+
FG4	Frequência Mais Grave da 4ª Nota (Hz)		+
FA4	Frequência Mais Aguda da 4ª Nota (Hz)		+

#### 2.4.1.2 Análises estatísticas dos dados acústicos:

Grande parte das variáveis acústicas escolhidas era correlacionada. Assim, para reduzir a dimensionalidade das variáveis e produzir um número menor de variáveis acústicas independentes entre si, utilizei uma análise de componentes principais. Os primeiros componentes gerados pela análise foram usados como variáveis dependentes em uma análise de variância multivariada (MANOVA), para testar se três grupos, diferenciados por número de notas dos cantos e lado do rio em que habitam, eram significativamente diferentes em características acústicas. O peso (em gramas) dos indivíduos foi incluído como covariável, uma vez que o tamanho do corpo pode afetar características espectrais do canto de anuros (Ryan, 1988; Keddy-Hector *et al.*, 1992). Da mesma forma, a temperatura média do ar no momento em que foram feitos os registros, em cada localidade, foi incluída como covariável, já que variações da temperatura ambiente podem afetar variáveis temporais do canto (Ryan, 1988; Keddy-Hector *et al.*, 1992; Gerhardt & Huber, 2002).

As coordenadas de cada área de coleta também foram incluídas como covariáveis, representando a distância entre as áreas, dado que características morfológicas e comportamentais podem variar com distância (Legendre *et al.*, 2002), independentemente de potenciais barreiras físicas. Para isso, inseri as coordenadas das áreas de coleta no programa computacional ArcMap do pacote ArcGIS e plotei os pontos representando as áreas de coleta sobre uma imagem de satélite geo-referenciada da área de estudo. Calculei a distância linear entre cada ponto e as margens esquerda e inferior da imagem. Inseri esses valores (denominando-os de “X” e “Y”, respectivamente) como duas variáveis individuais em minha planilha de dados e as testei em conjunto, como uma covariável, na MANOVA.

Uma vez que dois morfotipos acústicos são encontrados na área de estudo, as análises foram realizadas duas vezes. A primeira utilizou nove variáveis acústicas que estão presentes

nas duas primeiras notas do canto de anúncio, presentes em ambos os morfotipos e aparentemente homólogas. A segunda análise incluiu as 24 variáveis acústicas obtidas a partir das 4 notas que constituem os cantos de anúncio de um dos morfotipos e testou a divergência acústica entre populações habitando lados opostos do rio Madeira.

A disposição dos eixos gerados pela análise de componentes principais mostrou clara ortogonalidade entre as variáveis temporais e espectrais dos cantos, sugerindo que qualquer uma das variáveis espectrais utilizadas para gerar os “scores” do primeiro componente e qualquer variável temporal utilizada para gerar os “scores” do segundo componente da análise podem ser utilizados no modelo descrito anteriormente. Portanto, para testar se resultados semelhantes podem ser obtidos por variáveis simples ao invés de componentes principais, escolhi as variáveis “duração do canto” e “frequência máxima do canto” para repetir as mesmas análises descritas nos parágrafos anteriores. Acredito que essas duas variáveis assimilem razoavelmente bem alterações discretas em duração ou frequência em notas individuais, uma vez que contam com dados de todas as notas. A análise foi realizada apenas para o morfotipo com cantos de 4 notas, uma vez que está presente nos dois lados do rio.

O fator de condição, que pode ser considerado um índice do peso relativo ao comprimento total de cada indivíduo (Baker, 1992 *apud* Tárano, 2001), foi estimado dividindo-se os resíduos de uma regressão linear entre comprimento total e o peso pelos valores brutos do comprimento total. Os valores de condição obtidos foram testados para correlação com variáveis acústicas temporais. Procurei, assim, avaliar se a energia disponível para cada indivíduo poderia ser uma causa de variação na duração das notas ou na rapidez com que são emitidas.

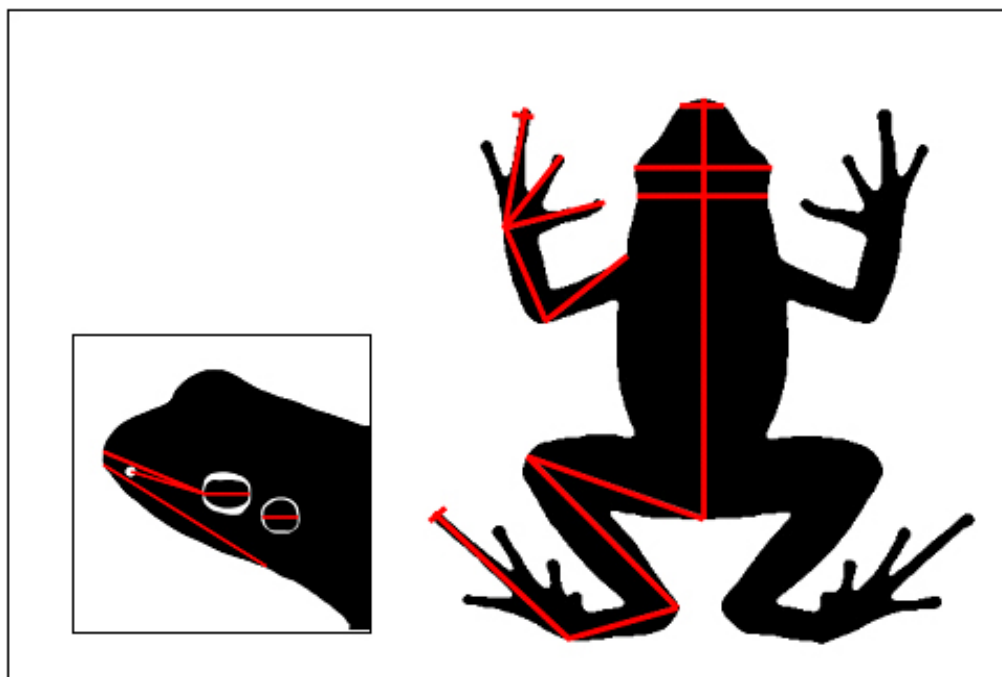
Todas as análises estatísticas descritas acima foram realizadas através do programa computacional Systat 8.0 (Wilkinson, 1990).

## **2.4.2 Dados morfológicos:**

### *2.4.2.1 Coleta dos dados morfológicos*

A maior parte dos indivíduos gravados foram coletados e transportados para um laboratório improvisado em acampamento. Os animais coletados foram mortos por imersão em cloridrato de lidocaína diluído em água e pesados em uma balança digital portátil com precisão de 0,001 g após a remoção do trato gastro-intestinal. Por fim, os animais foram etiquetados, fixados em formol comercial diluído a 10% e conservados em álcool etílico a 70%. Transporte todos os animais coletados ao Laboratório de Ecologia de Vertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde medidas morfológicas externas foram realizadas.

Vinte variáveis morfológicas externas diretas (Tabela 3) foram tomadas de cada indivíduo com o auxílio de uma estereolupa com lentes oculares graduadas e paquímetro digital. Todas as variáveis foram medidas do lado esquerdo do espécime (Fig. 6). Os exemplares coletados encontram-se depositados nas Coleções Zoológicas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Seção de Herpetologia (INPA-H), números de tombo 16541 a 16826.



**Figura 6:** Localização das 20 medidas morfométricas utilizadas nas análises de variação em morfologia externa.

**Tabela 3:** Siglas e descrições das variáveis morfológicas externas.

<b>SIGLA</b>	<b>DESCRIÇÃO DA VARIÁVEL</b>
<b>CT</b>	Comprimento total, do rostró à região cloacal
<b>CCA</b>	Comprimento da cabeça da articulação da maxila até a ponta mais anterior do rostró
<b>LCA</b>	Largura da cabeça no nível do ângulo da maxila
<b>CFO</b>	Comprimento do focinho do canto anterior do olho até a ponta do focinho
<b>ONA</b>	Distância do olho até o nariz, do canto anterior do olho até o centro da narina
<b>ENA</b>	Distância entre as narinas
<b>DIO</b>	Maior diâmetro do olho
<b>DOO</b>	Distância entre as órbitas oculares
<b>TIM</b>	Diâmetro do tímpano
<b>CBR</b>	Comprimento do braço, de sua inserção no tronco até a margem externa do cotovelo flexionado
<b>CAN</b>	Comprimento do antebraço, da margem externa do cotovelo flexionado até margem próxima ao tubérculo palmar
<b>CM1</b>	Comprimento da mão, da margem próxima ao tubérculo palmar até a ponta do dedo I
<b>CM2</b>	Comprimento da mão, da margem próxima ao tubérculo palmar até a ponta do dedo II
<b>CM3</b>	Comprimento da mão, da margem próxima ao tubérculo palmar até a ponta do dedo III
<b>D3C</b>	Maior diâmetro do disco do dedo III metacarpal
<b>CFE</b>	Comprimento do fêmur, de sua inserção até a margem externa do joelho flexionado.
<b>CTI</b>	Comprimento da tíbia, da margem externa do joelho flexionado até a articulação proximal do tarso.
<b>CTA</b>	Comprimento do tarso, a partir de sua articulação proximal até o calcanhar
<b>CPE</b>	Comprimento do pé, do calcanhar até a ponta do dedo IV
<b>D4T</b>	Maior diâmetro do disco do dedo IV metatarsal



#### 2.4.2.2 Análises estatísticas dos dados morfológicos

Dezenove variáveis morfométricas (Tabela 3) foram transformadas em  $\log_{10}$ , para padronização de escalas. O comprimento total não foi incluído, por poder influenciar o resultado da análise.

Uma análise de componentes principais foi usada para produzir um número menor de variáveis morfológicas independentes entre si, utilizando os  $\log_{10}$  das medidas morfométricas. Os dois primeiros componentes resultantes foram incluídos como variáveis dependentes em uma MANOVA, para testar se os mesmos três grupos diferenciados pelas análises acústicas (animais com cantos de 2 notas e animais com cantos de 4 notas dos lados esquerdo e direito do rio) apresentam diferenças morfológicas significativas entre si. O peso dos animais foi incluído como covariável no teste, uma vez que o tamanho dos animais poderia ter influência sobre outros caracteres morfométricos. As coordenadas das áreas onde foram coletados os animais também foram incluídas como covariáveis, de acordo com metodologia descrita no item 2.4.1.2, uma vez que caracteres morfológicos poderiam variar de acordo com distância geográfica.

Análises de componentes principais utilizando variáveis morfométricas externas normalmente geram um primeiro componente principal com forte efeito do tamanho dos animais, enquanto os demais componentes carregam informações sobre a forma do corpo. Geralmente, os componentes que representam forma do corpo explicam apenas uma pequena parte da variação morfológica total (Hafner, 1992; Vitt *et al.*, 1997; Bickel & Losos, 2002). Portanto, para controlar o efeito do tamanho sobre as dezenove medidas morfométricas utilizadas, calculei os resíduos de regressões das variáveis morfológicas contra o peso. Os resíduos resultantes foram utilizados em uma análise de

componentes principais, para redução de dimensionalidade. Individualmente, os componentes resultantes também explicaram pouco a variação em forma do corpo. Assim, para explicar mais que 50% da variação em forma, foi necessário considerar os cinco primeiros componentes.

Os cinco primeiros componentes gerados pela análise foram usados como variáveis dependentes numa MANOVA, para testar se existem diferenças significativas em forma do corpo, independente de tamanho, entre os três grupos definidos anteriormente. As coordenadas geográficas das áreas de coleta foram incluídas no modelo como covariável. A utilização de muitos componentes torna difícil localizar os caracteres mais importantes determinando divergência entre grupos, mas permite avaliar divergência morfológica em forma do corpo (morfologia independente de tamanho), de maneira geral.

Também comparei as médias aritméticas por área de coleta, das diferenças entre os comprimentos dos dedos I e II, III e II, e III e I, utilizando apenas amostras do morfotipo com cantos constituídos por 4 notas, presente em ambos os lados do rio Madeira. Os valores foram comparados por análise de variância (ANOVA). O teste foi uma outra forma de avaliar variações interpopulacionais utilizando variáveis morfológicas independentes de tamanho.

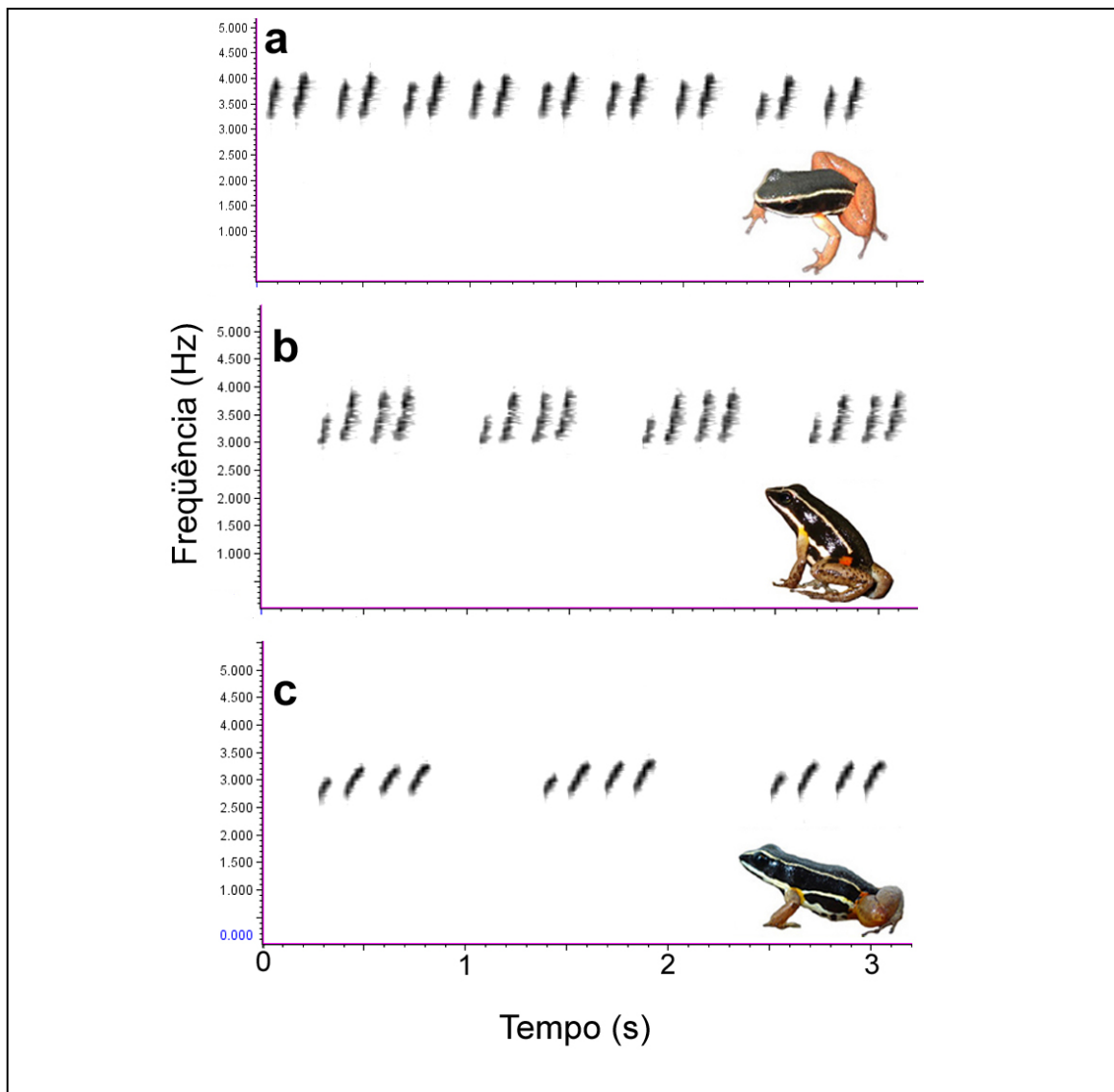
Por fim, para avaliar variações em energia disponível para grupos pré-estabelecidos, comparei o fator de condição individual entre lados do rio, para o morfotipo de 4 notas, e entre os dois morfotipos. Para tanto, utilizei o teste não-paramétrico *U* de Mann-Whitney, porque o conjunto de dados não apresentava distribuição normal.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa computacional Systat 8.0 (Wilkinson, 1990).

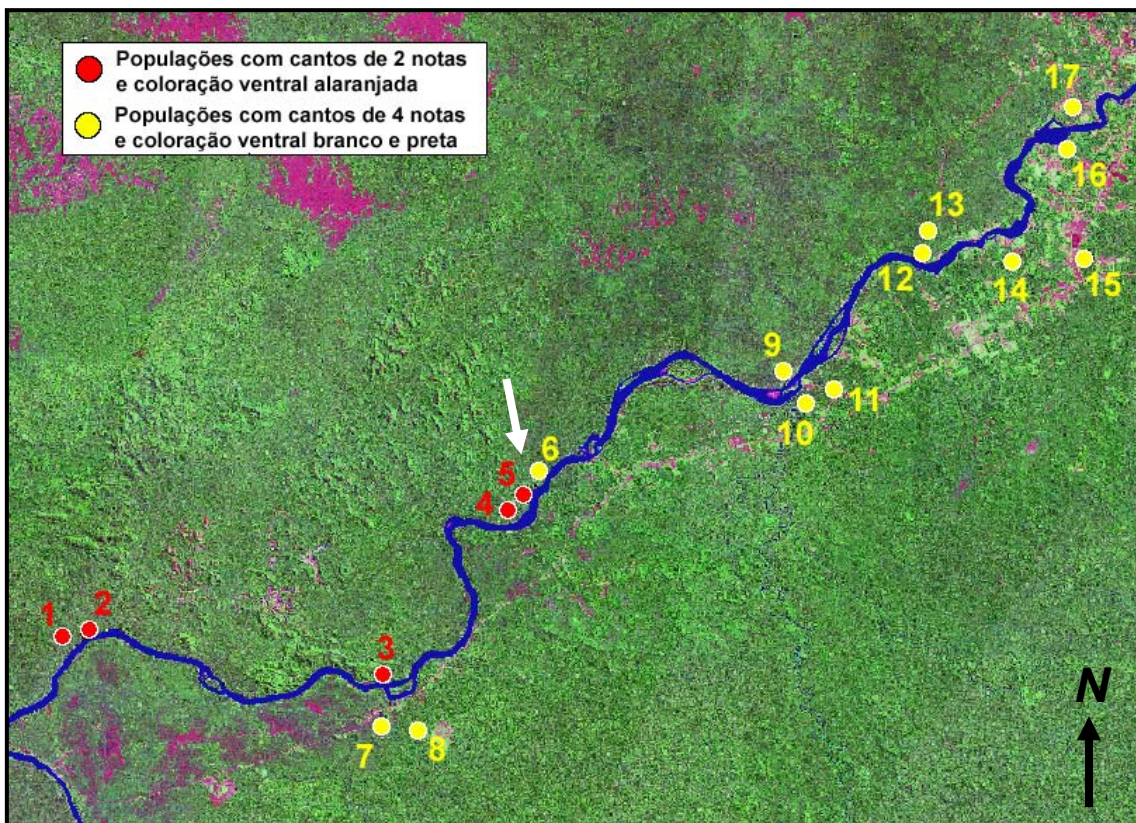
### **3 Resultados**

Registrei os cantos de anúncio de 226 indivíduos de *A. femoralis*. Indivíduos gravados, mas não capturados e falhas durante medidas de temperatura do ar resultaram na exclusão de 27 registros das análises que incluíssem valores de massa corporal ou temperatura como covariáveis. Machos capturados constituíram um total de 212 indivíduos utilizados em análises morfológicas. O número efetivo de registros ou indivíduos utilizados em cada análise, por área de coleta, é mostrado no Apêndice III.

Ao longo da área de coleta, encontrei dois morfotipos muito distintos de *A. femoralis*. O primeiro possui coloração ventral posterior alaranjada e cantos de anúncio com duas notas (Fig. 7A) e ocorreu somente na porção ocidental da margem esquerda da área de estudo (Fig. 8). À leste da área de ocorrência deste morfotipo, uma zona de contato com um segundo morfotipo foi localizada, onde não detectei nenhuma barreira física atual impedindo o movimento de indivíduos entre áreas. O segundo morfotipo tem coloração ventral exclusivamente branca e preta e cantos de anúncio constituídos por 4 notas (Fig. 7B e C). Este morfotipo tem sua área de ocorrência dividida pelo rio Madeira, ocorrendo nos lados direito e esquerdo do rio. (Fig. 8).



**Figura 7:** Sonogramas e coloração dos morfotipos de *A. femoralis* encontrados na área de estudo. **A:** morfotipo com cantos de anúncio com 2 notas e coloração ventral posterior alaranjada (indivíduo proveniente do ponto 1). **B e C:** morfotipo com cantos de anúncio com 4 notas e coloração ventral branco e preta, dos lados esquerdo (ponto 9) e direito (ponto 14) do rio, respectivamente.



**Figura 8:** Imagem ZULU da área de estudo apontando pontos efetivos de coleta. Pontos em cores diferentes indicam a distribuição dos dois morfotipos de *A. femoralis* encontrados na área. A seta branca indica a localização, na margem esquerda, da zona de contato atual entre os morfotipos.

### 3.1 Análises acústicas

As variáveis acústicas mostraram-se correlacionadas. Portanto, uma análise de componentes principais foi usada para produzir um número menor de variáveis bioacústicas independentes. Os dois primeiros componentes principais da análise envolvendo as seis variáveis espectrais e as três variáveis temporais das duas primeiras notas (Tabela 4), presentes em ambos os morfotipos, explicaram aproximadamente 82,2% da variação dos caracteres acústicos. O primeiro componente (CP-I) explicou aproximadamente 58,9% da variação acústica total e as variáveis espectrais tiveram altos pesos (“loadings”) nesse componente. O segundo componente (CP-II) explicou

23,3% da variação acústica, tendo um maior peso (“loadings”) as variáveis acústicas temporais.

**Tabela 4:** Pesos (“loadings”) das variáveis acústicas temporais e espectrais nos dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais realizada para os morfotipos agrupados.

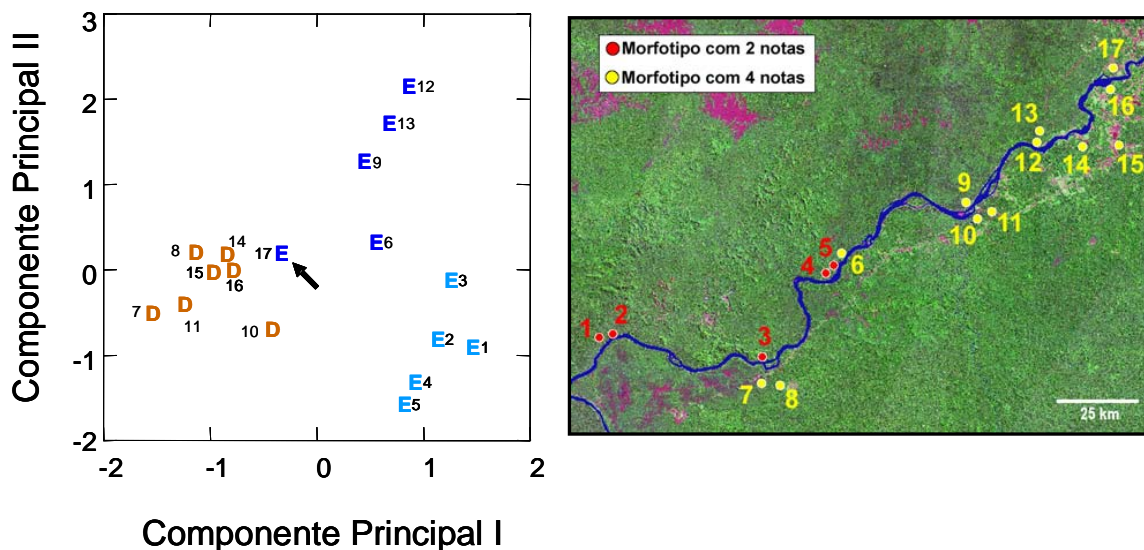
Variável	Tipo de Variável	“Loadings”	
		CP – I	CP - II
Duração da 1ª nota (D1)	Temporal	-0,352	0,875
Duração da 2ª nota (D2)	Temporal	-0,375	0,831
Intervalo Silencioso entre Notas (IS1)	Temporal	0,332	-0,595
Freq. Máxima da 2ª Nota (FM2)	Espectral	0,795	0,245
Freq. Mais Grave da 2ª Nota (FG2)	Espectral	0,956	-0,059
Freq. Mais Aguda da 2ª Nota (FA2)	Espectral	0,900	0,257
Freq. Máxima da 1ª nota (FM1)	Espectral	0,921	0,214
Freq. Mais Grave da 1ª Nota (FG1)	Espectral	0,952	-0,054
Freq. Mais Aguda da 1ª Nota (FA1)	Espectral	0,902	0,325
“Eigenvalues”		5,300	2,099
<b>% da Variação Explicada</b>		<b>58,888</b>	<b>23,318</b>

Os primeiros dois componentes gerados pela análise de componentes principais foram usados como variáveis dependentes em uma análise de variância múltipla (MANOVA), para testar se os parâmetros acústicos das duas primeiras notas diferem entre os três grupos, definidos de acordo com o número de notas dos cantos e lado do rio. O peso dos animais, a temperatura do ar e as coordenadas de cada área de coleta foram incluídos na análise como covariáveis, uma vez que podem afetar a variação de caracteres acústicos.

A análise de variância multivariada (MANOVA) mostrou que as covariáveis peso (*Pillai trace* = 0,225;  $P < 0,001$ ; 192 g.l.) e temperatura do ar (*Pillai trace* = 0,043;  $P = 0,015$ ; 192 g.l.) afetaram significativamente as características acústicas das duas primeiras notas. Entretanto, os três grupos definidos *a priori* diferiram significativamente, em relação a essas características acústicas, independentemente das

covariáveis (*Pillai trace* = 0,354;  $P < 0,001$ ; 192 g.l.). A distância entre os pontos de coleta, representada por suas coordenadas, não influenciou as características do canto (*Pillai trace* = 0,035;  $P = 0,144$ ; 192 g.l.).

Para ilustrar as diferenças entre os três grupos, relacionei CP-I, que representa principalmente variáveis espectrais, e CP-II, que representa principalmente variáveis temporais (Fig. 9). O ponto 17 da margem esquerda (St. Antônio-E) posicionou-se mais próximo aos pontos da margem direita. Este ponto está localizado a menos de 31,0 km de outra área de coleta (ponto 13) com indivíduos com características acústicas típicas daquela margem do rio.



**Figura 9:** Distribuição das populações amostradas ao longo dos componentes principais construídos com variáveis acústicas presentes em ambos os morfotipos e mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta. Indivíduos da localidade 17 têm, em média, espectro de freqüências do canto mais similar ao das populações do lado direito. E = pontos no lado esquerdo do rio; D = pontos no lado direito do rio.

Era esperado que o morfotipo de 2 notas da margem esquerda reunisse características acústicas suficientemente distintas para que fosse apontado como um grupo significativamente diferente dos dois restantes, dada a redução no número de notas em relação ao outro morfotipo. Dessa forma, uma nova análise de componentes



principais foi realizada utilizando apenas amostras do morfotipo de 4 notas. Com isso, variáveis acústicas provenientes de 4 notas (e não apenas de 2 notas, como na análise anterior), puderam ser incluídas na análise. Ainda, o morfotipo de 4 notas esteve presente em ambos os lados do rio, permitindo que o teste do efeito do rio sobre a variação desses caracteres acústicos fosse realizado sobre amostras de um mesmo morfotipo.

O primeiro componente (CP-I) de uma análise de componentes principais, incluindo apenas o morfotipo de 4 notas e utilizando 15 variáveis espectrais e 9 variáveis temporais, explicou 51,2% da variação acústica. O segundo componente da análise (CP - II) explicou 18,0% da variação acústica. Variáveis espectrais tiveram maiores “loadings” no PC-I e variáveis temporais, no PC-II (Tabela 5).

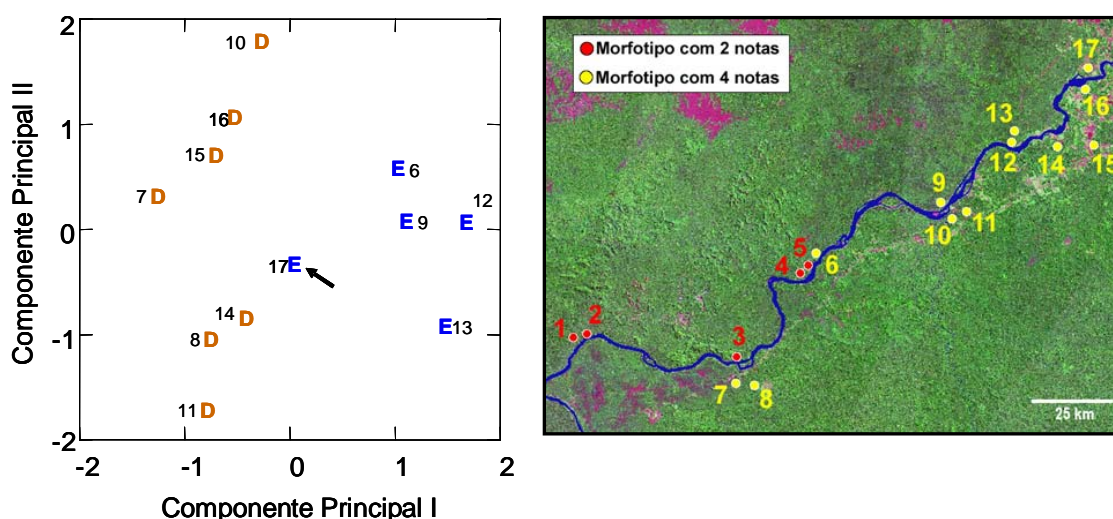
**Tabela 5:** Pesos (“loadings”) das variáveis acústicas temporais e espectrais nos dois primeiros componentes da análise de componentes principais realizada para o morfotipo de 4 notas.

Variável	Tipo da Variável	“Loadings”	
		CP - I	CP - II
Intervalo Silencioso entre Cantos (ISC)	Temporal	-0,059	-0,597
Duração do Canto (DC)	Temporal	0,160	-0,829
Duração da 1ª Nota (D1)	Temporal	0,121	-0,832
Duração da 2ª Nota (D2)	Temporal	0,065	-0,945
Duração da 3ª Nota (D3)	Temporal	0,156	-0,889
Duração da 4ª Nota (D4)	Temporal	0,118	-0,875
Intervalo Silencioso entre 1ª e 2ª Notas (IS1)	Temporal	0,135	0,090
Intervalo Silencioso entre 2ª e 3ª Notas (IS2)	Temporal	0,075	-0,155
Intervalo Silencioso entre 3ª e 4ª Notas (IS3)	Temporal	0,043	0,065
Freq. Máxima da 4ª Nota (FM4)	Espectral	0,846	0,005
Freq. Mais Grave da 4ª Nota (FG4)	Espectral	0,911	0,155
Freq. Mais Aguda da 4ª Nota (FA4)	Espectral	0,920	0,033
Freq. Máxima da 3ª Nota (FM3)	Espectral	0,876	0,002
Freq. Mais Grave da 3ª Nota (FG3)	Espectral	0,924	0,135
Freq. Mais Aguda da 3ª Nota (FA3)	Espectral	0,925	-0,027
Freq. Máxima da 2ª Nota (FM2)	Espectral	0,848	-0,056
Freq. Mais Grave da 2ª Nota (FG2)	Espectral	0,935	0,145
Freq. Mais Aguda da 2ª Nota (FA2)	Espectral	0,929	-0,003
Freq. Máxima da 1ª Nota (FM1)	Espectral	0,885	-0,053
Freq. Mais Grave da 1ª Nota (FG1)	Espectral	0,913	0,105
Freq. Mais Aguda da 1ª Nota (FA1)	Espectral	0,913	-0,095
Freq. Máxima da 4ª do Canto (FMC)	Espectral	0,832	0,015
Freq. Mais Grave do Canto (FGC)	Espectral	0,931	0,110
Freq. Mais Aguda do Canto (FAC)	Espectral	0,914	0,063
“Eigenvalues”		12,281	4,330
<b>% da Variação Explicada</b>		<b>51,171</b>	<b>18,040</b>



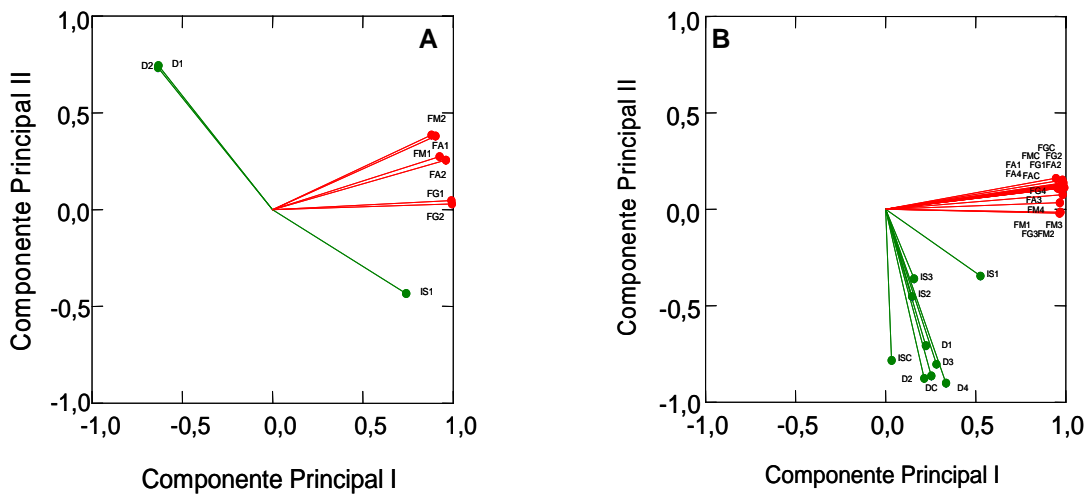
Uma MANOVA mostrou que as covariáveis peso ( $Pillai\ trace = 0,293$ ;  $P < 0,001$ ; 140 g.l.) e temperatura do ar ( $Pillai\ trace = 0,227$ ;  $P < 0,001$ ; 140 g.l.), afetaram significativamente as características acústicas das 4 notas. Entretanto, as características acústicas diferiram significativamente entre lados do rio, independente do efeito das covariáveis ( $Pillai\ trace = 0,099$ ;  $P = 0,001$ ; 140 g.l.). A distância entre as áreas de coleta não teve efeito significativo sobre o canto ( $Pillai\ trace = 0,028$ ;  $P = 0,410$ ; 140 g.l.).

A distribuição das áreas de coleta ao longo dos componentes principais mostrou, mais uma vez, variação espectral entre margens, com a amostra do ponto 17 aproximando-se mais das amostras do lado direito. Características temporais do canto, representadas pelo CP-II, mostraram-se muito variáveis entre populações do lado direito (Fig. 10).



**Figura 10:** Distribuição das populações amostradas ao longo dos componentes principais construídos com variáveis acústicas do morfotipo de 4 notas e mapa esquemático com a localização dos pontos de coleta. Como na análise anterior, o CP I explica a variação de frequência entre cantos de animais habitando margens opostas do alto Rio Madeira. Indivíduos da localidade 17 têm, em média, espectro de frequências do canto mais similar ao das populações do lado direito. Não há distinção clara entre margens do rio em relação às características temporais do canto (CP II). E = pontos no lado esquerdo; D = pontos no lado direito.

As análises sobre os dois morfotipos agrupados ou somente para o morfotipo de 4 notas, mostraram que as variáveis acústicas testadas geraram dois grupos de vetores ortogonais entre si: um representando variáveis espectrais e outro as variáveis temporais (Fig. 11). Neste caso, testar uma única variável temporal e uma única variável espectral, ao invés dos componentes principais, traria resultados semelhantes e de interpretação mais simples que aqueles fornecidos por métodos multivariados.



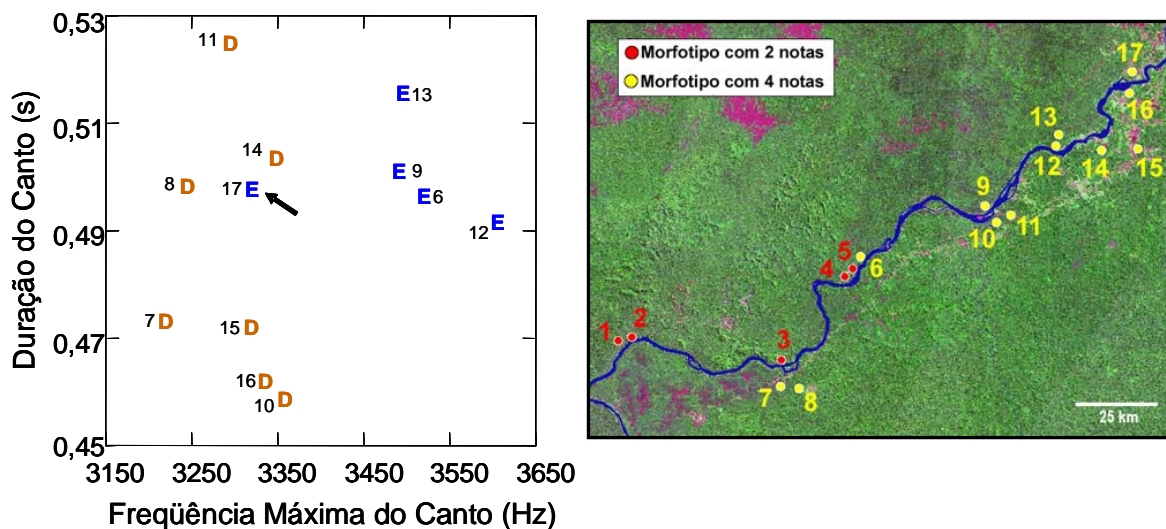
**Fig. 11:** Vetores de peso de cada variável acústica em espaço bidimensional originados pela análise de componentes principais, mostrando ortogonalidade entre variáveis espectrais (em vermelho) e temporais (em verde), considerando a análise para ambos os morfotipos (A) e somente para o morfotipo de 4 notas (B).

Utilizei dados de frequência máxima do canto e duração do canto do morfotipo de 4 notas para testar se resultados similares seriam obtidos substituindo os dois primeiros componentes principais por estas variáveis. Usei apenas o morfotipo com 4 notas, por estar presente em ambos os lados do rio.

Uma MANOVA utilizando os valores de frequência máxima do canto e duração do canto como variáveis dependentes confirmou que existe diferença significativa entre as características acústicas dos cantos das populações residentes nos lados direito e esquerdo do rio (*Pillai trace* = 0,061;  $P = 0,013$ ; 140 g. l.), independente dos efeitos

causados pelas covariáveis peso (*Pillai trace* = 0,173;  $P < 0,001$ ; 140 g. l.) e temperatura do ar (*Pillai trace* = 0,404;  $P < 0,001$ ; 140 g. l.). Como na análise anterior, a distância geográfica entre áreas de coleta não influenciou os valores de frequência máxima ou duração do canto (*Pillai trace* = 0,008;  $P = 0,890$ ; 140 g. l.). Relacionando a frequência máxima com a duração do canto para ilustrar os agrupamentos, o padrão obtido foi similar ao fornecido pela relação entre o primeiro e segundo componentes da análise de componentes principais (Fig. 12).

Houve evidente variação de frequência máxima do canto entre lados do rio, os indivíduos do lado direito tendo cantos com frequências máximas mais baixas. Como ilustrado anteriormente, indivíduos do ponto 17 têm cantos com frequências máximas mais similares àquelas dos indivíduos do lado direito do rio. Os valores médios de duração do canto encontrados para os indivíduos do lado esquerdo do rio tendem a serem altos, mas valores similares também são encontrados em indivíduos do lado direito (pontos 8, 11 e 14).



**Figura 12:** Valores médios de FMC e DC por ponto de coleta para o morfotipo de 4 notas e mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta. O padrão gerado é semelhante ao ilustrado pela análise multivariada, evidenciando que valores de FMC são, em média, menores dentre indivíduos da margem direita. Indivíduos do ponto 17 possuem, em média, FMC mais similar àquela dos animais da margem direita. E = pontos no lado esquerdo; D = pontos no lado direito.

Não houve correlação entre o fator de condição individual e a duração do canto ( $r = 0,010$ ;  $P = 0,902$ ;  $n = 147$ ) ou o intervalo silencioso entre cantos ( $r = 0,044$ ;  $P = 0,597$ ;  $n = 147$ ), descartando a hipótese de que a energia disponível para cada animal seja um importante fator influenciando estes parâmetros temporais do canto em *A. femoralis*.

### **3.2 Análises morfológicas**

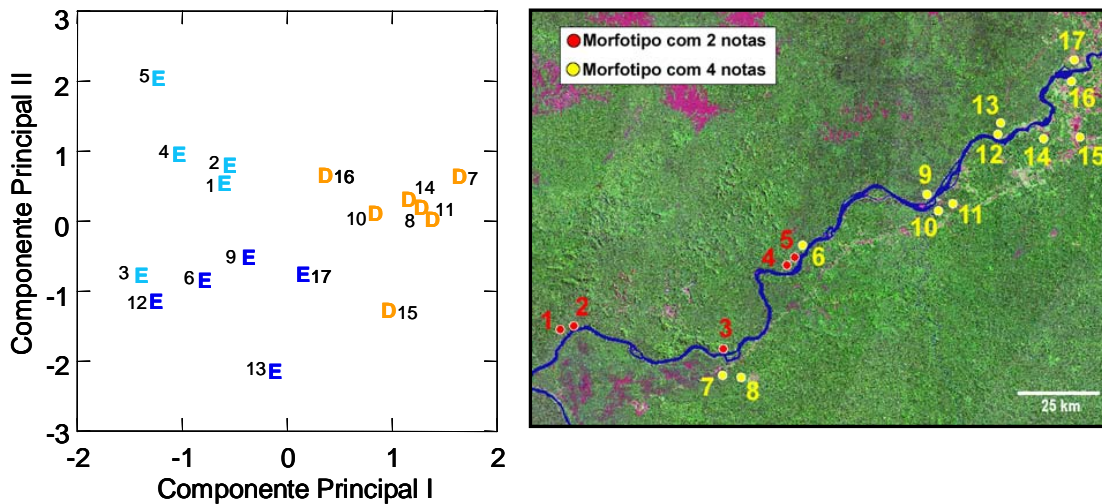
Uma análise de componentes principais sobre as dezenove variáveis morfométricas externas transformadas em seus  $\log_{10}$ , gerou um primeiro componente (CP - I) que explicou 43,93% da variação morfológica total, todas as variáveis tendo “loadings” positivos e geralmente altos neste componente. O segundo componente (CP - II) explicou apenas 6,79% da variação morfológica (Tabela 6).

Os dois primeiros componentes principais foram utilizados como variáveis dependentes em uma MANOVA, para testar se existiam diferenças entre os três grupos indicados pelas análises acústicas. O peso dos animais e as coordenadas das áreas de coleta foram incluídos como covariáveis, considerando os prováveis efeitos dessas variáveis sobre os caracteres morfológicos. A análise revelou que os três grupos testados (animais de 2 notas, e animais de 4 notas dos lados direito e esquerdo) são significativamente diferentes morfológicamente (*Pillai trace* = 0,208;  $P < 0,001$ ; 199 g.l.), independente do efeito de tamanho (*Pillai trace* = 0,507;  $P < 0,001$ ; 199 g.l.) e variações decorrentes da distância entre áreas de coleta (*Pillai trace* = 0,086;  $P = 0,002$ ; 199 g.l.).

**Tabela 6:** Pesos das variáveis morfométricas sobre dois primeiros componentes da análise de componentes principais.

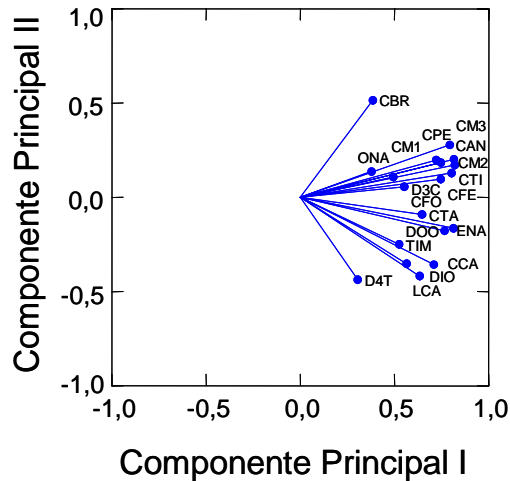
<b>Variável Morfológica</b>	<b>CP – I</b>	<b>CP - II</b>
CCA	0,710	-0,357
LCA	0,634	-0,418
CFO	0,552	0,055
ONA	0,378	0,137
ENA	0,813	-0,165
DIO	0,564	-0,353
DOO	0,766	-0,178
TIM	0,525	-0,250
CAN	0,815	0,201
CM1	0,747	0,184
CM2	0,821	0,171
CM3	0,793	0,277
D3C	0,494	0,107
CTI	0,804	0,128
CPE	0,722	0,197
D4T	0,305	-0,437
CFE	0,746	0,096
CBR	0,385	0,514
CTA	0,647	-0,092
“Eigenvalue”	8,347	1,291
<b>% da Variação Explicada</b>	<b>43,930</b>	<b>6,794</b>

A separação entre os grupos é evidenciada também pela distribuição das áreas de coleta ao longo dos componentes principais, onde áreas no lado direito do rio separam-se das do lado esquerdo ao longo de CP-I. Dentre as áreas do lado esquerdo do rio, amostras do morfotipo de 2 notas tendem a formar um grupo distinto do morfotipo de 4 notas, ao longo do CP–II, com exceção do ponto 3 – Mutum-E (Fig. 13).



**Figura 13:** Distribuição das populações amostradas ao longo dos componentes principais construídos com as variáveis morfométricas e mapa esquemático com a localização relativa entre pontos de coleta. Indivíduos do ponto n° 3, pertencentes ao morfotipo de 2 notas, foram mais similares, em média, à indivíduos das populações de 4 notas da mesma margem. E = pontos no lado esquerdo; D = pontos no lado direito.

A posição relativa dos vetores de peso das variáveis gerados pela análise (Fig. 14) e seus “loadings” no CP-I, sugeriam que um único fator estivesse direcionando a variação das características morfológicas externas. Os resultados da MANOVA apontaram que o tamanho dos animais foi o fator mais provável influenciando os valores dos “loadings” observados no CP-I, que explicou a maior parte da variação morfológica. O CP-II teria explicado, portanto, apenas 6,76% da variação morfológica restante, que seria independente de efeitos do tamanho e representaria, assim, a forma do corpo.



**Figura 14:** Vetores de peso das variáveis morfológicas em espaço bidimensional originados pela análise de componentes principais. Ver Tabela 3, p. 30, para descrição dos códigos das variáveis.

Assim, para avaliar a variação em forma do corpo, independente de efeitos causados por variações em tamanho, foi realizada uma segunda análise de componentes principais, utilizando os resíduos de regressões das dezenove variáveis morfométricas externas contra o peso.

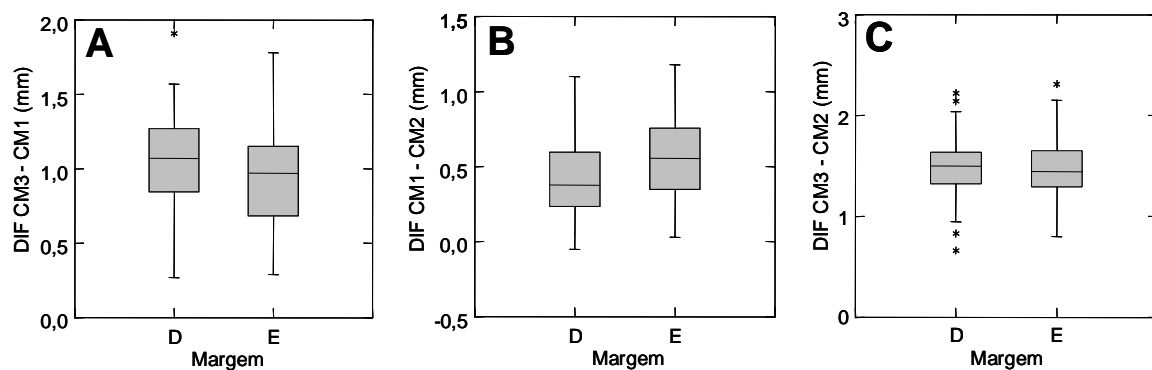
Os cinco primeiros componentes da análise utilizando os resíduos responderam por 50,3% da variação morfológica independente de tamanho (CP-I = 19,8%; CP-II = 9,7%; CP-III = 8,3%; CP-IV = 6,7%; CP-V = 5,9%). Individualmente, os componentes explicaram pouco a variação morfológica, mas responderam por mais variação em forma do corpo do que os 6,77% do CP-II da análise anterior, por mostrarem a variação em forma do corpo que antes estava incluída no CP-I e escondida pelo efeito do tamanho sobre as variáveis morfométricas.

Os cinco primeiros componentes gerados com os resíduos foram utilizados como variáveis dependentes em uma MANOVA para testar diferenças em forma do corpo entre os mesmos três grupos. Houve diferença significativa entre os grupos (*Pillai trace*

= 0,321;  $P < 0,001$ ; 197 g.l.), independente do efeito da distância geográfica sobre as variáveis morfológicas (*Pillai trace* = 0,137;  $P = 0,002$ ; 197 g.l.).

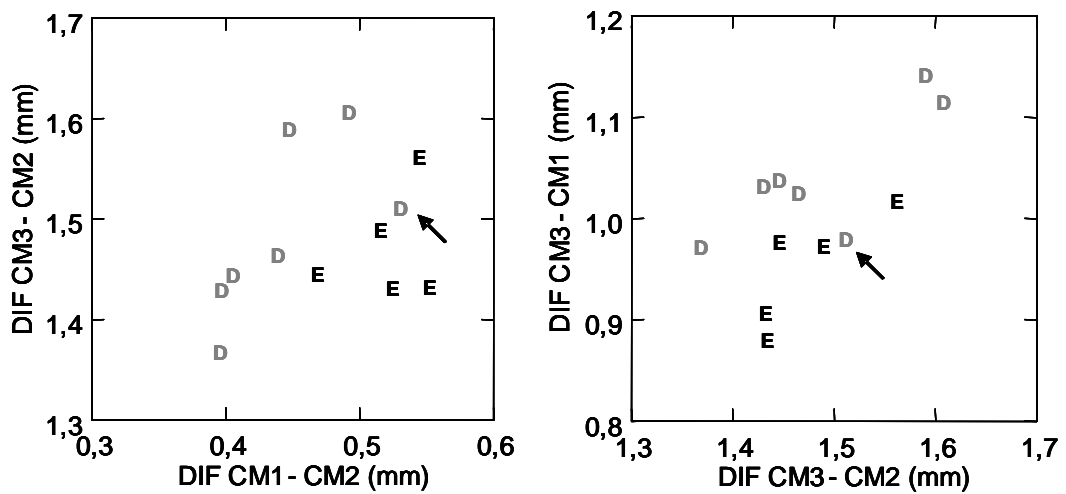
As diferenças aritméticas entre os comprimentos dos dedos palmares III e I e dedos I e II de amostras do morfotipo de 4 notas foram significativamente diferentes entre lados do rio (CM3 – CM1, ANOVA,  $F_{1,150} = 4,669$ ;  $P = 0,032$  e CM1-CM2, ANOVA,  $F_{1,150} = 4,061$ ;  $P = 0,015$ ). Não houve diferença significativa entre lados do rio, na diferença aritmética entre os comprimentos dos dedos III e II (CM3-CM2, ANOVA,  $F_{1,150} = 0,047$ ;  $P = 0,15$ ). Assim, as diferenças observadas entre margens foram devidas principalmente a um maior comprimento relativo do dedo I em populações da margem esquerda (Fig. 15A, B e C).

Em uma única localidade da margem direita (ponto 8, Mutum-DA), os animais também apresentaram dedos número I relativamente grandes (Fig. 16). Esta localidade encontrava-se a menos de 5,0 km de outro ponto de coleta, no mesmo lado do rio (ponto 7, Mutum-D).



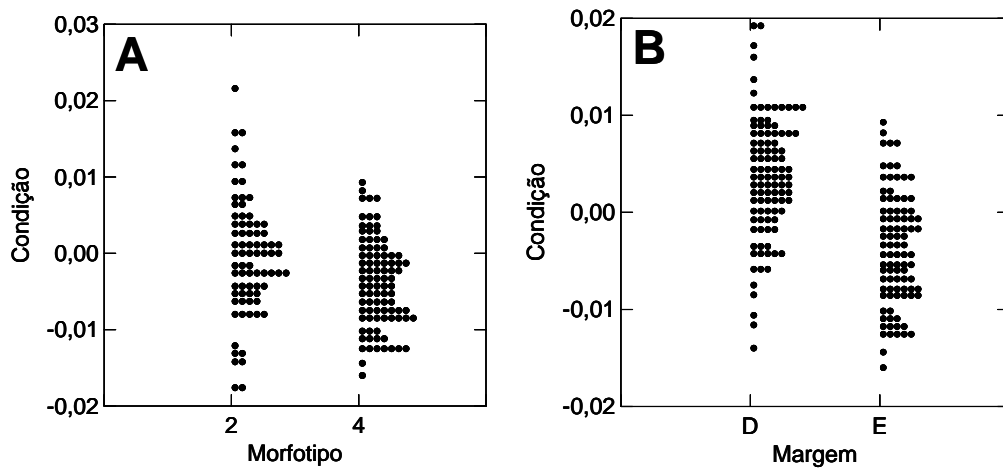
**Figura 15:** Relações entre comprimentos relativos dos dedos para populações de 4 notas da margem direita (D) e esquerda (E) do rio Madeira. A barra horizontal central representa o valor médio das diferenças, os quadrados em cinza representam a amplitude onde 50% dos valores de diferença estão representados, linhas verticais representam o desvio-padrão.





**Figura 16:** As setas apontam uma localidade no lado direito (Mutum-DA) cujos indivíduos também possuem dedos I relativamente longos (localidade nº 8 no mapa).

O fator de condição diferiu significativamente entre indivíduos dos morfotipos de 2 e 4 notas no lado esquerdo do rio ( $U = 4493,5$ ;  $P = 0,01$ ;  $n = 168$ ). O morfotipo de 2 notas apresentou condição superior, em média, àquela observada para o morfotipo de 4 notas (Fig. 17A). Diferença significativa em fator de condição também foi encontrada entre lados do rio, considerando apenas indivíduos do morfotipo de 4 notas ( $U = 7552,0$ ;  $P < 0,01$ ;  $n = 193$ ). O fator de condição foi, em média, superior em indivíduos do lado direito (Fig. 17B).



**Figura 17:** Variação do fator de condição individual de acordo com morfotipo (A) e lado do rio, somente para o morfotipo de 4 notas (B).

## 4 Discussão

Estudos anteriores já haviam constatado que rios amazônicos limitam espécies ou populações de primatas (Peres *et al.*, 1996; Roosmalen *et al.*, 1998) e aves (Caparella, 1987; Cohn-Haft, 2000). No entanto, os únicos estudos sobre a importância de rios como barreiras para anfíbios anuros foram realizados no Rio Juruá (Gascon *et al.*, 1996, 1998; Lougheed *et al.*, 1999). Esses estudos não encontraram evidências de diferenciação em populações de anuros em lados opostos do rio. Em todos eles, populações das margens direita e esquerda não formaram grupos discretos, independente dos parâmetros analisados. Apesar do baixo número de indivíduos analisados em algumas das localidades visitadas pelos autores e das menores proporções do rio Juruá em relação ao Madeira e a outros rios amazônicos, esses trabalhos atribuíram ao rio uma importância reduzida, ou secundária, como limite de distribuição para populações de *A. femoralis* e de outras espécies de anuros.

Baseados nas descrições de A. R. Wallace, que fundamentaram a hipótese de rios como barreiras, alguns autores (Caparella, 1987; Peres *et al.*, 1996; Cohn-Haft, 2000; Patton *et al.*, 2000) sugeriram que o efeito de barreira deve depender da largura do rio, tornando-se mais fraco à montante, uma vez que uma menor largura do leito poderia facilitar a travessia de indivíduos e o cruzamento entre populações. Diferente do que foi sugerido por esses autores, no alto Rio Madeira a maior divergência entre populações ocorre justamente no trecho à montante. No lado direito do rio, todas as populações pertencem ao morfotipo com cantos de anúncio com 4 notas, sendo relativamente uniformes em características acústicas do canto e morfologia externa. No lado esquerdo do rio, populações encontradas à jusante, a partir da localidade do Jirau, pertencem ao morfotipo com cantos de 4 notas e coloração ventral

posterior branco e preta. As populações à montante pertencem a um outro morfotipo, com cantos de anúncio de 2 notas e coloração ventral posterior alaranjada.

É provável que as populações dos morfotipos de 2 e 4 notas representem táxons distintos. Variações em tamanho e caracteres acústicos de cantos de anúncio indicam razoavelmente divergências genéticas em anfíbios (Blair & Littlejohn, 1960; Heyer, 1997; Summers *et al.*, 1997; Narins *et al.*, 1998). Já variações expressivas em coloração entre populações, não correspondem necessariamente a variações genéticas pronunciadas em anuros dendrobatídeos, podendo os padrões de coloração divergir rapidamente, por seleção sexual (Summers *et al.*, 1997). Todavia, dado o caráter aleatório desse tipo de seleção, um padrão espacial de distribuição de formas variantes de caracteres relacionados à seleção de parceiros conspecíficos indica que houve a ação de fatores geográficos sobre sua divergência (Ryan & Wilczynski, 1991). As análises mostraram que os dois morfotipos são distintos também em condição, morfologia externa e caracteres acústicos compartilhados, reforçando a hipótese de que as duas formas constituem táxons distintos.

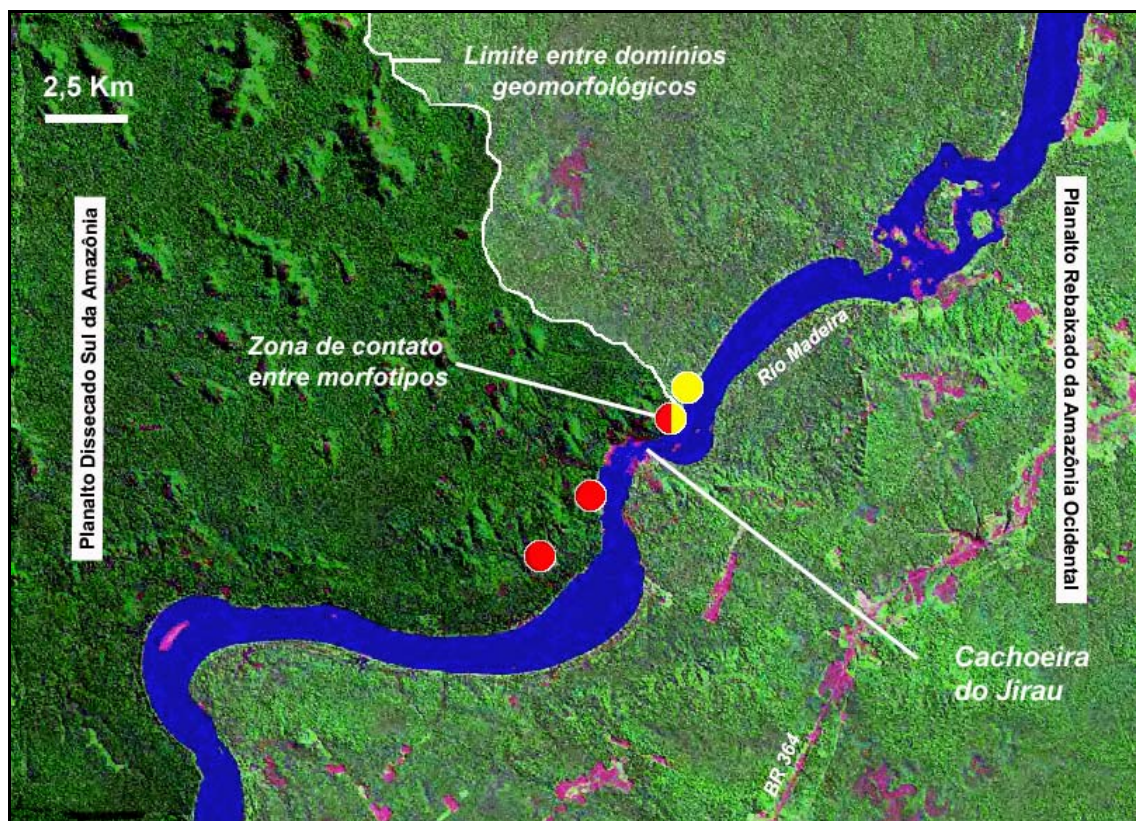
Até 1987, apenas populações com cantos de anúncio de 3 e 4 notas eram conhecidas para *A. femoralis*. Sabia-se que indivíduos dos morfotipos de 3 notas, provenientes do rio Pachitea, Peru, e de 4 notas, de outras localidades na Amazônia eram capazes de reproduzir entre si e produzirem prole viável, cujos cantos de anúncio são constituídos por sessões de 3 e 4 notas. Ainda, cruzamentos entre machos híbridos e fêmeas híbridas, ou pertencentes à geração parental, produziam ovos que morreram em etapas precoces do desenvolvimento (Hödl, 1987). A ocorrência de populações com cantos de 2 notas foi relatada apenas recentemente, nas proximidades de Rio Branco, Estado do Acre (A. P. Lima, com. pess.; Amézquita *et al.*, no prelo), mas não há dados sobre compatibilidade reprodutiva destas com outras populações.

Pouca ou nenhuma sobreposição em distribuição geográfica é esperada de espécies-irmãs que divergiram recentemente de forma alopátrica (Barraclough & Vogler, 2000) ou de populações que sofreram um processo de especiação incompleto (Haffer, 1969), ocorrendo apenas se estas acumulassem diferenças fenotípicas suficientes para originar diferenciações em seus nichos. Do contrário, as populações se excluiriam mutuamente por competição. Na área de estudo, os dois morfotipos foram encontrados juntos apenas ao longo da zona de contato, não havendo sobreposição em área de distribuição. O padrão sugere, dessa forma, que os morfotipos são formas divergentes de uma mesma espécie (talvez subespécies) ou espécies distintas que tenham divergido a um tempo insuficiente para gerar diferenciações substanciais em seu nicho.

Enquanto o rio Madeira é uma barreira potencial entre as populações com cantos de 2 e 4 notas no sentido SW-NE, não existe uma barreira óbvia entre esses dois morfotipos ao longo da margem esquerda, no sentido NW-SE. A zona de contato entre os morfotipos coincide com o limite entre dois domínios geomorfoestruturais, o qual é perpendicular ao sentido do rio (Souza Filho *et al.*, 1999) e é evidenciado em seu leito por uma quebra de nível que ocasiona o conjunto de grandes corredeiras conhecido localmente como Cachoeira do Jirau (Fig. 18). Atualmente, a zona de contato geomorfológica não apresenta uma barreira física que os indivíduos de *A. femoralis* não possam ultrapassar, mas espécimes coletados ao longo da zona de contato (não incluídos nas análises mostradas por este estudo) mostram que os morfotipos com cantos de 2 e 4 notas distribuem-se de forma parapátrica por pelo menos 1,5 km do limite geomorfológico a partir da margem do Rio Madeira.

A história tectônica recente da região do alto Rio Madeira conta com estudos escassos e pouco se pode dizer a respeito de eventos potencialmente vicariantes

associados a ela. No caso específico da margem esquerda do alto Rio Madeira, não é possível determinar com clareza se já existiu uma barreira vicariante expressiva onde ocorre hoje a zona de contato entre morfotipos de *A. femoralis* ou se a divergência foi ocasionada por outros mecanismos, ou em outros locais.



**Figura 18:** Limite entre domínios geomorfológicos do alto Rio Madeira (adaptado de Souza Filho *et al.*, 1999), enfatizando localização da zona de contato entre morfotipos. Pontos vermelhos indicam áreas de coleta onde foram encontrados exemplares do morfotipo com canto de 2 notas; o ponto amarelo representa uma área de coleta onde foram encontrados indivíduos do morfotipo com canto de 4 notas. O ponto vermelho e amarelo representa a zona de contato entre morfotipos.

A existência de pelo menos 20 zonas de contato entre 40 táxons de aves de florestas terra-firme já havia sido relatada (Haffer, 1997). Essas zonas ocorrem em áreas de floresta contínua e são geralmente perpendiculares a grandes rios amazônicos, como observado neste estudo para *A. femoralis*. Haffer as considerou zonas de sutura entre

táxons que divergiram em refúgios florestais no Pleistoceno, dando suporte a sua teoria de refúgios como mecanismo de especiação. O autor descarta fatores ecológicos como fatores determinantes da origem e localização dessas zonas de contato, uma vez que atravessam vastas áreas de terrenos ecologicamente variáveis.

A zona de contato entre os morfotipos de *A. femoralis* diferencia-se daquelas observadas por Haffer para aves por ocorrer apenas em uma das margens de um grande rio, não apresentando uma zona de contato complementar na margem oposta, e por ocorrer sobre terrenos com origens geológicas claramente diferentes (Haffer, com. pess.). Apesar de não ser possível descartar a hipótese de que os morfotipos de *A. femoralis* do alto Rio Madeira tenham divergido em refúgios florestais durante o Pleistoceno, esta não parece ser a explicação mais provável de sua divergência. A ocorrência de cada um dos morfotipos sobre domínios geomorfológicos distintos, encontrando-se exatamente sobre seu limite, sobre uma falha tectônica, suportaria melhor hipóteses paleogeográficas ou ecológicas (*sensu* Endler, 1982), a despeito do efeito de flutuações climáticas cíclicas ocorridas no Quaternário. Ainda, não seria possível relacionar o padrão de divergência observado à localização dos refúgios ou centros de endemismo proposta por Haffer (1969).

Eventos tectônicos já foram levantados como possíveis causadores de divergência genética populacional de *A. femoralis*. Loughheed *et al.* (1999) realizando testes ao longo do rio Juruá, AM, sugeriram que outros fatores, que não o leito do rio, podem ter gerado a diferenciação genética observada entre populações da espécie. O arco tectônico de Iquitos, uma crista rochosa formada em decorrência da orogênese da Cordilheira dos Andes (cujos vestígios são encontrados hoje apenas em camadas do subsolo), atravessa perpendicularmente o leito do Juruá e é coincidente com os pontos de maior divergência genética de *A. femoralis* ao longo das margens do rio.

A correspondência das diferenças entre populações do morfotipo com cantos de 4 notas e sua separação pelo leito do rio é menos nítida. Existem diferenças estatisticamente significativas em características acústicas do canto, morfologia externa e fator de condição entre populações dos dois lados do rio, mas as diferenças não parecem ser fixas. Em dois casos, houve pronunciada variabilidade acústica ou morfológica, mesmo entre localidades separadas por apenas alguns quilômetros. No ponto 17 (Sto.Antônio-E), há animais tão grandes quanto os do lado direito do rio. No ponto 8 (Mutum-DA), os animais têm dedos I relativamente maiores, como em populações do lado esquerdo do rio. Estas exceções ao padrão geográfico podem ser consideradas indícios de que o padrão de divergência de caracteres fenotípicos provavelmente foi determinado por vicariância ou efeito fundador, num cenário de eventos de migração raros e seleção natural fraca (Sokal & Odem, 1978).

Ao longo da área de estudo, o rio possui aproximadamente 1,0 km de largura e certamente representa uma barreira considerável para anuros que habitam o interior de floresta de terra-firme. Alterações de curso dos rios e a dinâmica de ilhas originadas por acúmulo de sedimentos já foram tidos como possíveis fenômenos capazes de alterar padrões de divergência genética causados por rios em primatas, promovendo a transferência passiva de indivíduos de uma margem à outra (Ayres & Clutton-Brock, 1992). Sabe-se que, ao longo da área abordada pelo presente estudo, o rio Madeira atravessa a maior parte de seu percurso encaixado sobre um vale fluvial incisivo, de embasamento predominantemente cristalino e geologicamente antigo. Portanto, não parecem ter ocorrido mudanças com respeito à orientação do curso do rio em tempos geologicamente recentes. A travessia de indivíduos de *A. femoralis* entre margens seria possível por dinâmica de ilhas sedimentares ao longo do leito, mas não é conhecido se isso realmente ocorre ou com que frequência.



A despeito de exceções ao padrão de divergência entre margens opostas, do grau de diferenciação entre morfotipos e das dimensões da área de estudo, que abrange apenas uma fração do Rio Madeira, os resultados aqui apresentados concordam com os resultados de estudos que enfatizam a importância de eventos históricos sobre padrões de divergência de animais amazônicos (Cracraft & Prum, 1988; Ron, 2000; Hall & Harvey, 2002).

Estudos sobre uma área muito maior serão necessários para elucidar completamente a origem da distribuição atual dos anuros pertencentes ao complexo *Allobates femoralis* ao longo do Rio Madeira. No entanto, este estudo evidenciou que pelo menos uma espécie de anuro mostra complementaridade entre um padrão de divergência populacional e a divisão de suas populações em lados opostos de um grande rio amazônico, como já havia sido documentado para várias espécies de aves e mamíferos.

O estudo também apresenta um padrão de divergência inédito para a região amazônica, onde grupos de populações muito divergentes ocorrem de forma parapátrica sobre a mesma margem de um grande rio, sem que exista um padrão complementar na margem oposta, que por sua vez apresenta populações relativamente uniformes da espécie.

Por fim, foi possível mostrar que populações incluídas no que é nominalmente uma espécie mostram diferenças fenotípicas significativas, compatíveis com limites estabelecidos por um grande rio ou por um limite entre unidades geológicas.

## ***Referências Bibliográficas***

- Amézquita, A., Hödl, W., Lima, A.P., Castellanos L., Erdtmann, L. & de Araújo M.C. Masking interference and the evolution of the acoustic communication system of the Amazonian frog *Epipedobates femoralis*. *Evolution*, no prelo.
- Ayres, J.M. & Clutton-Brock, T.H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *The American Naturalist* 140: 531-537.
- Blair, W.F. & Littlejohn, J. 1960. Stage of speciation of two allopatric populations of chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution* 14: 82-87.
- DNPM - Brasil. 1978. *Projeto RADAMBRASIL – Levantamento dos recursos naturais*, Vol.18, Folha SC 20, Porto Velho: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro. DNPM.
- Barracough T.G. & Vogler, A.P. 2000. Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. *The American Naturalist* 155(4): 419-434.
- Bickel, R. & Losos, J.B. 2002. Patterns of morphological variation and correlates of habitat use in Chameleons. *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 91-103.
- Capparella, A.P. 1987. *Effects of riverine barriers on genetic differentiation of Amazonian forest undergrowth birds*. Tese [Doutorado]. Luisiana State University. Baton Rouge.
- Charif, R.A., Clark C.W. & Frisrup, K.M. 2004. *Raven 1.2 User's Manual*. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY.
- Cohn-Haft, M. 2000. *A case study in amazonian biogeography: Vocal and DNA sequence variation in Hemitriccus Flycatchers*. Tese [Doutorado]. Luisiana State University. Baton Rouge.
- Cracraft, J. & Prum, R.O. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Systematic Zoology* 37: 221-236.
- Endler, J.A. 1982. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *American Zoologist* 22: 441-452.
- Foster, S. A. 1999. The geography of behaviour: An evolutionary perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 14(5): 190-195.
- Frost D. R. 2004. *Amphibian species of the world* [on line]. Dezembro 2005. American Museum of Natural History, New York.  
<<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>

- Gascon, C., Lougheed, S.C. & Bogart, J.P. 1996. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica* 28(3): 376-387.
- Gascon, C., Lougheed, S.C. & Bogart, J. P. 1998. Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: A test of the Riverine Barrier Hypothesis. *Biotropica* 30(1): 104-119.
- Gascon, C., Malcolm, J.R., Patton, J.L., Silva, M.N.F., Bogarti, J.P., Lougheed, S.P., Peres, C.A., Neckel, S. & Boag, P.T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *PNAS* 97(25): 13672–13677.
- Gerhardt, H.C. & Huber, F. 2002. *Acoustic communication in insects and anurans: Common problems and diverse solutions*. University of Chicago Press, Chicago. pp. 29-30.
- Gottsberger, G. & Gruber, E. 2004. Temporal partitioning of reproductive activity in a neotropical anuran community. *Journal of Tropical Ecology* 20: 271-280.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer, J. 1974. Avian speciation in Tropical South America: With a systematic survey of the toucans (Ramphastidae) and jacamars (Galbulidae). *Publications of the Nuttall Ornithological Club* 14: 1-390.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity Conservation* 6: 451–476.
- Hafner, D. J. 1992. Speciation and persistence of a contact zone in Mojave Desert Ground squirrels, subgenus *Xerospermophilus*. *Journal of Mammalogy*, 73(4): 770-778.
- Heyer, W.R. 1997. Geographic variation in the frog genus *Vanzolinius* (Anura: Leptodactylidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 110(3): 338-365.
- Heyer, W.R. & Reid, Y.R. 2003. Does advertisement call variation coincide with genetic variation in the genetically diverse frog taxon currently known as *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Leptodactylidae)? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75(1): 39-54.
- Hödl, W. 1987. *Dendrobates femoralis* (Dendrobatidae): a handy fellow for frog bioacoustics. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*. Nijmegen, 1987. p. 201-204.
- Keddy-Hector, A.C., Wilczynski, W. & Ryan, M.G. 1992. Call patterns and basilar papilla tuning in cricket frogs. II. Intrapopulation variation and allometry. *Brain Behav. Evolution* 39: 238-246.

- Legendre, P., Dale, M.R.T., Fortin, M.J., Gurevitch, J., Hohn, M. & Myers, D. 2002. The consequences of spatial structure for the design and analysis of ecological field surveys. *Ecography* 25: 601–615.
- Lescure, J. & Marty, C. 2000. *Atlas des Amphibiens de Guyane*. Patrimoines Naturels, 45: 388 p.
- Lougheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Bogart, J.P. & Boag, P.T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypothesis of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society Lond.* 266: 1829-1835.
- Lutz, B. & Kloss, G.R. 1952. Anfíbios anuros do alto Solimões e Rio Negro: apontamentos sobre algumas formas e suas vicariantes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 50: 621-677.
- Narins, P.M., Feng, A.S., Yong, H. & Christensen-Dalsgaard, J. 1998. Morphological, behavioral, and genetic divergence of sympatric morphotypes of the treefrog *Polypedates leucomystax* in peninsular Malaysia. *Herpetologica* 54 (2): 129-142.
- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography* 26: 475-485.
- Patton, J.L., Silva, M.N.F. & Malcom, J.R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal Spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: A test of the riverine hypothesis. *Evolution* 48(4): 1314-1323.
- Patton, J.L., Silva, M.N.F. & Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 44: 1-305.
- Peres, C.A., Patton J.L. & da Silva, M.N.F. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. *Folia Primatologica* 67: 113-124.
- Rodríguez, L.O. & Duellman, W.E. 1994. *Guide of the frogs of the Iquitos Region, Amazonian Peru*. University of Kansas Publications [Natural History Museum -Special Publications, 22], Lawrence, Kansas. 80 pp.
- Ron, S.R. 2000. Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate groups. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 379-402.
- Roithmair, M.E. 1992. Territoriality and male mating success in the Dart-Poison Frog, *Epipedobates femoralis* (Dendrobatidae, Anura). *Ethology* 92: 331-343.

- Roithmair, M.E. 1994. Field studies on reproductive behaviour in two dart-poison frog species (*Epipedobates femoralis*, *Epipedobates trivittatus*) in Amazonian Peru. *Herpetological Journal* 4: 77-85.
- Roosmalen, M.G.M. van, Roosmalen, T. van, Mittermeier, R.A. & Fonseca, G.A.B. 1998. A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower river Aripuanã, State of Amazonas, central Brazilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia* 22: 27 pp.
- Ryan, M.J. 1988. Energy, calling, and selection. *American Zoologist* 28: 885-898.
- Santos, J.C., Coloma, L.A. & Cannatella, D.C. 2003. Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *PNAS* 100(22): 12792-12797.
- Sokal, R.R. & Oden, N.L. 1978. Spatial autocorrelation in biology 2. Some biological implication and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean Society* 10: 229-249.
- Souza Filho, P.W.M., Quadros, M.L.E.S., Scandolara, J.E., Silva Filho, E.P. & Reis, M.R. 1999. Compartimentação morfoestrutural e neotectônica do sistema fluvial Guaporé-Mamoré-Alto Madeira, Rondônia – Brasil. *Revista Brasileira de Geociências* 29(4): 469-476.
- Summers, K., Bermingham, E., Weigt, L., McCafferty, S. & Dahistrom, L. 1997. Phenotypic and genetic divergence in three species of dart-poison frogs with contrasting parental behavior. *Journal of Heredity* 88: 08-13.
- Táranó, Z. 2001. Variation in male advertisement calls in the neotropical frog *Physalaemus eneseffae*. *Copeia*, 2001(4): 1061-1072.
- Vences, M., Kosuch, J., Boistel, R., Haddad, C.F.B., La Marca, H. & Lötters, S. 2003. Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Organisms Diversity and Evolution* 3: 215-226.
- Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Zani, P.A. & Titus, T.A. 1997. The role of habitat shift in the evolution of lizard morphology: evidence from tropical *Tropidurus*. *PNAS* 94: 3828-3832.
- Wilkinson, L. 1990. *SYSTAT: the system for statistics*. SYSTAT inc., Evanston, Illinois, 677 pp.
- Zimmermann, H. & Zimmermann, E. 1988. Etho-Taxonomie und zoogeographische Artengruppenbildung bei Pfeilgiftfröschen (Anura: Dendrobatidae). *Salamandra* 24: 125-160.

## APÊNDICE I

### Matriz de Distâncias entre os Pontos de Coleta.

As distâncias lineares entre cada ponto foram estimadas a partir do programa computacional ArcMap do pacote ArcGIS, plotando-se as coordenadas dos pontos sobre imagem de satélite referenciada (ZULU) da área de estudo. As distâncias são apresentadas em km. O ponto de código “Z Contato” representa uma zona de contato, na margem esquerda, entre dois morfotipos de *Allobates femoralis*.

	Abunã - D	Abunã - E	Abunã -EA	Mut - D	Mut - DA	Mut - E	Jirau -D	Jirau - E	Jirau - EA	Bxo Jirau	Z Contato	Jaci - D	Jaci - DA	Jaci - E	Morr - D	Morr - E	Morr - EA	StoAnt - D	StoAnt - D	StoAnt - E	
Abunã - D	0																				
Abunã - E	7.56	0																			
Abunã -EA	8.91	3.37	0																		
Mut - D	47.9	48.8	45.7	0																	
Mut - DA	52.4	53.2	50.2	4.51	0																
Mut - E	47.3	47.1	43.9	6.88	8.91	0															
Jirau -D	75.0	71.9	68.6	40.3	38.7	34.9	0														
Jirau - E	71.9	68.9	65.6	37.2	35.7	31.7	3.27	0													
Jirau - EA	74.0	71.0	67.7	39.5	37.9	34.0	0.95	2.36	0												
Bxo Jirau	77.2	74.0	70.7	42.9	41.3	37.5	2.67	5.89	3.53	0											
Z Contato	76.8	73.6	70.3	42.2	40.6	36.8	1.97	5.22	2.87	0.765	0										
Jaci - D	122.0	119.0	116.0	82.0	78.9	78.3	46.5	49.5	47.4	44.4	44.8	0									
Jaci - DA	118.0	115.0	112.0	78.5	75.4	74.7	42.8	45.8	43.7	40.7	41.1	3.69	0								
Jaci - E	117.0	113.0	110.0	78.3	75.5	74.2	41.2	44.3	42.1	38.9	39.4	7.27	4.99	0							
Morr - D	154.0	150.0	147.0	115.0	112.0	112.0	78.5	81.7	79.4	76.2	76.7	33.0	36.5	37.3	0						
Morr - E	141.0	137.0	134.0	104.0	102.0	99.7	66.1	69.4	67.1	63.7	64.2	23.0	26.0	25.5	13.9	0					
Morr - EA	142.0	138.0	135.0	106.0	103.0	101.0	67.2	70.5	68.2	64.8	65.3	24.3	27.3	26.7	13.2	1.27	0				
StAnt - D	164.0	161.0	158.0	125.0	121.0	121.0	88.8	91.9	89.7	86.5	87.0	42.5	46.2	47.6	11.4	25.2	24.6	0			
StAnt - DA	168.0	164.0	161.0	132.0	129.0	128.0	93.7	96.9	94.6	91.2	91.8	50.0	53.3	53.2	18.4	27.7	26.5	17.1	0		
StAnt - E	172.0	168.0	165.0	136.0	134.0	132.0	97.6	101.0	98.6	95.1	95.7	54.0	58.0	57.6	23.9	32.1	30.9	22.4	5.66	0	

## APÊNDICE II

Configurações de digitalização de gravações e análise de dados acústicos no *software* Raven 1.2 (Charif *et al.*, 2004) para *Allobates femoralis*.

### **Digitalização:**

As gravações foram digitalizadas a partir de fitas cassete utilizando a ferramenta “New Recorder” a **22050 Hz** (*Sample Rate*) e **16 bits** (*Sample Format*). O restante dos parâmetros seguiu o *default* oferecido pelo programa.

### **Análises Espectrais:**

A análise espectral foi realizada aplicando-se uma transformada rápida de Fourier às gravações digitalizadas, utilizando a função **Blackmann** (*Window Type*), com uma resolução em frequência de **82 Hz** (*3dB Bandwidth*) e **2048 pontos** (*DFT Size*). As medidas temporais tiveram precisão de **20 mS** (*Window Size*), com um limite de sobreposição entre dados adjacentes ajustado para **80 mS** (*Overlap*). Segue abaixo a descrição de cada parâmetro:

### **Definições de termos:**

**Window Type** – Seleciona funções para a transformação de dados, reduzindo o efeito de ondas espúrias dos espectros. As funções variam quanto à magnitude das ondas adjacentes em relação à onda principal.

**3dB Bandwidth** – Representa a largura, em Hz, da onda principal (gerada pela frequências de maior volume) 3 dB abaixo da frequência máxima. Sua variação influencia o grau de resolução em frequência do gráfico. Quanto maior a resolução temporal (definida em “*Window Size*”), menor a resolução em frequência do gráfico.

**Window Size** – Define a duração de cada dado de gravação utilizado na criação de espectros individuais, que juntos constituirão o espectrograma (gráfico). Quanto maior o valor adotado, maior a resolução das variáveis temporais.

**Overlap** – Representa o limite de sobreposição entre dados adjacentes utilizados na criação do espectrograma.

## APÊNDICE III

TABELA: Número de gravações obtidas por ponto, número efetivo de gravações utilizadas nas análises acústicas, e número de indivíduos coletados utilizados nas análises morfológicas. Diferenças entre o número de gravações obtidas em campo e o número de gravações utilizados nas análises acústicas devem-se à ausência de dados sobre massa corporal (quando animais gravados não foram coletados) ou temperatura do ar no momento da gravação.

<b>Ponto N°</b>	<b>Código da Área de Coleta</b>	<b>Número de gravações</b>	<b>N efetivo - Análises Acústicas</b>	<b>N - Análises Morfológicas</b>
1	Abunã-E	12	12	11
2	Abunã-EA	15	13	15
3	Mutum-E	10	10	10
4	Jirau-E	13	10	12
5	Jirau-EA	10	8	11
6	BaixoJirau-E	15	15	17
7	Mutum-D	15	14	14
8	Mutum-DA	14	12	12
9	Jaci-E	16	16	17
10	Jaci-DA	16	12	12
11	Jaci-D	10	10	10
12	Morrinhos-E	15	13	13
13	Morrinhos-EA	13	11	12
14	Morrinhos-D	13	13	13
15	SAntonio-DA	16	11	12
16	SAntonio-D	17	14	16
17	SAntonio-E	6	5	5
<b>TOTAL</b>		<b>226</b>	<b>199</b>	<b>212</b>