UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP- FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Identidade taxonômica e redefinição de espécies do complexo de *Boana calcarata* - *B. fasciata* (Anura: Hylidae)

Pedro Marinho

RIBEIRÃO PRETO / SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP- FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Identidade taxonômica e redefinição de espécies do complexo de *Boana calcarata* - *B.*

***fasciata* (Anura: Hylidae)**

Pedro Marinho

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciência e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de mestre em Ciências.

Área: Biologia Comparada

Orientador: Dr. Ariovaldo Antonio Giaretta

Coorientador: Dr. Thiago Ribeiro de Carvalho

RIBEIRÃO PRETO / SP

2020

Não autorizo a reprodução e divulgação deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, uma vez que os dados aqui contidos são inéditos.

Ficha Catalográfica

Marinho, Pedro.

Identidade taxonômica e redefinição de espécies do complexo de *Boana calcarata* - *B. fasciata* (Anura Hylidae). Ribeirão Preto, 2020.

84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Giaretta, Ariovaldo Antonio.

1. Amazônia; 2. Biodiversidade; 3. Cophomantini; 4. Grupo de *Boana albopunctata*; 5. Taxonomia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedro Marinho

Identidade taxonômica e redefinição de espécies do complexo de *Boana calcarata* - *B. fasciata* (Anura: Hylidae). Ribeirão Preto, 2020.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências,
Área: Biologia Comparada.

Aprovado em ____/____/____

Dr(a): _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr(a): _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr(a): _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmão que, mesmo frente às dificuldades, me proveram um ambiente privilegiado de amor e cuidado, permitindo que eu pudesse me dedicar a estudar e trabalhar com o que eu amo.

Ao meu orientador, Dr. Ariovaldo A. Giaretta, pelo seu comprometimento em formar novos pesquisadores, pelos ensinamentos valiosos, pela confiança, pelos inesquecíveis momentos de descontração e por ter me dado a oportunidade de ingressar nos estudos dos anuros.

Ao meu coorientador, Dr. Thiago R. de Carvalho, pela enorme paciência, pelo empenho e dedicação em me orientar, por todo conhecimento compartilhado e pelas ricas discussões que me ajudaram/ajudam a crescer como pesquisador.

Aos colegas de laboratório, MSc. Davi Lee Bang, MSc. Izadora Vidigal e André G. Lopes pelos momentos de descontração, trocas de conhecimento, pelas pilhas compartilhadas, tombos engraçados, mãos estendidas e playlists ouvidas nos diversos campos que tornaram possível a realização desse e de outros trabalhos.

Ao Dr. Antoine Fouquet e ao Dr. Carlos Eduardo Costa-Campos por compartilharem dados para a elaboração desta dissertação. Ao Dr. Célio Haddad por disponibilizar recursos de seu laboratório e à Dra. Mariana Lyra pelo conhecimento compartilhado e auxílio nos procedimentos de extração e amplificação.

À Cornell University, por disponibilizar gratuitamente o software “Raven Pro”. À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida e ao CNPq pelo financiamento de trabalhos de campo.

Ao meu namorado, Gustavo, e sua mãe, Sirlene, por me proverem suporte emocional e um lar em Uberlândia. À minha amiga, Michelle, por sempre me ouvir e entender os momentos em que não pude estar presente. E aos meus professores e professoras que contribuíram para minha formação acadêmica e também pessoal.

RESUMO

Espécie é a unidade básica da classificação biológica e delimitá-las é um dos principais objetivos dos estudos taxonômicos. O complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata* contém 8 espécies com distribuição amazônica. A diversidade desse grupo ainda pode estar subestimada, em parte pelo fato de que as espécies que o compõem são morfologicamente similares ou crípticas. Com isso em vista, uma abordagem taxonômica aliando diversas linhas de evidência é necessária para avaliar a riqueza de espécies do complexo e caracterizá-las detalhadamente. Para isso, usando uma abordagem taxonômica integrativa, caracterizamos nesse trabalho populações brasileiras de espécies do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata*. Descobrimos que *Boana dentei* (uma espécie descrita com base em uma única fêmea) é uma espécie que apresenta dimorfismo nos padrões de coloração, e características morfológicas e acústicas da espécie podem distingui-la de todas as outras sete espécies conhecidas do complexo. Além disso, confirmamos a identidade de uma população do Mato Grosso, previamente identificada como *Boana fasciata*, como uma espécie não descrita. A população do Acre foi identificada como *B. steinbachi*, com base na similaridade nas características morfológicas em comparação aos sítipos da espécie. Contudo, vale lembrar que ainda há muitas informações taxonomicamente importantes, como coloração em vida e vocalizações, ainda desconhecidas para a população topotípica de *B. steinbachi*.

Palavras-chave: 1. Amazônia; 2. Biodiversidade; 3. Cophomantini; 4. Grupo de *Boana albopunctata*; 5. Taxonomia.

ABSTRACT

Species is the basic unit of biological classification and species delimitation is one of the main goal of taxonomic studies. The *B. calcarata* - *B. fasciata* species complex has part of its diversity still underestimate and since its composed of morphologically very similar species, with a pan-Amazonia distribution, a taxonomic approach combining several lines of evidence is required to diagnoses and uncover the species contained in the complex. In this sense, we characterized Brazilian species/populations related to the complex. We found that *Boana dentei* (a species described based on a single female) is a dichromatic species, and acoustic and morphological data distinguish this species from all other seven species of the complex. Furthermore, genetic, acoustic and morphological data combined led us to confirm the identity of two populations (previously identified as *Boana fasciata* from Mato Grosso) as an undescribed species. The population of Acre was identified as *B. steinbachi* resulting from its similar morphological features relative to syntypes of *B. steinbachi*, although the latter is a species recently revalidated through analysis of only its type series (3 syntypes) and several important taxonomic characteristics of topotypes, such as their color in life and vocalizations are unknown.

Keywords: 1. Amazonia rainforest; 2. Biodiversity; 3. Cophomantini; 4. *Boana albopunctata* species group; 5. Taxonomy.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
Anuros e a taxonomia integrativa	11
O táxon <i>Boana</i> Gray, 1825	12
O complexo de espécies de <i>B. calcarata</i> - <i>B. fasciata</i>	12
Objetivos.....	13
CAPÍTULO I: REDESCRIÇÃO E DIAGNOSE DE <i>BOANA DENTEI</i> (HYLINAE:COPHOMANTINI)	14
Introdução	14
Métodos	15
Área de estudo e coleta de dados	15
Morfologia	18
Acústica	18
Resultados.....	19
Redescrição e diagnose de <i>Boana dentei</i> (Bokermann, 1967).....	19
Discussão	33
Apêndice	35
CAPÍTULO II: IDENTIDADE DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS RELACIONADAS AO COMPLEXO DE <i>BOANA CALCARATA</i> - <i>BOANA FASCIATA</i> (HYLINAE:COPHOMANTINI).	36
Introdução	36

Métodos	37
<i>Coleta de dados em campo</i>	37
<i>Morfologia</i>	37
<i>Acústica</i>	38
<i>Análises moleculares</i>	41
Resultados.....	43
<i>Relações filogenéticas das populações estudadas</i>	43
<i>Caracterização fenotípica das populações estudadas</i>	47
<i>Proposições taxonômicas</i>	65
Discussão	67
Apêndice.....	69
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO GERAL

Anuros e a taxonomia integrativa

A taxonomia integrativa é uma abordagem que leva em consideração os processos evolutivos que mediam a especiação, assumindo que o que é importante para a especiação também é importante para a taxonomia (Dayrat 2005; Pante *et al.* 2005; Padial *et al.* 2010). Diferentemente da taxonomia clássica, baseada essencialmente na morfologia externa, a taxonomia integrativa tem demonstrado maior poder de revelar a biodiversidade, principalmente dentro de complexos de espécies crípticas (morfologicamente similares ou idênticas) por meio da integração entre diferentes tipos de caracteres (*e.g.*, genéticos, ecológicos, comportamentais, etc.). Os anuros (ca. 7000 spp.) constituem cerca de 90% das espécies de lisanfíbios viventes (Frost 2020) e também apresentam a maior diversidade genética, fisiológica, ecológica e morfológica (Frost *et al.* 2006; Wells 2007) no clado. Trabalhos taxonômicos com abordagem integrativa têm revelado um número expressivo de novas espécies, muitas delas na região neotropical (*e.g.*, Caminer e Ron 2014; Rojas *et al.* 2018; Páez e Ron 2019; Carvalho *et al.* 2020). Nos estudos recém citados, a utilização de informações acústicas, genéticas, distribucionais e ecológicas revelou a importância da integração de diferentes fontes de linhas de evidência para a taxonomia atual, uma vez que estas fornecem caracteres para inferir a relação filogenética entre populações e caracteres quantitativos e comparativos que contribuem para o reconhecimento de espécies muito similares ou crípticas, como demonstrado em diversos trabalhos (Padial *et al.* 2014; Vacher *et al.* 2017; Caminer e Ron 2020; Silva *et al.* 2020; Sturaro *et al.* 2020), sobretudo em países megadiversos.

O táxon *Boana* Gray, 1825

Os anuros arborícolas do gênero *Boana* Gray, 1825 possuem distribuição neotropical (América Central e América do Sul) da Nicarágua até a Argentina (incluindo Trinidad e Tobago), além de ilhas caribenhas, e contém aproximadamente 100 espécies (Frost 2020). Sinapomorfias do grupo incluem apenas características moleculares: 33 transformações em proteínas nucleares e mitocondriais e genes ribossômicos. Os anuros desse gênero fazem parte de um grupo popularmente conhecido como *gladiator frogs*, pois, na maioria das espécies, os machos adultos têm o osso prepólex desenvolvido em um espinho na base do primeiro dedo, que é usado em disputas por território (Faivovich *et al.* 2005).

O histórico taxonômico no gênero *Boana* inclui os antigos grupos de espécies antes incluídos no gênero *Hyla* (*Hyla albopunctata*, *Hyla boans*, *Hyla geographica*, *Hyla granosa*, *Hyla pulchella*, *Hyla punctata*) e o complexo de espécies sob o nome de *Hyla albomarginata*, que foram recombinaados por Faivovich *et al.* (2005) e transferidos para o gênero *Hypsiboas* Wagler, 1830. Porém, o nome genérico *Boana*, já havia sido aplicado para espécies do grupo anteriormente, tendo prioridade de uso em relação a *Hypsiboas*, então o uso de *Boana* foi revalidado por Dubois (2017).

O complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata*

Em filogenias do gênero *Boana*, o antigo grupo “*Hyla geographica*” não foi recuperado como monofilético e foi, portanto, desmembrado (Faivovich *et al.* 2005, Weins *et al.* 2010). Duas espécies pertencentes a esse grupo, *Boana calcarata* (Troschel, 1848) e *Boana fasciata* (Günther, 1858), foram transferidas para o grupo de *Boana albopunctata*, formando um clado dentro dele. Posteriormente, em uma revisão taxonômica envolvendo espécies do complexo (Caminer e Ron 2014), *Boana dentei* (Bokermann, 1967) foi incluída a esse clado com base em sequências de DNA, quatro novas espécies foram descritas [*Boana*

alfaroi (Caminer e Ron, 2014), *Boana tetete* (Caminer e Ron, 2014), *Boana maculateralis* (Caminer e Ron, 2014) e *Boana almendarizae* (Caminer e Ron, 2014)], e um sinônimo de *B. fasciata* [*Boana steinbachi* (Boulenger, 1905)] foi revalidado. Esse clado, pertencente ao grupo de *Boana albopunctata*, contendo as espécies relacionadas a *B. calcarata* e *B. fasciata* foi nomeado por Caminer e Ron (2014) como “complexo de espécies de *Boana calcarata* - *B. fasciata*”. Apesar da distribuição pan-amazônica do clado, as revisões taxonômicas e sistemáticas desse complexo de espécies (Funk *et al.* 2011; Jansen *et al.* 2011; Caminer e Ron 2014) foram concentradas na Amazônia ocidental, principalmente no Equador. Com isso, populações de outras regiões amazônicas permanecem sem identidades taxonômicas bem definidas. Dada a ampla distribuição das espécies relacionadas ao complexo, sua morfologia externa bastante conservada, e a presença de linhagens moleculares sugeridas como espécies candidatas (Caminer e Ron 2014), faz-se necessário avaliar a taxonomia de populações do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata* sob uma abordagem integrativa, aliando padrões acústicos, genéticos e morfológicos.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da riqueza de espécies do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata*, caracterizando espécies/populações da Amazônia brasileira, revisando e atualizando suas diagnoses, e estabelecendo inter-relações filogenéticas entre estas e as demais espécies conhecidas nesse complexo.

No capítulo 1, caracterizei *Boana dentei* com base em uma série topotípica, incluindo pela primeira vez a descrição do macho e cores em vida da espécie, além do seu repertório vocal e dados sobre uso de habitat na localidade tipo. No capítulo 2, avaliei também a identidade taxonômica de duas populações da Amazônia brasileira, atualmente atribuídas a *Boana fasciata* de Alta Floresta (MT) e atribuída a *Boana alfaroi* de Assis Brasil (AC).

CAPÍTULO I: REDESCRIÇÃO E DIAGNOSE DE *BOANA DENTEI* (HYLINAE:COPHOMANTINI)

Introdução

O grupo de *Boana albopunctata* é atualmente composto por 16 espécies distribuídas essencialmente na América do Sul ao leste dos Andes, com uma única espécie [*B. heilprini* (Noble, 1923)] endêmica da ilha caribenha de Hispaniola. São elas: *B. albopunctata* (Spix, 1824), *B. caiapo* Pinheiro, Cintra, Valdujo, Silva, Martins, Silva & Garcia, 2018, *B. lanciformis* (Cope, 1871), *B. leucocheila* (Caramaschi e Niemeyer, 2003), *B. multifasciata* (Günther, 1858a), *B. paranaiba* (Carvalho & Giaretta, 2010), *B. raniceps* (Cope, 1862); e membros do complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata*: *B. alfaroi* (Caminer & Ron, 2014), *B. almendarizae* (Caminer & Ron, 2014), *B. calcarata* (Troschel, 1848), *B. dentei* (Bokermann, 1967), *B. fasciata* (Günther, 1858b), *B. maculateralis* (Caminer e Ron, 2014), *B. steinbachi* (Boulenger, 1905) e *B. tetete*. (Caminer e Ron, 2014). Até o momento, nenhuma sinapomorfia morfológica foi identificada para este grupo de espécies, diagnosticado por 43 transformações em proteínas mitocondriais e nucleares e genes ribossômicos (Faivovich *et al.* 2005).

Boana dentei foi descrita com base em uma única fêmea proveniente do município de Serra do Navio, região amazônica do estado do Amapá. A espécie foi originalmente relacionada às espécies do 'grupo de *Hyla geographica*' por características morfológicas (por exemplo, formato da cabeça “oval” e posição relativa do processo dentígero do vômer em relação às coanas) e a *B. raniceps* pela coloração (Bokermann 1967). A sistemática e a

taxonomia do gênero *Boana* passaram por mudanças substanciais desde a descrição de *B. dentei* (Faivovich *et al.* 2005; Wiens *et al.* 2005; Faivovich *et al.* 2013; Pinheiro *et al.* 2018). Dentre as mudanças importantes, o antigo grupo de *Hyla geographica* não foi recuperado como monofilético e algumas espécies até então associadas a esse grupo, incluindo *B. dentei*, foram realocadas para outros grupos de espécies (ver introdução geral para mais detalhes).

Desde sua descrição no final da década de 1960, há poucos registros de *B. dentei* fora da localidade-tipo (Lescure e Marty 2000; Salducci *et al.* 2002; Ouboter e Jairam 2012; Benício e Lima 2017), incluindo uma breve descrição da morfologia, vocalização, e ecologia de populações da Guiana Francesa (Lescure e Marty 2000). Avaliações preliminares das afinidades filogenéticas de *B. dentei* indicaram que a espécie pertence ao complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata* (ver Caminer e Ron 2014). Além disso, um recente trabalho de Silva e Costa-Campos (2018) redescobriu topótipos de *B. dentei*, porém informações taxonômicas relevantes (cor em vida, repertório vocal, etc.) ainda são desconhecidas para a população topotípica. Neste capítulo, redescrevo *B. dentei* com base em uma série coletada em sua localidade-tipo (Serra do Navio, na Amazônia Brasileira), assim como a primeira caracterização do macho da espécie, coloração em vida, dimorfismo sexual, e repertório vocal a fim de fornecer uma diagnose em relação aos seus congêneres do grupo de *B. albopunctata*, particularmente os do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata*.

Métodos

Área de estudo e coleta de dados

Os espécimes adultos foram coletados entre março e abril de 2018 no Parque Natural Municipal do Cancão (0,91176 ° N, 52,00343 ° W; altitude de 102 m), no perímetro urbano do município de Serra do Navio (Figura 1), estado do Amapá, onde a espécie havia sido

recentemente registrada (Silva e Costa-Campos 2018). Os espécimes foram depositados nas seguintes coleções herpetológicas: Coleção de Anfíbios da Universidade Federal de Uberlândia (AAG-UFU), em Uberlândia, Coleção Célio F.B. Haddad (CFBH) da Universidade Estadual Paulista, em Rio Claro, e na Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Amapá (CECC), em Macapá. Os números de tombo dos espécimes coletados são: AAG-UFU 6415–6416, CFBH 43260–43261 e 43461–43466, e CECC 2494, 2500–2501.

Figura 1. Localidade tipo de *Boana dentei*: Serra do Navio, Amapá, Brasil.

Morfologia

As seguintes medidas foram aferidas com paquímetro digital (precisão de 0,05 mm): comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), diâmetro do tímpano (DT), comprimento da tibia (CT), comprimento do pé (CP), e comprimento da coxa (CCX). As medidas de CRC, CC, LC, DO, DT, CT e CP seguiram as definições e terminologia de Duellman (1970); CCX seguiu terminologia de Heyer *et al.* (1990). As medidas do holótipo da espécie (MZUSP 74195) foram feitas e cedidas por Thiago R. de Carvalho. A terminologia da forma do rostro seguiu Heyer *et al.* (1990). As fórmulas palmar e plantar seguiram o sistema de notação de Savage e Heyer (1997).

Acústica

As vocalizações foram gravadas e cedidas por Carlos Eduardo C. Campos e Thiago R. de Carvalho. Foram usados gravadores digitais (Marantz PMD 670, PMD 671) e microfones unidirecionais (Sennheiser ME66 / K6 e ME67 / K6). Os gravadores foram configurados a uma taxa de amostragem de 44,1 ou 48,0 kHz, e 16 bits. A análise acústica foi realizada no Raven Pro 1.4, versão de 64 bits (Bioacoustics Research Program 2012). As figuras sonoras foram produzidas usando o seewave 2.1.0 (Sueur *et al.* 2008) e o tuneR 1.3.2. (Ligges *et al.* 2017), no R 3.5.0 (R Core Team 2018). Configurações do Raven Pro: tamanho da janela = 512 amostras; tipo de janela = Hann; Largura de banda do filtro 3dB = 124 Hz; sobreposição de janela = 85%; tamanho do salto = 77 ms; Tamanho de DFT = 1024 amostras; espaçamento da grade = 43,1 Hz; configurações de seewave: window type = Hanning; Tamanho de FFT = 256 amostras; Sobreposição de FFT = 90%. Os espectrogramas foram produzidos usando uma escala de amplitude relativa de 36 dB indicada por um esquema de cores em escala de cinza: a

cor preta corresponde à amplitude máxima (= 0 dB). O “canto A” foi classificado como canto de anúncio por ser o canto mais frequentemente emitido (Duellman & Trueb 1986; Wells 1977) e por ser comparável ao canto mais comumente emitido por outras espécies do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata* (Caminer e Ron 2014). As seguintes variáveis acústicas foram analisadas manualmente: variáveis temporais (duração da nota, pulsos por nota, taxa de pulso e pico relativo de amplitude; este através da função 'peaktime'); variáveis espectrais (frequência dominante usando a função 'PeakFreq'; frequência mínima e máxima usando as funções 'Freq5%' e 'Freq95%', respectivamente). As gravações foram depositadas nos repositórios acústicos das coleções AAG-UFU e CFBH. Informações adicionais sobre gravações sonoras são fornecidas no Apêndice 1. As variáveis acústicas usadas na descrição seguiram Köhler *et al.* (2017).

Resultados

Redescrição e diagnose de Boana dentei (Bokermann, 1967)

Diagnose. (1) CRC do macho = 34,4–37,5 mm, CRC da fêmea = 45,9–49,0 mm (Tabela 1); (2) membranas basais entre os dedos II-III e III-IV, vestigial entre os dedos I-II; (3) ausência de calcar, apêndice calcâneo presente em uma perna ou completamente ausente (Figura 2); (4) coloração dorsal variando de cinza claro a marrom claro nos machos, tons mais escuros de cinza e marrom nas fêmeas. Tanto machos quanto fêmeas têm faixas transversais largas e manchas irregulares marrons escuras no dorso (Figura 3); (5) em vida, flanco cinza claro ou branco creme, geralmente com manchas pretas irregulares que se estendem da virilha até a superfície posterior do membro anterior; (6) superfície dorsal da coxa, tíbia e pé coberto com faixas transversais marrons escuras; (7) superfície posterior das coxas creme ou marrom pálido com manchas pretas irregulares; (8) ventre creme esbranquiçado ou amarelado com

pontos marrons; (9) fórmula plantar: I (2-2⁺) — (2⁻-3) II (1⁻-2⁺) — (2⁻-3⁺) III 2^{1/2} — (3-3^{1/3}) IV (2-3⁺) — (1-2^{1/2}) V; (10) em vida, íris esbranquiçada com faixa horizontal amarela superior; (11) presença de pré-polex aumentado nos machos, coberto por pele; (12) almofada nupcial ausente; (13) tubérculos subarticulares arredondados; (14) tubérculos supranumerários discretos; (15) glândula mentoniana ausente; (16) rostro truncado de cima e arredondado a vertical em perfil; (17) fenda vocal larga, estendendo-se lateralmente de debaixo da língua para a mandíbula inferior; (18) processo dentígero do vômer levemente curvados posteriormente, posicionados posteriormente às coanas, bem separados, com 8 a 14 dentes vomerinos; (19) ossos verdes presentes nos machos; (20) repertório vocal composto por três tipos distintos de cantos pulsadao; (21) canto A relativamente curto (0,06 a 0,09 s) com frequência dominante variando de 1,9 a 2,9 kHz.

Figura 2. Vistas dorsal e ventral de topótipos (Serra do Navio, AP) de *Boana dentei*. (A – B) macho, CFBH 43260: CRC = 35,5 mm; (C – D) Fêmea, CFBH 43261: CRC = 45,9 mm; (E) Detalhe nos calcaneares (calcaneus direito com tubérculo cônico, ausente no calcaneus

esquerdo) do macho AAG-UFU 6416: CRC = 35,1 mm. Barras de escala = 10 mm. foto: Davi L. Bang.

Tabela 1. Variáveis morfométricas (mm) de topótipos (Serra do Navio, AP) e holótipo (originalmente WCAB 35880; atualmente MZUSP 74195) de *Boana dentei*. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP (amplitude).

Variável	<i>Boana dentei</i>		
	Machos	Fêmeas	Holótipo (fêmea)
	N = 8	N = 2	MZUSP 74195
CRC	35,6 $\pm$ 1,1 (34,4–37,5)	47,4 $\pm$ 2,1 (45,9–49,0)	49,8
CCX	20,1 $\pm$ 0,7 (19,0–21,2)	24,9 $\pm$ 2,5 (23,1–26,7)	28,7
CT	20,7 $\pm$ 0,8 (19,9–21,9)	25,9 $\pm$ 0,7 (25,4–26,4)	29,5
CP	14,2 $\pm$ 0,5 (13,5–14,9)	18,6 $\pm$ 0,2 (18,5–18,8)	18,3
HAL	10,9 $\pm$ 0,5 (10,2–11,6)	13,6 $\pm$ 1,0 (12,8–14,3)	12,9
CC	13,9 $\pm$ 0,9 (12,9–15,6)	18,5 $\pm$ 1,4 (17,6–19,5)	19,3
LC	12,0 $\pm$ 0,5 (11,3–12,6)	16,6 $\pm$ 1,2 (15,7–17,4)	18,3
DO	4,4 $\pm$ 0,5 (3,8–5,2)	6,1 $\pm$ 1,0 (6,3–6,8)	5,2
DT	2,0 $\pm$ 0,2 (1,7–2,1)	2,9 $\pm$ 0,5 (2,6–3,2)	3,3

Cores em vida. A coloração em vida se mostrou diferente para machos e fêmeas na nossa amostra (Figura 3; figuras de um macho e fêmea em vida). A coloração dorsal dos machos é amarela esverdeada com dois tons de marrom claro, às vezes com manchas marrons escuras no dorso. Garganta, peito e região anterior da barriga variando de branco a creme. Embora granular, região posterior do ventre é translúcida, manchada de amarelo lateralmente e alguns grânulos variando de creme a laranja claro. Uma linha longitudinal mediana dorsal estreita, mal definida e de extensão variável ao longo do comprimento do corpo presente na maioria dos indivíduos analisados (ausente no indivíduo CFBH 43461 e CFBH 43666). Superfície ventral da mão e membro posterior principalmente amarelo brilhante. Superfície posterior da coxa com barras ou manchas em preto e prateado, com tonalidades de amarelo, amarelo uniforme e brilhante posteroventralmente. Flanco com a mesma cor contrastante da região posterior da coxa, mas manchado em vez de barrado. Nas fêmeas, a coloração dorsal tem dois tons de marrom avelã (manchas marrons escuras no dorso estão presentes apenas na fêmea CFBH 43261). A superfície posterior da coxa é barrada em preto sólido e azul claro brilhante, preto sólido posteroventralmente. Flanco com as mesmas cores, mas com manchas parcialmente fundidas de cor escura, em vez de barras verticais. Pontos marrons na região mentoniana, exceto o saco vocal nos machos, nas fêmeas, os pontos são distribuídos ao longo da garganta, estendendo-se posteriormente para a barriga anterior. Garganta, peito e barriga principalmente brancos. Barriga posterior e lateral fracamente translúcida intercalada com grânulos. Superfície ventral da mão de cor escura, mais clara ao longo dos dígitos. Ossos verdes no macho (Figura 3B), ausentes ou não visíveis na fêmea (Figura 3E).

Figura 3. Cores em vida de topótipos adultos de *Boana dentei*. (A-C) Macho, CFBH 43260: CRC = 35,5 mm; (D – F) Fêmea, CFBH 43261: CRC = 45,9 mm. Crédito das fotos: Thiago R. de Carvalho.

Comentários sobre o holótipo. *Hyla dentei* Bokermann, 1967. Holótipo: WCAB 35880 por designação original (atualmente, MZUSP 74195), fêmea da Serra do Navio, Amapá, Brasil.

Indivíduo em bom estado de preservação, com mãos e pés parcialmente fechados. Algumas faixas transversais visíveis no dorso, mais evidentes anteriormente; e algumas manchas marrons escuras. O flanco e a superfície posterior da coxa exibiam uma cor de fundo creme esbranquiçada. Garganta e peito com manchas escuras, barriga imaculada. Barriga e coxa granular / areolada. Superfície ventral da mão e do pé e superfície posterior do tarso lisa. Tubérculos subarticulares arredondados. Prepollex modificado ausente. Fórmula plantar I 2 - 2 + II 1^{1/2} - 2^{1/2} III 1 + - 2 - IV 2^{1/2} - 1^{1/2} V. Membrana dos dedos das mãos vestigial. Dentes vomerianos em duas cristas angulares, retas, com um espaço curto, entre e posterior às coanas (número de dentes não quantificados). Dobra supratimpânica do canto posterior do olho até a base do braço. Rostro truncado em vista dorsal, arredondado para vertical em perfil. Apêndice calcâneo e prega tarsal ausente. Medidas apresentadas na Tabela 1.

Repertório vocal. O repertório vocal (Figura 4) de *B. dentei* (N = 9 machos; 87 cantos quantificados) é composto por três tipos distintos de cantos pulsados (referidos como cantos A, B e C) que são emitidos em intervalos irregulares. As vocalizações são formadas por cantos únicos (na maioria dos casos) ou séries de 2 a 4 cantos. As séries de cantos são emitidas em sequências variáveis, como (C / A), (A / B), (C / A / B) ou (C / A / A / B). O canto A é a vocalização mais frequente (N = 52) e dura 0,06–0,09 s ($0,07 \pm 0,01$). O pico relativo de amplitude é alcançado entre 15 e 37% (25 ± 7) da duração do canto. Os pulsos podem ser bem delimitados ou mal definidos ao longo do canto. Entre os cantos com pulsos bem definidos (N = 22), pulsos são emitidos a uma taxa de repetição de 186–492 pulsos por segundo (288 ± 64). O número de pulsos varia entre 11–31 (19 ± 5). A frequência mínima varia de 1,5–1,8 kHz ($1,6 \pm 0,1$), a frequência dominante de 1,9–2,9 kHz ($2,4 \pm 0,3$), e a

frequência máxima de 2,5–3,1 kHz ($2,8 \pm 0,2$). O canto B ($N = 24$) é emitido com menos frequência do que os cantos A, mas com mais frequência do que os cantos C. O canto B dura entre 0,12–0,20 s ($0,16 \pm 0,03$). O pico relativo de amplitude é alcançado entre 26 e 65% (41 ± 14) da duração total do canto. Os pulsos do canto B são geralmente mais definidos que os do canto A, e são emitidos a uma taxa de repetição de 79 a 380 por segundo (137 ± 91 ; $N = 18$). O número de pulsos varia entre 12–27 (17 ± 4 ; $N = 18$). A frequência mínima varia de 1,3–1,6 kHz ($1,5 \pm 0,1$), a frequência dominante de 1,6–2,2 kHz ($1,9 \pm 0,3$), e a frequência máxima de 2,3–2,6 kHz ($2,5 \pm 0,1$). O canto C ($N = 11$) dura 0,03–0,07 s ($0,04 \pm 0,02$). Esse canto raramente é emitido e pode ser emitido sozinho ou como a primeira emissão de uma sequência de cantos. Os pulsos do canto C são mal definidos, de modo que não é possível quantificar as modulações de amplitude ao longo do canto. O pico relativo de amplitude é alcançado entre 48 a 57% (50 ± 3) da duração total do canto. A frequência mínima varia de 1,4–1,5 kHz ($1,4 \pm 0,1$), a frequência dominante de 1,6–2,1 kHz ($1,7 \pm 0,2$), e a frequência máxima de 2,0–2,5 kHz ($2,2 \pm 0,2$).

Figura 4. Repertório vocal de *Boana dentei*. (A) Uma sequência de quatro cantos diferentes (A, B e C) na seguinte sequência: C / A / A / B. Oscilograma e espectrograma dos (B) três primeiros cantos (um canto C seguido de dois cantos A); e do (C) último canto (um canto B). Voucher de canto CECC 2494, gravado e coletado na localidade tipo (Serra do Navio, estado do Amapá, Brasil). Gravação: Boana_dentei_CECC4.

Comparações com o grupo de *B. albopunctata*. *Boana lanciformis*, *B. leucocheila*, *B. albopunctata*, *B. multifasciata*, *B. raniceps* e *B. paranaiba* têm o rostro sub-ovoide (em vista dorsal) e arredondado (em vista lateral), enquanto *B. dentei* tem um rostro truncado e arredondado, respectivamente (Figuras 2–3). *Boana dentei* (CRC dos machos = 34,4–37,5 mm; Tabela 1) se diferencia de *B. albopunctata*, *B. caiapo*, *B. heilprini*, *B. lanciformis*, *B. leucocheila*, *B. multifasciata*, *B. paranaiba* e *B. raniceps* pelo menor CRC [*B. albopunctata* = 40,3–56,7 mm (Carvalho *et al.* 2010), *B. caiapo* = 42,4–51,2 mm (Pinheiro *et al.* 2018), holótipo de *B. heilprini* = 48,0 mm (Noble 1923), *B. lanciformis* = 60,8–70,6 mm (Carvalho *et al.* 2010), *B. leucocheila* = 56,7–81,2 mm (Caramaschi e Niemeyer 2003), *B. multifasciata* = 46,3–58,6 mm; *B. paranaiba* = 46,3–52,3 e *B. raniceps* = 45,5–81,6 mm (Carvalho *et al.* 2010)]. O padrão de cor dorsal em *B. dentei* consiste em faixas transversais, enquanto que em *B. caiapo* há a presença de faixas longitudinais e ausência de faixas transversais (Pinheiro *et al.* 2018) e *B. heilprini* possui cor verde uniforme no dorso (Noble 1923). *Boana dentei* difere de *B. albopunctata*, *B. caiapo*, *B. lanciformis*, *B. leucocheila*, *B. multifasciata* e *B. paranaiba* e *B. raniceps* por ter manchas escuras no flanco e na virilha [barras ou listras verticais em *B. raniceps* (Caminer e Ron 2014) (Cope 1862); ausência de padrões distintos de cores em *B. lanciformis*, *B. leucocheila*, *B. multifasciata* e *B. paranaiba* (Lutz 1973; de Sá 1996; Caramaschi e Niemeyer 2003; Carvalho *et al.* 2010); presença de pontos claros em *B. albopunctata* (Carvalho *et al.* 2010); listras longitudinais e pontos pretos em *B. caiapo* (Pinheiro *et al.* 2018)]. Em relação as espécies do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata*, *Boana dentei* pode ser diferenciada de *B. almendarizae*, *B. calcarata*, *B. fasciata*, *B. maculateralis* e dos sintipos de *B. steinbachi* por não possuir calcar [calcar grande e cônico em *B. almendarizae*; calcar grande e triangular em *B. calcarata* e *B. maculateralis*; calcar pequeno e cônico em *B. fasciata* e um “calcar mal definido” nos sintipos de *B. steinbachi*

(Caminer e Ron 2014)] e por ter manchas escuras no flanco e na virilha [flanco e virilha barrados em *B. almendarizae*, *B. calcarata* e *B. fasciata* (Caminer e Ron 2014)]. *Boana dentei* é mais semelhante a *B. alfaroi* e *B. tetete*, compartilhando um flanco manchado, uma faixa superior da íris amarela e ausência de um calcar desenvolvido. As três espécies têm um tubérculo no calcanhar, embora *B. dentei* possa ser distinguido das outras duas espécies por nunca possuir tubérculos nos dois calcanhares (completamente ausente ou presente apenas em um calcanhar). Nenhuma outra característica morfológica distingue essas três espécies, mas elas podem ser diferenciadas principalmente com base em seus cantos (ver comparações abaixo).

O canto de anúncio de *B. dentei* (canto A) se difere pela menor duração (0,06–0,09 s) em relação à da maioria dos congêneres [0,35–0,90 s em *B. albopunctata* (Kwet *et al.* 2002), 0,16–0,19 s em *B. alfaroi* (Caminer e Ron 2014), 0,39–0,55 s em *B. almendarizae* (Caminer e Ron 2014), 0,40–0,80 s em *B. caiapo* (Pinheiro *et al.* 2018), 0,27–0,90 em *B. fasciata* (Caminer e Ron 2014), 2,5 s em *B. heilprini* (Galvis *et al.* 2015), 0,25–0,56 s em *B. lanciformis* (Márquez *et al.* 1993), 0,96–1,11 s em *B. leucocheila* (Pansonato *et al.* 2011), 0,32–0,40 s em *B. maculateralis* (Caminer e Ron 2014), 0,31–0,45 s em *B. multifasciata* (de Sá 1996), 0,40–0,70 s em *B. paranaíba* (Carvalho *et al.* 2010) e 0,11–0,24 s em *B. raniceps* (Márquez *et al.* 1993)]. Além disso, o canto de anúncio de *B. dentei* se distingue por ser formado por pulsos mal definidos [uma série de grupos de pulsos bem delimitados em *B. albopunctata*, *B. caiapo* e *B. raniceps* (Carvalho *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2018); canto composto por uma série de notas multipulsionadas em *B. heilprini* (Galvis *et al.* 2015); canto composto por 4 ou 5 notas em *B. alfaroi* e *B. leucocheila* (Pansonato *et al.* 2011; Caminer e Ron 2014), 3–4 notas em *B. almendarizae*, 3–5 notas em *B. fasciata*, 3–4 notas em *B. maculateralis*, duas notas nas populações da Guiana e Guiana Francesa de *B. calcarata*

(Lescure e Marty, 2000; Kok e Kalamandeen, 2008); uma nota não pulsada em *B. tetete* (Caminer e Ron 2014)]. O canto de *B. dentei* é mais semelhante ao das populações equatorianas de *B. calcarata*, sendo composto por uma nota curta e pulsada, mas difere na frequência dominante [1,9–2,9 kHz em *B. dentei* (Tabela 4); 1,6–1,9 kHz em *B. calcarata*; (Caminer e Ron 2014)].

Notas sobre habitat e história natural. A Serra do Navio é uma região do Escudo da Guiana Oriental coberta principalmente por florestas primárias de baixa altitude. O local do estudo é caracterizado por clareiras próximas a um riacho de fundo rochoso (Figura 5). Os machos de *Boana dentei* foram ouvidos nas primeiras horas da noite (cerca de 20h às 21h) em baixa densidade. Estavam cantando empoleirados (cerca de 1,5 m de altura em folhas largas em ambas as ocasiões). Também foram encontradas duas fêmeas adultas empoleiradas na vegetação. Esse habitat é gerado sazonalmente no início da estação chuvosa (especialmente de fevereiro a maio), quando os níveis de água no riacho são elevados pelo aumento da precipitação, fazendo com que suas margens transbordem.

Figura 5. Habitat típico de *Boana dentei* no Parque Natural Municipal do Cancão (Serra do Navio, Amapá, Brasil): um corpo de água de lenta troca sobre leito argiloso, associado a uma lagoa temporária, fluindo através de uma clareira da floresta ao lado de um riacho (não mostrado na fotografia). Crédito da foto: Thiago R. de Carvalho

Discussão

Ouboter e Jairam (2012) caracterizaram a população de *Boana dentei* no Suriname como uma perereca de tamanho médio (CRC máximo = 54 mm) com a pálpebra inferior reticulada. Os topótipos de *B. dentei* não possuem pálpebra reticulada, como nenhuma outra espécie do grupo *B. albopunctata*. Esse é um caráter diagnóstico exclusivo ou quase exclusivo dos membros do grupo de *B. semilineata* (ver Fouquet *et al.* 2016; Peloso *et al.* 2018). Porém, com base nas outras características e fotografias de animais em vida disponíveis em Ouboter e Jairam (2012), é provável que *B. dentei* ocorra no Suriname, mas o padrão reticulado das pálpebras não deve estar associado à espécie. Lescure e Marty (2000) registraram *B. dentei* da Guiana Francesa. Esses autores forneceram comparações com espécies relacionadas que também ocorrem no Suriname e na Guiana Francesa: *B. calcarata* e o que eles chamaram de '*Boana fasciata*'. Esse nome poderia ser aplicado com segurança apenas a populações distribuídas nas florestas de encosta dos Andes orientais no Peru e Equador (Caminer e Ron 2014), enquanto as populações do Escudo da Guiana, provisoriamente atribuídas a *B. fasciata*, podem corresponder a uma espécie potencialmente não descrita.

A vocalização de *B. dentei* relatada por Lescure e Marty (2000) da Guiana Francesa foi descrita como uma nota única emitida em um intervalo de um minuto, com duração de 92 ms e com frequência dominante em $1,43 \pm 2,86$ kHz. Não observamos diferença substancial entre os cantos descritos na localidade tipo e o descrito para a população da Guiana Francesa. Mesmo assim, os novos dados acústicos da localidade tipo acrescentam novas variáveis temporais e espectrais à descrição e ampliam o repertório vocal de *B. dentei*, adicionando outros dois tipos de notas anteriormente não relatadas. A reavaliação de características fenotípicas da pouco conhecida *Boana dentei* contribuirá para a taxonomia do complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata* e deve ajudar também a elucidar o status taxonômico de

linhagens adicionais que poderiam corresponder a espécies não descritas no complexo, uma vez que as informações acústicas e morfológicas contidas aqui resultaram na diagnose de *B. dentei* em relação a todas as outras espécies do complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata*.

Na avaliação mais recente do risco de extinção e das principais ameaças a *B. dentei*, ela foi classificada como "pouco preocupante" (Gaucher e Rodrigues 2004). Com os novos dados disponíveis para a espécie, sugerimos uma reavaliação levando em consideração três fatores principais: (1) restrição de habitat, (2) tolerância a distúrbios humanos e (3) tamanho da população. Na localidade tipo, a espécie foi encontrada em um local muito específico, com um certo grau de perturbação humana, principalmente devido ao uso de recursos hídricos na pequena cidade da Serra do Navio. Esse local foi visitado várias vezes nos últimos anos e a *Boana dentei* sempre foi registrada em baixas densidades (<5 indivíduos adultos) ou, em alguns casos, não foi registrada. Por outro lado, esse local fica dentro de um parque municipal (Parque Natural Municipal de Cancão; ver Silva e Costa-Campos 2018), o que ajuda a manter os habitats florestais inalterados. É importante destacar, portanto, que *Boana dentei* pode sofrer seriamente em razão dos diferentes tipos de atividades humanas, como exploração madeireira, mineração e barragens.

Apêndice

Apêndice 1. Informações sobre gravações de *Boana dentei* da localidade tipo (Serra do Navio, Amapá). As letras após o número nos nomes dos arquivos de som (por exemplo, 1a – g) indicam o número de gravações para esse macho (sete gravações para o macho # 1).

Arquivo sonoro	Espécime	Data	Hora	Ar (°C)
TRC 105a–g	CFBH 43260	30-03-2018	20:34	25,5
Boana_dentei_CECC1a–b	CFBH 43462	26-04-2018	19:37	24,5
Boana_dentei_CECC2a–b	CFBH 43463	26-04-2018	19:53	24,8
Boana_dentei_CECC3a–b	CFBH 43464	26-04-2018	20:04	25,5
Boana_dentei_CECC4	CECC 2494	27-04-2018	19:42	24,5
Boana_dentei_CECC5	CECC 2500	27-04-2018	19:48	24,5
Boana_dentei_CECC7	CECC 2501	27-04-2018	20:09	25,5
Boana_dentei_CECC8	CFBH 43465	27-04-2018	20:16	25,5

**CAPÍTULO II: IDENTIDADE DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS RELACIONADAS
AO COMPLEXO DE *BOANA CALCARATA* - *BOANA FASCIATA*
(HYLINAE:COPHOMANTINI).**

Introdução

A região neotropical abriga os mais diversos ecossistemas do planeta (Jenkins *et al.* 2013). Dentre eles, a Amazônia se destaca como uma importante região biogeográfica, cobrindo mais de 6 milhões de km², o que corresponde ao maior trecho contínuo de floresta tropical (40% das florestas tropicais do mundo) e provavelmente a maior biodiversidade continental do mundo (Myers *et al.* 2000). Com quase toda a parte leste e sul (25%) de sua extensão perdidas para a agricultura, espera-se que uma proporção desconhecida de espécies endêmicas já desapareceu (Lovejoy & Nobre 2018).

Para vários grupos de anuros, um grande número de espécies ainda não descritas têm sido reportados na Amazônia (Vacher *et al.* 2020). Um desses grupos é o complexo de espécies de *B. calcarata* - *B. fasciata* (Funk *et al.* 2011; Caminer & Ron 2014, Fouquet *et al.* submetido). Dentro desse clado de *Boana* amazônicas, Funk *et al.* (2011) identificaram, com base na divergência mitocondrial e dados acústicos, sete espécies potencialmente novas, e Caminer & Ron (2014) documentaram mais duas linhagens adicionais, descrevendo quatro das espécies encontradas anteriormente e removendo *B. steinbachi* de sua sinonímia com *B. fasciata*. No entanto, a amostragem de ambos os estudos foi concentrada na Amazônia ocidental (principalmente no Equador), mas as espécies e linhagens genéticas ocorrem ao longo de toda a Amazônia. Mais recentemente, Fouquet *et al.* (submetido) identificaram linhagens adicionais no complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata* que podem representar espécies novas. Um dos maiores limitantes para a taxonomia atual desse complexo de

espécies é a falta de informações sobre as características fenotípicas de muitas dessas linhagens. Este capítulo tem como objetivo determinar a identidade taxonômica de duas populações brasileiras relacionadas ao complexo de *B. calcarata* - *B. fasciata* através do posicionamento filogenético e caracterização fenotípica dessas populações, além de comparações interespecíficas com as demais espécies.

Métodos

Coleta de dados em campo

Dados foram coletados em campo em duas localidades da Amazônia brasileira: (1) município de Alta Floresta, Mato Grosso (-9.642839°, -56.271408°) em janeiro de 2019 e janeiro de 2020; e (2) município de Assis Brasil, Acre, em fevereiro de 2017 (-10.940833°, -69.566944°). Os espécimes foram depositados na coleção de anfíbios do Museu de Biodiversidade do Cerrado na Universidade Federal de Uberlândia (AAG-UFU), em Uberlândia. Os números de tombo para os espécimes provenientes de Alta Floresta são: AAG-UFU 6503–08 e AAG-UFU 6904, e para aqueles provenientes de Assis Brasil: AAG-UFU 5917–22.

Morfologia

Os espécimes adultos foram eutanasiados com lidocaína, fixados em formalina 10% e preservados em álcool 70%. As seguintes medidas foram realizadas com paquímetros digitais com precisão de 0,05 mm: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CC), largura da cabeça (LC), diâmetro do olho (DO), diâmetro do tímpano (DT), comprimento da tíbia (CT), comprimento do pé (CP), comprimento da coxa (CCX), comprimento da mão (CM) e comprimento do apêndice calcâneo (CAC). As medidas foram tomadas seguindo a terminologia de Watters *et al.* (2016). CAC foi medido da base do apêndice até sua ponta. CM

foi medido apenas para os indivíduos selecionados para comporem as figuras do capítulo. Classificamos o apêndice calcâneo em três categorias (ver figuras 3, 5 e 7): (i) calcar (apêndice dérmico com comprimento máximo, da base até a ponta, maior que 1 mm, sendo achatado ou cônico); (ii) apêndice dérmico com comprimento máximo menor que 1 mm; ou (iii) tubérculo, estrutura cônica de tamanho reduzido. A terminologia da forma do rostro seguiu a de Heyer *et al.* (1990).

Acústica

Informações detalhadas sobre os arquivos sonoros analisados são apresentadas na Tabela 1. A análise acústica foi realizada no Raven Pro 1.5, versão de 64 bits (Bioacoustics Research Program 2012); as figuras sonoras foram produzidas usando a versão 2.1.0 do pacote seewave (Sueur *et al.* 2008) e a versão 1.3.2 do tuneR. (Ligges *et al.* 2017), na versão R 3.5.0 (R Core Team 2018). Configurações do Raven Pro: window size = 512 samples; window type = Hann; 3dB filter bandwidth = 124 Hz; window overlap = 85 %; hop size = 77 ms; DFT size = 1024 samples; grid spacing = 43.1 Hz; seewave settings: window type = Hanning; FFT size = 256 samples; FFT overlap = 90 %. Consideramos como canto tipo 1 os cantos formados por séries de notas, que compõem o canto principal emitido por todas as espécies do complexo *B. calcarata* - *B. fasciata* estudadas. Cantos de notas únicas e pulsadas foram classificados como canto tipo 2. As seguintes variáveis acústicas foram analisadas: variáveis temporais (duração do canto, duração da nota, intervalo entre as notas, número de notas e pico de amplitude relativo; a última usando a função 'Peak Time'); variáveis espectrais (frequência dominante usando a função 'Peak Frequency; frequência mínima e máxima usando as funções 'Frequency 5%' e 'Frequency 95%', respectivamente). As variáveis acústicas usadas na descrição seguem as definições de Köhler *et al.* (2017), usando a abordagem centrada na nota.

Tabela 1. Informações detalhadas sobre os arquivos sonoros analisados para este estudo.

Arquivo	Espécie	Espécime	Localidade	Data	Ar (°C)	Observações	Autor da gravação/Repositório	Equipamento de gravação
Boana_spAltaFloresta MT1a- cDLB_AAGm671	<i>Boana</i> sp.	AAG- UFU6503	Alta Floresta- MT, Brasil	11-01-2019	25,1	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Davi L. Bang/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT2a- cDLB_AAGm671	<i>Boana</i> sp.	AAG- UFU6504	Alta Floresta- MT, Brasil	11-01-2019	25,1	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Davi L. Bang/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT3a- cDLB_AAGm671	<i>Boana</i> sp.	-	Alta Floresta- MT, Brasil	11-01-2019	25,1	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Davi L. Bang/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT4a- cDLB_AAGm671	<i>Boana</i> sp.	-	Alta Floresta- MT, Brasil	11-01-2019	25,1	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Davi L. Bang/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT5a- iPM_AAGm671	<i>Boana</i> sp.	AAG- UFU6901	Alta Floresta- MT, Brasil	20-01-2020	25,4	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Pedro Marinho/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT6a- bAAGm661MK2	<i>Boana</i> sp.	-	Alta Floresta- MT, Brasil	20-01-2020	25,4	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Ariovaldo A. Giaretta/AAG- UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6
Boana_spAltaFloresta MT7a-	<i>Boana</i> sp.	-	Alta Floresta- MT, Brasil	20-01-2020	25,4	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Ariovaldo A. Giaretta/AAG-	Marantz (PMD 671) e

fAAGm661MK2							UFU	microfone Sennheiser ME67/K6
Hypsib_steinbachiAssisBrasilAC1a–dTRC_AAGm671	<i>Boana steinbachi</i>	AAG-UFU5917	Assis Brasil-AC, Brasil.	12-02-2017	26,2	Filtro aplicado a 500 Hz e 5500 Hz	Thiago R. de Carvalho/AAG-UFU	Marantz (PMD 671) e microfone Sennheiser ME67/K6

Análises moleculares

Extração e amplificação. A extração do DNA total e as reações de amplificação (PCR) dos fragmentos do gene mitocondrial 16S das populações de Alta Floresta e Assis Brasil foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP. Demais sequências foram cedidas por colaboradores do projeto ou baixadas da base de dados Genbank (Apêndice 1). O DNA genômico foi extraído de pequenas amostras do tecido muscular esquelético, conservadas em etanol absoluto. O protocolo de extração segue Maniatis *et al.* (1982), adaptado por Lyra (2017): o álcool foi eliminado das amostras com papel absorvente e depois elas foram mantidas em estufa por 10 min.; o tecido foi colocado em 250 µl de solução de lise; foi adicionado 5 µl de Proteinase-K (25 mg/ml); os tubos foram invertidos de 10 a 20 vezes e incubados a 55°C overnight ou até que o tecido estivesse completamente diluído (mínimo 4 horas); as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e foi adicionado 250 µl de acetato de amônia (7, 5 M); as amostras foram para o Vórtex e, em seguida, encubadas no gelo por 30 minutos; foram centrifugadas por 20 minutos (13.000 rpm, centrifuga refrigeradas a 4°C); o sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos; os tubos foram mantidos no gelo para evitar que o precipitado começasse a se diluir novamente na solução; foram adicionados 500 µl de isopropanol absoluto e os tubos foram invertidos gentilmente; para ocorrer a precipitação do DNA, as amostras foram mantidas a temperatura de -20°C por duas horas; foram centrifugadas por 20 minutos (13.000 rpm) e o sobrenadante descartado; foi adicionado 500 µl de etanol 70% gelado e os tubos foram invertidos várias vezes para lavar o “pellet” de DNA; as amostras foram centrifugadas por 15 min. (13.000 rpm); o etanol foi descartado cuidadosamente; os tubos foram invertidos em papel absorvente e o pellet secado em bomba de vácuo por 15 minutos, para ressuspender

o DNA foi utilizado 1xTE (50 a 200 µl), mantido a temperatura ambiente por 1 hora e estocado em freezer a -20°C. Fragmentos parciais do final do gene mitocondrial 16S foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em um termociclador *Mastercycler – eppendorf*, usando os seguintes *primers*: 16Sar e 16Sbr (Palumbi 1996). Mantivemos as seguintes condições para a amplificação: desnaturação inicial do *DNA* a 95°C (5 min); 35 ciclos consistindo de 94°C (1 min) para a desnaturação, 45°C (1 min) para o anelamento, 72°C (1 min) para inicial extensão das cadeias, 72°C (5 min) para a extensão final. O mix do volume final (30 µl) do PCR consistiu em: *Taq dna Polymerase* (0,3 U/µl), *PCR buffer* 1x contendo MgCl₂ (1,5 mM cada), 1 µl de cada *primer* (direto e reverso) e água deionizada (25 µl). Os produtos resultantes da PCR foram enviados a *Macrogen Company* (Coréia do Sul) para purificação e sequenciamento em ambas direções (direto e reverso) dos fragmentos do gene 16S. Os cromatogramas das sequências obtidas do 16S foram checadas usando o *Genious 6*.

Reconstrução filogenética. A compilação das sequências de 16S resultou em uma matriz com 500 pares de base para 98 indivíduos, sendo que todas as espécies do complexo *B. calcarata* – *B. fasciata* foram incluídas (grupo focal) e outros representantes do grupo *B. albopunctata* (grupos externos). O enraizamento foi feito em um representante externo ao grupo *B. albopunctata* (*B. boans*). Os espécimes e respectivas localidades associados às sequências estão listados no Apêndice 1. O alinhamento das sequências foi feito usando a estratégia L-INS-i no da plataforma online do MAFFT (Kato *et al.* 2005). Seleccionamos o melhor modelo de substituição nucleotídica através do PartitionFinder 2 usando “branchlengths = linked”, com o algoritmo de busca completa (“all”). O fragmente parcial de 16S foi testado como uma única partição no modelo de substituição nucleotídica. O melhor modelo foi selecionado através do critério de informação Akaike corrigido (AICc). O melhor modelo de

substituição nucleotídica foi o GTR+I+G. A reconstrução filogenética usou uma análise Bayesiana no MrBayes versão 3.2.6. (Ronquist *et al.* 2012), implementado no portal online CIPRES Science gateway (Miller *et al.* 2010). A análise foi implementada com duas corridas independentes de $1,0 \times 10^7$ gerações, com quatro cadeias de Markov, amostradas a cada 1000 gerações. Burn-in= 25%. A checagem da convergência das duas corridas (ESS > 200) foi feita no Tracer versão 1.6 (Rambaut *et al.* 2014).

Resultados

Relações filogenéticas das populações estudadas

O complexo de espécies *B. calcarata* - *fasciata* foi recuperado como monofilético, contendo oito espécies (*B. alfaroi*, *B. almendarizae*, *B. calcarata*, *B. dentei*, *B. fasciata*, *B. maculateralis*, *B. steinbachi*, e *B. tetete*) e uma linhagem genética sem nome (população de Alta Floresta, MT, referida aqui como *Boana* sp.). As espécies do complexo, por sua vez, estão divididas em dois subclados: subclado de *B. calcarata* e subclado de *B. steinbachi* (figura 1).

No subclado de *B. calcarata*, *B. maculateralis* (com a ocorrência restrita à Amazônia equatoriana e peruana) é o grupo irmão das demais espécies do subclado (*B. almendarizae*, *B. calcarata*, e *B. fasciata*). *Boana calcarata*, espécie com distribuição pan-amazônica, é irmã de um clado composto pelas outras duas espécies (*B. almendarizae* e *B. fasciata*), cujas distribuições são restritas ao sopé dos Andes no Equador.

No subclado de *B. steinbachi*, *B. dentei*, distribuída na porção leste do Escudo da Guiana, é irmã de um clado composto por quatro outras espécies (*B. alfaroi*, *B. steinbachi*, *B. tetete*, e *Boana* sp.). *Boana* sp. corresponde a uma das populações focais deste estudo (Alta Floresta MT) e outras populações do sul e sudeste da Amazônia brasileira (MT e RO; Figura

4; Apêndice 1). Essa linhagem é irmã das demais três espécies do subclado (*B. alfaroi*, *B. steinbachi*, e *B. tetete*). Na nossa análise filogenética baseada apenas em um gene mtDNA (16S), as inter-relações entre as três linhagens sem estrutura geográfica dentro de *B. steinbachi* não foram recuperadas com resolução (politomia interna), e resultaram em uma espécie não monofilética (Figura 1). Um exemplo é o das populações da Amazônia oriental (PA) e localidade tipo na Bolívia recuperadas em uma única linhagem, enquanto populações geograficamente intermediárias (AM, AC e Peru) estão embebidas em outras linhagens, incluindo a outra população focal deste estudo (Assis Brasil, AC), até então reportada como coespecífica a *B. alfaroi*. As outras duas espécies (*B. alfaroi* e *B. tetete*) formam um clado com distribuição restrita à Amazônia ocidental.

Figura 1. Árvore de consenso (50% majority-rule) resultante de análise Bayesiana, inferida a partir de uma matriz de fragmentos parciais do gene mitocondrial 16S (500 bp) para o complexo de *Boana calcarata* - *B. fasciata*. Terminais do subclado de *B. calcarata* e grupos externos foram colapsados para facilitar visualização (veja Apêndice 1 para informações

sobre cada um dos terminais). Probabilidades posteriores estão indicadas próximo aos nós correspondentes. A escala é dada como a taxa de substituição de nucleotídeos. Os espécimes testemunho seguem os terminais correspondentes.

Caracterização fenotípica das populações estudadas

As espécies do complexo de *B. calcarata* e *B. fasciata*, incluindo os espécimes aqui estudados, podem ser diferenciadas das demais espécies do grupo de *B. albopunctata* pela seguinte combinação de características: (1) rostro truncado em vista dorsal; (2) formato da cabeça arredondada; e (3) presença de apêndice calcâneo. O subclado de *Boana calcarata* é composto por espécies que possuem calcar e repertório vocal composto por um único tipo de canto (Caminer & Ron 2014). As espécies do subclado de *B. steinbachi*, por outro lado, não possuem calcar (possuem prega dérmica no calcanhar ou tubérculo calcâneo) e possuem repertórios vocais compostos por mais de um tipo de canto, exceto *B. alfaroi*, para a qual apenas um tipo de canto foi documentado (Caminer & Ron 2014). As populações caracterizadas a seguir têm características fenotípicas congruentes com seu posicionamento no subclado de *B. steinbachi*.

População de Assis Brasil, AC:

Série examinada. AAG-UFU 5917–22, machos adultos, coletados no município de Assis Brasil, Acre, Brasil (-10.940833°, -69.566944°) entre 12 a 13 de fevereiro de 2017 por Thiago R. de Carvalho, Bernardo F. V. Teixeira, e Davi L. Bang.

Diagnose. A população de Assis Brasil (Figuras 2 e 3, tabela 2 para a morfometria) é caracterizada pela seguinte combinação de características: (1) prega dérmica no calcanhar (Figura 2C); (2) repertório vocal composto por mais de um tipo de canto; (3) canto do tipo 1 composto por uma série de notas; (4) notas com intervalos bem definidos; (5) intervalos variáveis entre as notas (tabelas 3 e 4).

Comparações com congêneres do complexo de B. calcarata - B. fasciata. A população de Assis Brasil pode ser diferenciada das espécies do subclado de *B. calcarata* (*B. almendarizae*,

B. fasciata, *B. calcarata* e *B. maculateralis*) pela ausência de calcar e pelo repertório vocal composto por mais de um tipo de canto. Dentre as espécies do subclado de *B. steinbachi*, a população de Assis Brasil pode ser diferenciada de *B. alfaroi*, *B. dentei* e *B. tetete* pela presença de prega dérmica no calcanhar (presença de tubérculo nas outras três espécies), canto tipo 1 composto por uma série de notas (canto tipo 1 formado por uma única nota em *B. dentei* e *B. tetete*), pelas notas com intervalos bem definidas (notas parcialmente fundidas em *B. alfaroi*), e repertório vocal composto por dois cantos distintos (apenas um tipo de canto em *B. alfaroi*) (Caminer & Ron, 2014; Marinho *et al.* 2020). Nós não encontramos nenhuma diferença morfológica entre a população topotípica de *B. steinbachi* em comparação à população de Assis Brasil e, portanto, esse nome foi também atribuído à população de Assis Brasil (mas veja as seções Proposições taxonômicas e Discussão).

Cores em vida (Figura 8). A coloração dorsal é de bege a marrom claro, marrom alaranjado em machos vocalizando, com listras longitudinais marrom-arroxeadas escuras, marrom fraco ou cinza fraco e faixas transversais marrons tênues. Íris creme ou cinza, às vezes com pigmentação amarela na parte superior. Garganta variando de branco a amarelo, peito e região anterior da barriga variando de branco a creme. Superfície ventral da mão e membro posterior bege a amarelo brilhante. Superfície posterior da coxa e flancos manchados em preto, com uma cor de fundo amarelo ou branco brilhante. Pontos marrons dispersos no dorso, superfície dorsal dos membros, margens da boca, região mentoniana e peito.

Variação. O indivíduo AAG-UFU 5921 não possui linhas longitudinais no dorso, o indivíduo AAG-UFU 5918 não possui prega dérmica no calcanhar.

Figura 2. Macho adulto da população de Assis Brasil, AC (= *Boana steinbachi*). Espécime AAG-UFU 5921, CRC = 34,2 mm: (A) vista dorsal, (B) vista ventral. Crédito das fotos: Ariovaldo A. Giaretta.

Figura 3. Macho adulto da população de Assis Brasil, AC (= *Boana steinbachi*). (A) vista dorsal e (B) vista lateral da cabeça (CC = 12,3 mm e LC = 10,2 mm), (C) vista dorsal das pregas dérmicas nos calcanhares. (D) superfície palmar da mão esquerda (CM = 10,6 mm),

(E) superfície plantar do pé esquerdo (CP = 13,9 mm). Indivíduo AAG-UFU 5921. Crédito das fotos: Ariovaldo A. Giaretta.

Repertório vocal (Figura 8, tabelas 3 e 4). Os machos coletados vocalizam em arbustos em áreas inundadas associadas à vegetação secundária. Cantos de um macho (Tabela 1) foram analisados. O repertório vocal da população de Assis Brasil (AC) é composto por dois tipos distintos de cantos (tipo 1: n = 5 cantos; tipo 2: n = 4 cantos). O canto do tipo 1 dura 0,25–0,30 s ($0,28 \pm 0,02$) e é composto por 6 ou 7 notas com duração de 0,005–0,018 s ($0,012 \pm 0,003$) e intervalos bem definidos entre as notas, variando entre 0,01–0,06 s ($0,04 \pm 0,02$). O pico de amplitude relativa varia de 2% a 98% da duração do canto. A banda de frequência varia de 1,3 a 3,5 kHz e a frequência dominante de 2,0 a 2,8 kHz. O canto do tipo 2 é composto por uma nota pulsada com duração de 44 a 51 ms. O pico de amplitude relativa varia entre 18% e 60% da duração do canto. A banda de frequência varia de 1,4 a 4,3 kHz e a frequência dominante de 1,8 a 2,9 kHz.

Distribuição. A linhagem a qual esta população está associada (figura 1) contém espécimes de localidades no Peru próximas a Assis Brasil (figura 4).

Figura 4. Localidades associadas às sequências de DNA usadas na análise filogenética do subclado de *Boana steinbachi*. Polígonos representam a distribuição dos clados que contêm as populações caracterizadas nesse capítulo (Alta Floresta, MT, e Assis Brasil, AC).

População de Alta Floresta, MT:

Série examinada. AAG-UFU 6503 (Figura 4 e 5) e AAG-UFU 6504–6508, machos adultos, coletados no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil (-9.64284°, -56.271408°) em 11 de janeiro de 2019 por Davi L. Bang, André G. Lopes e Pedro Marinho. AAG-UFU 6904, macho adulto coletado em 20 de janeiro de 2020 por Ariovaldo A. Giaretta, Pedro Marinho e André G. Lopes.

Diagnose. A população de Alta Floresta (MT) (Figuras 5 e 6, tabela 2 para morfometria) é caracterizada pela seguinte combinação de características: (1) tubérculo no calcanhar (Tabela 2 e Figura 5, E); (2) repertório vocal composto por mais de um tipo de canto; (3) canto do tipo 1 composto por séries de notas; e (4) notas com intervalos bem definidos; (5) intervalos regulares entre notas (figura 8).

Cores em vida (figura 8). A coloração dorsal é bege a marrom, marrom alaranjado nos machos vocalizando, com listras longitudinais marrom-arroxeadas escuras e faixas transversais marrons fracas. A garganta varia de branco a amarelo, o tórax e a barriga anterior variam de branco a creme. Íris creme ou cinza, às vezes com pigmentação amarela na íris superior. Barriga posterior granular. Superfície ventral da mão e coxas amarelo brilhante. Superfície posterior da coxa e flancos manchados em preto, com uma cor de fundo amarelo ou branco brilhante. Pontos marrons espalhados no dorso, superfície dorsal dos membros, margens da boca, região mentoniana e peito.

Comparações com congêneres do complexo de B. calcarata – B. fasciata. A população de Alta Floresta pode ser diferenciada das espécies do subclado *B. calcarata* (*B. almendarizae*, *B. calcarata*, *B. fasciata*, e *B. maculateralis*) pela ausência de calcar e pelo repertório vocal composto por mais de um tipo de canto. Dentro do subclado de *B. steinbachi*, a população de

Alta Floresta pode ser diferenciada de *B. dentei* e *B. tetete* por seu canto tipo 1 formado por várias notas (canto formado por uma única nota em *B. dentei* e *B. tetete*); de *B. alfaroi* por seu canto com notas com intervalos bem definidos e repertório vocal composto por dois tipos de canto (em *B. alfaroi*, notas com intervalos mal definidos, fundidas entre si; e apenas um tipo de canto); da população de Assis Brasil (= *B. steinbachi*), pelo canto tipo 1 com intervalos regulares entre notas (canto tipo 1 composto por notas com intervalos irregulares na população de Assis Brasil de *B. steinbachi*) (Figura 8). A população de Alta Floresta pode ser diferenciada de topótipos de *B. steinbachi* e da população de Assis Brasil pela presença de tubérculo no calcanhar (prega dérmica no calcanhar em *B. steinbachi* topotípica e na população de Assis Brasil). A partir da combinação dos resultados das análises filogenética e fenotípica, os resultados apontam para que a população de Alta Floresta corresponda a uma espécie não descrita do subclado de *B. steinbachi*, provisoriamente referida como *Boana* sp. de Alta Floresta (mas veja seções Proposições taxonômicas e Discussão).

Varição. Indivíduo AAG-UFU 6507 não apresentou linhas longitudinais no dorso.

Figura 5. Macho adulto da população de Alta Floresta, MT (espécie não descrita referida como *Boana* sp.). Espécime AAG-UFU 6503, CRC = 30,8 mm : (A) vista dorsal, (B) vista ventral. Crédito das fotos: Ariovaldo A. Giaretta.

Figura 6. (A) vista dorsal e (B) vista lateral da cabeça (CC = 11,9 mm, LC = 10,3 mm) (C) vista dorsal dos tubérculos calcâneos. (D) superfície palmar esquerda (CM = 10,4), (E) superfície plantar (CP = 13,1 mm) esquerda de macho adulto proveniente da população de Alta Floresta, MT. (AAG-UFU 6503). Crédito das fotos: Ariovaldo A. Giaretta.

Repertório vocal (Figura 8, Tabelas 3 e 4). Os machos cantam empoleirados em arbustos, em áreas inundadas associadas à borda de florestas secundárias. O repertório vocal da população de Alta Floresta é composto por dois tipos de canto (tipo 1: n = 133 cantos de sete machos; tipo 2: n = 62 cantos de sete machos). O canto do tipo 1 dura de 290 a 420 ms e consiste em 3 a 7 notas não pulsadas que duram de 3 a 60 ms, separadas por intervalos de 27 a 82 ms. O pico de amplitude relativa varia entre 2% e 97% da duração do canto. A banda de frequência varia de 1864 a 3907 Hz, a frequência dominante de 2147 a 2462 Hz. O canto do tipo 2 consiste em uma nota pulsada com duração de 29 a 64 ms. A amplitude relativa varia entre 24% e 78%. A banda de frequência varia de 1593 a 3491 Hz, a frequência dominante de 1938 a 3133 Hz.

Distribuição. A linhagem da qual a população de Alta Floresta faz parte está distribuída no sul e sudeste da Amazônia brasileira dos estados do Mato Grosso e Rondônia (Figura 4), tendo sua distribuição aparentemente limitada ao leste pelo rio Teles Pires, e ao oeste pelo rio Madeira.

Tabela 2. Estatística descritiva das variáveis morfométricas (em mm) das populações estudadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (intervalo). As abreviações são: CRC = comprimento rostro cloacal CP = comprimento do pé; CC = comprimento da cabeça; LC = largura da cabeça; DO = diâmetro ocular; DT = diâmetro do tímpano; CT = comprimento do tibia; CCX = comprimento da coxa; CAC = comprimento do apêndice calcâneo.

	Assis Brasil, AC (<i>Boana steinbachi</i>)	Alta Floresta, MT (<i>Boana</i> sp.)
	Machos N = 6	Machos N = 7
CRC	33,64 $\pm$ 1,60 (30,37–37,44)	32,66 $\pm$ 1,15 (30,80–34,72)
CP	14,03 $\pm$ 1,43 (11,42–16,59)	13,30 $\pm$ 0,39 (12,70–13,70)
CC	11,51 $\pm$ 2,13 (7,86–13,38)	12,05 $\pm$ 0,74 (10,68–12,90)
LC	10,84 $\pm$ 0,76 (9,21–12,07)	10,68 $\pm$ 0,52 (10,07–11,78)
DO	4,04 $\pm$ 0,39 (3,20–4,88)	4,23 $\pm$ 0,24 (3,80–4,69)
DT	2,12 $\pm$ 0,26 (1,33–2,46)	1,99 $\pm$ 0,19 (1,60–2,22)
CT	18,72 $\pm$ 2,06 (14,23–21,72)	18,37 $\pm$ 0,70 (17,10–19,60)
CCX	18,75 $\pm$ 1,92 (14,78–21,05)	16,73 $\pm$ 1,39 (14,90–18,63)
CAC	0,5 $\pm$ 0,1 (0,3–0,6)	0,2 $\pm$ 0,0 (0,1–0,2)

Figura 7. Cores em vida em vista dorsolateral e detalhes dos apêndices calcâneos em vida. A) Indivíduo de *Boana steinbachi* (AAG-UFU 5918) da população de Assis Brasil, AC; e B) detalhe da dobra dérmica no calcanhar do mesmo indivíduo. C) indivíduo de *Boana* sp. (AAG-UFU 6503) da população de Alta Floresta, MT e D) tubérculo calcâneo (indivíduo AAG-UFU 6904). E) indivíduo de *B. calcarata* (sem número de tombo) de Jacareacanga, PA

e F) calcar triangular e achatado dorsoventralmente. Crédito das fotos: Thiago R. de Carvalho (A e B), Davi L. Bang (C), Ariovaldo A. Giaretta (D), e Leandro Silva (E e F).

Figura 8. Espectrogramas e oscilogramas dos cantos do tipo 1 (esquerda) e tipo 2 (direita) () para a população de *Boana steinbachi* de Assis Brasil, AC (fileira superior; arquivo: Boana_steinbachiAssisBrasilAC1aTRC_AAGm671) e de *Boana* sp. da população de Alta Floresta, MT (fileira inferior; arquivo: Boana_spAltaFlorestaMT5hPM_AAGm671).

Tabela 3. Estatísticas descritivas do canto tipo 1 para as duas populações estudadas. Dados apresentados como média $\pm$ DP (range).

	Alta Floresta, MT (<i>Boana steinbachi</i>)	Assis Brasil, AC (<i>Boana</i> sp.)
Duração do canto (ms)	290 $\pm$ 42 (100–430)	280 $\pm$ 49 (130–430)
Número de notas	4.7 $\pm$ 0.4 (3–7)	6.6 $\pm$ 0.5 (3–8)
Duração da nota (ms)	13 $\pm$ 5 (3–60)	15 $\pm$ 7 (4–52)
Intervalo entre notas (ms)	61 $\pm$ 4 (27–82)	41 $\pm$ 10 (1–67)
Frequência dominante (Hz)	2319 $\pm$ 113 (1981–2971)	2397 $\pm$ 313 (1688–3402)
Frequência máxima (Hz)	2841,46 $\pm$ 475,71 (2196,40–4220,50)	3336 $\pm$ 331 (2713–4479)
Frequência mínima (Hz)	1965 $\pm$ 110 (1723–2250)	1665 $\pm$ 139 (1355–1981)
Pico de amplitude (%)	45 $\pm$ 10 (2–97)	48 $\pm$ 57 (2–98)
Machos gravados	7	1
Temperatura (°C)	25,1–25,4	26,2

Tabela 4. Estatísticas descritivas dos canto tipo 2 para as duas populações estudadas. Dados apresentados como média $\pm$ DP (range).

	Alta Floresta, MT (<i>Boana</i> sp.)	Assis Brasil, AC (<i>Boana steinbachi</i>)
Duração do canto (ms)	48 $\pm$ 5 (29–64)	48 $\pm$ 5 (29–64)
Frequência dominante (Hz)	2515 $\pm$ 245 (1938–3143)	2469 $\pm$ 175 (1687–2812)
Frequência máxima (Hz)	3083 $\pm$ 142 (2712–3421)	3146 $\pm$ 353 (2713–4522)
Frequência mínima (Hz)	1861 $\pm$ 56 (1593–2067)	1724 $\pm$ 62 (1453–2015)
Pico de amplitude (%)	48 $\pm$ 7 (24–78)	70 $\pm$ 7 (18–60)
Machos gravados	7	1
Temperatura (°C)	25,1–25,4	26,2

Proposições taxonômicas

Os indivíduos provenientes da população de Assis Brasil (AC), identificados como *Boana alfaroi* (Carvalho *et al.*, 2017), formaram um clado juntamente com indivíduos de *B. steinbachi* do Cusco Amazônico (Peru) (Fouquet *et al.* submetido). Embora os três clados principais de *B. steinbachi* não tenham sido recuperados como uma linhagem monofilética na análise filogenética deste estudo baseada em mtDNA, sabemos que o entendimento das inter-relações dos clados internos da espécie se resolvem com alta resolução ao passo que outros genes mitocondriais e nucleares são adicionados às análises, fazendo com que *B. steinbachi* seja uma espécie monofilética, amplamente distribuída na Amazônia (Figura 4), com estrutura genética bem marcada, mas sem congruência geográfica ao longo de sua distribuição (Fouquet *et al.* submetido). Além disso, com as novas informações adquiridas, o nome *Boana alfaroi* não poderia ser aplicado à população de Assis Brasil com base em evidências filogenéticas (Figura 1), acústicas e morfológicas (veja comparações entre espécies).

Boana steinbachi. foi descrita por Boulenger (1905) da Bolívia “Província Sara, Departamento Santa Cruz da Serra, Bolívia”. De la Riva (1990) sinonimizou a espécie com *Boana fasciata*. Posteriormente, Jansen *et al.* (2011) encontraram diferenças moleculares entre as populações de *B. fasciata* da Bolívia e do Equador e sugeriram que seus resultados implicariam na revalidação de *B. steinbachi*. Caminer & Ron (2014) associaram *B. steinbachi* a uma linhagem genética (“clade J”) que habita a Amazônia boliviana, próxima à sua localidade-tipo, revalidando formalmente *B. steinbachi* baseando-se nas seguintes características de sua série sintípica: (1) calcar “mal definido” (referindo-se ao que definimos aqui como prega dérmica do calcanhar) e (2) tubérculos supranuméricos da mão conspícuos e numerosos. Contudo, a revalidação não

incluiu uma avaliação de topótipos para a avaliação dos padrões de coloração em vida, repertório vocal, e variação intraespecífica em geral.

Em nossas análises, não recuperamos a espécie *B. steinbachi* como monofilética, visto que indivíduos identificados como *B. steinbachi* do Cusco Amazônico (Fouquet *et al.* submetido), juntamente com os indivíduos da população de Assis Brasil, foram recuperados mais próximos de *B. alfaroi* e *B. tetete* do que dos demais clados identificados como *B. steinbachi*. Porém, o posicionamento dos três clados de *B. steinbachi* em nossas análises foram recuperados com suportes baixos, com um deles formando uma politomia no subclado que contém esta espécie, *B. alfaroi* e *B. tetete* (Figura 1). Dessa maneira, visto que não encontramos diferenças morfológicas entre a população de Assis Brasil e os sítipos de *B. steinbachi*, e visto também que as relações de parentesco entre as populações identificadas como *B. steinbachi* não foram recuperadas com bom suporte, identificamos provisoriamente a população de Assis Brasil como *B. steinbachi*. Porém, uma redescrição de *B. steinbachi* de sua localidade tipo se faz necessária para confirmar a identidade taxonômica dos clados relacionados a ela, visto que o repertório vocal, cores em vida e outras características taxonômicas relevantes ainda são desconhecidas para a população topotípica.

A população de Alta Floresta foi recuperada em nossa análise como irmã de todas as outras espécies do subclado de *B. steinbachi*, exceto *B. dentei*, que é irmã de todas as espécies do subclado. As comparações morfológicas e acústicas com todas as espécies descritas para o subclado de *B. steinbachi* revelou diferenças morfológicas superficiais, mas também diferenças acústicas importantes no padrão de emissão das notas, quantidade de notas por canto, e composição do repertório vocal. Portanto, a posição filogenética desta população somada às diferenças fenotípicas (principalmente

acústicas) encontradas indicam fortemente que a *Boana* sp. de Alta Floresta corresponda a uma espécie não descrita.

Discussão

O complexo de espécies de *B. calcarata* e *B. fasciata* contém 8 espécies válidas (Caminer e Ron 2014). Neste estudo, as características fenotípicas de uma linhagem restrita ao sul da Amazônia aponta para o ineditismo desta como espécie não descrita, o que aumentaria o número total de espécies do clado para nove. Esta espécie era confundida com *Boana fasciata* até este nome ser associado a populações restritas ao sopé dos Andes no Equador, restringindo a distribuição de uma espécie que antes se pensava ocorrer em 5.867.000 km² a 10.000 km² (Caminer e Ron, 2014). A potencial espécie nova (*Boana* sp. de Alta Floresta, MT) tem sua distribuição conhecida para uma pequena área entre os rios Teles Pires e Madeira, em uma região amazônica que sofre constantes distúrbios antrópicos (queimadas, desmatamento, construção de hidrelétricas, etc.) (Lovejoy & Nobre 2018). Apesar disso, há pelo menos uma unidade de conservação de proteção integral em seu polígono de distribuição (Parque Nacional de Pacaás Novos) e a espécie parece tolerar ambientes relativamente antropizados (bordas de fragmentos de florestas). Esses fatores podem contribuir para a conservação dessa linhagem de *Boana* endêmico do sul da Amazônia brasileira.

A espécie *Boana steinbachi*, por sua vez, parece apresentar uma ampla distribuição, que engloba todo o oeste amazônico da Bolívia e Peru, até o leste amazônico no estado do Pará (Figura 4), porém, esta espécie ainda requer uma caracterização de suas populações ao longo de sua ampla distribuição, inclusive da população topotípica.

A diversidade do complexo de espécies de *B. calcarata* e *B. fasciata* ainda pode ser maior que as atuais nove espécies (incluindo a *Boana* sp. de Alta Floresta), já que para algumas linhagens nós não obtivemos informações fenotípicas, como é o caso das várias linhagens aqui relacionadas a *B. steinbachi* e de outras linhagens circunscritas a outras regiões da Amazônia, como as linhagens “H” e “I” de Caminer e Ron (2014), distribuídas no Escudo da Guiana e historicamente atribuídas a *B. fasciata*. Além disso, alguns países ainda tem sua diversidade pobremente representada em trabalhos taxonômicos e sistemáticos que se propõem a entender a evolução e diversificação do complexo de *B. calcarata* e *B. fasciata*. Um exemplo é a Colômbia, onde há pelo menos quatro espécies do complexo (*B. alfaroi*, *B. calcarata*, *B. maculateralis*, e *B. tetete*; Acosta-Galvis *et al.* 2018, Meza-Joya *et al.* 2019), porém, apenas a presença de *B. calcarata* e *B. alfaroi* foi confirmada através de análises moleculares, e os registros de *B. maculateralis* e *B. tetete* ainda necessitam de confirmação. Na Venezuela, as espécies do complexo ainda são identificadas genericamente como *B. fasciata* ou *B. calcarata* (Senãris e Rojas-Runjaic *et al.* 2020) sem que estudos detalhados sejam feitos para a confirmação das identificações. Esse padrão é observado também para o Suriname (Ouboter e Jairam 2012) e em diferentes regiões da Amazônia brasileira, como nos estados do Amazonas (Menin *et al.* 2019) e Acre (Fonseca *et al.* 2019, Freitas *et al.* 2020), um limitante na avaliação da identidade taxonômica e os padrões de distribuição das espécies do complexo.

Apêndice

Apêndice 1. Informações sobre as sequências incluídas neste estudo. Sequências produzidas para este estudo estão marcadas em negrito.

Sequências que ainda serão submetidas à base de dados do GenBank indicadas por #.

Número Genbank	Espécie	Espécime	Localidade	Latitude	Longitude	Gene
#	<i>Boana boans</i>	AF1981	Sipaliwini, Suriname	2.11341	-56.17422	16s
>KF723066	<i>Boana raniceps</i>	SMF94094	San Sebastian, Bolívia	-16.3596	-62.0001	16s
>KF723067	<i>Boana raniceps</i>	SMF946263	Estancia Bechi, Bolívia	-17.51720	-63.28998	16s
#	<i>Boana albopunctata</i>	AAG-UFU 1681	Piatã-BA, Brasil	13.151944	-41.772778	16s
#	<i>Boana albopunctata</i>	AAG-UFU 1682	Piatã-BA, Brasil	13.151944	-41.772778	16s
#	<i>Boana paranaiba</i>	AAG-UFU 3532	Araguari-MG, Brasil	-18.648889	-48.186944	16s
#	<i>Boana paranaiba</i>	AAG-UFU 977	Ituiutaba-MG, Brasil	-18.968889	-49.465	16s
#	<i>Boana multifasciata</i>	AAG-UFU 6481	Alta Floresta-MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
#	<i>Boana multifasciata</i>	AAG-UFU 6482	Alta Floresta-MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
#	<i>Boana multifasciata</i>	AAG-UFU 6483	Alta Floresta-MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
KDQF010032	<i>Boana multifasciata</i>	MTR13750	Serra do Navio-AP, Brasil	0.9180556	-52.0027778	16s
KDQF010000	<i>Boana multifasciata</i>	AF0079	Serra do Navio-AP, Brasil	3.888232	-51.807804	16s
JN970646	<i>Boana lanciformis</i>	QCAZ30936	Huino, Ecuador	-0.606	-77.173	16s
JN970647	<i>Boana lanciformis</i>	QCAZ18175	Estación Biologica Jatun Sacha, Ecuador	-1.0675	-77.6152778	16s
>JN970538	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ17944	Rio Hollin, Equador	-0.69547	-77.72958	16s
>JN970614	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ24392	Rio Lagarto, Equador	-0.678184	-76.396556	16s
>JN970615	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ24394	Rio Lagarto, Equador	-0.678184	-76.396556	16s
>JN970616	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ31449	Rio Pastaza, Equador	-1.41283	-78.26878	16s
>JN970617	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ31450	Rio Pastaza, Equador	-1.41283	-78.26878	16s
>JN970618	<i>Boana almendarizae</i>	QCAZ31452	Rio Pastaza, Equador	-1.41283	-78.26878	16s
>JN970524	<i>Boana fasciata</i>	QCAZ48584	La Pradera, Via Gualaquiza, Equador	-2.285	-78.094	16s

>JN970525	<i>Boana fasciata</i>	QCAZ48585	La Pradera, Via Gualaquiza, Equador	-2.285	-78.094	16s
>JN970526	<i>Boana fasciata</i>	QCAZ48593	La Pradera, Via Gualaquiza, Equador	-2.285	-78.094	16s
>JN970531	<i>Boana fasciata</i>	QCAZ26497	Limon-Macas road, km 8, Equador	-2.8858	-78.39708	16s
>JN970523	<i>Boana fasciata</i>	QCAZ18271	La Pradera, Via Gualaquiza, Equador	-2.285	-78.094	16s
>JN970633	<i>Boana calcarata</i>	CM131	crique Margot, Guiana Francesa	5.443190	-53.972344	16s
>JN970635	<i>Boana calcarata</i>	PG105	Kaw, route, Guiana Francesa	4.516105	-52.10053	16s
>KDQF01000164	<i>Boana calcarata</i>	AF0605	Trou Poisson, mare, Guiana Francesa	5.373475	-53.097575	16s
>KDQF01000338	<i>Boana calcarata</i>	AF0941	Matoury , Lac des Americains, Guiana Francesa	4.852891	-52.352092	16s
>KDQF01000408	<i>Boana calcarata</i>	AF1106	Mana , Ilet Lezard rive G, Guiana Francesa	5.054481	-53.8007	16s
>KDQF01000587	<i>Boana calcarata</i>	AF1549	Matoury , crique manceliere, Guiana Francesa	4.89741	-52.92	16s
#	<i>Boana maculateralis</i>	CORBIDI6182	Jenaro Herrera, Requena, Peru	-4.903812	-73.663577	16s
>KDQF01003645	<i>Boana maculateralis</i>	MTR28015	Anguilla Peru, 50 km de Iquitos, Peru	-3.662914	-73.924860	16s
>KDQF01003658	<i>Boana maculateralis</i>	MTR28077	Serra do Divisor-AC, Brasil	-7.44309497	73.6576660	16s
#	<i>Boana maculateralis</i>	NMP6V71250	Anguilla Peru, 50 km de Iquitos, Peru	-3.662914	-73.924860	16s
#	<i>Boana maculateralis</i>	MTR35995	Comunidade Cuiaua, Rio Içá-AM, Brasil	-2.88619	-68.37169	16s
>JN970541	<i>Boana maculateralis</i>	QCAZ40082	Comunidad Santa Rosa, , 640 m SE, Equador	-1.02337	-77.48359	16s
>KDQF01002632	<i>Boana sp.</i>	HJ071	UHE Jirau, Porto Velho-RO, Brasil	-8.748483	-63.903465	16s
>KDQF01002656	<i>Boana sp.</i>	HJ443	UHE Jirau, Abunã-RO, Brasil	-9.69941	-65.358875	16s
>KDQF01002657	<i>Boana sp.</i>	HJ447	UHE Jirau, Abunã-RO, Brasil	-9.69941	-65.358875	16s
>KDQF01003636	<i>Boana sp.</i>	MTR25798	PARNA Pacaás Novos-RO, Brasil	-10.7869789	-63.6273050	16s
>KDQF01003752	<i>Boana sp.</i>	MTR968510	Apiacás-MT, Brasil	-9.650846	-57.393665	16s
>KDQF01003759	<i>Boana sp.</i>	MTR977049	Juruena-MT, Brasil	-10.3236111	-58.4927778	16s
#	<i>Boana sp.</i>	H2472	UHE Jirau, Porto Velho-RO, Brasil	-9.60283365	-65.0583638	16s
#	<i>Boana sp.</i>	MTR25896	PARNA Pacaás Novos-RO, Brasil	-10.7815800	-63.6267350	16s
#	<i>Boana sp.</i>	AAG-UFU6503	Alta Floresta-MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
#	<i>Boana sp.</i>	AAG-UFU6504	Alta Floresta -MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
#	<i>Boana sp.</i>	AAG-UFU6505	Alta Floresta -MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s

#	<i>Boana</i> sp.	AAG-UFU6506	Alta Floresta -MT, Brasil	-9.642839	-56.2714	16s
>JN970543	<i>Boana alfaroi</i>	QCAZ43977	Anangu, Equador	-0.52492	-76.38445	16s
>JN970544	<i>Boana alfaroi</i>	QCAZ43682	Coca, Equador	-0.47782	-76.98982	16s
>JN970554	<i>Boana alfaroi</i>	QCAZ44180	Eden, Equador	-0.49833	-76.07112	16s
>JN970557	<i>Boana alfaroi</i>	QCAZ44191	Eden, Equador	-0.49833	-76.07112	16s
>JN970569	<i>Boana alfaroi</i>	QCAZ43826	La Primavera, margem sul, Equador	-0.44427	-76.78685	16s
>JN970539	<i>Boana tetete</i>	QCAZ40080	Comunidad Santa Rosa, 230 m SE, Equador	-1.02137	-77.47819	16s
>JN970540	<i>Boana tetete</i>	QCAZ40081	Comunidad Santa Rosa, 230 m SE, Equador	-1.02137	-77.47819	16s
>JN970627	<i>Boana tetete</i>	WED60015	San Jacinto, Equador	-2.3125	-75.8628	16s
>KU221865	<i>Boana tetete</i>	Sem dados	San Jacinto, Equador	-4.674982	-73.958995	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	AAG-UFU5917	Assis Brasil-AC, Brasil	-10.933098	-69.594418	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	AAG-UFU5918	Assis Brasil-AC, Brasil	-10.933098	-69.594418	16s
>KDQF01003399	<i>Boana steinbachi</i>	MTR18819	Lago Chaviana, Itapuru, margem direita, Rio Purus-AM, Brasil	-4.18314	-61.48801	16s
>KDQF01003646	<i>Boana steinbachi</i>	MTR28018	Serra do Divisor-AC, Brasil	-7.43707300	-73.6571960	16s
>KDQF01003722	<i>Boana steinbachi</i>	MTR33822	Japurá, Trilha da Anta-AM, Brasil	-1.77207062	-66.3725554	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI11192	Saniri Malvinas, Peru	-11.846765	-72.94	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI12128	Rio Tapiche, Peru	-7.448717	-73.940944	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13035	Coronel Pontillo, Peru	-8.662599	-74.059897	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI8542	Poyentimari, Peru	-12.3175	-72.8922	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI8698	Datem del Maranon, Peru	-4.171196	-76.932370	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI8974	Rio Corrientes, Peru	-2.735647	-76.031778	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI8975	Rio Corrientes, Peru	-2.735647	-76.031778	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	MTR35970	Comunidade Cachoeirinha, Rio Içá-AM, Brasil	-2.87148	-68.34707	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	MTR36143	Açaí, Rio Içá-AM, Brasil	-2.90452	-68.33869	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	MTR36968	Coari-AM, Brasil	-4.08864	-63.09844	16s
>JN970629	<i>Boana steinbachi</i>	WED57865	Cuzco Amazónico, Peru	-12.583	-69.083	16s
>JN970632	<i>Boana steinbachi</i>	WED59350	Cuzco Amazónico, Peru	-12.583	-69.083	16s

>KU205472	<i>Boana steinbachi</i>	WED55554	Puerto Maldonado, Peru	-12.618187	-69.167000	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	SCF395	Puesto de control y vigilância Cocama, Peru	-10.399	-71.165	16s
>JF790135	<i>Boana steinbachi</i>	MJ1300	Sara, Buenavista, Bolívia	-17.481683	-63.684867	16s
>JF790136	<i>Boana steinbachi</i>	MJ1301	Sara, Buenavista, Bolívia	-17.481683	-63.684867	16s
>JF790137	<i>Boana steinbachi</i>	MJ1302	Sara, Buenavista, Bolívia	-17.481683	-63.684867	16s
>JF790138	<i>Boana steinbachi</i>	MJ1310	Sara, Buenavista, Bolívia	-17.481683	-63.684867	16s
>KDQF01001813	<i>Boana steinbachi</i>	BM048	UHE Belo Monte, Vitoria do Xingu, Rio Xingu-PA, Brasil	-2.950584	-51.936607	16s
>KDQF01001848	<i>Boana steinbachi</i>	BM355	UHE Belo Monte, Vitoria do Xingu, Rio Xingu-PA, Brasil	-2.950584	-51.936607	16s
>KDQF01002994	<i>Boana steinbachi</i>	MPEG36753	Canaã dos Carajás, Mina do Sossego-PA, Brasil	-6.075562	-50.243245	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13415	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13417	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13453	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13454	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI13482	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	CORBIDI15138	Tambopata, Peru	-11.962370	-70.213704	16s
#	<i>Boana steinbachi</i>	JMP088	Chalalan. Franz Tamayo, Bolívia	-14.428168	-67.922330	16s

CONCLUSÕES

A crescente descoberta de novas espécies de anuros na Amazônia (Melo-Sampaio *et al.*, 2018; Peloso *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019 a,b; Caminer & Ron, 2020; Sturaro *et al.*, 2020) tem mostrado que em quase todos os estudos taxonômicos e sistemáticos de grupos amplamente distribuídos por este bioma foram descobertos complexos de espécies sob um mesmo nome. Muitas vezes, as espécies recém descritas são restritas a uma pequena área e, portando, em risco de ameaças por ações antrópicas (por exemplo, Fouquet *et al.* 2014; Carvalho *et al.* 2019; Vacher *et al.* 2020). Esse padrão também é seguido pelo complexo de espécies de *B. calcarata* e *B. fasciata*, uma vez que *Boana fasciata* era um nome usado para populações em toda a Amazônia até as conclusões de Caminer e Ron (2014), o que tornou necessária uma revisão taxonômica das demais populações associadas a essa espécie e ao complexo como um todo.

Visto isso, neste trabalho, avançamos no conhecimento a respeito da taxonomia e distribuição de espécies do complexo de *Boana calcarata* - *B. fasciata*, adicionando novas informações taxonômicas relevantes para uma espécie previamente descrita (*B. dentei*), o que tornou possível comparações mais robustas desta com as demais espécies do grupo e linhagens candidatas, gerando maior segurança na aplicabilidade deste nome às populações do leste do Escudo da Guiana. Como consequência, análises moleculares, e comparações morfológicas e acústicas permitiram o reconhecimento de uma nova espécie, sugerindo o aumento do número total de espécies do grupo para nove, reiterando a importância e eficácia da combinação desses dados para o conhecimento da diversidade do complexo. Ainda, evidências moleculares apontam para a presença de *B. steinbachi* no Peru e em vários estados brasileiros, o que aumenta consideravelmente a distribuição de uma espécie recém revalidada e conhecida até então apenas de sua localidade tipo e arredores. Porém, em razão da baixa amostragem genética e fenotípica

de trabalhos feitos até hoje com o clado, diversas linhagens do complexo permanecem sem caracterização, sendo provável que sua diversidade ainda esteja subestimada.

REFERÊNCIAS

- BENÍCIO, R. A.; LIMA, J. D. Anurans of Amapá National Forest, Eastern Amazonia, Brazil. **Herpetology Notes**. N. 10, p. 627–633, 2017.
- BIOACOUSTICS RESEARCH PROGRAM. 2012. Ithaca (NY): **The Cornell Lab of Ornithology**; [acessado em 2018 Nov 19]. <http://www.birds.cornell.edu/raven>
- BOKERMANN, W. C. A. Nova espécie de *Hyla* do Amapá (Amphibia, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 27, p. 109–112, 1967.
- BOULENGER, G. A. Descriptions of new tailless batrachians in the collection of the British Museum. **Annals and Magazine of Natural History Series**. v. 7, n. 16, p. 180–184, 1905.
- CAMINER, M.A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **Zookeys**, n. 370, p. 1, 2014.
- CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of the *Boana semilineata* species group (Anura: Hylidae), with a description of two new species from Amazonian Ecuador. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2020.
- CARAMASCHI, U.; NIEMEYER, H. New species of the *Hyla albopunctata* group from central Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu Nacional**. n. 504, p. 1–8, 2003.
- Carvalho, T. R. *et al.* A new Amazonian species of *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) from the Brazilian state of Pará: a tody-tyrant voice in a frog. **American Museum Novitates**. n. 3919, p. 1–21, 2019.

CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; FACURE, K. G. A new species of *Hypsiboas* Wagler (Anura: Hylidae) closely related to *H. multifasciatus* Günther from southeastern Brazil. **Zootaxa**. n. 2521, p. 37–52, 2010.

CARVALHO, T. R. *et al.* First record of *Boana alfaroi* (Caminer & Ron, 2014)(Anura: Hylidae) in Brazil. **Check List**, v. 13, p. 135, 2017.

CARVALHO, T. R. *et al.* Systematics and historical biogeography of Neotropical foam-nesting frogs of the *Adenomera heyeri* clade (Leptodactylidae), with the description of six new Amazonian species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, p. 1–39, 2020.

COPE, E. D. Catalogues of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, U.S.N.; and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. Top. Eng., Commander of the expedition conducting the survey of the Atrato River. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**. n. 14, p. 346–359, 1862.

COTTERILL, F. P. D. The second Alexandrian tragedy, and the fundamental relationship between biological collections and scientific knowledge. **The Value and Valuation of Natural Science Collections**, p. 227-241, 1997.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean society**, v. 85, n. 3, p. 407-415, 2005.

DE LA RIVA, I. Lista preliminar comentada de los anfibios de Bolivia con datos sobre su distribución. **Bollettino. Museo Regionale di Scienze Naturali**. v. 8, p. 261–319, 1990.

DUBOIS, A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. **Bionomina**, v. 11, n. 1, p. 1-48, 2017.

DUELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. **Lawrence (KS): The 539 University of Kansas**. 1970

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. Biology of Amphibians. **McGraw-Hill**, p. 670, 1986.

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

FAIVOVICH, J.; MCDIARMID, R. W.; MYERS, C.W. Two new species of *Myersiohyla* (Anura: Hylidae) from Cerro de la Neblina, Venezuela, with comments on other species of the genus. **American Museum Novitates**, v. 23, P. 1–63, 2013.

FONSECA, W. L. *et al.* Herpetofauna of Porto Walter and surrounding areas, southwest Amazonia, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 91–107, 2019.

FOUQUET, A. *et al.* Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. **Zootaxa**. v. 4084, p. 79–104, 2016.

FOUQUET, A. *et al.* Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 5, p. 855–870, 2014.

FOUQUET, A *et al.* Systematics and biogeography of the *Boana albopunctata* species group, with the description of two new species from Amazonia. No prelo.

FREITAS, M. A *et al.* Herpetofauna at the Rio Acre Ecological Station, Amazon Rainforest, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 13, p. 33–48, 2020.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (03 May 2020). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**, New York. 2015.

FROST, D. R. *et al.* The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-291, 2006.

FUNK, W.C.; CAMINER, M.; RON, S.R. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, 1806-1814, 2011.

GALVIS, P. A. *et al.* The advertisement calls of three hylid frogs from Hispaniola. **Bioacoustics**. n. 25, p. 89–97, 2016.

GAUCHER P., RODRIGUES M. T. 2004. *Hypsiboas dentei*. **The IUCN Red List of Threatened Species** [acesso em 13 de dezembro de 2019].

HEYER, W. R. *et al.* Frogs of Boracéia. **Arquivos Zoológicos**. n. 31, p. 231–410, 1990.

JANSEN, M. *et al.* Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. **Zoologica Scripta**, v. 40 p. 567–583, 2011

JENKINS, C.N.; PIMM, S.L.; JOPPA, L.N. Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 110, n. 28, p. 2602–2610, 2013.

KATOH, K. *et al.* MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 511–518, 2005.

KÖHLER, J. *et al.* The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**. n. 4251, p. 001–124, 2017.

KOK, P. J. R.; KALAMANDEEN, M. Introduction to the taxonomy of the amphibians of Kaieteur National Park, Guyana. **Brussels (Belgium): ABCTaxa**. 2008

KWET, A. *et al.* First record of *Hyla albopunctata* Spix, 1824 (Anura: Hylidae) in Uruguay, with comments on the advertisement call. **Boletín de la Asociasson Herpetoliga Española**. n. 13, p. 15–19, 2002.

LESCURE, J.; MARTY, C. Atlas des amphibiens de Guyane. Collection patrimoines naturels. Paris (France): **Publication Scientifiques du M.N.H.N.** v. 23, p. 1–24, 2000.

LIGGES, U. *et al.* 2017. **TuneR: analysis of music and speech**. [accessed 2018 Nov 19]. <https://CRAN.R-project.org/package=tuneR>.

LOVEJOY, T.E.; NOBRE, C. Amazon tipping point. **Science advances**. v. 3, p. 1, 2018.

LUTZ, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. Austin (TX): **University of Texas Press**.

LYRA, M.L.; HADDAD, C. F. B.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**. v. 17, p. 966–980, 2017

- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1992.
- MARINHO, P. *et al.* The Amapá treefrog *Boana dentei* (Bokermann, 1967): diagnosis and redescription. **Journal of Natural History**, 2020.
- MÁRQUEZ, R.; DE LA RIVA, I.; BOSCH, J. Advertisement calls of Bolivian species of *Hyla* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Biotropica**. n. 25, p. 426–443, 1993.
- Melo-Sampaio, P. R.; Oliveira, R. M.; Prates, I. (2018). A new nurse frog from Brazil (Aromobatidae: Allobates), with data on the distribution and phenotypic variation of western Amazonian species. **South American Journal of Herpetology**. v. 13, n. 2, p. 131–149, 2018.
- MENIN, M. Anuran diversity in urban and rural zones of the Itacoatiara municipality, central Amazonia, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 2, p. 122–130, 2019.
- MEYER, C. *et al.* Global priorities for an effective information basis of biodiversity distributions. **Nature communications**. v. 6, n. 1, p. 1-8, 2018.
- NOBLE, G. K. Six new batrachians from the Dominican Republic. **American Museum Novitates**. n. 61, p. 1–6, 1923.
- OUBOTER, P. E.; JAIRAM, R. Amphibians of Suriname. **Leiden (Netherlands): Brill**. 2012.
- PADIAL, J. M. *et al.* The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 16, 2010.

PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. **Zootaxa**, v. 3825, n. 1, p. 1-132, 2014.

PÁEZ, N. B.; RON, S. R. Systematics of Huicundomantis, a new subgenus of Pristimantis (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. **ZooKeys**, v. 868, p. 1, 2019.

PALUMBI, S.R. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Eds.). **Molecular Systematics**. p. 205–247, 1996.

PANSONATO, A. *et al.* Advertisement call and new distribution records of *Hypsiboas leucocheilus* (Anura: Hylidae). **Salamandra**. n. 47, p. 55–58, 2011.

PELOSO, P. L. *et al.* Phylogeny of map tree frogs, *Boana semilineata* species group, with a new Amazonian species (Anura: Hylidae). **South american journal of herpetology**. v. 13, n. 2, p. 150–169, 2018.

PINHEIRO, P. D. P. *et al.* A new species of the *Boana albopunctata* group (Anura: Hylidae) from the Cerrado of Brazil. **South American Journal of Herpetology**. v. 13, p. 170–182, 2018.

RAMBAUT A., *et al.* Tracer version 1.6, 2014.

R CORE TEAM. 2018. **Vienna (Austria)**: R Foundation for Statistical Computing; SÁ, R. O. *Hyla multifasciata*. **CAAR**. v. 62, p. 4–14, 1996. 638 [accessed 2018 Nov 19]. [http:// www.R-project.org/](http://www.R-project.org/)

ROJAS, R. R. *et al.* A Pan-Amazonian species delimitation: high species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). **PeerJ**, v. 6, p. e4941, 2018.

SALDUCCI, M *et al.* Molecular phylogeny of French Guiana Hylinae: implications for the systematic and biodiversity of the Neotropical frogs. **C R Biology**. v. 325, p. 141–153, 2002.

SALDUCCI, M. *et al.* Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana. **Comptes Rendus Biologies**. v. 328 n. 10–11 p. 1009–1024.

SAVAGE, J. M.; HEYER, W.R. Digital webbing formulae for anurans: a refinement. **Herpetological Review**. n. 28, p. 131, 1997.

SEÑARIS, C.; ROJAS-RUNJAIC, F.J.M. Amphibians and reptiles of Venezuelan Guayana: diversity, biogeography and conservation. **Neotropical Diversification: Patterns and Processes**. p. 571–633, 2020.

SILVA Y. B. S.; COSTA-CAMPOS C. E. Anuran species composition of Cancão Municipal Natural Park, Municipality of Serra do Navio, Amapá state, Brazil. **ZooKeys**. n. 762, p. 131–148, 2018.

SILVA, L.A. *et al.* Unraveling the species diversity and relationships in the *Leptodactylus mystaceus* complex (Anura: Leptodactylidae), with the description of three new Brazilian species. **Zootaxa**. v. 4779, n. 2, 151–189, 2020.

STURARO, M. J *et al.* Resolving the taxonomic puzzle of *Boana cinerascens* (Spix, 1824), with resurrection of *Hyla granosa gracilis* Melin, 1941 (Anura: Hylidae). **Zootaxa**. v. 4750, n. 1, p. 1–30, 2020.

SUEUR, J.; AUBIN, T.; SIMONIS, C. Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. **Bioacoustics**. v. 18, p. 213–226, 2008.

VACHER, J.P. *et al.* Large scale DNA-based survey of Amazonian frogs suggest a vast underestimation of species richness and endemism. **Journal of Biogeography**, 2020.

VACHER, J.P. *et al.* Cryptic diversity in Amazonian frogs: Integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 112, p. 158-173, 2017.

WATTERS, J. L. *et al.* Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. **Zootaxa**, v. 4072 n. 4, p. 477–495, 2016.

WELLS, K. D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, p. 666–693, 1977.

WIENS, J. J. *et al.* An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 871-882, 2010.

WIENS, J. J. *et al.* Hylid frog phylogeny and sampling strategies for specios clades. **Systematic and Biology**. v. 54, p. 719–748, 2005.