

EMERSON GONÇALVES DIAS

**AUTOECOLOGIA DE *PHYLLODYTES GYRINAETHES* PEIXOTO, CARAMASCHI
& FREIRE, 2003, UM ANFÍBIO BROMELÍGENA ENDÊMICO DO LESTE DO
BRASIL**

**SERRA TALHADA,
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**AUTOECOLOGIA DE *PHYLLODYTES GYRINAETHES* PEIXOTO, CARAMASCHI
& FREIRE, 2003, UM ANFÍBIO BROMELÍGENA ENDÊMICO DO LESTE DO
BRASIL**

Emerson Gonçalves Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Ecologia, Conservação e uso da Biodiversidade de Ambientes Terrestres.

Prof.(a) Dr.(a) Ednilza Maranhão dos Santos
Orientador

Prof.(a) Dr.(a) Mauro de Melo Júnior
Co-orientador

SERRA TALHADA,
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G635a Dias, Emerson Gonçalves
 AUTOECOLOGIA DE PHYLLODYTES GYRINAETHES PEIXOTO, CARAMASCHI & FREIRE, 2003, UM
 ANFÍBIO BROMELÍGENA ENDÊMICO DO LESTE DO BRASIL / Emerson Gonçalves Dias. - 2020.
 113 f. : il.
- Orientadora: Ednilza Maranhao dos Santos.
 Coorientador: Mauro de Melo Junior.
 Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
 Conservação, Serra Talhada, 2021.
1. Comunicação acústica. 2. Etograma. 3. Reprodução. I. Santos, Ednilza Maranhao dos, orient. II. Junior, Mauro de
 Melo, coorient. III. Título

CDD 338.95

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**AUTOECOLOGIA DE *PHYLLODYTES GYRINAETHES* PEIXOTO, CARAMASCHI
& FREIRE, 2003, UM ANFÍBIO BROMELÍGENA ENDÊMICO DO LESTE DO
BRASIL**

Emerson Gonçalves Dias

Dissertação a ser julgada adequada para
obtenção do título de mestre em
Biodiversidade e Conservação. Defesa prevista
para 28/02/2020 pela seguinte Banca
Examinadora.

Prof^(a). Dr^(a). Ednilza Maranhão dos Santos - Orientador
[Departamento de Biologia/ UFRPE]

Prof^(a). Dr^(a). Mauro de Melo Júnior - Coorientador
[Departamento de Biologia/ UFRPE]

Prof^(a). Dr^(a). Ailton Torres Carvalho – Membro Interno (Titular)
[UFRPE/ UAST]

Prof^(a). Dr^(a). Marcelo Nogueira de Carvalho Kokubum – Membro Externo (Titular)
[Universidade Federal de Campina Grande/UFCG]

Prof^(a). Dr^(a). André Laurênio de Melo – Membro Interno (suplente)
[UFRPE/ UAST]

Prof^(a). Dr^(a). Maria Adélia Borstelmann de Oliveira – Membro Externo (suplente)
[Departamento Morfologia e Fisiologia Animal/ UFRPE]

Dedicatória

A toda ciência produzida por LGBTQIA+, mulheres,
negros, pobres e cotistas.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a minha família, em especial minha mãe Adelma Vital, meu pai Maurício Dias, padrasto Damião Leôncio, e Irmãos Amanda Dias e Denilson Leôncio. Obrigado por vocês serem a minha base. Amo vocês!

Aos amigos e colegas de trabalho que contribuíram para realização deste trabalho. Em especial Flávio José (Zé), Erika Suzan, Igor Gonçalves, Joécio Donellys e Rayssa Santos que se revezaram mensalmente para me ajudar nas coletas de dados. Sou muito grato a vocês!

À minha Orientadora Ednilza Maranhão dos Santos, pela confiança e todo auxílio necessário para o delineamento, execução e finalização do trabalho. Minha parceira da vida acadêmica, profissional e grande amiga! Aproveito para estender também meus agradecimentos ao Professor Mauro de Melo Júnior, um cientista que é uma verdadeira inspiração para seus colegas de trabalho e alunos.

Ao Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, assim como o apoio e amizade das famílias que moram dentro da Unidade de Conservação, por nos acolher em suas residências durante a etapa de campo. Um agradecimento especial a Dona Edjane, Seu Rubens, David e Seu Gilson.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Anfíbios e Répteis (L.I.A.R.) e ao Laboratório de Ecologia do Plâncton (LePlanc) da Universidade Federal Rural de Pernambuco e a referida instituição de ensino ao qual pertenço.

Ao Programa de Biodiversidade e Conservação (PGBC).

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

Resumo

Estudos sobre autoecologia de *Phyllodytes gyrinaethes* foi realizado com o objetivo de conhecer aspectos sobre seu comportamento vocal, ecologia comportamental (etograma) e dados reprodutivos. O estudo ocorreu no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, uma Unidade de Conservação estadual de Floresta Atlântica, localizado no município de São Vicente Férrer, Pernambuco. A coleta de dados se deu mensalmente, de outubro de 2018 a setembro de 2019, seis dias consecutivos, através de buscas ativas. Vocalizações de *P. gyrinaethes* foram gravadas e analisadas para a descrição de seus parâmetros acústicos e seu contexto de emissão (Cap. I); assim como também construímos um etograma do repertório comportamental e caracterizamos os sítios e contextos reprodutivos vinculados à espécie (Cap. II). Descrevemos o repertório vocal, investigando se há variação intra e interindividual das chamadas acústicas e a determinação do reconhecimento vocal e o efeito de fatores abióticos e bióticos nas propriedades de seu canto. Analisamos 109 chamadas de boa qualidade obtidas de 10 indivíduos, utilizando teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para avaliar diferenças entre chamadas em diferentes contextos (territorial e anúncio) e o teste de Spearman (rs) para testar a correlação entre os cantos de anúncio e fatores abióticos e bióticos. Também utilizamos o coeficiente de variação e inferência de reconhecimento individual. Foi descrita pela primeira vez, o canto referente ao contexto territorial para a espécie estudada. As chamadas do contexto territorial diferiram temporalmente e espectralmente das chamadas de anúncio. O tamanho, massa e temperatura mostraram-se correlacionados com as propriedades acústicas dos sons. A análise de variação intra e interindividual, revelou que as propriedades físicas dos sons variam entre os indivíduos, indicando que eles podem se reconhecer individualmente através da emissão dos sons. Sobre a caracterização da população estudada, este trabalho amplia a distribuição de *Phyllodytes gyrinaethes* dentro do estado de Pernambuco. 76 indivíduos de *P. gyrinaethes* foi registrado ocupando apenas bromeliácea *Aechmea costantinii*, utilizando seus fitotelmos como sítios reprodutivos, abrigo diurno e sítio de alimentação. O repertório comportamental exibido por *Phyllodytes gyrinaethes* contou com 20 atos comportamentais distribuídos em seis categorias. Portanto, as informações aqui elencadas sobre sua ecologia podem vir a se tornar uma ferramenta valiosa na criação de planos de manejos futuros envolvendo a espécie, visto que se trata de uma espécie beneficiada pelo Plano de Ação Nacional para conservação da herpetofauna nordestina.

Palavras-chave: Comunicação acústica; Etograma; Reprodução.

Abstract

Studies on the autoecology of *Phyllodytes gyrinaethes* were carried out with the objective of knowing aspects about his vocal behavior, behavioral ecology (ethogram) and reproductive data. The study took place at the Matas de Siriji Wildlife Refuge, an Atlantic Forest State Conservation Unit, located in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco. Data collection took place monthly, from October 2018 to September 2019, six consecutive days, through active searches. Vocalizations of *P. gyrinaethes* were recorded and analyzed for the description of his acoustic parameters and their context of emission (Chap. I); as well as building an ethogram of the behavioral repertoire and characterizing the reproductive sites and contexts linked to the species (Chapter II). We describe the vocal repertoire, investigating whether there is intra and interindividual variation in the acoustic calls and the determination of vocal recognition and the effect of abiotic and biotic factors on the properties of your singing. We analyzed 109 good quality calls obtained from 10 individuals, using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn test to assess differences between calls in different contexts (territorial and advertisement) and the Spearman test (r_s) to test the correlation between the ad chants and abiotic and biotic factors. We also use the coefficient of variation and inference of individual recognition. The song referring to the territorial context for the species studied was described for the first time. The calls from the territorial context differed temporally and spectral from the calls from the announcement. The size, mass and temperature were shown to correlate with the acoustic properties of the sounds. The analysis of intra and inter-individual variation revealed that the physical properties of sounds vary between individuals, indicating that they can recognize themselves individually through the emission of sounds. On the characterization of the studied population, this work expands the distribution of *Phyllodytes gyrinaethes* within the state of Pernambuco. 76 individuals of *P. gyrinaethes* were registered occupying only bromeliad *Aechmea costantinii*, using their phytotelmos as reproductive sites, daytime shelter and feeding site. The behavioral repertoire exhibited by *Phyllodytes gyrinaethes* included 20 behavioral acts divided into six categories. Therefore, the information listed here about its ecology may become a valuable tool in the creation of future management plans involving the species, since it is a species benefited by the National Action Plan for the conservation of the Northeastern herpetofauna.

Keywords: Acoustic communication; Ethogram; Reproduction.

Lista de figuras

Página

Artigo I

Figura 1- Macho de *Phyllodytes gyrinaethes* em sítio de canto, um fitotelmos de bromeliácea, no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, nordeste do Brasil em maio de 2019..... 48

Figura 2- Oscilograma e espectrograma de vocalizações de *Phyllodytes gyrinaethes*, nos contextos de anúncio (C1) e defesa territorial (C2). 48

Artigo II

Figura 1- Localização do Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji e as áreas de estudo selecionadas (A1 e A2), localizado no município de São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil 76

Figura 2- Fases de vida de *Phyllodytes gyrinaethes* no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco. a. Macho adulto. b. Fase larval, cardume de girinos. c. Imago de *P. gyrinaethes*. c. Indivíduo jovem, totalmente metamorfoseado..... 77

Figura 3- Distribuição vertical de bromélias ocupadas por *Phyllodytes gyrinaethes* em relação ao solo, no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, entre outubro de 2018 e setembro de 2019..... 78

Figura 4- a. Gráfico referente ao teste de regressão linear simples, indicando correlação positiva entre umidade relativa do ar com a incidência de machos acusticamente ativos no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji (RVSMS), Pernambuco, Brasil. b. Gráfico referente ao teste de regressão linear simples, indicando correlação negativa entre a temperatura do ambiente e número de machos acusticamente ativos na RVSMS, Pernambuco, Brasil. c. Flutuação pluviométrica de precipitações (mm) no município de São Vicente Férrer durante os meses de coleta no RVSMS (Fonte: Climate-Data.Org)..... 79

Figura 5- Ocupação de sítios reprodutivos por *Phyllodytes girinaethes* em Bromeliacea no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil. a. Bromélia da espécie *Aechmea costantinii*. b. Macho adulto vocalizando em sítio de canto. c. Cardume de girinos no estágio 22 em axila fitotelmada abaixo do fitotelmus central. d. Macho ocupando sítio reprodutivo abaixo do fitotelmus central de *Aechmea costantinii*, onde o pendão contendo a estrutura germinativa da bromélia está projetada para superfície..... 80

Figura 6- Machos de *Phyllodytes girinaethes* pertencente ao Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, interagindo com a prole na realização comportamento indicativo de cuidado parental. a. Macho sobre o cardume de girinos (tabela 2, código 10). b. Imagem ampliada de “a”. c e d. Machos adjacentes ao cardume de girinos (Tabela 2, código 11).....81

Figura 7- Atos comportamentais referente a outras categorias comportamentais não evidentes na ecologia reprodutiva. a. Ato de deslocar-se para outra axila, pertencente a categoria Deslocamento (código 16); b. Ato de arquear o corpo, categoria Defesa (código 8); c. Ato de predação, categoria forrageamento (código 20).82

Lista de tabelas

Página

Artigo I

Tabela 1- Características físicas de vocalizações emitidas por <i>P. gyrinaethes</i> em diferentes contextos	45
Tabela 2- Correlação entre parâmetros acústicos do canto de anúncio de <i>P. gyrinaethes</i> e fatores bióticos e abióticos	46
Tabela 3- Coeficientes de variação Intraindividual e interindividual do canto de anúncio de <i>Phyllodytes gyrinaethes</i>	47

Artigo II

Tabela 1- Cardumes de girinos registrados no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil entre outubro de 2018 e setembro de 2019.	83
Tabela 2- Etograma comportamental de <i>Phyllodytes gyrinaethes</i> oriundos do Refúgio de vida silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. Para acessar a descrição dos atos comportamentais, consultar o Anexo 1	84
Apêndice 1- Descrição dos atos comportamentais efetuados por <i>Phyllodytes girinaethes</i> representados por códigos, referente ao etograma comportamental da tabela 1.	85

Sumário

	Página
Dedicatória.....	5
Agradecimento.....	6
Resumo	7
Abstract	8
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas.....	11
1- Introdução.....	13
2- Objetivos.....	16
3- Referências bibliográficas.....	18
4- Artigo científico.....	22
4.1- Artigo científico I.....	22
4.2- Artigo científico II.....	50
5. Conclusões.....	88
6. Declaração de Plágio.....	90
7. Norma das Revistas.....	91
7.1. Normas da revista <i>Bioacoustics</i> (artigo I)	91
7.2. Normas da revista <i>Herpetological Conservation and Biology</i> (artigo II)	96

1. Introdução

Estudos sobre autoecologia são instrumentos importantes para subsidiar ações futuras de manejo e reprodução de espécies que constam como vulneráveis às mudanças ambientais, além de fornecer dados que dão suporte a diversas áreas do conhecimento, como a sistemática, ecologia, etologia e evolução, além de atuar como base para a formulação de hipóteses ecológicas (Vitt, 2013), relacionando a conservação do ecossistema e a função das espécies no ambiente (Greene e Losos, 1988; Fleischner e Noss, 2013). De modo geral, investigações sobre história natural de anfíbios visam compreender como esses animais se relacionam entre eles e com o meio, através de informações sobre uso de habitat, padrão de atividade, repertório comportamental, reprodução, comunicação, competição entre espécies, entre outros (Stebbins e Cohen, 1995). Nesse sentido, o estudo da autoecologia pode ser considerado uma base para a ecologia da conservação, muitas vezes fornecendo informações que auxiliam no entendimento de padrões e seus mecanismos causais, documentando eventos muitas vezes inéditos sobre táxons (Ricklefs, 1990), inclusive aqueles que pouco se conhece, levantando propostas e discussões valiosas, fundamentais para o estudo evolutivo do organismo e de sua manutenção (Greene e Losos, 1988; Hillis, 1995).

Investigações sobre a comunicação acústica em anfíbios anuros são excelentes formas de se adquirir informações pertinentes a respeito de sua história de vida, pois esta, além de ser uma característica taxonômica, está geralmente associada a um repertório composto por diferentes tipos de vocalizações que envolvem diversos tipos de contextos comportamentais (Toledo *et al.* 2014; Toledo *et al.* 2015; Köhler *et al.* 2017). Entre os tipos de vocalizações, os cantos de anúncio são os mais comuns (Toledo *et al.*, 2014), podendo possuir duas funções principais: atrair parceiras reprodutivamente maduras e defender territórios, além de possuir um caráter taxonômico (Köhler *et al.*, 2017), uma vez que são espécie-específicos. Esses

sinais acústicos utilizados em exibições durante o período reprodutivo são considerados resultados e motores de processos evolutivos, contribuindo para o isolamento reprodutivo e processos de especiação (Wells, 1977; Halliday e Tejedo, 1995).

Nesse sentido, a escolha de parceiros por fêmeas pode exercer forte pressões seletivas sobre machos (Anderson e Simmons, 2006), direcionando importantes mudanças nas características exibidas por estes (Gerhardt, 1991). Em anuros, além dos sinais acústicos, outras características dos machos, como por exemplo, tamanho corporal, bem como a qualidade do seu território, também são alvos da escolha de fêmeas, que pode selecionar machos por meio de sinais visuais em exibições (Sá et al., 2016) e inspeção dos sítios reprodutivos (Cayuela et al., 2017). Vale ressaltar, que a seleção sexual também pode operar através da competição entre machos (Andersson e Simmons, 2006), onde machos de algumas espécies são capazes de avaliar o tamanho e a capacidade de luta de rivais, com base na variação das propriedades espectrais de suas vocalizações (Gerhardt e Bee, 2006), influenciando o resultado de disputas e a partilha dos sítios reprodutivos.

Vale ressaltar, que para anfíbios anuros, suas estratégias ou táticas reprodutivas é quem vão definir seu padrão temporal e comportamental de reprodução (Wells, 1977), culminando no seu modo reprodutivo, que pode ser caracterizado por uma combinação de diversas características como tipo de sítio de desova, desenvolvimento larval e, quando presente, tipo de cuidado parental (Duellman e Trueb, 1986). Atualmente existem cerca de 39 modos reprodutivos ao redor do Mundo, sendo 31 deles encontrados nos anuros neotropicais e 28 no Brasil (Haddad e Prado, 2005), onde os anuros exibem uma diversidade de modos reprodutivos maior que qualquer outro grupo de vertebrados tetrápodes (Haddad e Prado, 2005). Dentre os Modos reprodutivos conhecidos para os anuros, *Phyllodytes* possui o modo seis, caracterizado por depositarem ovos e girinos exotróficos na água em covas de árvores ou plantas aéreas (Haddad e Prado, 2005).

Phyllodytes gyrinaethes Peixoto, Caramaschi e Freire, 2003 é uma espécie endêmica da Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, conhecida de poucos registros nos municípios de Murici (Fazenda Bananeiras - localidade-tipo), em Alagoas, e de Jaqueiras (Usina Colônia), em Pernambuco (Freire e Peixoto, 2004). O seu ciclo de vida está associado a fitotelmos de bromeliáceas terrestres e epífitas (Peixoto *et al.*, 2003). Seu canto de anúncio foi descrito só após cerca de dez anos de sua descoberta (Roberto e Ávila, 2013), e apenas recentemente sua fase larval teve descrição da morfologia interna e cranial (Candiotte *et al.*, 2017). Apesar de notáveis esforços para uma melhor compreensão de alguns aspectos de sua autoecologia, a história de vida de *Phyllodytes gyrinaethes* ainda possui muitas lacunas a serem preenchidas, principalmente no âmbito da ecologia comportamental, biologia reprodutiva, informações sobre caracterização de suas populações e limites de ocorrência.

O gênero *Phyllodytes* Wagler, 1830, atualmente, inclui 13 espécies distribuídas na Mata Atlântica brasileira, ocorrendo desde os estados do Espírito Santo e norte de Minas Gerais, estendendo-se até o estado da Paraíba (Bokermann, 1966; Orrico *et al.*, 2018). Enquanto os adultos de *Phyllodytes* são semelhantes aos de outras espécies congêneres, os girinos de *P. gyrinaethes* estão entre os mais morfologicamente distintos entre as espécies já conhecidas (Candiotte *et al.*, 2017). Dentre as muitas características incomuns, esses girinos são descritos com um corpo em forma de guitarra com um profundo entalhe que dá ao focinho uma forma semelhante a um “casco de vaca”, um disco oral com um lábio superior cortado e lábio inferior semicircular, e nadadeira caudal dorsal lobada, além do ventre modificado em forma de ventosa, tornando este girino muito intrigante, pois em mais de 100 anos de estudos sobre larvas de anuros, este é o primeiro girino com ventosa abdominal a ser descrito fora das famílias Bufonidae e Ranidae (Peixoto *et al.* 2003; Candiotte *et al.*, 2017).

Atualmente, a espécie *Phyllodytes gyrinaethes* se encontra beneficiada pelo Plano de Ação Nacional (PAN) para conservação da herpetofauna ameaçada da Mata Atlântica

nordestina brasileira (ICMBio 2018a), por apresentar-se na categoria Deficiente em Dados (DD) na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Freire e Peixoto, 2004); Em Perigo de Extinção (CR) na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas do Brasil (ICMbio 2018b); e considerada Criticamente Ameaçada (EN) na Lista de Espécies ameaçadas do Estado de Pernambuco (SEMAS, 2015). Portanto, estudos que visem suprir tais lacunas no conhecimento sobre a autoecologia da espécie se fazem necessários, além de compreender o segundo objetivo específico assumido pelo segundo ciclo do PAN com vigência até o ano de 2024: estimular redução da perda de indivíduos das espécies do PAN em suas áreas naturais, ampliando e compartilhando conhecimento e diminuindo conflitos entre humanos e animais (ICMBio, 2019); conhecimento este, que pode auxiliar na orientação de práticas em seu manejo e conservação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o comportamento vocal, ecologia comportamental e reprodutiva de *Phyllodytes gyrinaethes*.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever o repertório vocal da espécie e as propriedades acústicas de seus cantos;
- Avaliar se há variações intra e interindividuais no canto de anúncio de *Phyllodytes gyrinaethes*, e determinar se há reconhecimento individual por meio de suas características acústicas;
- Correlacionar os parâmetros acústicos do canto de anúncio com fatores bióticos (tamanho e peso) e abióticos (temperatura do ar e umidade relativa do ar).
- Descrever o repertório comportamental (construir um etograma) e o período de atividade reprodutiva da espécie;
- Caracterizar os sítios reprodutivos (sítio de canto e oviposição) e sua ocupação;

- Fornecer dados sobre aspectos reprodutivos da espécie.

3. Referências bibliográficas

- ANDERSSON, M. B.; SIMMONS, L. W. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 6.
- BOKERMANN, W.C.A. O gênero *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38, 335–344, 1966.
- CANDIOTE, V. F.; HASS, A.; ALTIG, R.; PEIXOTO, O. Cranial anatomy of the amazing bromeliad tadpoles of *Phyllodytesgyrinaethes* (Hylidae: Lophyohylini), with comments about other gastromyzophorous larvae. *Zoomorphology*, 136:61–73, 2017.
- CAYUELA, H.; LENGAGNE, T.; JOLY, P.; LENA J. P. 2016. Females trade off the uncertainty of breeding resource suitability with male quality during mate choice in an anuran. *Animal Behaviour* 123 (2017): 179-185.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB L. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York, 1986. 670p.
- FLEISCHNER, T.L.; NOSS, R.F. 2013. Natural history and conservation (interview recorded by Drummond, B. and Steele, S.J.). Natural histories Project. Disponível em: <<http://naturalhistoriesproject.org/conversations/natural-history-and-conservation>>. Acesso em: 22 nov. 2019.
- FREIRE, E. M. X.; PEIXOTO, O. L. 2004. *Phyrodites gyrinaethes*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55833A11377202. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55833A11377202.en>>. Acesso em: 22 jul. 2018.
- GERHARDT, H. C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42, 615–635.
- GERHARDT, H. C.; BEE, M. A. 2006. Recognition and localization of acoustic signals. In *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (ed. P. M. Narins,; A. S. Feng, R. R. Fay.; A. N. Popper), pp. 113-146. New York: Springer.

- GREENE, H. W.; LOSOS, J. B. 1988. Systematics, Natural History and Conservation: Field Biologists Must Fight a Public-Image Problem. *Bio Science* 38(7): 458-462.
- HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, v. 55, p. 207-217, 2005.
- HALLIDAY, T; TEJEDO, R. M. 1995. Intrasexual selection and alternative mating behaviour. pp. 419-468. In H. Hearn, and B. K. Sullivan (eds.), *Amphibian Biology*. Vol. 2. Social behaviour. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Australia.
- HILLIS, D.M. American molecular naturalist. *Ecology* .1995, 76(3): 1017-1018.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018. Plano de Ação Nacional para Conservação da Herpetofauna Nordestina - PAN Herpetofauna Nordestina. Portaria Nº 1.175, de 28 de dezembro de 2018.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2019. 2º ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada do Nordeste – PAN Herpetofauna do Nordeste. Portaria Nº 354, de 25 de julho de 2019.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018b. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 4162 p.
- KÖHLER, J.; JANSEN, M.; RODRÍGUEZ, A.; KOK, P. J. R.; TOLEDO, L. F.; EMMERICH, M.; GLAW, F.; HADDAD, C. F. B.; RÖDEL, M. O.; VENCES, M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251(1):001-124.
- ORRICO VGD, DIAS IR, MARCIANO-JR E. Another new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *4407* (1): 101–110.
- PEIXOTO OL, CARAMASCHI U, FREIRE EMX. 2003. Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the state of Alagoas, northeastern Brazil. *Herpetologica*, 59: 235–246.
- ROBERTO IJ, ÁVILA RW. 2013. The advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Peixoto, Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae). *Zootaxa*, 3669 (2): 193–196.

RICKLEFS, R.E. Ecology. Freeman and Company, New York. 1990.

SÁ, F. P.; ZINA, J.; HADDAD, C. F. B. 2016. Sophisticated Communication in the Brazilian Torrent Frog *Hylodes japi*. PLoS ONE 11(1): e0145444.

SEMAS (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade). 2015. Lista Estadual Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Anfíbios. Resolução SEMAS Nº 1 de 09/01/2015.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, New Jersey.

TOLEDO, L. F.; LLUSIA, D.; VIEIRA, C. A.; CORBOA, M.; MÁRQUEZ, R. 2015. Neither convergence nor divergence in the advertisement call of sympatric congeneric Neotropical treefrogs. Bioacoustics 24: 31-47.

TOLEDO, L. F.; MARTINS, I. A.; BRUSCHI, D. P.; PASSOS, M. A.; ALEXANDRE, C.; HADDAD, C. F. B. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. Acta Ethol. 18 (2): 87-99.

VITT, L. J. 2013. Walking the natural-history trail. Herpetologica, n. 69, v. 2, p. 105-117.

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

4- Artigo científico

4. 1 - Artigo científico I

Artigo científico SUBMETIDO a Revista **Bioacoustics**.

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma.

Vocal repertoire and an analysis of intra and inter-individual variations in the advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae), a threatened and endemic bromeligenous amphibian from eastern Brazil

Emerson Gonçalves Dias^{a*}, M. M. Júnior^b and E. M. Santos^c

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Serra Talhada, Pernambuco; ^b Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de biologia, Laboratório de Ecologia do Plâncton, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Recife, Pernambuco; ^c Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de biologia, Laboratório Interdisciplinar de Anfíbios e Répteis, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Recife, Pernambuco

*corresponding author: emersonherpeto@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3167-4596>

^bmmelojunior@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7963-1205>

^cednilzamartanhao@gmail.com; <https://orcid.org/000-0001-9214-1131>

Vocal repertoire and an analysis of intra and inter-individual variations in the advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae), a threatened and endemic bromeligenous amphibian from eastern Brazil

We investigated the vocal repertoire and intra and interindividual acoustic call variations and determined the vocal recognition of the *Phyllodytes gyrinaethes*, a bromeligenous hylid and threatened, and also determined the effect of abiotic and biotic factors on its call properties. It is important to note that scarce knowledge on *P. gyrinaethes*'s autoecology is available, and that this species is endemic to the Northeastern Atlantic Rainforest of Brazil. All vocalizations were recorded in the species natural habitat. A total of 109 good quality calls obtained from 10 individuals were analyzed. Statistics: Spearman's test to test for correlations between advertisement calls and abiotic and biotic factors. Significance was reached when $P \leq 0.05$. The coefficient of variation and inference of individual recognition followed the model proposed by Gerahd (1991). This study describes calls referring to a territorial context for the studied species for the first time. Divergence in some advertisement call parameters were observed in comparison to previously described calls for the species. Size, mass and temperature were associated to the acoustic properties of the assessed sounds. Intra- and inter-individual variation analyses revealed that physical sound properties vary between individuals, indicating that they *P. gyrinaethes* individuals recognize themselves through sound emission.

Keywords: frogs; bioacoustics; acoustics parameter; communication; Interactions

Introduction

The acoustic communication of anuran amphibians is associated to a repertoire composed of different calls, which may involve different types of behavioral contexts (Toledo et al. 2014; Toledo et al. 2015; Köhler et al. 2017). About 14 types of calls have been reported, classified into four categories: reproductive, aggressive, defensive (Toledo et al. 2015) and feeding (Köhler et al. 2017). Among the types of vocalizations, calls to attract partners (“advertisement calls”), belonging to the reproductive category, are the most common (Toledo et al. 2014), and can have two main functions: attracting partners and defending territories (Köhler et al., 2017).

Vocalization in anurans, performed by males in exhibitions to attract females, play an essential role in reproduction, being shaped by sexual selection through the choice of females (Bradbury and Vehrencamp, 2011). The acoustic signals used in exhibitions during the reproductive period are the result of evolutionary processes, contributing to reproductive isolation and speciation processes (Wells 1977; Halliday and Tejedo 1995).

Although sexual selection pressures can direct acoustic differences between amphibian populations and species (Wilkins et al. 2013), environmental factors, such as temperature and humidity, also display notable influences on the acoustic variations of the sounds emitted by these animals (Goutte et al. 2013; Vargas-Salinas and Amézquita 2013), as well as biotic factors, when, for example, smaller individuals with shorter vocal cords, produce higher frequency calls (Gingras et al. 2013). Therefore, it is possible that specimens within a population may exhibit intra and interindividual differences in advertisement call properties, which may indicate individual recognition, as well as possible singing strategies, social context and sexual selection (Gerhardt 1991, Gerhardt 1982; Ryan and Rand 1993; Castellano et al. 2002; Köhler et al. 2017).

Phyllodytes gyrinaethes Peixoto, Caramaschi and Freire, 2003 is an endemic Northeastern Brazil Atlantic Rainforest species, occurring only in the states of Alagoas and Pernambuco (Freire and Peixoto 2004), and exhibits its entire life cycle associated with the phytotelms of terrestrial and epiphytic bromeliacea species (Peixoto et al. 2003). Currently the species is benefited by the National Action Plan (PAN) for the Conservation of the Threatened Herpetofauna of the Brazilian Northeast Atlantic Rainforest (ICMBio 2018), classified as Data Deficient (DD) by the International Union for Conservation of Nature's (IUCN) red list (Freire and Peixoto 2004), and is listed as critically endangered (CR) in the red list of endangered species in Brazil (ICMBio 2018b) and as Endangered (EN) in the list of endangered species in the state of Pernambuco (Semas 2015).

Regarding the acoustic communication exhibited by *P. gyrinaethes*, only its advertisement call has been described, about ten years after the species description, through the calls of two specimens from the Pedra D'Antas Private Natural Heritage Reserve, located in the municipality of Jaqueira (8°42'15.5" S, 35°51'06.2" W), in the state of Pernambuco (Roberto and Ávila 2013). Information about the species' vocal repertoire, or any intra- and inter-individual variation assessments, are lacking.

In this context, the aim of the present study is to expand the knowledge on acoustic communication in *Phyllodytes gyrinaethes* in order to (1) describe its vocal repertoire and physical structures; (2) correlate the influence of biotic (size and mass) and abiotic (temperature and relative humidity) factors on advertisement call variations; (3) verify intra and interindividual variations in sampled calls from a population inhabiting an Atlantic Rainforest fragment located in northeastern Brazil; and (4) determine individual recognition for the species.

Material and methods

Study area

Data collection took place at the Matas de Siriji Wildlife Refuge (RVSMS), a comprehensive Conservation Unit located in the municipality of São Vicente Férrer (35°30'00 "W, 07°35'00" S). The RVSMS belongs to the Atlantic Rainforest domain, integrating the second largest continuous Atlantic Rainforest block north of the São Francisco River, the Serra do Mascarenhas. The forest comprises about 630 ha (6.3 km²), with altitudes ranging between 300 to more than 600m, located in a small portion of the northeastern Northern Hinterlands, bordering the North Forest (Semas 2014). The local climate is Tropical Rainy, classified as hot and humid with drought periods between September and January/February and rains between February and August/September (Beltrão et al. 2005).

Two areas containing more accessible bromeliads for animal observation and capture were chosen for sampling (A1 and A2), although we did not rule out the possibility of occasional encounters with *Phyllodytes gyrinaethes* individuals in other areas during the data collection period. A1 is characterized by bromeliads more associated to rocky outcrops inside the forest, in a more conserved region (25 M 02247750/9157986, 638 m elev.), and A2 is characterized by being located closer to the edge of the forest, comprising both terrestrial and epiphytic bromeliads, without any rock outcrops (25 M 0223655/9157874, 637 m elev.).

Data collection

The license for collecting biological species information studied was approved by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO: 66121-1) and the state management agency. Data were collected monthly for six consecutive days between 4:00 pm and 10:00 pm, comprising the twilight and nighttime periods, between October 2018 and

September 2019, sampling the dry and rainy periods for one year. Abiotic data (ambient temperature, relative humidity) were obtained using a digital hygrometer.

The animals were located through an active search (visual and auditory) with the aid of flashlights at night, using ropes to access epiphytic bromeliads when they were occupied by *Phyllodytes gyrinaethes* individuals, when necessary.

Acoustically active *Phyllodytes gyrinaethes* individuals were recorded with the aid of a Tascam DR-40 digital recorder coupled to a unidirectional YOGA HT-81 microphone, at a sampling rate of 44.1 kHz, 16 bits), maintaining a standard distance of 0.50 m from the calling individual. The behavioral observations combined with the context of the vocalizations during the vocal repertoire investigations followed the *ad libitum* method, in which the individuals were observed during an for 30 uninterrupted minutes after the sound recordings, taking into account all behavioral occurrences (Delclaro 2004).

The individuals were then captured for biometric data collection (snout-vent length - SVL and body mass), using a digital caliper (0.1 mm) and digital scale (0.1 g). All animals were individualized with subcutaneously applied colored elastomer polymers, considered non-toxic (Freitas et al. 2013), creating unique marks on the inner thigh. All sampled animals were released at their respective capture locations.

Data analysis

A total of 109 calls from 10 individuals were analyzed. The Raven Pro 1.5 program was used to analyze the acoustic data (settings: DFT = 256, type = Hann; brightness and contrast = 50, default values) (Cornell Lab of Ornithology, USA). The physical characteristics of each analyzed call comprised call duration, (in seconds = s), rate of calls per minute, number of notes per call, rate of notes per second (notes/s), duration of the note (s), interval

between notes (s), number of pulses per note, initial frequency (Hz), final frequency (Hz), dominant frequency (Hz) and mean amplitude.

The Kruskal-Wallis test (KW) was used to test differences in the acoustic parameters of the vocal repertoire between the types of calls, classified by context. In case of significant difference, the Dunn test in pairs was used. Spearman's correlation (r_s) was used to test the correlation between advertisement calls and biotic (SVL, body mass) and abiotic (temperature and relative humidity) factors.

The significant differences between each individual call and between the calls of the studied population were calculated using intra-individual (CVi) and inter-individual (CVe) variation coefficients. The analyzed parameters followed the classification suggested by Gerhardt (1991), where CVi values <5 were considered static and >12 , dynamic. For CVe, parameters <10 were considered static and >20 , dynamic. To determine the variability of male calls (Márquez and Eekout, 2006), the rates between the inter-individual and intra-individual variation coefficients were also calculated, where parameters with $CVe / CVi \Rightarrow 1$ can function as an indicator of individual recognition for the species (Bee et al. 2001). In addition, the Kruskal-Wallis analysis (Zar 1999) was used to test the significance of variations in the acoustic parameters of the advertisement calls to determine the degree of inter-individual recognition. Statistical analyses were performed according to Zar (1999), at a significance level of $p < 0.05$, using Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007).

Results

Vocalization context and sound properties

Phyllodytes gyrinaethes males emitted sounds in two categories; “Reproductive” (advertisement context) and “aggressive” (territorial context). When issuing advertisement calls within *Aechmea costantinii* (Mez) LBSm. bromeliad phytotelmos, *Phyllodytes*

gyrinaethes males maintained their heads up and their front legs slightly arched forward on the water surface displaying inflated vocal sacs with their trunks and hind legs submerged in water (Figure 1). During the same night, individuals occupied up to two different call sites, but always in the same bromeliad.

During the emission of territorial calls, belonging to the aggressive vocalization category, the males vocalized with an immobile body and head and limbs slightly arched forward. Calls emitted in this context were always observed at the beginning of the vocalization shift (twilight period, approximately 17:30h), with male arrival and occupation of the reproductive site, or when males visited and/or occupied other phytotelmos during the night.

The advertisement calls exhibited a mean duration of 1.572 s (SD = 0.155), composed of about 3-5 multipulsed notes (mean = 4.19; SD = 0.437), with a mean duration of 0.064 seconds (s) (SD = 0.010) and inter-note intervals ranging from 0.292 to 0.501 s (mean = 0.413; SD = 0.052). The number of pulses per note ranged from 50 to 153 (mean = 86,175; SD = 18,757). The advertisement call displayed a mean dominant frequency of 2428.0 Hz (SD = 206.9) and amplitude of 7914.3 (DP = 3727.1) (Figure 2; Table 1). Territorial calls were characterized by being shorter (mean = 1.368 s; SD = 0.273), with four multipulsed notes. Territorial calls were longer duration compared to advertisement calls (mean = 0.114 s; SD = 0.004), and with shorter intervals, ranging between 0.240 to 0.363 s (mean = 0.302; SD = 0.087). Concerning number of pulses, a mean of 45.875 (SD = 10.625) was observed per note. The dominant territorial call frequency was slightly lower than the advertisement call frequency (mean = 2153.3; SD = 730.9), but with a higher frequency range (mean = 8131.5; SD = 4230.6) (Figure 2; Table 1).

Statistical analysis of the physical vocal repertoire parameters

In addition to spectral differences between advertisement and territorial calls (Figure 2), statistically significant differences were observed for the following parameters: interval between calls ($H = 6.4286$, $P = 0.0112$; Dunn : $P < 0.05$), repetition call rate per minute ($H = 5.9417$, $P = 0.0148$; Dunn: $P < 0.05$), note duration, in seconds ($H = 6.4286$, $P = 0.0112$; Dunn: $P < 0.05$), interval between notes ($H = 4.1443$, $P = 0.0425$; Dunn: $P < 0.05$) and number of pulses per note ($H = 6.4286$, $P = 0.0112$; Dunn: $P < 0.05$). No other parameters reached the significance level accepted for this study ($P > 0.05$).

Influence of biotic (SVL and mass) and abiotic (temperature and relative humidity) factors on Phyllodytes gyrinaethes advertisement calls

Phyllodytes gyrinaethes male size (SVL) was correlated to a positive association to number of notes per song ($n = 10$, $r_s = 0.8211$, $P = 0.0036$; Table 2) and a negative correlation regarding interval between notes ($n = 10$, $r_s = -0.6970$; $P = 0.0250$; Table 2). The same occurred for body mass, with a positive correlation observed with number of notes per call ($n = 10$, $r_s = 0.8449$, $P = 0.0021$; Table 2), and negative correlation to interval between notes ($n = 10$, $r_s = -0.6964$; $P = 0.0252$; Table 2). Temperature was negatively correlated to the number of pulses per call notes ($n = 10$, $r_s = -0.772$; $P = 0.0089$; Table 2). Relative air humidity (RAH) was not correlated to any of the analyzed calls.

P. gyrinaethes vocal activity was observed from January to August and in November and December. No calls were recorded September and October. Few animals ($n < 5$) were acoustically active in the studied areas in November and December, vocalizing only in epiphytic bromeliads located more than 20 meters from the ground, in the forest canopy. Peak vocal activity occurred between February and May, with two new individuals vocalizing each month.

Intra and interindividual advertisement call variations and interindividual recognition determinations

According to the intra and inter-individual variation coefficients, only four parameters were static: interval between calls (2,236%) and rate of notes per second (4,940%), intra-individually (<5%); and call duration (9,869%) and dominant frequency (8,523%), interindividually (<10%). Dynamic parameters comprised interval between the calls per second (16,934%), intra-individually (> 12%); and interval between calls per second (97,275%), rate of calls per minute (23.5%), number of pulses per note (21,766%), minimum frequency (21,345%) and frequency amplitude (47,093%), interindividually (> 20 %). The other assessed parameters were considered intermediate (Table 3).

Regarding individual recognition, CV_e/CV_i values were > 1 , suggesting a high degree of recognition for all evaluated parameters. The most noteworthy parameters for individual recognition were interval between calls and the interval between notes, of 5.744% and 5.613%, respectively (Table 3).

Still concerning individual advertisement call variations, the Kruskal Wallis' analysis indicated significant values concerning variations of all recorded temporal and spectral parameters ($P < 0.01$). Rate of notes per second ($H = 33,620$; $P < 0.0001$), minimum frequency ($H = 35,792$; $P < 0.0001$) and frequency amplitude ($H = 35,002$; $P < 0.0001$) were the most significant, indicating that these parameters can be considered the main evidence for interindividual *P. gyrinaethes* recognition through acoustic signals (Table 3).

Discussion

Acoustic behavior and physical sound structure

Among the calls evaluated herein, those belonging to a territorial defense context, which had not yet been described, were evaluated as another type of call belonging to the

species repertoire. Regarding advertisement calls, the values described herein were consistent with three parameters reported by Roberto and Ávila (2013), namely call duration (1.7 ± 0.3), interval between calls (52.4 ± 25.7), and interval between notes (0.4 ± 0.03). However, our results also indicated mean variations exceeding the standard deviation limits for three other parameters, specifically note duration (0.04 ± 0.01), which was higher than described by Roberto and Ávila (2013), and number of notes (4.9 ± 0.6) and dominant frequency (2746.7 ± 158.2), which were lower.

It is important to note that Roberto and Ávila (2013) described *Phyllodytes gyrinaethes* advertisement calls from the vocalizations of only two specimens. Therefore, the high rate of variation observed between the acoustic parameters of the assessed populations requires further investigation, including analyses from other populations, aiding in understanding whether the species advertisement calls, considered pre-zygotic in character and extremely important for sexual selection, varies to the point where small existing populations become acoustically isolated (Koller, et al., 2017).

Currently, among only ten other species belonging to the *Phyllodytes* genus besides *P. gyrinaethes* have has their advertisement calls described, as follows: *P. edelmoi* Peixoto, Caramaschi and Freire, 2003 (Lima et al. 2008); *P. luteolus* (Wied-Neuwied 1824) (Weygoldt 1981); *P. melanomystax* Caramaschi, Silva and Britto-Pereira, 1992 (Nunes et al. 2007); *P. kautskyi* Peixoto e Cruz, 1988 (Simon and Peres 2012); *P. tuberculosus* Bokermann, 1966 (Juncá et al. 2012); *P. acuminatus* Bokermann, 1966 (Campos et al. 2014); *P. amadoi* Vörös, Dias, e Solé, 2017 (Vörös et al. 2017); *P. megatympanum* Marciano, Lantyer-Silva e Solé, 2017 (Marciano-Jr. et al. 2017); *P. wuchereri* (Peters, 1873) (Cruz et al. 2014); and *P. praeceptor* Orrico, Dias and Marciano-Jr, 2018 (Orrico et al. 2018).

P. gyrinaethes's advertisement call, exhibiting structurally multipulsed notes, is easily distinguished from *P. acuminatus*, *P. kautskyi*, *P. megatympanum* and *P. melanomystax* calls,

which are characterized by no pulses within their notes (Campos et al. 2014; Nunes et al. 2007; Simon and Peres 2012; Marciano-Jr. et al. 2017). *Phyllodytes amadoi*, *P. luteolus*, *P. edelmoi*, *P. tuberculosus*, *P. wuchereri* and *P. praeceptor* calls, on the other hand, are more similar to *P. gyrinaethes* calls, due to the presence of multipulsed notes (Weygoldt 1981; Lima et al. 2008; Juncá et al. 2012; Roberto and Ávila 2013; Cruz et al. 2014; Magalhães et al. 2015; Vörös et al. 2017; Orrico et al. 2018).

Among *Phyllodytes* species presenting multipulsed notes, *P. gyrinaethes* exhibits that the shortest call duration ($1,572 \pm 0.155$) and number of notes per call ($4,195 \pm 0.437$), but the highest number of pulses per note ($86,175 \pm 18,757$) and the highest interval between notes (0.413 ± 0.052) (see:Weygoldt 1981; Lima et al. 2008; Juncá et al. 2012; Cruz et al. 2014; Magalhães et al. 2015; Vörös et al. 2017; Orrico et al. 2018). Regarding note duration, *P. gyrinaethes* and *P. amadoi* (Vörös et al. 2017) exhibit the lowest notes (0.064 ± 0.010 and 0.043 ± 0.021 , respectively). All species display similar intervals between calls (approximately 50 s) (Weygoldt 1981; Lima et al. 2008; Juncá et al. 2012; Magalhães et al. 2015; Vörös et al. 2017; Orrico et al. 2018), except for *P. wuchereri* (0.4 ± 0.03) (Cruz et al. 2014). The dominant frequency of *P. gyrinaeyhes* calls (2428.0 ± 206.9) was more similar to *P. tuberculosus* ($2,570 \pm 0.490$) (Juncá et al. 2012), lower than those reported for *P. edemioi*, *P. amadoi* and *P. praeceptor* (Lima et al. 2008; Vörös et al. 2017; Orrico et al. 2018); and higher than for *P. luteolus* and *P. wuchereri* (Weygoldt 1981; Cruz et al. 2014).

Regarding the vocal repertoire of the *Phyllodytes* genus, besides *P. gyrinaethes*, only *P. wuchereri* exhibits another type of call in addition to advertisement calls (Cruz et al. 2014), which differs both structurally and concerning social context. *P. wuchereri* was the only *Phyllodytes* species reported as exhibiting a reproductive call to date (Cruz et al. 2014), and the present study describes a territorial defense call for *P. gyrinaethes* for first time for this genus. We postulate that the basic function of this territorial call is to serve as a warning to

potentially invasive males that the breeding site is already occupied (Wells 1977), reducing physical fighting in territorial disputes between sexually mature males (Hermans et al. 2002, Nali and Prado 2014) and, thus, decreasing energy expenditure (Robertson 1986).

Influence of biotic and abiotic factors on *Phyllodytes gyrinaethes* advertisement calls

In our analysis, temperature was the only abiotic factor correlated to an acoustic parameter, in this case, negatively correlating with the number of pulses per note. It is important to note that environmental temperature regulates the vocal activity period for many amphibians (Wells 2007; Steelman and Dorcas 2010), as well as some acoustic signal characteristics (Köhler et al., 2017). In the latter, effects are more related to resources directly linked to muscle contractions, such as call duration, call rate and number of pulses (as in the case of *P. gyrinaethes*), while tending to be more subtle or non-existent with regard to spectral traits (Gerhardt 1994; Pröhl et al. 2007; Ziegler et al. 2015).

Biotic factors such as SVL and mass are rarely associated to temporal call variations (Köhler et al., 2017), but rather, strongly correlated with spectral characteristics (Rodríguez et al. 2015; Gerhardt and Huber 2002 ; Gingras et al. 2013). However, in accordance to similar results reported for the anuran *Xenophrys boettgeri* (Wei et al. 2019), instead of a spectral correlation between SVL and/or mass, these parameters were correlated to temporal call parameters, positive concerning number of notes, and negative in relation to interval between notes. Body size and mass influence temporal call characteristics have also been reported for song rate (Toledo and Haddad 2009), number of pulses and note duration (Bee et al. 2013).

The greatest vocal activities sampled between April and May, as well as the non-recording of acoustic activities in September and October, may be related to the rainy and dry period, where the rainiest period in the study area occurs between February and August, and water deficiency is noted between September and January (Beltrão et al. 2005).

Intra and interindividual advertisement call variations and interindividual recognition determination

In general, morphological differences between anurans can be coded in call characteristics, indicating individual identity (Gerhardt 1991). In addition, intraspecific variations of many anurans can be influenced by individual motivation, due to intrinsic and/or extrinsic factors, mainly influencing dynamic parameters and causing the emission of different types of calls (Schwartz 1986; Reichert 2013; Toledo et al. 2015).

Given the morphological and energetic restrictions in signal production, competing females and males can interpret calls from a potential partner or opponent as a “reliable” signal, informing on the sender's size, condition, motivation and, therefore, its strength and quality (Davies and Halliday 1978; Wells 2007).

In the present study, the inter-individual variation coefficients of the recorded advertisement calls exhibited greater variations (most parameters were considered dynamic = $CV_e > 20\%$) in relation to the intra-individual coefficients (most parameters were categorized as intermediate $> 5 < 12\%$ or static $< 5\%$), in addition to the $CV_e / CV_i > 1\%$ for all parameters. This suggests that acoustic parameter variability between individuals can be used for individual discrimination, similar to findings for other anuran species (Pröhl 2003; Gasser et al. 2009; Gambale et al. 2014; Arini et al. 2016; Guerra et al. 2017).

Assuming that advertisement calls contains co-specific identification properties sufficient to determine individuality (Bee et al. 2001; Pettitt et al. 2013; Gambale et al. 2014; Arini et al. 2016), the most noteworthy acoustic properties as individual recognition indicators $> 1\%$ in the present study were intervals between calls (5.744%) and between notes (5.613%). An analysis of variance between the acoustic advertisement calls parameters indicated that the properties that varied the most were rate of notes per second ($H = 33,620$; P

<0.0001), minimum frequency ($H = 35,792$; $P < 0.0001$) and frequency amplitude ($H = 35.002$; $P < 0.0001$). Therefore, these parameters are capable of providing important clues concerning interindividual *Phyllodytes gyrinaethes* recognition.

It is worth noting that, despite efforts to highlight the importance of intra and inter-individual variations in anuran calls, further studies are still required in order to understand the main acoustic aspects involved in ecological processes and in acoustic communication, as well as in their relationship with the environment. In this sense, meeting the proposed objectives of this study, we present herein the first comprehensive results on acoustic communication, intra and interindividual variation and individual recognition capacity inference, as well as the influence of some abiotic and biotic factors, in *P. gyrinaethes* sound emissions in a natural environment. The physical analysis of the recorded sounds indicate that communication in the assessed species is characterized by two different types of calls. It is also important to highlight that vocalization plasticity in *P. gyrinaeyhes* can occur, given the circumstances in which the sounds are emitted, according to local biotic and abiotic factors. Therefore, this study provides an important contribution concerning knowledge on select *Phyllodytes gyrinaethes* autoecology aspects, a scarcely studied species that faces notable extinction risk threats (Freire and Peixoto 2004; Semas 2015; ICMBio 2018a; ICMbio 2018b).

Acknowledgments

The authors would like to thank CAPES for support in the form of a postgraduate scholarship and IBAMA for the collection license granted for obtaining biological information for the studied species, approved by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO: 66121-1). We would also like to thank the State Environment Agency (CPRH), for the permission granted for study and collection of the evaluated species at the Matas de Siriji

Wildlife Refuge, and Mr. Gilson and his family, who plays the role concerning knowledge and defense of the area.

Declaration of ethics

we state for due purposes that this study follows the institutional and national ethical guidelines for scientific research in a natural environment in Brazil, where the research project was submitted and approved by the State Environment Agency (CPRH), by the permission granted for study and collection of the evaluated species at Siriji Wildlife Refuge, Pernambuco, Brazil. The collection license granted to obtain biological information for the species studied was also granted by CPRH and ICMBio(Chico Mendes institute of biodiversity), and the IBAMA, approved by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO: 66121-1).

References

- Arini K, Noer MI, Wulandari A, Amalia R, Auliandina T. 2016. Temporal and spectral variation in advertisement call of males *Microhyla achatina* (Tschudi, 1838) are sufficient for individual discrimination. AIP Conf Proc 1744:020032.
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AS. 2007. Bioestat 5.0 - Statistical applications in the areas of biomedical sciences. ONG Mamiraua, Belém, PA. 364p.
- Bee MA, Kozich CE, Blackwell KJ, Gerhardt HC. 2001. Individual variation in advertisement calls of territorial male green frogs, *Rana clamitans*: Implications for individual discrimination. Ethol. 107: 65-84.
- Bee MA, Suyesh R, Biju SD. 2013. Vocal behavior of the Ponmudi Bush Frog (*Raorchestes graminirupes*): repertoire and individual variation. Herpetologica, 69: 22–35.

Beltrão BA, Mascarenhas JC, Miranda JLF, Junior LCS, Galvão MJTG, Pereira SN. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco. Recife: CPRM/PRODEEM, 2005.

Bradubury WJ, Vehrencamp LS. 2011. Principles of animal communication. (4th ed.). Massachusetts: Cornell University.

Campos TF, Lima MG, Nascimento FACD, Santos EM. 2014. Larval morphology and advertisement call of *Phyllodytes acuminatus* Bokermann, 1966 (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. *Zootaxa* 3779(1): 93.

Castellano S, Cuatto B, Rosalba R, Rosso A, Giacoma C. 2002. The advertisement call of the European treefrogs (*Hyla arborea*): a multilevel study of variation. *Ethology* 108: 75–89.

Cruz D, Marciano-Jr E, Napoli MF. 2014. Advertisement and courtship calls of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Anura: Hylidae). *Zootaxa*, 3774: 97–100.

Davies NB, Halliday TR. 1978. Deep croaks and fighting assessment in toads, *Bufo bufo*. *Nature*, 274, 683–685.

Del-Claro K. 2004. Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental. Edit. Livraria Conceito, Jundiaí. 132 p.

Freire EMX, Peixoto OL. 2004. *Phyllodytes gyrinaethes*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Available from: <http://www.iucnredlist.org/> (Accessed 25 October 2019).

Freitas PRS, Mesquita DO, França FGR. 2013. Uso do implante visível de elastômero fluorescente (IVE) para marcação de lagartos *Phyllorhynchus pollicaris* (Squamata: Phyllodactylidae). *Biotemas* 26 (4): 271-276.

Gambale PG, Signorelli L, Bastos RP. 2014. Individual variation in the advertisement calls of a Neotropical treefrog (*Scinax constrictus*). *Amphibia-Reptilia* 35:271–281.

- Gasser H, Amézquita A, Hödl W. 2009. Who is calling? Intraspecific call variation in the Aromobatid frog *Allobates femoralis*. *Ethology* 115: 596–607.
- Gerhardt HC. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour* 42: 615–635.
- Gerhardt HC. 1982. Sound pattern recognition in some North American treefrogs (Anura: Hylidae): implications for mate choice. *American Zoologist* 22: 581–595.
- Gerhardt HC. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 25, 293– 324.
- Gingras B, Boeckle M, Herbst CT, Fitch WT. 2013. Call acoustics reflect body size across four clades of anurans. *Journal of Zoology*, 289:143–150.
- Gerhardt HC, Huber F. 2002). *Acoustic Communication in Insects and Frogs: Common Problems and Diverse Solutions*. University of Chicago Press, Chicago, 542 pp.
- Gingras B, Boeckle M, Herbst CT, Fitch WT. 2013. Call acoustics reflect body size across four clades of anurans. *J Zool* 289:143–150.
- Goutte S, Dubois A, Legendre F. 2013. The importance of ambient sound level to characterise anuran habitat. *PloS One*, 8: e78020.
- Guerra V, de Moraes AR, Gambale PG, Oda FH, Bastos RP. 2017. Variation of the advertisement call of *Physalaemus centralis* Bokermann, 1962 (Anura: Leptodactylidae) in the Cerrado of Central Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ* 52(2):103–111.
- Halliday T, Tejedo RM. 1995. Intrasexual selection and alternative mating behaviour. pp. 419-468. In H. Heatwole, and B. K. Sullivan (eds.), *Amphibian Biology*. Vol. 2. Social behaviour. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, Australia.
- Hermans K, Pinxten R, Eens M. 2002. Territorial and vocal behavior in a captive dart-poison frog, *Epipedobates tricolor* Boulenger, 1899 (Anura: Dendrobatidae). *Belg. J. Zool.* 132: 105-109.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018a. Plano de Ação Nacional para Conservação da Herpetofauna Nordestina - PAN Herpetofauna Nordestina. Portaria Nº 1.175, de 28 de dezembro de 2018.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018b. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 4162 p.

Junca FA, Napoli MF, Cedraz J, Nunes I. 2012. Acoustic characteristics of the advertisement and territorial calls of *Phyllodytes tuberculosus* Bokermann, 1966 (Amphibia: Anura: Hylidae). Zootaxa 3506: 87–88.

Köhler J, Jansen M, Rodríguez A, Kok, PJR, Toledo LF, Emmrich M, Glaw F, Haddad CFB, Rödel MO, Vences M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. Zootaxa 4251(1):001-124.

Lima MG, Lingnau R, Skuk GO. 2008. The advertisement call of *Phyllodytes edelmoi* (Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology*, Brazilian Society of Herpetology 3(2):118-121.

Marciano-Jr E, Lantyer-Silva ASF, Solé M. 2017. A new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil. Zootaxa, 4238: 135–142.

Nali RC, Prado CPA. 2014. The fight call of *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura: Hylidae): first record for the genus. Salamandra 50: 181-184.

Nunes I, Santiago RS, Juncá, F.A. 2007. Advertisement calls of four hylid frogs from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology* 2 (2):89–96.

Orrico VGD, Dias IR, Marciano-Jr E. Another new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil. 4407 (1): 101–110.

Peixoto OL, Caramaschi U, Freire EMX. 2003. Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the state of Alagoas, northeastern Brazil. *Herpetologica*, 59: 235–246.

- Pröhl H, Hagemann S, Karsh J, Höbel G. 2007. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). *Ethology* 113:1669–1679.
- Pröhl H. 2003. Variation in male calling behaviour and relation to male mating success in the strawberry poison frog (*Dendrobates pumilio*). *Ethology* 109:273–290.
- Reichert MS. 2013. Sources of variability in advertisement and aggressive calling in competitive interactions in the grey treefrog, *Hyla versicolor*. *Bioacoustics* 22:195–214.
- Robertson JGM. 1986. Male territoriality, fighting and assessment of fighting ability in the Australian frog *Uperoleia rugosa*. *Anim. Behav.* 34: 763–772.
- Roberto IJ, Ávila RW. 2013. The advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Peixoto, Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae). *Zootaxa*, 3669 (2): 193–196.
- Rodríguez RL, Araya-Salas, M, Gray DA, Reichert MS, Symes LB, Wilkins MR, Safran, RJ, Höbel G. 2015. How acoustic signals scale with individual body size: common trends across diverse taxa. *Behavioral Ecology* 26: 168–177.
- Ryan MJ, Rand S. (1993) Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647–657.
- Schwartz JJ. 1986. Male calling behavior and female choice in the Neotropical treefrog *Hyla microcephala*. *Ethology* 73: 116–127.
- Semas (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade). 2015. Lista Estadual Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Anfíbios. Resolução SEMAS Nº 1 de 09/01/2015.
- Semas (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade). 2014. Proposta para criação de Unidades de Conservação na Mata de Siriji, em São Vicente Ferrer – PE . Available from: http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/Proposta_UC_-Mata_de_Siriji_PE.pdf. (Accessed 17 June 2019).

- Simon JE, Peres J. 2012. Revisão da distribuição geográfica de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto & Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão. Nova Série 29:17–30.
- Pettitt BA, Bourne GR, Bee MA. 2013. Advertisement call variation in the golden rocket frog (*Anomaloglossus beebei*): evidence for individual distinctiveness. *Ethology* 119:244–256.
- Steelman CK, Dorcas ME. 2010. Anuran calling survey optimization: developing and testing predictive models of anuran calling activity. *Journal of Herpetology* 44: 61–68.
- Toledo LF, Llusia D, Vieira CA, Corboa M, Márquez R. 2015. Neither convergence nor divergence in the advertisement call of sympatric congeneric Neotropical treefrogs. *Bioacoustics* 24: 31–47.
- Toledo LF, Haddad CFB. 2009. Defensive vocalizations of Neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology* 4: 25–42.
- Toledo LF, Martins IA, Bruschi DP, Passos MA, Alexandre C, Haddad CFB. 2014. The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethol.* 18 (2): 87–99.
- Vargas-Salinas F, Amézquita A. 2013. Stream noise, hybridization, and uncoupled evolution of call traits in two lineages of poison frogs: *Oophaga histrionica* and *Oophaga lehmanni*. *PLoS ONE*, 8: e77545.
- Vörös J, Dias IR, Solé M. 2017. A new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 4337 (4): 584–594.
- Weil L, Zhou C, Shao W, Lei H, Lin Z. 2019. Individual variation in advertisement calls of the pale-shouldered horned toad (*Xenophrys boettgeri*). *Acta ethol.* 23:2019.
- Wells KD. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666–693.
- Wells KD. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.

Weygoldt P. 1981. Beobachtungen zur Fortpflanzungsbiologie von *Phyllodytes luteolus* (Wied, 1824) im Terrarium (Amphibia: Salientia: Hylidae). *Salamandra* 17:1–11.

Wilkins MR, Seddon N, Safran RJ. 2013. Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 156–166.

Zar JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River.

Ziegler L, Arim M, Bozinovic F. 2015. Intraspecific scaling in frog calls: the interplay of temperature, body size and metabolic condition. *Oecologia* 181: 673–681.

Table 1: Physical characteristics of vocalizations emitted by *P. gyrinaethes* in different contexts (advertisement and territorial). SD = standard deviation, min = minimum value, max = maximum value, s = second; Hz = Hertz. Matas de Siriji Wildlife Refuge, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, between October 2018 and September 2019, (Number of individuals = 10).

Physical characteristics	<u>Context</u>							
	Advertisement				Territorial			
	Mean	SD	(min - max)		Mean	SD	(min - max)	
Call duration (s)	1.572	0.155	1.143 -	1.797	1.368	0.273	1.175 -	1.561
Call interval (s)	53.350	51.897	20.203 -	197.888	291.790	132.172	198.330 -	385.250
Call rate per minute	1.860	0.437	1 -	3	1	0	1 -	1
Notes per call	4.195	0.437	3 -	5	4	0	4 -	4
Note duration (s)	0.064	0.010	0.037 -	0.106	0.114	0.004	0.112 -	0.117
Interval between notes (s)	0.413	0.052	0.292 -	0.501	0.302	0.087	0.240 -	0.363
Note rate per second	2.675	0.472	2 -	3	3	0	3 -	3
Number of pulses per note	86.175	18.757	50 -	153	45.875	10.625	24 -	79
Minimum Frequency (Hz)	1358.6	290.0	1033.6 -	1808.8	1593.5	426.3	1292 -	1894.9
Maximum Frequency (Hz)	3104.2	586.4	2670.1 -	4349.7	2670.1	487.2	2325.6 -	3014.6
Dominant frequency (Hz)	2428.0	206.9	1205.9 -	2842.4	2153.3	730.9	1636.5 -	2670.1
Frequency amplitude	7914.3	3727.1	3487 -	17389	8131.5	4230.6	5140 -	11123

Table 2: Correlation between acoustic parameters of *P. gyrinaethes* advertisement calls and biotic * and abiotic factors **. * SVL (snout-vent length) and body mass. ** Temperature and RAH (relative air humidity). Statistics: Spearman's correlation (r_s); significance value: $P \leq 0.05$ in bold and underlined. Matas de Siriji Wildlife Refuge, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, between October 2018 and September 2019, (Number of individuals = 10).

Call properties	SVL		Mass		Temperature		RAH	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
Call duration (s)	0.4303	0.2144	0.396	0.2572	-0.1885	0.6021	0.503	0.1383
Call interval (s)	-0.1515	0.6761	-0.0273	0.9403	-0.3647	0.3	0.2	0.5796
Call rate per minute	0.4233	0.2228	0.3808	0.2776	-0.1746	0.6294	0.0615	0.8661
Notes per call	0.8211	<u>0.0036</u>	0.8449	<u>0.0021</u>	0.0778	0.8308	0.5366	0.1097
Note duration (s)	0.3576	0.3103	0.594	0.0701	-0.3343	0.345	0.503	0.1383
Interval between notes (s)	-0.6970	<u>0.0250</u>	-0.6964	<u>0.0252</u>	-0.5714	0.0843	-0.0182	0.9602
Note rate per second	0.4716	0.1687	0.3868	0.2695	0.5948	0.0696	-0.4647	0.176
Number of pulses per note	0.1758	0.6272	0.3277	0.3552	-0.772	<u>0.0089</u>	0.4424	0.2003
Minimum Frequency (Hz)	0.2364	0.5109	0.157	0.6648	-0.152	0.6751	0.2727	0.4458
Maximum Frequency (Hz)	0.0909	0.8028	0.2595	0.4691	-0.079	0.8282	0.4788	0.1614
Dominant frequency (Hz)	-0.2249	0.5321	-0.0993	0.7849	-0.5457	0.1026	0.1094	0.7635

Frequency amplitude	-0.2121	0.5563	-0.0205	0.9552	-0.0061	0.9867	0.4949	0.1496
---------------------	---------	--------	---------	--------	---------	--------	--------	--------

Table 3: Intraindividual and interindividual coefficients of variation of *Phyllodytes gyrinaethes* advertisement calls in an Atlantic Rainforest fragment, Northeastern Brazil. SD = standard deviation;) min = minimum value, max = maximum value; CVi = intra-individual variation coefficient; CVe = inter-individual variation coefficient; s = second; Hz = Hertz. Matas de Siriji Wildlife Refuge, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, between October 2018 and September 2019, (Number of individuals = 10; number of corners = 109).

Acoustic parameters								Kruskal Wallis	
	Mean	DSDP	(min-max)		Cvi (%)	Cve (%)	CVe/Cvi (%)	H	P
Call duration (s)	1.572	0.155	1.143	1.797	7.771	9.869	1.270	22.835	0.007
Call interval (s)	53.350	51.897	20.203	197.888	16.934	97.275	5.744	19.647	0.006
Call rate per minute	1.860	0.437	1	3	9.901	23.500	2.374	22.933	0.002
Notes per call	4.195	0.437	3	5	5.421	10.428	1.924	26.792	0.002
Note duration (s)	0.064	0.010	0.037	0.106	6.452	14.795	2.293	25.927	0.002
Interval between notes (s)	0.413	0.052	0.292	0.501	2.236	12.550	5.613	30.466	0.004
Note rate per second	2.675	0.472	2	3	4.940	17.650	3.573	33.620	< 0.0001
Number of pulses per note	86.175	18.757	50	153	10.924	21.766	1.992	27.328	0.001
Minimum Frequency (Hz)	1358.6	290.0	1033.6	1808.8	5.243	21.345	4.071	28.572	0.001
Maximum Frequency (Hz)	3104.2	586.4	2670.1	4349.7	5.102	18.890	3.702	35.792	< 0.0001
Dominant frequency (Hz)	2428.0	206.9	1205.9	2842.4	8.425	8.523	1.012	24.748	0.003
Frequency amplitude	7914.3	3727.1	3487	17389	11.577	47.093	4.068	35.002	< 0.0001



Figure 1

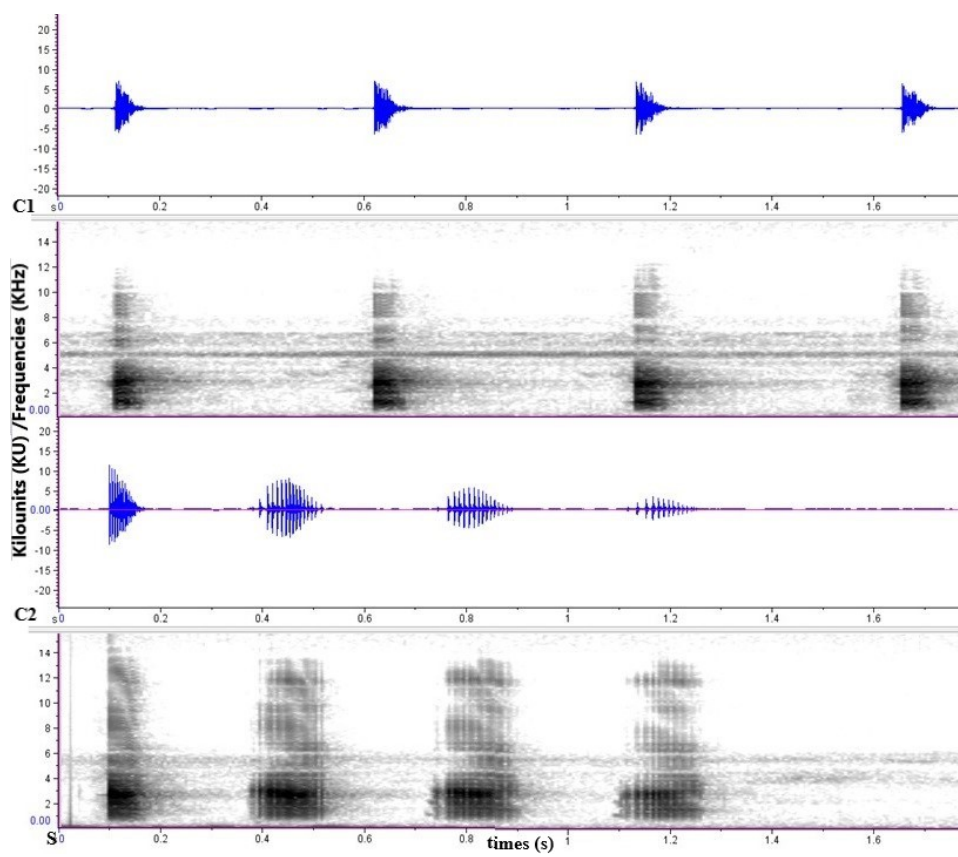


Figure 2

Caption for Figure 1: Male *Phyllodytes gyrinaethes* at a call site, an *Aechmea costantinii* bromeliad phytotelma, at the Matas de Siriji Wildlife Refuge, northeastern Brazil, in May 2019.

Caption for Figure 2: Oscillogram and spectrogram of *Phyllodytes gyrinaethes* vocalizations in advertising (C1) and territorial defense (C2) contexts. Matas de Siriji Wildlife Refuge, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, between October 2018 and September 2019, (Number of individuals = 10; Number of calls = 109).

4. 2 - Artigo científico II

Artigo científico a ser encaminhado a Revista **Herpetological Conservation and Biology**.

Todas as normas de redação e citação, doravante, atendem as estabelecidas pela referida revista, exceto o idioma.

ECOLOGIA COMPORTAMENTAL E REPRODUTIVA DE *Phyllodytes gyrinaethes* (Anura, Hylidae), UMA ESPÉCIE BROMELÍGENA ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE DO BRASIL

Emerson G. Dias^{1*}, Mauro M. Júnior² and Ednilza M. Santos³

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Serra Talhada, Pernambuco

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de biologia, Laboratório de Ecologia do Plâncton, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Recife, Pernambuco

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de biologia, Laboratório Interdisciplinar de Anfíbios e Répteis, Rua Manoel de Medeiros, s/n, Recife, Pernambuco

*corresponding author: emersonherpeto@gmail.com

Resumo.— *Phyllodytes gyrinaethes*, ocorrendo apenas em fragmentos de Floresta Atlântica entre Alagoas e Pernambuco, está em perigo de extinção no Brasil e é considerado criticamente ameaçado de extinção em Pernambuco. Apesar de valiosas contribuições a respeito de conhecimentos sobre a espécie, muitas são as lacunas ainda existentes sobre sua autoecologia e limites de ocorrência. Diante disso, este trabalho objetiva conhecer alguns de seus aspectos autoecológicos, como ecologia comportamental e reprodutiva, além de caracterizar a população estudada. O estudo ocorreu no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, um fragmento de Floresta Atlântica localizado no município de São Vicente Férrer, Pernambuco. A coleta de dados se deu mensalmente, de outubro de 2018 a setembro de 2019, seis dias consecutivos, através de buscas ativas. As bromélias ocupadas por *P. gyrinaethes* foram identificadas, bem como caracterizados os sítios de ocupação, e os animais ali encontrados. Na obtenção de dados comportamentais, foi utilizado o método amostral *ad libitum* e *animal focal*. Na investigação sobre ecologia reprodutiva, além da caracterização do sítio reprodutivo, foram registrados indícios de atividade reprodutiva, como por exemplo, atividade acústica e presença de fases larvais em estágios iniciais, correlacionando-os com temperatura do ambiente, pluviosidade e umidade relativa do ar. Este trabalho amplia a distribuição de *Phyllodytes gyrinaethes* dentro do estado de Pernambuco, para mais 127.35 km sudoeste, sendo esta, atualmente a terceira população conhecida para a Mata Atlântica nordestina. *P. gyrinaethes* foi registrado ocupando apenas bromeliácea *Aechmea costantinii* (Mez) LBSm, utilizando seus fitotelmos como sítios reprodutivos, abrigo diurno e sítio de alimentação. Foram amostrados cerca de 76 indivíduos adultos ocupando bromeliáceas epífitas e terrestres, dos quais, 16 foram capturados (CRC= 25.06 mm, DP= 7.13 mm; Massa= 1.2 g, DP= 0.3 g), marcados e monitorados, por ocupar bromélias mais acessíveis. Ainda

foram amostrados oito imagos, seis juvenis completamente metamorfoseados e 19 cardumes de girinos, composto por aproximadamente sete a 19 larvas. Machos foram observados efetuando comportamentos de interação com sua prole, sugerindo cuidado parental, atendendo suas larvas em estágios de desenvolvimento iniciais (21-24). O repertório comportamental exibido por *Phyllodytes gyrinaethes* contou com 20 atos comportamentais distribuídos em seis categorias: Deslocamento (36.19%), Reprodução (27.35%); Defesa (26.01); Territorialidade (4.29%); Assistência a prole (5.90%); e Alimentação (0,27%).

Diante disso, vale ressaltar que o presente estudo dispõe de informações inéditas a respeito da ecologia comportamental e reprodutiva da espécie estudada em ambiente natural, a qual se encontra ameaçada de extinção. Portanto, as informações aqui elencadas sobre sua ecologia podem vir a se tornar uma ferramenta valiosa na criação de planos de manejo futuros envolvendo a espécie, visto que se trata de uma espécie beneficiada pelo Plano de Ação Nacional para conservação da herpetofauna nordestina. Vale ressaltar, que pela primeira vez foi realizado a construção de um etograma para uma espécie de *Phyllodytes*. Entretanto, faz-se necessário mais investigações sobre os atos comportamentais exibidos pelo grupo, para avaliar se existe algum padrão comportamental entre *Phyllodytes gyrinaethes* e seus congêneres.

Key Words.— Etograma; Cuidado parental; Reprodução.

Short Title.— Ecologia comportamental e reprodutiva de *P. gyrinaethes*.

INTRODUÇÃO

No campo da Ecologia Comportamental, construção de etogramas ou repertórios comportamentais, são considerados importantes ferramentas para uma melhor compreensão da biologia, ecologia e comportamento de um animal, seja ele cativo ou de vida livre (Alcok, 1977; Del-Claro, 2004). Esse tipo de investigação acaba contribuindo bastante sobre o conhecimento da história natural de uma espécie, auxiliando na busca de padrões comportamentais (Martin e Bateson 1993; Lehner 1996). Em relação aos anfíbios anuros, as descrições comportamentais por meio de etogramas são consideradas incipientes, dificultando o entendimento da frequência e importância dos atos comportamentais (Santos et al. 2012). Mas vale salientar, que é através desse tipo de estudo que se revela a plasticidade comportamental, bem como a diversidade de atos comportamentais em anuros, muitas vezes com registros inéditos de sistemas de acasalamento, cuidado parental e/ou displays comportamentais poucos investigados.

Para anuros a sua maior dinâmica de atividade comportamental ocorre na época reprodutiva, esse é o momento da formação dos agregados, e para boa parte das espécies, escolha de sítios de canto interessantes para propagação do som e interceptação de fêmeas (Wells, 2007). Cada espécie possui estratégias que irão garantir o sucesso reprodutivo e a perpetuação dos seus descendentes, onde a escolha de parceiros por fêmeas pode exercer forte pressões seletivas sobre machos (Anderson e Simmons, 2006), direcionando importantes mudanças nas características exibidas por estes (Gerhardt, 1991). Fêmeas podem ser particularmente seletivas de forma a otimizar os benefícios resultantes dessa escolha para sua prole: benefícios diretos resultantes de atributos fenotípicos masculinos e/ou cuidados paternos; ou benefícios indiretos relacionados à contribuição genotípica de um macho (Andersson, 1994).

Além dos sinais acústicos, que são primordiais no processo de atração feminina entre anfíbios anuros (Köhler et al., 2017), outras características exibidas pelos machos, como por exemplo, tamanho corporal e coloração, bem como do seu território, como qualidade do sítio reprodutivo, também são alvos da escolha de fêmeas, escolhendo machos por meio de sinais visuais em exibições (Starnberger, et al.,

2014; Sá et al., 2016) e inspeção dos sítios reprodutivos (Martins, 1993; Santos e Amorim, 2005; Cayuela et al., 2017).

Vale ressaltar, que para anfíbios anuros, suas estratégias ou táticas reprodutivas é quem vão definir seu padrão temporal e comportamental de reprodução (Wells, 1977), culminando no seu modo reprodutivo, que pode ser caracterizado por uma combinação de diversas características como tipo de sítio de desova, desenvolvimento larval e, quando presente, tipo de cuidado parental (Duellman e Trueb, 1994). Atualmente existem cerca de 39 modos reprodutivos ao redor do Mundo, sendo 31 deles encontrados nos anuros neotropicais e 28 no Brasil (Haddad e Prado, 2005), onde os anuros exibem uma diversidade de modos reprodutivos maior que qualquer outro grupo de vertebrados tetrápodes (Haddad e Prado, 2005). Nesse conjunto de modos reprodutivos, encontra-se o tipo seis, com ovos e girinos exotróficos depositados em fitotermos de covas de árvores ou plantas aéreas, compreendendo as espécies de *Phyllodytes* (Haddad e Prado, 2005).

Phyllodytes gyrinaethes Peixoto, Caramaschi e Freire, 2003 é uma espécie endêmica da Mata Atlântica do Nordeste do Brasil que tem registro nos municípios de Murici (Fazenda Bananeiras - localidade-tipo), em Alagoas, e em Jaqueiras (Usina Colônia), Pernambuco (Freire e Peixoto, 2004). Atualmente a espécie se encontra beneficiada pelo Plano de Ação Nacional (PAN) para Conservação da Herpetofauna Ameaçada da Mata Atlântica nordestina brasileira (ICMBio, 2018a), apresentando-se na categoria de Deficiência de Dados (DD) na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Freire e Peixoto 2004); e está criticamente ameaçada de extinção (CR) na lista vermelha de espécies ameaçadas do Brasil (ICMbio, 2018b), considerada Em Perigo (EN) na lista de espécies ameaçadas do Estado de Pernambuco (Semas, 2015). Apesar de notáveis esforços para uma melhor compreensão de alguns aspectos de sua autoecologia, a história de vida de *Phyllodytes gyrinaethes* ainda

possui muitas lacunas a serem preenchidas, principalmente no âmbito da ecologia comportamental, biologia reprodutiva, informações sobre caracterização de suas populações e limites de ocorrência.

Diante disso, levando em consideração que até o momento nenhum repertório comportamental ou investigação mais aprofundada sobre ecologia reprodutiva de *Phyllodytes gyrinaethes* foi realizado, este trabalho teve como objetivo fornecer informações a respeito de sua ecologia comportamental e reprodutiva, descrevendo seu etograma, assim como a caracterização de sua população em um fragmento de Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo.— A coleta de dados ocorreu no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji (RVSMS), uma Unidade de Conservação integral localizada no município de São Vicente Férrer (35°30'00" W, 07°35'00" S) (fig. 1). Pertencente ao domínio da Mata Atlântica, o RVSMS conta com cerca de 630 ha (6,3km²) possuindo altitudes que podem variar entre 300 a mais de 600m, estando localizada numa pequena porção do nordeste do Agreste Setentrional, limítrofe com a Mata Norte (Semas 2014). Na região, o clima é do tipo Tropical Chuvoso, e enquadra-se como quente e úmido com períodos de seca entre setembro e janeiro/fevereiro e de chuvas entre fevereiro e agosto/setembro (Beltrão et al. 2005).

Na RVSMS, foram selecionadas duas áreas (A1 e A2) contendo bromélias acessíveis à observação e captura dos animais (fig. 1), porém não descartamos a possibilidade do encontro ocasional de *Phyllodytes gyrinaethes* em outras áreas durante o período de coleta. A1 caracterizou-se por se localizar mais próximo da borda da mata, com bromélias terrestres e epífitas, sem colônias em afloramentos rochosos (35°30'20.6 W, 07°36'41.2" S); e A2 caracterizou-se por haver bromélias mais associadas a afloramento rochoso adentrando um pouco mais na porção interior da mata, em uma região mais conservada (35°30'21.2" W, 07°36'40.9" S).

Caracterização do ambiente bromelígena.— Bromélias pertencentes a espécie *Aechmea costantinii* foi ocupada por *Phyllodytes gyrinaethes*. Estas foram mensuradas quanto à sua altura e largura total, distância do solo e tiveram seu fitotelmos caracterizados quanto ao seu diâmetro, profundidade e presença de matéria orgânica. *A. costantinii* contou com fitotelmos distribuídos tanto na sua região mais superior, quanto na região mais basal próximo à base bromélia, que poderia estar disposta em unidade (uma única bromélia) ou formando colônias (mais de uma bromélia agrupada). Os fitotelmos foram classificados em ordem decrescente (de cima para baixo) a começar pelo fitotelmos localizado centralmente no topo da bromélia: fitotelmos central localizado no centro da bromélia (A); primeiro lance de fitotelmos abaixo do central (B); segundo lance de fitotelmos abaixo do central (C); e assim sucessivamente até chegar na região mais basal, próximos da base da bromélia ou colônia.

Coleta de dados.— Os dados foram coletados mensalmente durante seis dias consecutivos entre outubro de 2018 e setembro de 2019, amostrando o período seco (setembro a janeiro) e chuvoso (fevereiro a agosto) durante um ano. Os animais foram localizados através da busca ativa (visual e auditiva) com ajuda de lanternas no período noturno, se fazendo de uso de cordas para acessar as bromélias épifitas em locais altos ocupadas por *Phyllodytes gyrinaethes*, quando necessário. A busca compreendeu o turno diurno e noturno, concentrando as coletas de informações no período entre 16:00 e 22:00h, correspondente ao período crepuscular e noturno. Dados abióticos como temperatura e umidade relativa do ar foram mensurados sempre que um indivíduo era registrado. Caso não houvesse registro de animais, foi mensurado apenas dados abióticos do início e fim das buscas. Informações quanto a pluviosidade foi obtida através de dados cedidos pela estação meteorológica mais próxima, disponibilizados no Climate.data-Org.

Os animais quando localizados, para cada um foi registrado a distância entre o indivíduo mais próximo, assim como o tipo de substrato ocupado, nesse caso, a identificação das bromélias ocupadas; e assim, efetuada a caracterização do sítio de ocupação, sítios de canto e ovipostura. Durante essa etapa de campo, a população estudada também foi caracterizada quanto ao número de indivíduos amostrados; adultos, girinos, imagos e jovens; além de registrar se havia atividade acústica ou sinais reprodutivos, como por exemplo, presença de fêmeas ovadas, desova ou larvas em estágio inicial. A determinação do estágio larval das larvas seguiu a classificação de Gosner (1960).

Quando possível, os indivíduos jovens e adultos foram capturados para aferição de dados biométricos (comprimento rostro-cloacal – CRC, e massa corporal), utilizando-se de paquímetro digital (0,1mm) e balança digital (0,1g). Todos os animais capturados foram individualizados com marcação de polímeros de elastômero coloridos, considerados atóxicos, aplicado subcutaneamente (Freitas et al. 2013), criando marcas únicas na face interna da coxa. Todos os animais amostrados foram soltos nos seus respectivos locais de captura.

Para avaliar a influência da temperatura e umidade relativa do ar sobre a atividade acústica dos animais, nas áreas A1 e A2 foram traçados um transecto em linha reta de 250 m (fig. 1), afim de registrar o número de animais acusticamente ativos por meio de busca auditiva levando em consideração tais dados abióticos. Durante a realização dos transectos sempre no início da noite, por volta das 18:30, momento de início e maior atividade acústica, foram contabilizados todos os animais audíveis lateralmente e à cima do observador, assim como a temperatura e umidade relativa do ar durante a realização do senso. O trajeto foi realizado uma noite em cada área todos os meses durante o período de coleta.

Na etapa de investigação comportamental para construção de um etograma, o método amostral empregado foi o *ad libitum*, no qual os indivíduos quando acessíveis a observações, foram monitorados por um período de 30 minutos ininterruptos, levando em consideração toda ocorrência comportamental (Delclaro 2004). Todos os registros comportamentais foram tabelados em planilhas, fotografados e

filmados sempre que possível, e em seguida separados em categorias comportamentais elencadas e descritas pelo observador.

Análise de dados.— Foi utilizado estatística descritiva para melhor representar a maioria dos resultados obtidos. Porém para análise da influência de fatores abióticos (temperatura e umidade relativa do ambiente) sobre o número de machos de *P. gyrinaethes* em atividade acústica registrados nos transectos da A1 e A2, foi utilizado o teste de Regressão Linear Simples, tanto para temperatura, quanto para umidade relativa do ar.

RESULTADOS

População amostrada e Sítios de ocupação.— Este trabalho registrou e monitorou uma população de *Phyllodytes gyrinaethes* para o estado de Pernambuco, totalizando atualmente, três populações conhecidas para Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Além da população da localidade tipo em Murici, Alagoas, e a de Jaqueira, Pernambuco, aqui apresentamos a população pertencente ao Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji localizado no município de São Vicente Férrer, ampliando a distribuição no estado em 127.35 km sudoeste.

Nas áreas estudadas, foram registrados cerca de 76 indivíduos adultos ocupando bromeliáceas epífitas e terrestres, dos quais, 16 foram capturados (CRC= 25.06 mm, DP= 7.13 mm; Massa= 1.2 g, DP= 0.3 g), marcados e monitorados, por ocupar bromélias mais acessíveis. Já os demais animais adultos, foram amostrados apenas por registro sonoro, se apresentando acusticamente ativos em bromeliáceas de difícil acesso ou em grandes altitudes, dificultando a captura e marcação. Vale ressaltar, que ainda foram amostrados oito imagos, seis juvenis completamente metamorfoseados e 19 cardumes de girinos, composto por aproximadamente sete a 19 larvas (fig. 2), avistados em diferentes estágios larvais (Tabela 1).

As larvas de *P. gyrinaethes* mostrou-se está em atividade predominantemente no período noturno, ocupando ativamente a região mais externa do fitotelmos a partir do período crepuscular/noturno, por volta das 17/18h, momento em que o macho também iniciava sua atividade acústica. Durante o dia, as larvas raramente foram avistadas por se manterem abrigadas no fundo do corpo d'água, alojando-se dentro de frestas na base da folha da bromélia. Apenas os girinos de estágios iniciais (21-27) formaram agregados em cardumes. Esse tipo de comportamento não foi observado nos demais estágios, onde nos estágios superiores, as larvas passaram a adotar uma natação mais livre sem se agrupar. Bromélias superiores a 80 cm de altura x 90 cm de largura, possuíram fitotelmos com capacidade de comportar mais água (Diâmetro= 65.78 DP= 21. mm), e tiveram maior incidência de cardume em relação a bromélias menores com capacidade menor de comportar água (Diâmetro= 42.63 mm DP= 15.87 mm (Tabela 1).

No Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, *Phyllodytes gyrianethes* ocupou exclusivamente Bromeliáceas da espécie *Aechmea costantinii* (fig. 5a), mesmo com outras espécies de bromeliáceas compartilhando o mesmo ambiente, bromélias estas, pertencente ao gênero *Canistrum* e *Bilbergia*. *P. gyrinaethes* ocupou fitotelmus de *A. costantinii*, utilizando-as como abrigo diurno, sítio de canto, oviposição e alimentação. A altura das bromélias ocupadas variou entre zero e mais de 20 metros do solo, com uma predominância de ocupação em bromélias altas (fig. 3).

Os indivíduos adultos foram sempre encontrados em axilas fitotelmadas; seja em acúmulos de água na porção mais superior da bromélia, geralmente usados como sítio reprodutivo em contextos voltados à reprodução, e algumas vezes também como sítios de alimentação; ou em fitotelmos mais próximo da base da bromélia, usado como abrigo diurno antes de iniciar seu período de atividade, que geralmente se iniciou no crepúsculo da tarde/noite, aproximadamente por volta das 17:30h. Salvo uma exceção, *P. gyrinaethes* só ocupou axilas sem acúmulo de água durante sua alimentação. Nesse caso a axila era preenchida por folhas secas (matéria orgânica vegetal), o qual servia de abrigo para vários tipos de artrópodes, onde *P.*

gyrinaethes foi observado se alimentando unicamente de ortópteras (fig. 6c), em ambos tipos de axilas, seja ela fitotelmada ou não.

Em relação ao fitotelmos usado como abrigo, este mostrou-se ser diferente daquele usado como sítio reprodutivo não só espacialmente, mas também em sua caracterização. Os sítios reprodutivos além de mais espaçosos (Diâmetro= 47.38 mm DP=12.28 mm; Profundidade=52.11 mm DP=15.25 mm), indicando comportar uma maior capacidade de água em comparação ao abrigo diurno, que foi mais estreito e mais raso (Diâmetro= 32.11 mm DP= 9.74 mm; Profundidade= 39.25 mm DP= 13.56 mm), o abrigo diurno tinha uma grande incidência folhas secas, ideal para se proteger durante o período de descanso e/ou durante o dia.

Contextos envolvidos na reprodução.— O Período de atividade acústica de *P. gyrinaethes*, o qual ocupou fitotelmos de *A. costantinii* como sítio de canto, ocorreu de janeiro a agosto, e nos meses de novembro e dezembro. Não houve registro de vocalização em setembro e outubro no local do estudo. Nos meses de novembro e dezembro poucos animais se apresentaram acusticamente ativos, vocalizando apenas em bromélias epífitas a mais de 20 metros do solo, no dossel da floresta. Os picos de atividade vocal ocorreram entre fevereiro e julho, meses com maiores precipitações (Média= 131.83 mm³, DP= 39.06 mm³) (Fig. 4c). A distância mínima entre os machos acusticamente ativos ocupando sítios reprodutivos foi de 15,8 metros (DP: 6,53 m).

Na investigação da influência da temperatura e umidade relativa do ambiente sobre a atividade vocal de *P. gyrinaethes*, a busca auditiva realizada nos transectos sugeriu que a incidência de machos acusticamente ativos ocupando sítios reprodutivos esteja relacionada a tais fatores abióticos. Diante disso, o teste de Regressão linear simples indicou que a umidade relativa do ar está associada positivamente com o número de machos em atividade acústica ($F_{1,22}= 44.57$, $P<0,01$); e a temperatura, relacionada negativamente ($F_{1,22}= 35.64$, $P<0,01$) (fig. 4a, b).

Em relação a distribuição espacial dos animais acusticamente ativos nas bromeliáceas *A. costantinii*, estes ocuparam preferencialmente os fitotelmos central das bromélias. Porém se tratando de bromélias superiores a 80 cm de largura x 90 cm de altura, além de ocupar o fitotelmus central (A), ocuparam também axilas fitotelmadas abaixo do central como sítios de canto alternativos (B e C). Em relação a postura corporal associada a emissão do canto de anúncio, importante para atração de fêmeas reprodutivamente maduras e defesa de território (Koller, et al., 2017), o animal vocalizou dentro da lâmina d'água com a cabeça arqueada, suspendendo seu corpo com as patas dianteiras apoiadas na folha da bromélia (fig. 5b).

Em situações onde o sítio de canto poderia transitar entre o fitotelmos central (A) e adjacentes (B e C), o sítio de oviposição desses animais foi o mesmo fitotelmos usado para vocalizar. Já em relação a bromeliáceas menores que 80 cm de largura x 90 cm de altura, seu sítio de canto foi apenas o fitotelmos central (A), e seu sítio de oviposição revelou-se diferente. Nessas bromélias sua prole foi depositada no fitotelmos abaixo do central (B ou C). Isso possivelmente ocorreu pelo fato do fitotelmos central das bromélias menores possuírem pouco espaço por conta da floração de *A. costantinii*, que aconteceu justamente no período chuvoso, coincidindo com período reprodutivo de *P. gyrinaethes*, onde a estrutura germinativa da bromélia brotou do fitotelmos central, reduzindo o espaço que normalmente comportaria um amplexo e prole de *P. gyrinaethes* (Fig, 5d).

Sobre a territorialidade de *P. gyrinaethes*, os animais se mostraram bastante fies a bromélia ao qual ocupou, onde os machos acusticamente ativos que foram marcados e monitorados, mesmo submetidos a manipulação todos os meses para conferir a identidade da marcação, permaneceram na mesma bromélia até o final da coleta, ou migraram para outra a poucos metros da anterior. Reforçando essa afirmativa, houve um episódio durante a coleta de dados, em que o indivíduo saltou em um precipício com profundidade de mais de dez metros no momento em que foi devolvido a bromélia após a marcação, e na noite seguinte, estava ocupando exatamente o mesmo sítio de canto ao qual havia sido capturado antes de

saltar para fora da bromélia. Essa fidelidade pode estar relacionada a defesa de um bom sítio reprodutivo, com recursos importantes para atração de fêmeas reprodutivamente madura e que beneficie sua prole.

Interação macho x prole.— Ao total, foram registrados 19 cardumes de larvas de *Phyllodytes gyrinaethes* entre os meses de janeiro e junho, em diferentes estágios larvais (tabela 1). Dos quatro machos (5, 6, 7 e 11) que foram avistados com girinos, três deles (macho 5, 6 e 11) apresentaram comportamentos que sugerem algum tipo de assistência a prole (Tabela 1).

Phyllodytes gyrinaethes além de exibir comportamentos associados a defesa do território por meio de sinais acústicos e inspeção dos sítios reprodutivos (Tabela 2, códigos 2 e 3), que indiretamente ofereceu proteção a sua prole alocada no fitotelmos defendido, observou-se que quando as larvas estavam em estágios iniciais, aproximadamente entre os estágios 21 e 24, o macho exibiu comportamentos que indicaram uma assistência direta ao seu cardume de girinos, lhe conferindo proteção (Tabela 2, código 10 e 11). O comportamento consistiu primeiramente na frequência do macho junto as larvas, bem como no posicionamento do macho com o corpo sobre ou adjacente ao agregado de girinos (fig. 6), que por sua vez demonstrou estar em atividade apenas durante a noite, formando cardume de larvas que se mantinham fixados na parede submersa do fitotelmos por meio de suas ventosas. Durante a realização desse comportamento de interação com a prole, os machos mantiveram contato físico direto com os girinos, pois sua região ventral permanecia total ou parcialmente sobre suas larvas (fig. 6).

Vale ressaltar, que durante a realização do comportamento de assistência, os machos não cessavam sua atividade acústica, mantendo a postura de emissão de canto com o ventre sobre o cardume de girinos, que se mantinham praticamente imóvel sob ou próximo do macho.

Etograma Comportamental.—Ao total, 16 espécimes foram monitorados e tiveram o registro comportamental amostrado até o final da coleta de dados (setembro/2019). Cada indivíduo foi amostrado

uma vez por mês desde a sua primeira captura e marcação que se deu durante o período de atividade acústica, até deixarem de ser observado na bromélia ao qual estava sendo monitorado.

O repertório comportamental exibido por *Phyllodytes girinaethes* na área estudada contou com 20 atos comportamentais distribuídos em seis categorias (Tabela 2; Fig. 7). Avaliando a frequência dos atos comportamentais separadamente, o ato de emitir o canto de anúncio (código 1) realizado unicamente por machos, pertencente a categoria Reprodução, foi o mais exibido durante o estudo (27,35%). Já ao avaliar as categorias comportamentais que mais se destacaram em relação a ecologia comportamental de *Phyllodytes girinaethes*, se sobressaiu Deslocamento (36.19%), seguido das categorias Reprodução (27.35%); Defesa (26.01); Territorialidade (4.29%); Assistência a prole (5.90%); e Alimentação (0,27%).

DISCUSSÃO

População amostrada e Sítios de ocupação.—O fato de se ter registrado *Phyllodytes gyrinaethes* em todas as fases de vida: larval, juvenil e adulta em um fragmento de Floresta Atlântica ao qual não se tinha informação nem mesmo sobre sua ocorrência, é um resultado um tanto promissor, principalmente se tratando de uma espécie ameaçada de extinção e que pouco se conhece. Os resultados aqui obtidos, sugerem que os animais estão tendo sucesso reprodutivo na área estudada, e assim, assegurando que novos indivíduos sejam disponibilizados para a população durante seu período reprodutivo.

Vale ressaltar que na ocupação do sítio reprodutivo, para uma melhor interação benéfica entre progenitores e prole, suas qualidades, tal como disponibilidade de recursos, risco de predação e competição, são considerações importantes no momento de sua escolha (Stearns, 1989; Resetarits e Wilbur, 1989; Jones, 2001; Buxton et al., 2017). Onde para o sucesso do acasalamento, indivíduos machos precisam escolher bem os locais que sejam atrativos a uma companheira reprodutivamente madura, principalmente quando namoro e reprodução ocorrem no mesmo lugar (Lantyer-Silva, et al. 2018).

Levando isso em consideração, e o fato de que no ambiente amostrado do Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji existiam outras espécies de bromeliácea fitotelmada diferente de *A. costantinii*, e

mesmo assim *P. girinaethes* não foi observado ocupando nenhuma outra espécie vegetal, podemos deduzir que a escolha do sítio reprodutivo pela perereca não é um evento aleatório. Possivelmente a bromélia pertencente a espécie *Aechmea costantinii* possua algum recurso chave importante para o sucesso reprodutivo da espécie. Um outro ponto interessante a ser observado, é o fato do uso e ocupação elaborada da bromélia por *P. girinaethes*, o qual chegou a ocupar quatro tipos de sítios diferentes: sítio de canto, oviposição, alimentação e abrigo diurno.

Apesar de notoriamente machos de *P. girinaethes* ocuparem bromeliáceas de vários tamanhos, dispostas solitariamente ou em colônias, nota-se que bromélias de maiores portes com fitotelmos de maior diâmetro e profundidade, conseqüentemente com maior capacidade de aporte de água, são as que tiveram um maior número de cardumes de girinos (tabela 1), e portanto se apresentando mais atrativas reprodutivamente. Um resultado semelhante a este foi um padrão de ocupação encontrado em *Aparasphenodon arapapa* (Lantyer-Silva, et al. 2018), onde a perereca bromelígena ocupou preferencialmente bromélias que tinham uma maior capacidade de acúmulo de água, recurso imprescindível para reprodução dessas espécies adaptadas para viver nesses corpos d'água efêmeros.

Outro fato interessante em *P. girinaethes*, foi o de ocuparem preferencialmente bromélias dispostas nos estratos mais altos da mata, entre cinco e mais de 20 metros de altura do solo. Essa preferência por altitudes possivelmente ocorra pelo fato de bromeliáceas mais próximas do dossel captarem mais facilmente água da chuva em seus tanques, do que aquelas mais próximas do solo, visto que a copa das árvores funciona como uma barreira que dilui o impacto das chuvas no solo. Esse possivelmente seja um dos motivos pelo qual apenas machos foram observados ocupando bromeliáceas no dossel da mata, tenham ficado acusticamente ativos nos meses mais secos de poucas chuvas. Essa preferência na ocupação de bromélias em grandes altitudes também reforça a exigência ambiental dessa espécie que se encontra

ameaçada de extinção, apontando uma associação com uma floresta mais madura que tenha um porte arbóreo relativamente grande.

Contextos envolvidos na reprodução.— No presente estudo, verificamos que *P. girinaethes* não apresentou atividade vocal em todo o período de estudo, demonstrando um intervalo de inatividade acústica em dois meses do período mais seco. Levando em consideração que as atividades reprodutivas em anuros são intensamente influenciadas pelos fatores abióticos (Blair, 1960; Taylor et al., 2005; Volkmer et al., 2017), não foi diferente com *P. gyrinaethes*. A atividade acústica da espécie mostrou-se ter uma relação estreita com a umidade relativa do ar, visto a correlação positiva com alto número de machos vocalizando nos períodos mais úmidos, assim como uma influência negativa com o aumento da temperatura (fig. 4). Entretanto, apenas estas variáveis ambientais não são capazes de explicar o período e permanência de atividade acústica para a espécie. Outras variáveis ambientais e até mesmo interações interespecíficas podem ser mais explicativas para atividade vocal desta perereca.

Com a ausência de atividade vocal nos meses de setembro e outubro, e pela diminuição da mesma nos meses da estação seca, é perceptível que existe um pico de atividade de vocalização nos meses da estação chuvosa. Tal resultado pode ser explicado pelo fato desses animais serem bromelígenas, portanto com as chuvas, as bromélias fitotelmadadas ficam com os fitotelmos cheios, oferecendo uma maior disponibilidade de ambientes propícios para sua reprodução, além de diminuir a temperatura do ambiente, caracterizando o padrão de reprodução de *P. girinaethes* como contínua com variação sazonal.

Outro indício da influência da variação sazonal na atividade reprodutiva de *P. gyrinaethes* foi a presença de larvas apenas no período de abundância hídrica, entre janeiro (início do período precipitações no RVSMS) e junho (finalizando o período de chuvas no RVSMS).

Acreditamos que *P. girinaethes* apresente uma reprodução contínua (que se estende por aproximadamente dez meses) devido à ausência de vocalizações nos meses de setembro e outubro, pertencente ao período mais seco. E sobre o comportamento altamente territorial exibido pela espécie.

Duellman e Trueb (1994) propõem que em anuros que exibem esse padrão de reprodução prolongada, esse tipo de comportamento territorial parece ser comum na defesa de seu sítio reprodutivo, onde o período chuvoso quando mais longo, favorece a permanência dessa estratégia por mais tempo visto que esses animais vão ter a manutenção da água no fitotelmo um período maior.

Interação macho x prole.— O cuidado parental nos anfíbios anuros durante a assistência aos seus ovos e girinos tem sido relacionada com a proteção contra predadores e patógenos, oxigenação, hidratação, e a redução das anomalias do desenvolvimento (McDiarmid 1978, Taigen et al 1984, Crump 1995, Wells 2007), conferindo assim uma maior probabilidade de sobrevivência a prole. Sendo assim, vale ressaltar que anuros habitantes de fitotelmos podem apresentar uma série de estratégias comportamentais que lhes permitam sobreviver nestes ambientes, como oofagia e cuidado parental (Schiesari et al. 2003, Lehtinen et al. 2004, Brown et al. 2008 a,b).

Semelhante aos displays comportamentais efetuado por *Phyllodytes gyrinaethes* que sugere uma assistência dispensada a sua prole, onde o macho se mantém junto aos girinos posicionando seu corpo sobre ou adjacente ao cardume, conferindo-lhe proteção (Tabela 2; códigos 10 e 11), existem também outras três espécies de anfíbios bromelígenas que são endêmicos da Floresta Atlântica; *Aparasphenodon arapapa* (Lantyer-Silva et al. 2014), *Frostius pernambucensis* (Dias et al. 2016) e *Dendrophryniscus brevipollicatus* (Malagoli et al., 2017), onde os machos realizam cuidado parental dispensados tanto aos ovos quanto aos girinos, apresentando atos comportamentais semelhantes ao realizado por *Phyllodytes gyrinaethes*.

Quanto ao período da permanência do cuidador junto a prole durante a assistência, *P. gyrinaethes* se assemelha bastante com o cuidado realizado por *Frostius pernambucensis*, realizando cuidado parental apenas enquanto sua prole está em estágios larvais iniciais (21 a 24), cessando o cuidado à medida que as larvas vão se desenvolvendo.

De acordo com Crump (1995), na maioria dos anfíbios, qualquer sexo poderia cuidar de seus filhotes igualmente bem. Sendo assim, espera-se que esse cuidado parental evolua em espécies e em ambientes onde os custos para o genitor são mínimos (Shine, 1988; Clutton-Brock, 1991), assegurando que os benefícios existam. Sendo assim, Vale ressaltar que durante o cuidado parental de *P. girinaethes*, o macho não cessa sua atividade reprodutiva, portanto, seu cuidado dispensado à prole acaba se somando aos comportamentos rotineiros de defesa de território e sítio reprodutivo. Espécies onde os machos já gastam uma grande quantidade de tempo defendendo uma pequena área, cuidar da prole pode não representar muito de uma alteração às suas atividades diárias normais (Trivers, 1972; Williams, 1975).

Por fim, vale lembrar que este trabalho traz dados inéditos sobre a história de vida ou autoecologia, a respeito de cuidado parental no gênero *Phyllodytes*. Entretanto, faz-se necessário mais investigações sobre estes eventos, bem como para acompanhar e compreender a evolução do cuidado parental tanto presente na espécie *Phyllodytes girinaethes*, quanto em outros congêneres com modo reprodutivo semelhante.

Etograma Comportamental.— O repertório comportamental de *P. girinaethes* mostrou-se bem elaborado com seus 20 atos comportamentais distribuídos nas seis categorias comportamentais elencadas na Tabela 2. O fato de o canto de anúncio ter sido o ato comportamental mais efetuado durante as observações (27.35%), pode estar relacionado ao período reprodutivo da espécie, que é justamente o período em que o animal está em atividade e pode ser observado ocupando bromélias mais próximas do solo. Acrescido a essa informação, vale salientar que em uma investigação comportamental envolvendo *Allobates olfersioide*, um anfíbio de hábitos diurnos que realiza comunicação visual, o ato comportamental de emissão do canto de anúncio também foi o mais observado (Costa e Dias, 2019), portanto, evidenciando que o canto de anúncio é um comportamento básico e essencial, até mesmo para espécies que usam outros tipos de comunicação além da acústica (Koller, et al. 2017).

Se tratando dos comportamentos alocados na categoria Deslocamento, que por sinal foi a categoria mais expressiva para *Phyllodytes gyrinaethes* (tabela 2), apesar dos atos comportamentais não terem sido muito frequentes, foram bastante diversificados. Tais comportamentos exibidos nesta categoria pode está conexo à relação estreita entre o animal estudado e o ambiente bromelígena ao qual está associado. Por ser um animal cujo modo reprodutivo depende de água acumulada em bromeliácea, talvez seu deslocamento e movimentação dentro do fitotelmos possa ter alguma relação com a aeração do corpo d'água, como é o caso de *D. brevipollicatus* (Malagoli et al., 2017), que também é um anfíbio bromelígena que realiza cuidado parental, e a movimentação dentro do fitotelmos promove a aeração da água beneficiando diretamente sua prole. Ainda sobre Deslocamento, a inspeção do sitio reprodutivo pelo macho, por outro lado, pode estar atrelada a manutenção da qualidade do sítio de ocupação, afim de garantir que esteja ocupando um bom local que seja atrativo reprodutivamente e beneficie sua prole, como é o caso de *Aparasphenodon arapapa* (Lantyer-Silva et al., 2018) que inspeciona fitotelmos de bromélias antes de ocupá-la como sítio de canto e oviposição.

Em relação ao comportamento alimentar de *P. gyrinaethes*, levando em consideração que os anuros geralmente consomem artrópodes como um principal recurso alimentar (Lima e Moreira, 1993; Ferreira et al. 2012), esse tipo de dieta não foi diferente em relação a espécie congênere *Phyllodytes luteolus* (Motta-Tavares, et al. 2016), que em um trabalho de ecologia trófica envolvendo a espécie, revelou que *P. luteulos* também se alimentou de vários artrópodes, porém não de ortóptera. Sendo assim, vale salientar, que dentre o comportamento alimentar de anfíbios anuros, os tipos e tamanhos de presas consumidas podem diferir (Sabagh et al. 2012; Maia-Carneiro et al. al. 2013; Coco et al. 2014) entre populações, e entre disponibilidade de alimento, seja por diferença entre áreas, período de coleta, altitudes e / ou filogenia (Sabagh et al. 2012).

A territorialidade em anfíbios anuros muitas vezes está relacionada a próprias pressões advindas da seleção sexual na interação macho x macho (Andersson e Simmons, 2006). Alguns machos podem até mesmo avaliar o tamanho e a capacidade de luta de rivais, com base na variação das propriedades espectrais de chamadas de defesa de território (Gerhardt e Bee, 2006). Portanto o canto territorial, por exemplo, se torna um canto de grande valia na manutenção e defesa do sítio reprodutivo. Diante disso, comportamentos territoriais durante a temporada reprodutiva de anuros são imprescindíveis, para que os machos garantam a qualidade necessária para atrair uma fêmea reprodutivamente madura e alcançar o sucesso reprodutivo.

Um bom exemplo onde a ecologia comportamental se tornou uma importante aliada da conservação de anfíbios anuros ameaçados de extinção, é o caso de estudos realizados com *Atelopus* Spp. (Cikanek et al. 2014), onde a partir de estudos comportamentais envolvendo a espécie (Cocroft et al. 1990; Crump, 1986), foi possível compilar um etograma que auxiliasse nas medidas necessárias para planejar e executar ações de conservação *ex situ*, e que vem gerando resultados positivos na manutenção de populações de *Atelopus* em ambiente natural no Panamá (Cikanek et al. 2014).

Diante disso, vale ressaltar que este trabalho levanta informações inéditas a respeito do repertório comportamental de *Phyllodytes gyrinaethes* em ambiente natural, uma espécie endêmica da Mata Atlântica nordestina ameaçada de extinção. Pela primeira vez é realizado a construção de um etograma para uma espécie desse gênero *Phyllodytes*. Entretanto, faz-se necessário mais investigações sobre os atos comportamentais exibidos, para avaliar se existe algum padrão comportamental entre os *Phyllodytes*, bem como para acompanhar e compreender a evolução da plasticidade comportamental, tanto presente na espécie estudada, quando em outros congêneres e/ou hilídeos bromelígenas.

Agradecimentos.— À CAPES pelo apoio na concessão da bolsa de pós graduação; e ao IBAMA pela licença concedida para coleta de informações biológicas da espécie estudada, que foi aprovada pelo

Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade (SISBIO: 66121-1). Agradecemos também a Agência Estadual do Meio Ambiente (CPRH), pela autorização do estudo e coleta de espécimes no Refúgio de vida silvestres matas de Siriji, bem como, na pessoa do Sr. Gilson e sua família que faz o papel de conhecedor e defensor do local.

LITERATURA CITADA

- Alcock, J. 1997. *Animal Behavior, an evolutionary approach* 3rd. edition. Sunderland, England Sinauer Associates.
- Andersson, M.B. 1994. *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Andersson, M.B., and L.W. Simmons. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 6.
- Beltrão, B.A, J.C. Mascarenhas, J.L.F. Miranda, L.C.S. Junior, M.J.T.G. Galvão, and S.N. Pereira. 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco. Recife: CPRM/PRODEEM.
- Blair, W.F. 1960. A breeding population of the Mexican toad (*Bufo valliceps*) in relation to its environment. *Ecology* 41:165-174.
- Buxton, V.L., M.P. Ward, and J.H. Sperry. 2017. Frog breeding pond selection in response to predators and conspecific cues. *Ethology*. 123: 397–404.
- Brown, J.L., V. Morales, and, K. Summers. 2008a. Divergence in parental care, habitat selection and larval life history between two species of Peruvian poison frogs: an experimental analysis. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 1534–1543.
- Brown, J.L., E. Twomey, V. Morales, and K. Summers. 2008b. Phytotelm size in relation to parental care and mating strategies in two Peruvian poison frogs. *Behaviour* 21 145, 1139–1165.

- Cayuela, H., T. Lengagne, P. Joly, and J. P. Lena. 2017. Females trade off the uncertainty of breeding resource suitability with male quality during mate choice in an anuran. *Animal Behaviour* 123 (2017): 179-185.
- Cikanek, S. J. et al. 2014. Evaluating group housing strategies for the ex-situ conservation of harlequin frogs (*Atelopus* spp.) using behavioral and physiological indicators. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e90218, 25 fev.
- Clutton-Brock, T.H. 1991. The evolution of parental care. Princeton University Press, New Jersey.
- Coco, L., V.N.T. Borges-Junior, L.A. Fusinato, M.C. Kiefer, J.C. Oliveira, P.G. Araujo, B.M. Costa, M. Van Sluys, and C.F.D. Rocha. 2014. Feeding habits of the leaf litter frog *Haddadus binotatus* (Anura, Craugastoridae) from two Atlantic Forest areas in southeastern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 86: 239-249.
- Cocroft, R.B., R.W. McDiarmid, A.P. Jaslow, and P.M. Ruiz-Carranza. 1990. Vocalizations of eight species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) with comments on communication in the genus. *Copeia*: 631–643
- Costa, S.M., and E.J.R. Dias. 2019. Comportamento territorial, vocalização e biologia reprodutiva de *Allobates olfersioides* (Anura: Aromobatidae). *Iheringia, Série Zoologia*, 109: e2019031.
- Crump, M.L. 1986. Homing and Site Fidelity in a Neotropical Frog, *Atelopus varius* (Bufonidae). *Copeia* 1986: 438–444.
- Crump, M.L. 1996. Parental care among the Amphibia. In: Jay SR, Charles TS (eds) *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press, San Diego, pp 109–144.
- Del-Claro, K. 2004. *Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental*. Edit. Livraria Conceito, Jundiaí. 132 p.
- Dias, E.G., P.S. Santana, E.N. Pereira, and E.M. Santos. 2016. *Frostius pernambucensis* (Frost's Toad). Parental care. *Herpetol Rev* 47:277–278.
- Duellman, W.E., and L. Trueb. 1994. *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 670p.

- Ferreira, R.F., J.A.P. Schineider, and R.L. Teixeira. 2012. Diet, fecundity and use of bromeliads by *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil. *J Herpetol* 46(1): 19-24.
- Freire, E. M. X., and O. L. Peixoto. 2004. *Phyrodites gyrinaethes*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55833A11377202. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55833A11377202.en>>. Acesso em: 22 jul. 2018.
- Freitas, P.R.S., D.O. Mesquita, and F.G.R. França. 2013. Uso do implante visível de elastômero fluorescente (IVE) para marcação de lagartos *Phyllopezus pollicaris* (Squamata: Phyllodactylidae). *Biotemas* 26 (4): 271-276.
- Gerhardt, H.C. 1991. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42, 615–635.
- Gerhardt, H.C., and M.A. Bee. 2006. Recognition and localization of acoustic signals. In *Hearing and Sound Communication in Amphibians* (ed. P. M. Narins,; A. S. Feng, R. R. Fay.; A. N. Popper), pp. 113-146. New York: Springer
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae notes enidentification. *Herpetologica*, Lawrence, 43(4):467-481.
- Haddad, C.F.B., and C.P.A. Prado. 2005. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, v. 55, p. 207-217.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018a. Plano de Ação Nacional para Conservação da Herpetofauna Nordestina - PAN Herpetofauna Nordestina. Portaria Nº 1.175, de 28 de dezembro de 2018.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018b. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 4162 p.

- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2019. 2º ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada do Nordeste – PAN Herpetofauna do Nordeste. Portaria Nº 354, de 25 de julho de 2019.
- Jones, J. 2001. Habitat selection studies in avian ecology: a critical review. *Auk*. 118: 557–562.
- Köhler, J., M. Jansen, A. Rodríguez, P.J.R. Kok, L.F. Toledo, M. Emmrich, F. Glaw, C.F.B. Haddad, M. O. Rödel, and M. Vences. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251(1):001-124.
- Lantyer-Silva, A.S.F., M. Solé, and J. Zina. 2014. Reproductive biology of a bromeligenous frog endemic to the Atlantic Forest: *Aparasphenodon arapapa* Pimenta, Napoli and Haddad, 2009 (Anura: Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2014) 86(2): 867-880.
- Lantyer-Silva, A.S.F., A. Waldron, J. Zina, and M. Sole. 2018. Reproductive site selection in a bromeliad breeding treefrog suggests complex evolutionary trade-offs. *PLoS ONE* 13(12): e0207131.
- Lehtinen, R.M., and R.A. Nussbaum. 2003. Parental Care: A Phylogenetic Perspective. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. (Jamieson, B. G. M., ed.). SciencePublishers, Enfield, New Hampshire, pp. 343—386.
- Lehtinen, R.M., M.J. Lanoo, and R.J. Wassersug. 2004. Phytotelm-breeding anurans: past, present and future research. *Ecology and Evolution of Phytotelm Breeding Anurans*, (ed R.M. Lehtinen), pp. 1–9. Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan.
- Lima, A.P., and G. Moreira. 1993. Effects of prey size and foraging mode on the ontogenetic change in feeding niche of *Colostethus stepheni* (Anura: Dendrobatidae). *Oecologia* 95(1): 93-102.
- Malagoli, L.R., V. Trevine, T.H. Condez, F.C. Centeno, B.V. Berneck, and C.F.B. Haddad. 2017. Notes on the breeding behaviour of the Neotropical toadlet *Dendrophryniscus brevipollicatus* (Anura: Bufonidae), a bromeliad phytotelmata specialist. *Herpetol Notes* 10:31–39

- Maia-Carneiro, T., M.C. Kiefer, M. Van Sluys, and C.F.D. Rocha. 2013. Feeding habits, microhabitat use, and daily activity period of *Rhinella ornata* (Anura, Bufonidae) from three Atlantic rainforest remnants in southeastern Brazil. *North-West J Zool* 9(1): 157-165.
- Martins, M. 1993. Observations on nest dynamics and embryonic and larval development in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*. *Amphibia-Reptilia* 14: 411-421.
- Martin, P., and P. Bateson. 1986. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge: Cambridge University Press. 200 pp.
- McDiarmid, R.W. 1978. Evolution of parental care in frogs. In: Burghardt GM, Bekoff M (eds) *The development of behaviour: Comparative and evolutionary aspects*, Garland Publishing, New York, pp 127-147
- Motta-Tavares, T., T. Maia-Carneiro, L.F. Dantas, M. V. Sluys, F.H. Hatano, D. Vrcibradic, and C. F. D. Rocha. 2016. Ecology of the bromeligenous frog *Phyllodytes luteolus* (Anura, Hylidae) from three restinga remnants across Brazil's coast. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2016) 88(1): 93-104.
- Resetarits, W.J., Jr, and H.M. Wilbur. 1989. Choice of oviposition site by *Hyla chrysoscelis*: role of predators and competitors. *Ecology*. 70: 220-228.
- Sá, F.P., J. Zina, and C.F.B. Haddad. 2016. Sophisticated Communication in the Brazilian Torrent Frog *Hylodes japi*. *PLoS ONE* 11(1): e0145444.
- Sabagh, L.T., A.M.P.T. Carvalho-e-Silva, and C.F.D. Rocha. 2012. Diet of the toad *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae) from Atlantic Forest Highlands of southeastern Brazil. *Biota Neotrop* 12(4): 258-262.
- Santos, E.M., and F.O. Amorim. 2005. Reproductive mode of *Leptodactylus natalensis* Lutz, 1930 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Rev. bras. Zoociências*, 7 (1): 39-45.
- Santos, E.M., E.M.X. Freire, and F.O. Amorim. 2012. Etograma de *Leptodactylus natalensis* Lutz 1930 (Anura, Leptodactylidae) em ambiente natural. *Rev Nordestina Zool* 6:68-79.

- Schiesari, L., M. Gordo, and W. Hodl. 2003. Treeholes as calling, breeding, and developmental sites for the amazonian canopy frog, *Phrynohyas resinifictrix* (Hylidae). *Copeia* 2, 263–272.
- SEMAS (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade). 2014. Proposta para criação de Unidades de Conservação na Mata de Siriji, em São Vicente Ferrer – PE . Available from: http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/Proposta_UC_-Mata_de_Siriji_PE.pdf. (Accessed 17 june 2019).
- SEMAS (Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade). 2015. Lista Estadual Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Anfíbios. Resolução SEMAS Nº 1 de 09/01/2015.
- Shine, R. 1978. Propagule size and parental care- safe harbor hypothesis. *J Theor Biol* 75:417–424.
- Starnberger, A., D. Preininger, and W. Hodl. 2014. The anuran vocal sac: a tool for multimodal signalling. *Animal Behaviour* 97(2014): 281-288.
- Stearns, S.C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Funct Ecol.* 3: 259–268.
- Taigen, T.L., H. Pough, and M.S. Stewart. 1984. Water balance of terrestrial anuran (*Eleutherodactylus coqui*) eggs: Importance of parental care. *Ecology* 65:248–255.
- Taylor, B., D. Skelly, L.K. Demarchis, M.D. Slade, D. Galusha, and P. M. Rabinowitz. 2005. Proximity to Pollution Sources and Risk of Amphibian Limb alformation. *Environmental Health Perspectives* 113(11):1497-1501.
- Trivers, R. 1972. Parental investment and sexual selection. In: Campbell B (ed) *Sexual selection and the descent of man*. Aldine Press, Chicago, pp: 1871–1971.
- Volkmer, G., L.F.M. da Fonte, F.T. Brum, and L. Verrastro. 2017. Quando e onde vocaliza *Sphaenorhynchus surdus* (Anura: Hylidae) no sul do Brasil? *Iheringia, Série Zoologia* 107:e2017029.
- Wells, K.D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, 1148 pp.
- Williams, G.C. 1975. *Sex and evolution*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ

LISTA DE FIGURAS

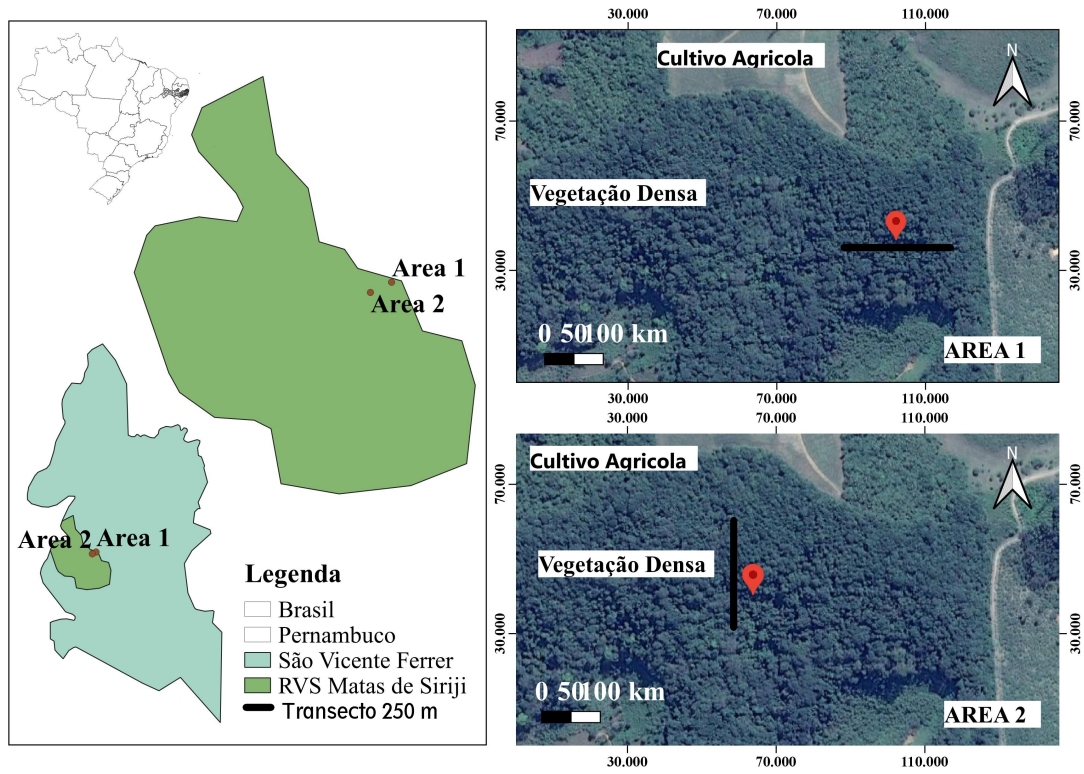


Figura 1: Localização do Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji e as áreas de estudo selecionadas (A1 e A2), localizado no município de São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil.

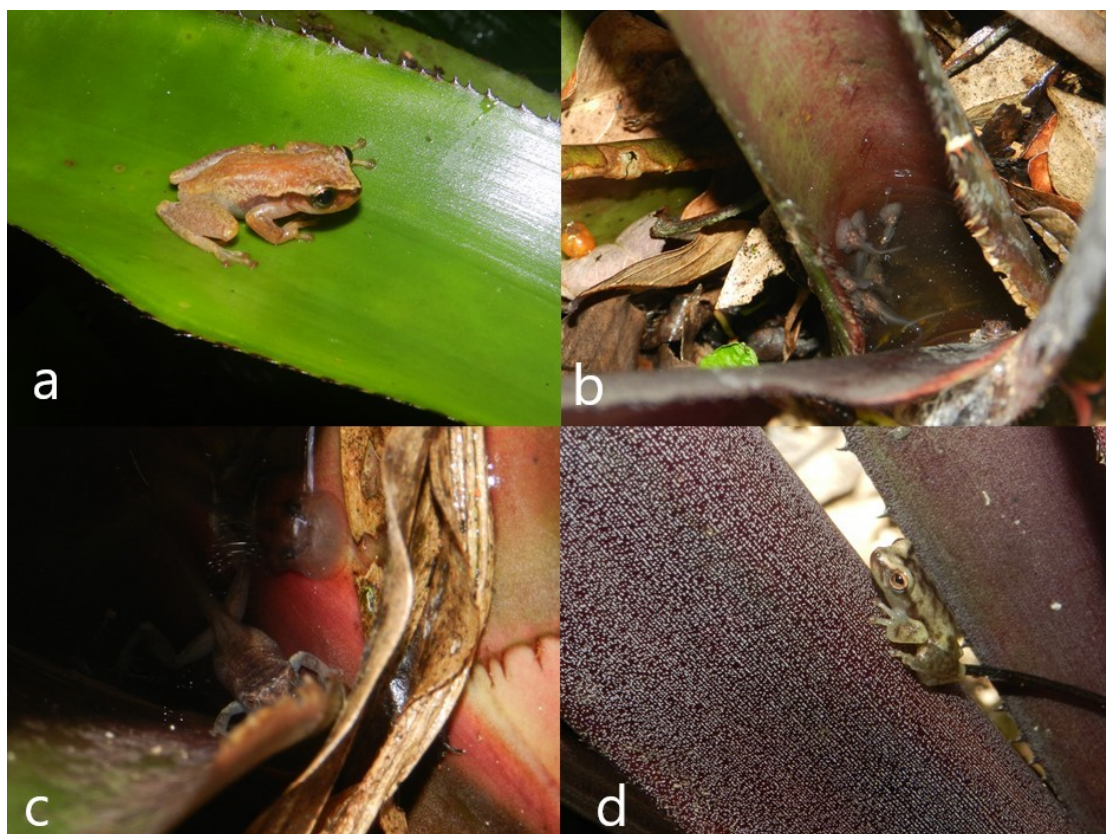


Figura 2: Fases de vida de *Phyllodytes gyrinaethes* amostrada no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. **a.** Macho adulto. **b.** Fase larval, cardume de girinos. **c.** Imago de *P. gyrinaethes*. **d.** Indivíduo jovem, totalmente metamorfoseado.

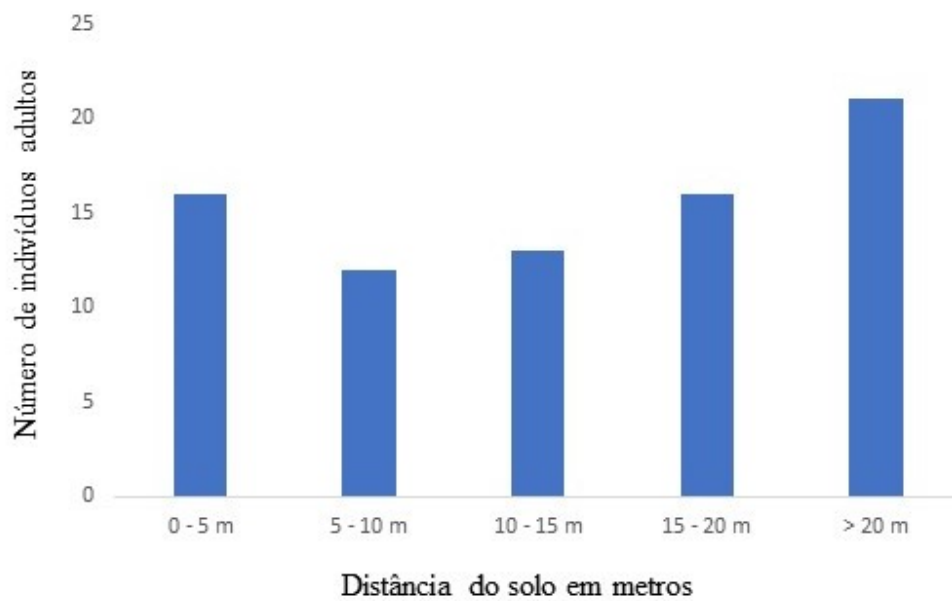


Figura 3: Distribuição vertical de bromélias ocupadas por *Phyllodytes gyrinaethes* em relação ao solo, no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, entre outubro de 2018 e setembro de 2019.

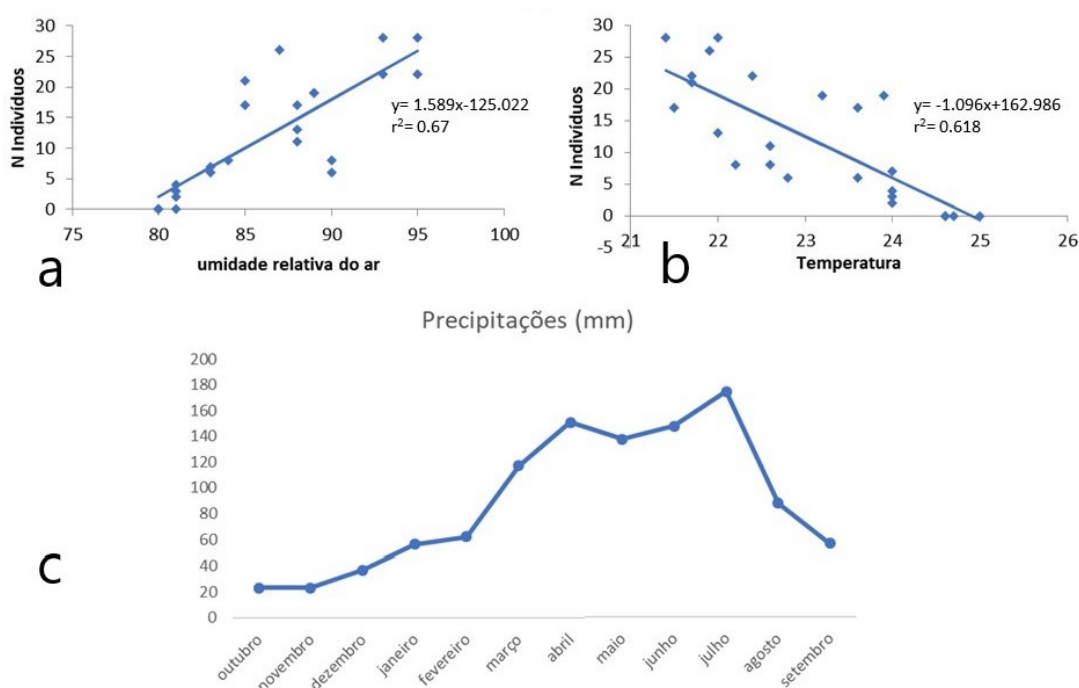


Figura 4: **a.** Teste de regressão linear simples, indicando correlação positiva entre umidade relativa do ar com a incidência de machos acusticamente ativos no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji (RVSMS), Pernambuco, Brasil, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. **b.** Gráfico referente ao teste de regressão linear simples, indicando correlação negativa entre a temperatura do ambiente e número de machos acusticamente ativos na RVSMS, Pernambuco, Brasil. **c.** Flutuação pluviométrica de precipitações (mm) no município de São Vicente Férrer durante os meses de coleta no RVSMS (Fonte: Climate-Data.Org).

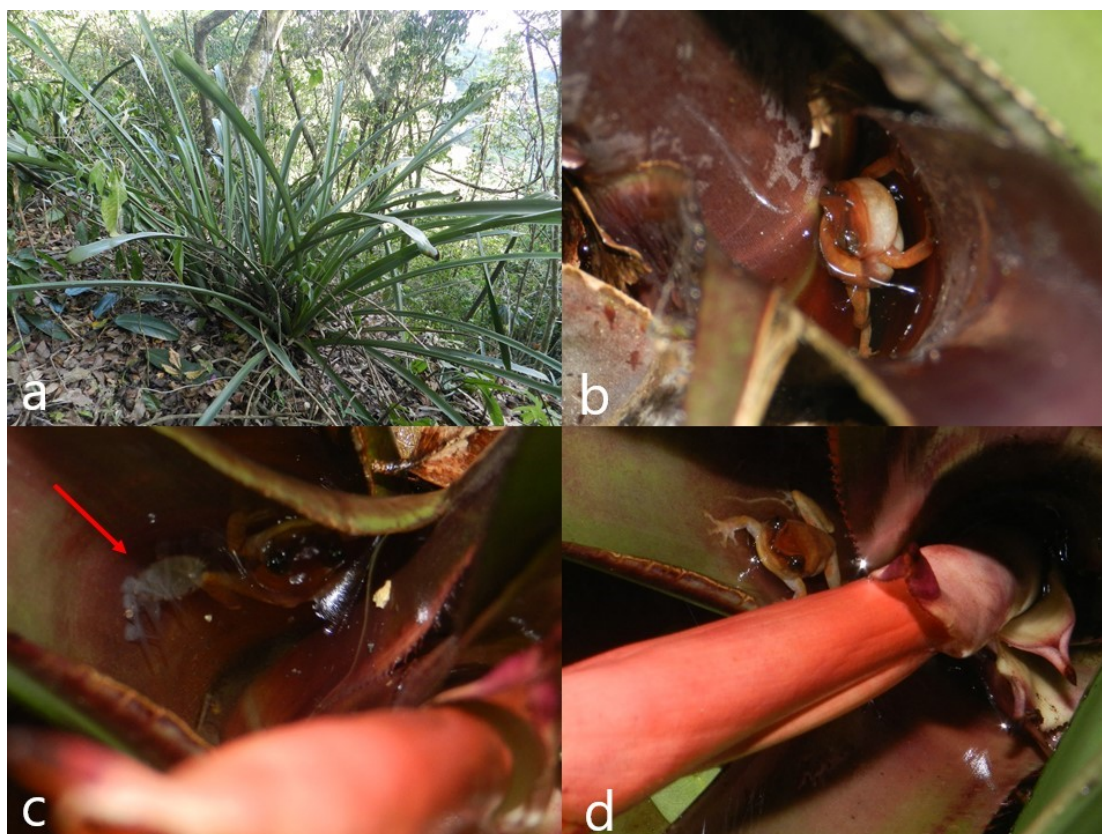


Figura 5: Ocupação de sítios reprodutivos por *Phyllodytes girinaethes* em Bromeliaceae no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil entre outubro de 2018 e setembro de 2019. **a.** Bromélia da espécie *Aechmea costantinii*. **b.** Macho adulto vocalizando em sítio de canto. **c.** Cardume de girinos no estágio 22 em axila fitotelmada abaixo do fitotelmus central. **d.** Macho ocupando sítio reprodutivo abaixo do fitotelmus central de *Aechmea costantinii*, onde o pendão contendo a estrutura germinativa da bromélia está projetada para superfície.

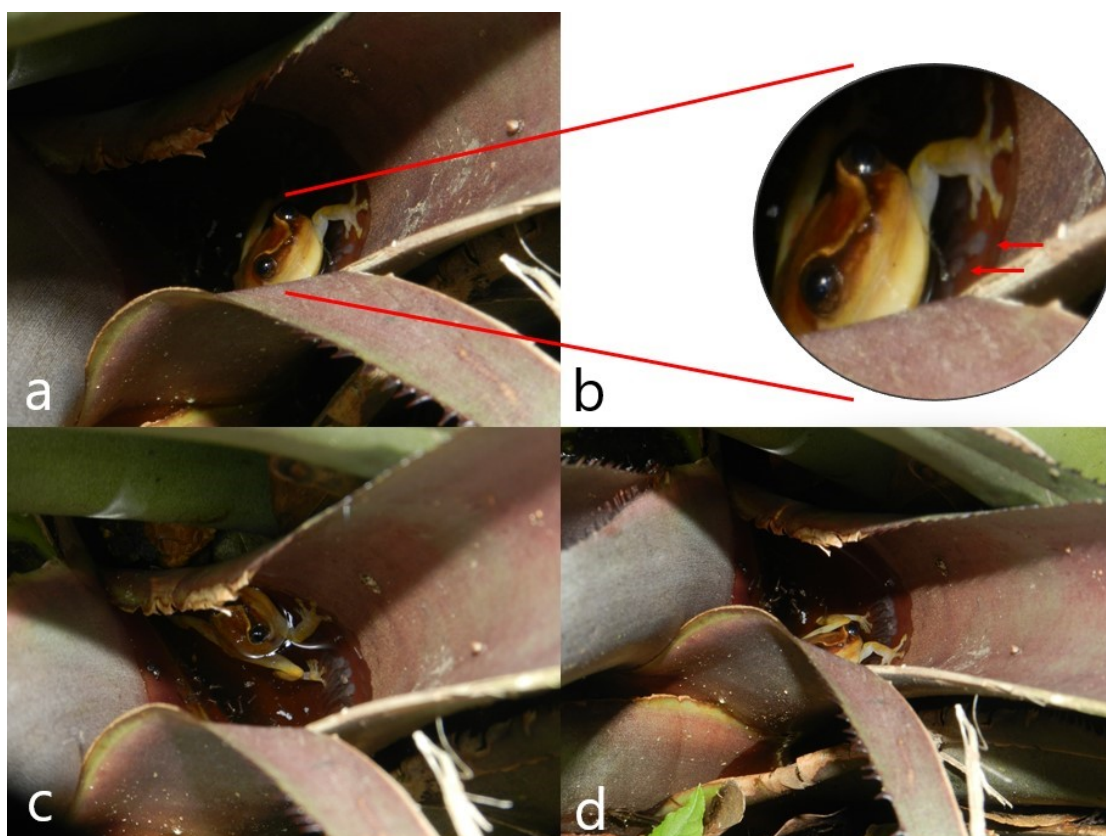


Figura 6: Machos de *Phyllodytes girinaethes* interagindo com a prole na realização comportamento indicativo de cuidado parental no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. **a.** Macho sobre o cardume de girinos (tabela 2, código 10). **b.** Imagem ampliada de “a”. **c e d.** Machos adjacentes ao cardume de girinos (Tabela 2, código 11).

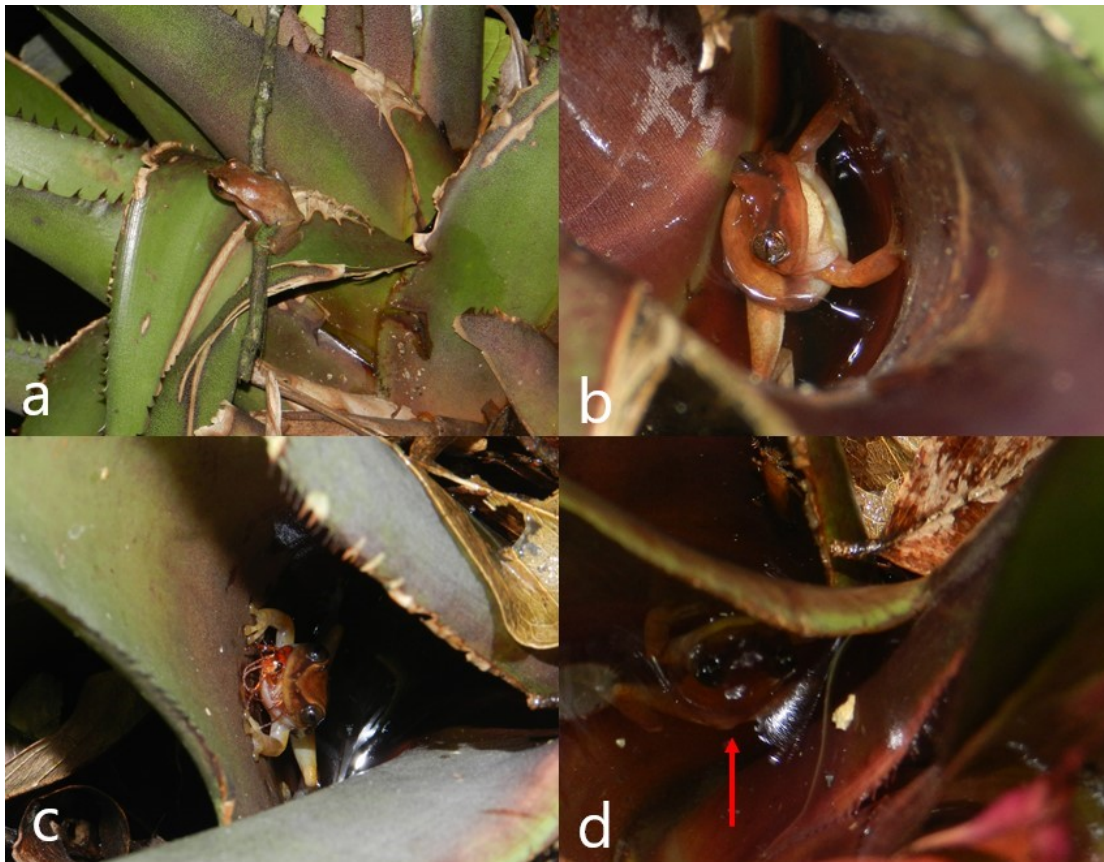


Figura 7: Atos comportamentais referente a outras categorias comportamentais não evidentes na ecologia reprodutiva. Animais oriundos do Refúgio de vida silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. **a.** Ato de deslocar-se para outra axila, pertencente a categoria Deslocamento (código 16); **b.** Ato de arquear o corpo, categoria Defesa (código 8); **c.** Ato de predação, categoria forrageamento (código 20).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cardumes de girinos registrados no Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil entre outubro de 2018 e setembro de 2019. *Altura x largura total das bromélias*: (+)= maior que 80cm x 90 cm; (o)= menor que 80 cm x 90 cm. *Tipos de fitotelmos*: A= central; B= primeiro lance de fitotelmos abaixo do central; C= segundo lance de fitotelmos abaixo do Central. **cardume com assistência paternal.

Nº macho/			Estágios		
Meses/	tam. da	Tipo de	N ° de Cardumes	Nº de Indivíduos	larvais (Gosner,
2019	Bromélia	Fitotelmos	por fitotelmos	por cardume	1960)
<i>Janeiro</i>	5 (+)	A	2A	6, 6	24, 30
<i>fevereiro</i>	5 (+)	A, B	2A; 1B**	7, 6; 6**	29, 37; 22**
<i>março</i>	5 (+)	B	2A**	12**, 7	23**, 30
<i>Abril</i>	6 (o)	B	2B**	6, 16**	32, 24**
<i>Mai</i>	5 (+)	B, C	3A; 1B	6, 7, 6; 4	21, 26, 30; 39
<i>Mai</i>	7 (o)	A	1A	7	37
<i>Junho</i>	6 (o)	B	1B**	19**	21**
<i>Junho</i>	11 (+)	B	3A; 1C**	3, 6, 5; 13	39, 31, 25; 22**

Tabela 2: Etograma comportamental de *Phyllodytes gyrinaethes* oriundos do Refúgio de vida silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, entre outubro de 2018 e setembro de 2019. Para acessar a descrição dos atos comportamentais, consultar o Apêndice 1.

Categoria Comportamental/		
Ato Comportamental	Código	Frequência (%)
<i>Reprodução</i>		
Canto de anúncio	1	27.35
<i>Territorialidade</i>		
Canto territorial	2	1.88
Inspeção de fitotelmos	3	1.88
Abrigar-se	4	0.54
<i>Defesa</i>		
Esconder-se	5	7.24
Recuar	6	12.87
Inflar/desinflar saco vocal	7	1.61
Arquear o corpo	8	2.68
Esticar patas traseira	9	1.61
<i>Assistência à prole</i>		
Ficar sobre girinos	10	2.14
Ficar adjacente aos girinos	11	3.75
<i>Deslocamento</i>		
Mergulhar	12	8.85
Sair da água	13	2.95
Emergir	14	7.77
Submergir	15	4.02
Deslocar para outra axila ou bromélia	16	1.34
Locomover-se para frente	17	3.49
Girar para esquerda	18	4.83
Girar para direita	19	2.95
<i>Alimentação</i>		
predação	20	0.27

APÊNDICE

Apêndice 1: Descrição dos atos comportamentais efetuados por *Phyllodytes girinaethes* representados por códigos, referente ao etograma comportamental da tabela 2.

Categoria	
Comportamental/ Código	Descrição
do ato comportamental	
<i>Reprodução</i>	
1	Canto de 3 a 4 notas, emitidos com o animal vocalizando dentro da lâmina d'água com a cabeça arqueada, suspendendo seu corpo com as patas dianteiras apoiadas na folha da bromélia, com função principal de atrair fêmea sexualmente madura para reproduzir-se.
<i>Territorialidade</i>	
2	Canto de 1 a 3 notas, geralmente emitido no período crepuscular (tarde/noite) durante o início da atividade acústica enquanto o macho mantinha o corpo arqueado dentro do corpo d'água. Esse comportamento foi efetuado antes de se deslocar para outro fitotelmos, ou após ocupar uma nova axila de broméiaceae depois de um deslocamento;
3	Ao se deslocar para um novo fitotemos, percorrer seu espaço interno antes de adotar a postura de canto de anúncio;
4	Recolher-se dentro de uma axila mais estreita e próxima da base da bromélia, geralmente a mesma usada como abrigo diurno e em noites sem atividade vocal em período mais seco, de baixa umidade.

Defesa

- 5 Ato de se refugiar dentro da axila fitotelmada da bromélia;
Locomover-se de ré, deslocando para trás sem rotacionar o
- 6 corpo;
Inflar e desinflar o saco vocal sem emitir som,
- 7 evidenciando a região gular;
Erguer o corpo com os membros anteriores apoiados na
- 8 base lateral da folha da bromeliácea, posicionando-se sobre a lâmina d'água do fitotelmos, tanto na posição de frente quanto de trás;
Movimentar os membros traseiros, simulando um falso
- 9 nado, com o corpo parcialmente submerso enquanto apoia o corpo com as patas dianteiras fora d'água.

Assistência à prole

- 10 Ficar com o corpo, região ventral, sobre o cardume cujo as larvas estão fixadas na folha da bromélia, de modo que seu ventre fique em contato com as larvas. Durante esse comportamento o macho não necessariamente cessava sua atividade acústica;
Ficar imóvel, com o corpo a frente ou ao lado do cardume de girinos.
- 11

Deslocamento

- 12 Ato de mergulhar o corpo dentro da água e se deslocar submerso dentro do fitotelmos;
Sair totalmente da água do fitotelmos, deslocando-se para
- 13 cima na folha da bromélia;
Estar parcialmente com o corpo para fora da lâmina
- 14 d'água;
Ficar totalmente coberto pela lâmina d'água sem se mover;
- 15 Sair de um fitotelmos para ocupar outro próximo;
- 16 Deslocar-se para frente;
- 17 Rotacionar o corpo para esquerda;
- 18
-

19	rotacionar o corpo para direita;
<i>Alimentação</i>	
	Ato de se alimentar de outro animal. Nesse caso, <i>P. gyrinaethes</i> foi observado se alimentando apenas de ortópteras. Após abocanhar rapidamente a presa, o tempo médio para engolir o grilo foi de aproximadamente 15
20	minutos.

5. CONCLUSÕES

Atendendo aos objetivos propostos, apresentamos os primeiros resultados abrangentes sobre comunicação acústica, variação intra e interindividual, inferência da capacidade de reconhecimento individual, assim como a influência de alguns fatores abióticos e bióticos na emissão sonora de *P. gyrinaethes* em ambiente natural, bem como o repertório comportamental da espécie, contextos e informações inéditas sobre sua reprodução, e ainda a caracterização da população proveniente do Refúgio de Vida Silvestre Matas de Siriji, São Vicente Férrer, Pernambuco. Diante dos resultados obtidos concluímos que:

1. A população estudada configura o segundo registro de *Phyllodytes gyrinaethes* no estado de Pernambuco, tornando-se a terceira população conhecida para a Mata Atlântica nordestina, ampliando sua distribuição no estado de Pernambuco para 127.35 km sudoeste;
2. A comunicação acústica na espécie é caracterizada por dois tipos diferentes de chamadas (canto de anúncio e territorial);
3. De acordo com o coeficiente de variação intra e interindividual dos cantos de anúncio, os animais possivelmente são capazes de se reconhecer individualmente por meio dos sinais acústicos em exibição;
4. O canto de anúncio da população estudada sofre influência de fatores bióticos (tamanho e massa) e abiótico (temperatura do ambiente);
5. *Phyllodytes gyrinaethes* mostrou-se ter predição em ocupar bromeliáceas *Aechmea costantinii*, utilizando seus fitotelmos como sítio de canto, oviposição, abrigo diurno e sítio de alimentação;
6. A quantidade de machos em atividade acústica sofre influência da pluviometria, apresentando uma correlação positiva com o aumento da umidade relativa do ar, e negativa com a temperatura;
7. *Phyllodytes girinaethes* apresenta uma reprodução contínua (que se estende por aproximadamente dez meses), podendo cessar sua atividade vocal e reprodutiva nos meses mais seco;

8. Machos de *Phyllodytes gyrinaethes* interage com sua prole por meio de comportamentos que sugerem realização de cuidado parental dispensado às larvas em estágio iniciais (21-25);
9. *Phyllodytes gyrinaethes* possui um repertório comportamental elaborado, com pelo menos 20 atos comportamentais distribuídos em seis categorias comportamentais; Reprodução, Deslocamento, Territorial, Defesa, Assistência à prole e Alimentação.

6. Declaração sobre plágio

Eu, Emerson Gonçalves Dias, autor(a) da dissertação intitulada “AUTOECOLOGIA DE *PHYLLODYTES GYRINAETHES* CARAMASCHI & FREIRE, 2003, UM ANFÍBIO BROMELÍGENA ENDÊMICO LESTE DO BRASIL”, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Unidade Acadêmica de Serra Talhada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, declaro que:

- O trabalho de pesquisa apresentada nesta dissertação, exceto onde especificado, representa uma pesquisa original desenvolvida por mim;
- Esta dissertação não contém material escrito ou dados de terceiros, de qualquer fonte bibliográfica, a menos que devidamente citada e referenciada no item “Referências Bibliográficas”.

Serra Talhada, 20 de janeiro de 2020

(assinatura)

7. Normas das revistas

7.1 *Bioacoustics*

About the Journal

Bioacoustics is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Bioacoustics accepts the following types of article: original articles.

Peer Review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use British (-ise) spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where 'a quotation is "within" a quotation'. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Section headings should be concise.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper.

An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain an unstructured abstract of 200 words.
3. Between 3 and 6 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
4. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
5. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
6. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.

7. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
8. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).
9. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, GIF, or Microsoft Word (DOC or DOCX). For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
10. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
11. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
12. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Bioacoustics* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Bioacoustics* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

Updated 10-01-2020.

7.2 Herpetological Conservation and Biology

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

RAYMOND A. SAUMURE^{1,2} AND DAVID J. GERMANO^{3,4}

¹Department of Natural Resource Sciences, McGill University, 2111 Lakeshore Road,
Ste. Anne de Bellevue, Québec H9X 3V9, Canada

²Southern Nevada Water Authority, 100 City Parkway, Suite 700, Las Vegas, Nevada 89106, USA

³Department of Biology, California State University, Bakersfield, 9001 Stockdale Highway, Bakersfield, California 93311, USA

⁴Corresponding author, e-mail: dgermano@csu.edu

Abstract.—*Herpetological Conservation and Biology* is an open-access, peer-reviewed, international journal that publishes original research, reviews, perspectives, and correspondence on the ecology, natural history, management, and conservation biology of amphibians and reptiles. The journal's focus stresses the importance of natural history to conservation efforts. Manuscript topics considered for inclusion include all aspects of natural history (e.g., behavior, parasitology, and physiology), ecology, sampling design and techniques, field studies, inventories, long-term monitoring, and management case studies. Manuscripts with strong applied conservation objectives or implications that employ genetic techniques as tools will be considered for publication. Authors who are unsure of the suitability of their manuscript for submission to *Herpetological Conservation and Biology* should contact the appropriate Section Editor for guidance. Upon final acceptance, articles are published electronically in a portable data file (.pdf) format with full pagination. Articles will be published and archived at <http://www.herpconbio.org>.

Key Words.—citations; formatting; grammar; manuscript; style; syntax; topics (note alphabetical order)

Short Title.—Instructions for Authors (put at top of manuscript in the form Saumure and Germano.—Instructions for authors.)

Scope of Journal

Thank you for considering *Herpetological Conservation and Biology* as an outlet for your research. *Herpetological Conservation and Biology* is an open-access, peer-reviewed, international journal that publishes original research, reviews, perspectives, and correspondence on the ecology, natural history, management, and conservation biology of amphibians and reptiles. The focus of the journal stresses the importance of natural history to conservation efforts. Our online publishing service is unique in that it is provided free to both authors and readers alike (i.e., no open access fees).

Submission and Format

Each manuscript submitted must be accompanied by an Author Submission Form, which is available in portable document file (PDF) format on the *Herpetological Conservation and Biology* website. Failure to provide the Author Submission Form will result in the manuscript being returned without review. Section Editors should acknowledge receipt of a manuscript within 7 d of submission; should the corresponding author not receive a timely response, please contact a Managing Editor to confirm receipt.

Upon final acceptance, articles are published electronically as a PDF file with full pagination. Articles will be published and archived at <http://www.herpconbio.org>. Moreover, the journal is archived electronically at <http://www.archive.org>. Offprints will not be produced; however, authors can download a PDF for distribution. There are no page charges. Upon final acceptance, manuscripts will be published in the next available issue. *Herpetological Conservation and Biology* publishes three

issues per calendar year (30 April, 31 August, 16 December). Articles are indexed currently in Biology Browser, CAB Abstracts, Current Contents, Directory of Open Access Journals, EMBiology,

Google Scholar, Scopus, Wildlife Review Abstracts, and Thomson Reuters. *Herpetological Conservation and Biology* papers should be cited using the following format:

Bury, R.B. 2006. Natural history, field ecology, conservation biology and wildlife management: time to connect the dots. *Herpetological Conservation and Biology* 1:56–61.

For the purposes of tracking the success of our non-profit journal (i.e., no paid staff), **we prefer that authors provide direct hyperlinks to our open-access content on their personal or institutional webpages rather than providing PDFs.** This is our only request of authors and we ask that you support our journal in this way.

Further, all copyrights remain with the first author of a manuscript. Authors are free to archive their manuscript on their personal or institutional websites, as well as in manuscript repositories. Authors who chose to distribute their manuscript by other means should be aware that the relative popularity of their research may suffer when *Herpetological Conservation and Biology* compiles and publishes download statistics for impact factors.

Manuscripts must be submitted electronically as Microsoft Word (MSWord) documents to the appropriate Section Editor(s):

Frog, Toad, and Caecilian:	David Bradford / Sarah Kupferberg – dbradfo@herpconbio.org
Salamander and Newt:	Brian Miller / Mizuki Takahashi – bmiller@mtsu.edu
Freshwater Turtle (North America):	Will Selman – will.selman@millsaps.edu
Freshwater Turtle (Cent.-S. America):	Vivian Páez / Bruno Ferronato – vivian@herpconbio.org
Freshwater Turtle (International):	Bruno Ferronato – brunoferronato@hotmail.com
Tortoise:	Ken Nussear – knussear@mac.com
Sea Turtle:	Joe Pfaller – joe.pfaller@gmail.com
Lizard, Amphisbaenian, Crocodilian:	David Germano – dgermano@csu.edu
Snake:	Brian Halstead – bhalstead@usgs.gov
General Herpetology (multiple taxa/surveys):	Ann Paterson – distichus@herpconbio.org
Special Publication:	Stan Trauth – strauth@astate.edu
Photo Gallery:	Raymond Saumure – insculpta@gmail.com

Types of Contributions

Herpetological Conservation and Biology welcomes the submission of original experimental, descriptive, and/or inferential research. Manuscripts categories include the following:

- (1) Research Articles (includes techniques papers);
- (2) Forums (invited contributions only: critical reviews, rebuttals);
- (3) Invited Papers;
- (4) HerpSpectives (open to contributions: historical reviews, commentaries on *Herpetological Conservation and Biology* articles);
- (5) Point-Counterpoint; and
- (6) Classics in Herpetology

Limit manuscripts to 30 pages of text (Times New Roman font, 12 pt., double spaced, 1-inch margins all around). Literature Cited, Tables, Figures, author biosketches, and Appendices are excluded from this limit. Long tables that run onto a second formatted page will be presented in an appendix. Appendices exceeding five pages will be presented as a separate Supplementary Information PDF.

Forums are invited contributions that focus on the review or synthesis of a topic within the focal areas of the journal *Herpetological Conservation and Biology*. Authors should indicate in the introduction why such a review is needed at this time. An example is “the concept is subject to controversy and distinction between the different theories is needed.” Articles are typically large and culminate in a comprehensive address of literature for that field. Reviews that simply duplicate previous reviews and/or books, or that do not add significantly to the status of the science, will not be accepted.

The HerpSpectives manuscript category is open to contributed manuscripts. HerpSpectives focus on viewpoints, summaries of current research, and commentaries on articles previously published in *Herpetological Conservation and Biology*. These articles address broad-ranging methodology and/or concepts of importance to the focal areas of the journal. HerpSpectives may be review articles. Still, *Herpetological Conservation and Biology* expects a balanced approach that fairly evaluates analyses of data, logic, and/or interpretations of other published works. Tirades or one-sided manuscripts will be rejected by the Editors.

Point-Counterpoint articles or notes challenge or provide additional perspective to a previously published *Herpetological Conservation and Biology* research, forum, or HerpSpective article. Point-Counterpoint articles are similar to HerpSpectives, except that they are focused upon the results or deductions made in a single paper. Articles should be written in a literary reporting style. Most importantly, the attitude of these articles must be professional, informative, and non-confrontational.

Forums, HerpSpectives, and Point-Counterpoint articles must be balanced (e.g., pertinent citations listed with no bias toward one view). Authors are asked to support their arguments logically with their own published data on the subject, if appropriate. Discussions should be approached in a persuasive or reporting scientific literary style. Authors should also be aware that well-supported views could become the topic of Point-Counterpoint articles challenging the views put forth. Style and formatting for these types of manuscripts should follow those of [Steen and Smith \(2006\)](#) or [Altig \(2007a\)](#).

Suitable Topics

Manuscript topics considered for inclusion in *Herpetological Conservation and Biology* include all aspects of natural history (e.g., behavior, parasitology, and physiology), ecology, sampling design and techniques, field studies, inventories, long-term monitoring, and management case studies. Manuscripts with strong applied conservation objectives or implications that employ genetic techniques as tools will be considered for publication in *Herpetological Conservation and Biology*. Authors who are unsure of the suitability of their manuscript for submission to *Herpetological Conservation and Biology* should contact the appropriate Section Editors listed above for guidance.

Unsuitable Topics

Short notes describing unique or rare observations, such as those published in the Natural History Notes section of *Herpetological Review*, are not accepted. Moreover, book reviews, species descriptions, checklists, species accounts, county records, or manuscripts with a focus on systematics and/or phylogeny are not accepted. We no longer accept ecological modeling papers unless the study includes extensive new field sampling.

Statement of Authorship

Authors must attest that manuscripts submitted to *Herpetological Conservation and Biology* are original and that no portion of a given work has been published elsewhere, in any language. Moreover, the corresponding author must affirm that the manuscript, or parts thereof, are not under consideration for publication in another journal. Theses and dissertations do not normally constitute prior publication. The corresponding author must also assure that every author listed contributed significantly to the manuscript and that each one has read and approved of the manuscript. A significant contribution implies that authors actively participated in at least three of the following five phases of a research project: (1) conceptual; (2) data collection; (3) analyses; (4) writing the manuscript; and (5) editing the manuscript.

Submission of a manuscript implies that, if accepted, the authors consent to the open-access distribution of the published paper, including any photographs contained therein.

Review of Manuscripts

The editorial staff of *Herpetological Conservation and Biology* will consider requests to avoid specific parties as peer reviewers; however, they provide no guarantee that these requests will be honored. Authors are asked not to submit names of potential peer reviewers, unless requested by the editorial staff. Acceptance of a manuscript is contingent upon at least two favorable recommendations from anonymous peer reviewers and the concurrence of the Associate and Section Editors assigned to the manuscript. Should a manuscript receive both positive and negative reviews, the Associate Editor may submit the manuscript to a third peer reviewer. Alternatively, the Associate Editor may choose to review the manuscript. Final acceptance rests with the Section Editor.

Peer reviewers will be asked to complete the Confidentiality Form provided by the editor upon accepting to review a given manuscript. Comments by peer reviewers will be submitted to the Associate Editor on the Peer Review Form in PDF format. Upon receipt of the reviews, the Associate Editor handling the manuscript will revisit the Author Submission Form to identify inconsistencies between the manuscript and *Herpetological Conservation and Biology* guidelines. To be able to save the PDF forms, reviewers and editors must have a recent version of Adobe Reader installed on their computers (i.e., Version 8 or later). This free software is available at: <http://www.adobe.com>. Finally, the Associate Editor makes his/her recommendation for acceptance pending revisions/rejection of a given manuscript in consultation with the appropriate Section Editor. Revisions received after six months will be treated as new submissions; however, the corresponding author may request an extension from the appropriate Section Editor.

Galley proofs will be provided to the corresponding author prior to publication. Authors must respond within 48 h with any corrections required or the manuscript may be withheld until the next issue. In

recent years, the acceptance rate for manuscripts submitted to *Herpetological Conservation and Biology* was 50%.

Language and Style

Manuscripts must be written in English. Moreover, manuscripts must be clear, concise, and written primarily in the active voice.

Active voice: "We set traps at random locations..."

Passive voice: "Traps were set at random locations..."

Authors who fail to use an active voice will be required to rewrite entire sections of their manuscript, even if such changes are only detected at the final copy edit stage. This will likely cause substantial delays. Publication of the manuscript would likely be delayed to a future issue.

A second abstract in a language other than English may be included at the discretion of the authors. Upon acceptance, authors may choose to include a non peer-reviewed appendix containing a foreign language version of the manuscript. Authors whose first language is not English are strongly encouraged to have the manuscript proofed by an English-speaking colleague prior to submission.

Please use the United States spelling of words, e.g., color rather than colour. Also, common Latin abbreviations such as *et al.*, *i.e.*, and *e.g.* should not be italicized; whereas, all others are italicized (e.g., *in vitro*, *ad libitum*, *in situ*, *op. cit.*, and *sensu stricto*). Acronyms should be defined upon first use in the manuscript, e.g., snout-vent length (SVL), temperature-dependent sex determination (TSD), or *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Note that the latter example is an abbreviation of a scientific name and thus retains italics. Do not start sentences with abbreviations; write out the word in full. Similarly, sentences beginning with a number should always be spelled out. When using numbers in running text, spell out numbers one through nine and use numerals for 10 onward (e.g., three lizards, nine toads, and 11 salamanders). When numbers are followed by units of measurement, however, the numbers should not be spelled out (e.g., 1,968 ha, 0.3 kg, 3.7 m, 11 km, and 5-y period). Use the *Système International d'Unités* (SI) when describing units of measure. Temperature should be presented in Celsius (25° C) and geographic coordinates can be submitted as either Latitude and Longitude (41°25'01"N, 120°58'57"W or decimal degrees) or as Universal Transverse Mercators (UTMs) and should include the zone (11S 0527892, 3887215).

The standard reference for English stylistic and grammatical conventions is the Chicago Manual of Style published by the University of Chicago Press. Moreover, authors may wish to consult Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers compiled by the Council of Science Editors and published by the University of Chicago Press in 2014.

The Manuscript

The whole manuscript must be double-spaced; this includes tables, table and figure headings, and the Literature Cited section. Use Times New Roman and a font size of 12, including figures (axis labels) and tables. Text should be left justified. Do not right-justify any portion of the manuscript. All

manuscript pages are to be consecutively numbered at the bottom center of each page. Prospective

authors are encouraged to consult recently published *Herpetological Conservation and Biology* articles for style. Manuscripts that do not follow closely the style guidelines and format set forth herein will be returned to the corresponding author without review.

Short title.—Provide a short title (i.e., maximum 60 characters including spaces) to be used as a running header.

Title (not given a heading). Be brief yet informative. Titles should convey the focus of the investigation and preferably include the scientific name(s) of the species studied. Although *Herpetological Conservation and Biology* prefers that common and binomial scientific names for North American species follow Crother et al. (2008), authors may choose to use alternative taxonomic designations. Scientific names should be in *italics*. The first letter of each word composing a specific common name should be capitalized (e.g., American Crocodile, Pygmy Short-horned Lizard, and Timber Rattlesnake), but not when referring to the group (e.g., painted turtles, garter snakes, or spadefoot toads). Titles should be centered, 16 point font, bolded, and in large and small capitals Times New Roman font (see this title on first page).

Abstract.—An abstract is required for all manuscripts. It should be a concise summary of the objectives of the manuscript, results, and conclusions written in layman's terms (i.e., avoid all technical jargon so as to be easily understood by the public and press). The abstract text should be bolded, begin with “**Abstract.**—” in boldface italics, and should not exceed 250 words.

Key Words.—A maximum of eight key words should reflect the main aspects of the investigation. Key words should not include words already used in the title. Please note that short phrases or names such as “Eastern Garter Snake” would count as one key word. The title or keywords should include the common and scientific names of the amphibians and/or reptiles studied as well as the primary topics of the investigation. Key words should be listed in alphabetical order, in plain font, and separated by semi-colons. They should form a new paragraph that follows immediately after the Abstract. The heading should be two words, in italics (but not bolded), and followed by a period and em dash (—).

Format as shown:

Key Words.—amphibians; biology; conservation; international; journal; reptiles; research; success

Text.—Each research manuscript should be composed of the following sections. The first page should be composed of: *Short Title*, title (no heading callout), **Abstract**, and *Key Words*. Subsequent pages should have the following sections: **INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, Acknowledgments, LITERATURE CITED**, Tables, Figures, Author Photographs and Biosketches, and, if applicable, Appendices. HerpSpectives and other contributions may have fewer categories, as needed. The preceding major section headings should be in small caps, boldface, and centered. The *Short Title*, **Abstract**, *Key Words*, and *Acknowledgments* should be lower case, italicized, and followed by a period and em dash. Acknowledgments should also be indented by 0.33 cm (0.13 inches). Section sub-headings should begin a new paragraph after a space, boldface, italicized as shown below:

Study site.—Our study site was located on Salado Creek, Independence County, Arkansas, USA. This lowland creek is characterized by its turbid waters and lack of a floodplain...

In-text citations should be in chronological order and separated by a semicolon (e.g., Iverson 1991; McCallum and Trauth 2000; Steen et al. In press). Citations published in the same year should then be alphabetical for that year (e.g., Gibbons 1991; Iverson 1991). Multiple papers by the same author(s) should be cited by chronologically listing the years, separated by a comma (e.g., Gibbons 1983, 1990). Do not include a comma between the author and year of publication. Equipment and/or software providers that you believe deserve special mention should be cited in running text (e.g., Holohil Systems Ltd., Carp, Ontario, Canada; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Numbered lists should be as follows: (1) more than two items long; (2) have semi-colons between items; and (3) have parentheses on both sides of the numbers. Authors should verify that there are exactly two spaces between all sentences. There are no sentences in the Literature Cited; therefore, nothing should be separated by two spaces in this section.

INTRODUCTION

The Introduction should not be exhaustive; rather it should acquaint the reader with the present state of knowledge through the judicious use of relevant citations. A more complete argument within the framework of published knowledge should be included in the Discussion. In most cases, five citations are sufficient to make a point; alternatively, authors may cite a single review article or an example (e.g., Plummer 1979). Next, authors should state the significance of their work (i.e., how the manuscript addresses a void in the present state of knowledge). Lastly, the introduction should end with a clear statement of the specific objective(s) of the study. In some cases, these would include the specific hypotheses tested.

MATERIALS AND METHODS

This section should provide a level of detail sufficient to ensure future repeating of the study. If particularly lengthy, such information can be provided as an appendix. Descriptions of study sites belong in this section. Precise locality data such as latitude and longitude for Special Concern, Threatened, or Endangered species should not be included in the manuscript. Instead, these data should be deposited at an established museum or secure institution that is referenced in the text. Dates in running text should be formatted as 29 March 2006. Units of time such as year, month, day, hour, minute, and second should be abbreviated as y, mo, d, h, min, and s, respectively. Use the 24-hour system to specify a given time (e.g., 0956, 1645); please note the absence of colons and units.

RESULTS

The results section should include neither raw data nor interpretations or conclusions. Authors should strive to summarize data using statistics, tables, and/or figures. Statistical results should be presented in the following format: ($Z = 1.395$, $df = 3$, $P = 0.040$). Capitalize and italicize statistical test statistics except those that require lower-case and use subscript where appropriate (e.g., t -test or Pearson's correlation; $t = 2.453$, $df = 4.5$, $P = 0.031$ or $r = 0.13$, $t = 3.142$, $P < 0.001$). Do not capitalize or italicize degrees of freedom. Mean plus or minus Standard Deviation or Standard Error (range) should be reported as: mean SVL = $14.3 \pm$ (SE) 1.6 mm (range, 12.2–16.5 mm) with sample

sizes presented as $n = 25$. Separate number ranges with an en dash and make sure all significant figures are consistently detailed across reports. Standard error and standard deviation need to be identified in the text and should be represented without periods as SE and SD, respectively.

Use Arabic numerals to number sequentially each table and figure. Use Times Roman font for all lettering and numerals and axes must be black. Self-explanatory captions should accompany each table and figure and should be capable of standing alone without the accompanying text. Include species common and scientific names and location of study in captions, if appropriate. Such detailed captions are placed at the top of the table(s); whereas, those for figures should be placed below the appropriate figure(s). There is no need to list them sequentially on a separate page that precedes the figures. Footnotes may be used sparingly for tables; although they are not permitted elsewhere in the manuscript. Figures containing histograms, pie charts, line graphs, etc. must have legible text when reduced to the appropriate width for the material, which is often one published column wide. Check your figure(s) prior to submission to ensure that they are of sufficient clarity at the journal size by selecting the graph/photo in MSWord, selecting the Format tab, then in the Size box change the width to the recommended size; single column figures should be approximately 80 mm (3.18 inches) whereas double column figures should not exceed 165 mm (6.5 inches). Photographs may be in color or black and white. Multiple graphs or photographs submitted as one figure should be laid out and formatted by the authors and saved and inserted into the manuscript as one image, with letters A, B, C, D, etc. used to reference to them in the figure caption. Figures should be high-resolution (but not to exceed 1 MB) .png, .tif, or .jpg files embedded within the manuscript submitted for consideration; see additional details below. Maps should include a legend, scalebar, and cardinal direction indicator. Maps are figures and should include data source information in the caption.

DISCUSSION

An ideal Discussion interprets the relevance of data presented in Results and is a logical conclusion to the Introduction. Authors should strive for the truth rather than present biased discussions in favor of a preferred theory. A discussion should present both sides of an argument and draw upon all relevant publications. Speculative statements that go beyond the scope of a given investigation are strongly discouraged. Still, authors should strive to interpret results that exhibit no clear trend or that contradict their initial suppositions. Authors should indicate aspects of studies that would benefit from further research. For articles with implications for conservation or resource management, these should be stated.

Acknowledgments.—These should appear in the last paragraph prior to the Literature Cited section. The section heading should be indented, italicized, and followed by a period and em dash. Authors should acknowledge full names of individuals and organizations that contributed materially or financially to the project. Also, colleagues that contributed to only one or two of the aforementioned phases of a research project should be acknowledged using full names. Authors should not acknowledge editorial staff or anonymous peer reviewers. Where applicable, Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) protocol and/or research permit numbers must be stated here. Be direct. For example, for the current work: We thank David Bradford, Robert Brodman, R. Bruce Bury, Andrea Currylow, Sean Doody, Andrew Walde, Malcolm L. McCallum, Brian Miller, Nancy Karraker, Brian Smith, Stan Trauth, and Elizabeth Walton for reviewing drafts of this manuscript and pointing out errors and/or omissions. Please do not abbreviate first names.

LITERATURE CITED

Authors should strictly adhere to the citation formats presented below; otherwise, authors demonstrate a lack of attention to detail and expose themselves to increased scrutiny by editors and peer-reviewers. Likewise, authors should verify that the Literature Cited section contains all in-text citations and vice-versa. This section should be formatted such that there are no empty lines between references and the first line should be left justified with all other lines hanging by 0.33 cm (0.13 inches). Note that there should be only one space between elements of a given citation (e.g., between date and title, title and journal name) and no spaces between author initials. In citation titles, the first word following a colon should only be capitalized if it begins a complete sentence or is in a book title. Authors using bibliographic software (e.g., EndNote, Reference Manager, Zotero, Mendeley, or Sente) should remove all bibliographic formatting from the manuscript prior to submission as editors and reviewers cannot edit or make comments in the Literature Cited section when program codes are present. Failure to remove this formatting will result in manuscripts being returned without review.

Conference abstracts and submitted manuscripts that are not yet accepted should not be cited. Personal communications, as well as unpublished and non peer-reviewed reports, should be cited sparingly in running text rather than be included within the Literature Cited section (e.g., David Germano, pers. comm.; Patrick Gregory, pers. obs.; Raymond Saumure et al., unpubl. report; Ray Ashton, unpubl. data). Authors should not cite their own unpublished reports; rather, they are encouraged to summarize the information or place it within an appendix. Alternatively, authors may submit such pertinent data in manuscript form to *Herpetological Conservation and Biology*.

Websites are to be cited sparingly in running text using the following format: (Iowa Natural Resource Commission. 2009. Chapter 77: Endangered and Threatened Plant and Animal Species. Available from <https://www.legis.iowa.gov/docs/ACO/chapter/571.77.pdf> [Accessed 24 October 2018]). If a particular website is cited more than once, please abbreviate to (Iowa Natural Resource Commission. 2009. *op. cit.*) for all subsequent citations. Please ensure all hyperlinks work prior to submittal. There are two exceptions to web sites that must be cited in the text: those citing the International Union for Conservation of Nature (IUCN) and citations pertaining to the R statistical package. Because of the ubiquity of these web sites, we want them cited in Literature Cited (see below).

Order of citations is alphabetical and then chronological. For citations with the same first author, the order is single author, two authors, then three or more authors. Order multi-authored papers alphabetically (see Dodd example below). Please note the use of en dashes without adjacent spaces to separate numerals, whether the numerals represent statistics or a range of page numbers. As done in text, capitalize all specific common names of species in citations. If a citation has more than 10 authors, write out the first 10 names and then use et al. List the first author by last name, followed by a comma and first initials. If more than one author, list all subsequent authors by initials and then last name, and separate each name using a comma. Use “, and” before the last author. For books, theses, dissertations, and some serials, include the country of publication. Spell out country names entirely, except USA and UK.

Citation Formats

Journal Article:

- Dodd, C.K., Jr. 1991. The status of the Red Hills Salamander *Phaeognathus hubrichti*, Alabama, USA, 1976–1988. *Biological Conservation* 55:57–75.
- Dodd, C.K., Jr., and B.S. Cade. 1998. Movement patterns and the conservation of amphibians breeding in small, temporary wetlands. *Conservation Biology* 12:331–339.
- Dodd, C.K., Jr., and R.A. Seigel. 1991. Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? *Herpetologica* 47:336–350.
- Dodd, C.K., Jr., W.J. Barichivich, and L.L. Smith. 2004. Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily traveled highway in Florida. *Biological Conservation* 118:619–631.
- Dodd, C.K., Jr., K.M. Enge, and J.N. Stuart. 1989. Reptiles on highways in north-central Alabama, USA. *Journal of Herpetology* 23:197–200.
- Germano, D.J., and R.B. Bury. 1998. Age determination in turtles: evidence of annual deposition of scute rings. *Chelonian Conservation and Biology* 3:123–132.
- Iverson, J.B. 1991. Patterns of survivorship in turtles (order Testudines). *Canadian Journal of Zoology* 69:385–391.
- Iverson, J.B., S.J. Converse, G.R. Smith, and J.M. Valiulis. 2006. Long-term trends in the demography of the Allen Cays Rock Iguana (*Cyclura cychlura inornata*): human disturbance and density-dependent effects. *Biological Conservation* 132:300–310.
- McCallum, M.L., and S.E. Trauth. 2000. Curly-tail malformity in hatchlings of the Alligator Snapping Turtle, *Macrolemys temminckii* (Testudines: Chelydridae), from northeastern Arkansas. *Journal of the Arkansas Academy of Science* 54:150–152.

Book:

- Gibbons, J.W. 1983. *Their Blood Runs Cold: Adventures with Reptiles and Amphibians*. The University of Alabama Press, Tuscaloosa, Alabama, USA.
- Gibbons, J.W. (Ed.). 1990. *Life History and Ecology of the Slider Turtle*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA.
- Sokal, R.R., and F.J. Rohlf. 1995. *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*. 3rd Edition. W.H. Freeman and Company, New York, New York, USA.

Book Chapter:

- Brodman, R. 2005. *Ambystoma laterale*, Blue-spotted Salamander. Pp. 614–616 *In* *Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species*. Lannoo, M. (Ed.). University of California Press, Berkley, California, USA.
- Moore, M.C., and J. Lindzey. 1992. The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. Pp. 70–113 *In* *Biology of the Reptilia* 18. Gans, C., and D. Crews (Eds.). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Plummer, M.V. 1979. Collecting and marking. Pp. 45–60 *In* *Turtles: Perspectives and Research*. Harless, M., and H. Morlock (Eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, USA.

Thesis or Dissertation:

- Bjorndal, K.A. 1979. Nutrition and grazing behavior of the Green Turtle, *Chelonia mydas*, a seagrass herbivore. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, Florida, USA. 73 p.

Saumure, R.A. 1997. Growth, mutilation, and age structure of two populations of Wood Turtles (*Clemmys insculpta*) in southern Québec. M.Sc. Thesis, McGill University, Montréal, Québec, Canada. 70 p.

Published Report/Serial:

Crother, B.I., J. Boundy, F.T. Burbrink, J.A. Campbell, K. de Queiroz, D. Frost, R. Highton, J.B. Iverson, F. Kraus, R.W. McDiarmid, et al. 2008. Scientific and standard English names of amphibians and reptiles of North America north of Mexico, with comments regarding confidence in our understanding. 6th Edition. SSAR Herpetological Circular 37. 84 p.

Graves, B.M., and S.H. Anderson. 1987. Habitat suitability index models: Snapping Turtle. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 82 (10.141). 18 p.

Nicoll, M.E., and O. Langrand. 1989. Madagascar: Revue de la conservation et des aires protégées. World Wildlife Fund, Gland, Switzerland.

In Press:

Steen, D.A., M.J. Aresco, S.G. Beilke, B.W. Compton, E.P. Condon, C.K. Dodd, Jr., H. Forrester, J.W. Gibbons, J.L. Greene, G. Johnson, et al. In press. Relative vulnerability of female turtles to road mortality. Animal Conservation.

On-line Journals (that do not give volume and sequential page numbers):

Nifong, J.C., R.L. Nifong, B.R. Silliman, R.H. Lowers, L.J. Guillette, J.M. Ferguson, M. Welsh, K. Abernathy, and G. Marshall. 2014. Animal-borne imaging reveals novel insights into the foraging behaviors and diel activity of a large-bodied apex predator, the American Alligator (*Alligator mississippiensis*). PLoS ONE 9:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083953>.

IUCN and R package citations:

Choudhury, B.C., and A. de Silva. 2013. *Crocodylus palustris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013. International Union for Conservation of Nature. <http://www.IUCN.org>.

International Union for the Conservation of Nature (IUCN). 2018. IUCN Red List of Threatened Species, 2018. <http://www.iucnredlist.org>.

R Development Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Signorell, A. 2019. DescTools: tools for descriptive statistics. R package version 0.99.28. <https://cran.r-project.org/package=DescTools>.

Note, for these web sites, we do not want a date accessed to be listed. We treat these similarly to on-line journals.

Other Required Formats

Tables and figures.—Authors must create tables using the Tables function in MSWord (or similar). Authors should submit low-resolution figures/images in .png, .tif, or .jpg format imbedded within the

MS Word manuscript submitted for consideration. High-resolution images will be required by the Section Editor upon manuscript acceptance. Illustrations in color are accepted at no cost to the author(s) and we encourage photographs of subject animals taken by the author(s) if a good quality. Electronic manipulations and/or enhancement to original digital photographs must be disclosed in the figure title. Photographic data must also include the photographer's full name, which should be listed as: (Photographed by John L. Behler).

Author photographs and biosketches.—Authors should provide a photograph of each author as an image in .png, .tif, or .jpg format imbedded in the manuscript, accompanied by a brief biography (maximum 180 words). If more than three authors, limit biosketches to 90 words or fewer. For manuscripts with many authors, one or more group photos can be submitted; alternatively, only the most prominent authors of manuscripts with more than five authors can be featured. Include photographer's name as described above.

Appendices.—If appendices are > one page, then author biographies should precede the appendices. If, however, the appendices are ≤ one page, then author biographies should follow them. Appendices may include a variety of additional data: (1) large data sets; (2) translation of manuscript in a language other than English; and (3) additional illustrations (e.g., photographs, graphs, and/or maps). Please contact the appropriate Section Editor concerning guidelines for appendices.

Supplemental information.—The author may choose to provide additional information that may be useful to a reader, but not necessary to understand the paper. This material will not be reviewed or edited. At the discretion of the Section Editor in consultation with the Copy Editor, supplemental information may be placed at the end of article and not paginated or, if particularly long, will be accessed by a link within the article to a separate PDF file.

Photo gallery.—Besides the photographs included in their manuscript, authors of accepted manuscripts are encouraged to submit up to 20 high-quality digital images of their research subjects, sites, colleagues, techniques, habitats, etc. for the online photo gallery. Image files must be of the highest resolution possible (≥ 300 dpi), but not exceed 2 MB each. Inclusion in the photo gallery is at the sole discretion of the photo gallery Section Editor. Copyright is retained by the photographer.

The photo gallery can be viewed at: <http://www.herpconbio.org/x3/galleries/>. Once a manuscript has been accepted, photographic submissions should be forwarded to the Photo Gallery Editor.



RAYMOND A. SAUMURE began his career as a Research Associate for the National Museum of Canada's Herpetology Department while attending high school. He received his Bachelor of Science in Biology from the University of Guelph in Ontario, Canada. His Masters of Science and Doctor of Philosophy (2004) were bestowed by McGill University in Québec, Canada for his seminal research on the impacts of agriculture on the North American Wood Turtle, *Glyptemys insculpta*. He has been a member of four IUCN Species Survival Commissions: the Re-introduction, Conservation Breeding, Tortoise and Freshwater Turtle, and Crocodilian Specialist Groups. Ray is a member of the Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group (TFTSG) Steering Committee. Thus far, he has 40 publications, most of which are on the population ecology, parasitology, and conservation of freshwater turtles. Currently, he is co-editing the TFTSG monograph entitled Conservation Biology of Turtles and Tortoises. He serves on the Board of Directors, as a Managing Editor, and as Photo Gallery Editor of *Herpetological Conservation and Biology*. Ray is an Environmental Biologist for the Southern Nevada Water Authority. (Photographed by Andrew D. Walde).



DAVID J. GERMANO is a Professor Emeritus of Biology at California State University, Bakersfield, and is on the Board of Directors and is a Section Editor of *Herpetological Conservation and Biology*. He received his B.A. in Biology from California State University, Northridge, a M.S. in Wildlife Ecology from the University of Arizona, Tucson, and his Ph.D. in Biology from the University of New Mexico, Albuquerque, where he studied the growth and life history of North American tortoises (*Gopherus* spp.). His research interests involve population ecology and life-history analysis of small mammals, reptiles, and amphibians. He has conducted long-term studies of Blunt-nosed Leopard Lizards (*Gambelia sila*), Western Pond Turtles (*Emys marmorata*), North American tortoises, Desert Box Turtles (*Terrapene ornata luteola*), and various species of kangaroo rats (*Dipodomys* spp.), including a 24-y study of Giant Kangaroo Rats (*D. ingens*). (Photographed by David J. Germano).