

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA -**  
**PPGDIVBIO**



**UFAM**

**Revisão taxonômica e distribuição geográfica do  
complexo *Amazophrynella minuta* (Amphibia: Anura:  
Bufonidae) da região Amazônica**

**ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA**

**Manaus- Amazonas**

**Março - 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA -**  
**PPGDIVBIO**

**Revisão taxonômica e distribuição geográfica do  
complexo *Amazophrynella minuta* (Amphibia: Anura:  
Bufonidae) da região Amazônica**

**ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA**

**Orientador: Prof. Dr. TOMAS HRBEK**

**Co-Orientador: Prof. Dr. MARCELO GORDO**

Dissertação apresentada à  
Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Diversidade  
Biológica, Universidade Federal  
do Amazonas, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
mestre em Diversidade Biológica

**Manaus - Amazonas**

**Março - 2014**

## Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Rojas Zamora, Rommel Roberto

*R741r* Revisão taxonômica e distribuição geográfica do complexo  
Amazophrynella minuta (Amphibia: Anura: Bufonidae) da região  
Amazônica / Rommel Roberto Rojas Zamora. - 2014.

83 f. : il. color. ; 31 cm.

Dissertação (mestre em Diversidade Biológica) — Universidade  
Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Tomas Hrbek.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Gordo.

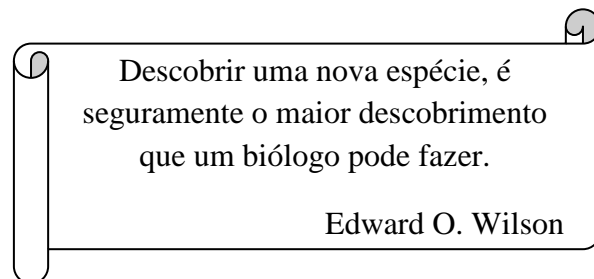
1. Anuro – Classificação - Amazônia 2. Anfíbio – Classificação –  
Amazônia 3. Bufo – Classificação – Amazônia 4. Anuro – Criação  
5. Anfíbio – Criação 6. Bufo – Criação I. Hrbek, Tomas, orientador  
II. Gordo, Marcelo, orientador III. Universidade Federal do Amazonas  
IV. Título

CDU (2007): 597.8(811)(043.3)

Poucas vezes são as ocasiões onde um filho tem a oportunidade de agradecer o esforço do seus pais; esta é uma de elas.

Dedico esta teses aos meus queridos Pais (Elvira e Roberto) por cuidar com empenho sua prole.

Para meus queridos vovós: Micaela, Otilia, Melitón e Jorge com grande respeito.



## AGRADECIMENTOS

Poucas vezes se conhece pessoas tão ligadas à ciência; agora sei que Einstein tinha algo de razão ao falar que todo cientista tem algo de maluco.

Aos professores Tomas Hrbek e Marcelo Gordo pela orientação constante, dedicação, apoio, conselhos e sua grande amizade. Eles não sabiam que uma tarde de março eu pareceria da nada com ideias extrapoladas, acho que uma pessoa aprende de exemplos. Obrigado.

Ao biólogo Vinicius Carvalho, ao qual conheci uma tarde (ao redor das 13:00 horas) pelo apoio, colaboração, orientação e a coisa mais grande que existe: a amizade.

Ao biólogo Mario Nunez MSc. um dos motores do LEGAL, por sua ajuda na parte molecular, seu apoio, colaboração e especialmente pela amizade

Ainda lembro aquele dia quando entrei no escritório da Dra. Izeni Farias, foi ela quem me ajudou encontrar um orientador e me abriu as portas para o Laboratório de Evolução e Genética Animal - LEGAL. Muito obrigado.

Ao Dr. Robson Ávila pelo apoio e contribuições no desenvolvimento do projeto *Amazophrynella*.

Ao Dr. Richard Vogt pela permissão no ingresso na Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

Aos Drs. Izeni Farias, Igor Kaefer e Ermelinda Oliveira pelos comentários e sugestões na aula de qualificação.

À Marcia e Lana por sua amizade e apoio; poucas pessoas são tão boas no mundo; pela colaboração na Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

Aos meus caros amigos do Laboratório de Evolução e Genética Animal - LEGAL: Jose “el patron”, Aline, Julia, Juliana, Valeria, Luciana, Waleska, Emanuel, Joice, Ana Paula I e II, Priscila, Sandra, Elciomar, Fabricio, Roberta I e II, Israela, Sara, Wancley, Gaby, Andre, Pedro, que suportaram toda minha maluques, ideias doidas e experimentos não pensados.

Aos meus amigos do Projeto Sauim: Alexandre, pelas conversas herpetológicas e saídas ao campo, Benedito e Tainara.

Aos meus amigos do Peru: Ian Medina pelo importante aporte no trabalho de campo no Perú, Richard Curto, Cilnio, Carlos, Tony, Mori, Odicio, Edson, Beder, Andy, Sally, Guti, Roberson, Mery; testemunhas da formação dum embrião de herpetólogo, que gosta dos sapos e sair a caminhar pelas noites no meio do mato.

Agradeço a Guissepe Gagliardi, por ser o meu primer professor na herpetologia e me passar algo da sua maluques científica, os “compilados” sempre foram uteis para mim.

Aos professores do programa de Pós-graduação pela colaboração na minha formação profissional.

Aos meus amigos peruanos no Brasil: Dick, Daniel I e II, Pedro Bracamonte, Gilson, Jomber, Lilia, Francis, Pablito, pelas tardes de domingos conversando sobre as incertezas do futuro incerto.

Ao professor Juan Castro da Universidad Nacional de la Amazonia Peruana-UNAP, sempre agradecido.

Aos meus amigos de Taracuá, Sr. Max, Sr. Gabriel, Sra. Vera e seus filhos, grandes representantes do povo Tucano, com os quais teve a honra de conviver, procurar os sapinhos e aprender do seus sonhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela licença de coleta concedida.

À UFAM e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica pela oportunidade para realizar este estudo e pelo apoio financeiro.

## Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>14</b>
<b>Estado taxonômico atual do gênero <i>Amazophrynella</i> (ANURA: BUFONIDAE) .....</b>	<b>16</b>
O complexo <i>Amazophrynella minuta</i> e as implicações na diversidade do gênero .....	18
Problemas taxonômicos do gênero <i>Amazophrynella</i> .....	21
Objetivos e justificativa.....	22
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>24</b>
<b>Sistemática do gênero <i>Amazophrynella</i> (Anfíbia:Anura:Bufonidae): revelando a diversidade críptica do complexo <i>Amazophrynella minuta</i>, com descrição dos cantos de anúncio.....</b>	<b>24</b>
Introdução.....	25
Materiais e Métodos .....	26
Amostragens herpetológicas .....	26
Visitas em coleções e museus zoológicos .....	26
Coleta de dados .....	26
Análises de dados .....	28
Resultados.....	29
Análise filogenético.....	29
Análises morfométricas.....	32
Análise Bioacústicas .....	37
História natural.....	42
Distribuição .....	43
Discussão.....	45
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>49</b>
<b>Redescrição de <i>Amazophrynella minuta</i> da localidade tipo e descrição morfológica de duas linhagens do complexo <i>Amazophrynella minuta</i> .....</b>	<b>49</b>

Introdução.....	50
Redescrição de <i>Amazophrynella minuta</i> (Melin, 1941) .....	51
<i>Amazophrynella</i> sp. “buriti” .....	58
<i>Amazophrynella</i> sp. “matses” .....	63
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>73</b>
Bibliografia.....	74
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
Anexo 1.Espécimes examinados .....	80
Anexo 2. Localidades, número do GeneBank e de Museu dos indivíduos utilizados para a construção da árvore filogenético. ....	81
Anexo 3. Artigo publicado na Zootaxa como parte do mestrado .....	84



## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

**Figura 1.** Divergência do gênero *Dendrophryniscus* e *Amazophrynella* com base nos dados moleculares (marcadores 16S, 12S e RAG-1). Retirado de Fouquet *et al.*(2012b).

**Figura 2.** Variações morfológicas do complexo *Amazophrynella* gr. *minuta*. A) Puerto Almendras, Peru (Foto: Giuseppe Gagliardi); B) Reserva Pucacuro, Peru, (Foto: Ian Medina); C) Amazônia do Equador (Foto: Martin Bustamante); D) Taracua, São Gabriel da Cachoeira, Brasil; E) Fundo UNAP, Peru; F) Nuevo Salvador, Peru.

### Capítulo I

**Figura 1.** Mapa de distribuição de *Amazophrynella*, as cores representam as linhagens na árvore. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança inferidas a partir do fragmento 16S rDNA.

**Figura 2.** Análise morfométrica de *Amazophrynella* construído utilizando os dois primeiros componentes principais.

**Figura 3.** Análise morfométrica do complexo *Amazophrynella minuta* construída utilizando os dois primeiros componente principais.

**Figura 4.** Comparações no tamanho (SVL) entre as linhagens de *Amazophrynella* encontrados neste trabalho.

**Figura 5.** Oscilograma e espectrograma de três notas dos cantos de: **A)** *Amazophrynella vote*; **B)** *A. bokermanni*; **C)** *A. sp* (linhagem A); **D)** *A. manaos*.

**Figura 6.** Oscilograma e espectrograma de uma nota dos cantos de: **A)** *Amazophrynella vote*; **B)** *A. bokermanni*; **C)** *A. sp*. (linhagem A); **D)** *A. manaos*.

**Figura 7.** Características gerais dos habitats das espécies de *Amazophrynella*. A) Serrapilheira, onde as espécies ocorrem; B) Vegetação ao redor de uma pequena poça reprodutiva das spp. do gênero.

**Figura 8.** Mapa de distribuição de todas as linhagens e espécies de *Amazophrynella* encontradas neste estudo.

## Capítulo II

**Figura 1.** *Amazophrynella minuta* da localidade tipo, Taracuí, Rio Uaupés, Amazonas Brasil em amplexo.

**Figura 2.** Estado atual dos sítipos de *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941); NHMG 462, 465, Taracuí, Rio Uaupés, Amazonas, Brasil.

**Figura 3.** Comparação de algumas características diagnosticas do gênero *Amazophrynella*. A, B, C) *Amazophrynella minuta* (INPA-H 31725); D, E, F) *A. manaos* (espécie não coletada); G, H, I) *A. bokermanni* (INPA-H 31863); J, K, L) *A. vote* (INPA-H 31870); M, N, O) *A. sp.* “buriti” (linhagem A); P, Q, R) *A. sp.* “matses” (linhagem D). A, D, G, J, M, P são as formas do focinho e cabeça; B, E, H, K, N, Q textura dorsal da pele; C, F, I, L, O, P textura ventral da pele e formas das manchas.

**Figura 4.** Variação entre espécimes de *Amazophrynella minuta* da localidade tipo. A-C) fêmeas adultas; D-E) machos adultos.

**Figura 5.** Topótipos de *Amazophrynella minuta* em preservação. A-C) espécimes machos (INPA-H 32736, 32723, 32722); D-F) espécimes fêmeas (INPA-H 32731, 32725, 32723).

**Figura 6.** Indivíduo de *Amazophrynella sp.* “buriti” (MZUNAP-901). A) vista dorsal; B) vista ventral; D) vista ventral da cabeça; E) vista ventral do pé direito; F) vista ventral da mão direita

**Figura 7.** Indivíduos de *Amazophrynella sp.* “buriti”. A-C) fêmeas adultas, MZUNAP 905, MZUNAP 905, MZUNAP 242; D-F) machos adultos, MZUNAP 887, MZUNAP 908, MZUNAP 902.

**Figura 8.** Padrões de variação no ventre de *Amazophrynella sp.* “buriti” note-se a presença de manchas grandes e a coloração do ventre amarelo intenso. A-F) espécimes fêmeas (Foto E ©Guissepe Gagaliardi); G-L) espécimes machos.

**Figura 9.** Indivíduos de *Amazophrynella sp.* “matses” (MZUNAP 921); A) vista dorsal; B) vista ventral; C) forma da cabeça (vista dorsal); D) forma da cabeça (vista lateral); E) forma da cabeça (vista lateral).

**Figura 10.** Espécimens de *Amazophrynella* sp. “matses”. A-C) fêmeas adultas, MZUNAP 928, MZUNAP 931, MZUNAP 947; D-F) machos adultos, MZUNAP 922, MZUNAP 920, MZUNAP 923.

**Figura 11.** Formas das cabeças em vista, dorsal, ventral e lateral de: A) *Amazophrynella* sp. “matses” (MZUNAP 921); B) *A. minuta* (INPA-H 32740); C) *A. sp.* “buriti” (MZUNAP 908). A seta em *A. sp.* “matses” indica a protuberância nasal nas bordas; e em *A. sp.* “buriti” indica a protuberância triangular no final do focinho (escala=3.2mm).

**Figura 12.** Comparação entre as mãos e os pés de: A) *Amazophrynella* sp. “buriti” (MZUNAP 901); B) *A. minuta* (INPA-H 32740, topótipo) da localidade tipo; C) *A. sp.* “matses” (MZUNAP 931). As setas indicam a existência ou ausência de membranas no I e III dedos da mão e a forma do tubérculo palmar de *A. sp.* “buriti” e *A. sp.* “matses”.

**Figura 13.** Padrões de variação no ventre de *Amazophrynella* sp. “matses” sp. nov. note-se a presença de manchas grandes e a coloração do ventre amarelo intenso. A-C) espécimes fêmeas; G-L) espécimes machos. Note-se a menor quantidade de ocelos e manchas no ventre.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Distância genética entre linhagens de *Amazophrynella* utilizando o gene 16S rDNA, entre os parênteses se encontram o número de amostras.

Tabela 2. Dois primeiros componentes principais construídos com as medidas morfológicas (log10-resíduos das regressões) de todas as linhagens de *Amazophrynella*.

Tabela 3. Dois primeiros componentes principais construídos com as medidas morfológicas (log10-resíduos das regressões) do complexo *Amazophrynella minuta*.

Tabela 4. Comparação entre as variáveis bioacústicas de algumas espécies do gênero *Amazophrynella* (canto do espécime da localidade tipo não disponível).

### Capítulo II

Tabela 1. Médias das medidas morfométricas entre as variáveis morfológicas de indivíduos machos das espécies de *Amazophrynella*. Significado das abreviaturas encontra-se em material e métodos.

## Resumo

*Amazophrynella* é um gênero da família Bufonidae que durante muito tempo não recebeu um tratamento taxonômico adequado; como por exemplo a espécie *A. minuta*; que provavelmente representa um complexo de espécies. No presente estudo foi realizada uma revisão da taxonômica e sistemática do gênero *Amazophrynella*; especialmente tentando revelar a diversidade biológica e evolutiva críptica no complexo *A. minuta*. O estudo foi realizado integrando dados filogenéticos, utilizando o gene 16S rRNA, morfométricos, através dos análises de componentes principais das medidas dos organismos, bioacústicos, pelo análises e comparação dos cantos de anúncio, e morfológicos, através da comparação de caracteres merísticos de todas as quatro espécies conhecidas do gênero. Nossos resultados filogenéticos mostraram a existência de oito linhagens de *Amazophrynella*; quatro dos quais são espécies nominais conhecidas e as outras quatro linhagens representam potenciais espécies novas. As distâncias genéticas mostraram uma alta divergência entre todas as linhagens (maior que 4%). A comparação dos cantos de anúncio mostraram diferenças nas frequências, tamanho da nota, e número de pulsos e as análises de componentes principais indicaram divergências na forma e tamanho entre algumas linhagens filogenéticas encontradas. Com a necessidade de melhorar a taxonomia do gênero, *A. minuta* foi redescrita com base em topótipos coletados na localidade tipo, gerando novos caracteres diagnósticos e uma descrição mais completa da espécie. Duas linhagens do gênero encontradas neste trabalho foram descritas morfológicamente; observando-se profundas diferenças morfológicas entre elas. Baseado em nossos resultados, sugerimos a continuidade dos estudos integrativos deste gênero.

## Abstract

*Amazophrynella* is a genus of the family Bufonidae. Actually the genus remains problematic taxonomically; the difficulty lays principally in the lack of diagnostic characters in the original description of *A. minuta*, the lack of molecular data and refined taxonomic comparison of individuals through its wide distribution. In this study a partial taxonomic revision of the genus *Amazophrynella* was performed; especially trying to reveal the evolutionary and biological diversity hidden in the *A. minuta* complex. The study was conducted integrating several sources of data: (1) phylogenetic, using the 16S rRNA; (2) morphometric, through the principal component analysis measures of organisms; (3) bioacoustics, by comparison of the advertisement calls, and (4) morphological, by comparing meristic characters. Our results showed the existence of eight lineages of *Amazophrynella*, four of which are known nominal species and the other four strains represent potential new species. The genetic distances showed a high divergence between all strains (higher than 4%). The comparison of the bioacoustic data showed differences in frequency, note size, and number of pulses, while the principal component analysis indicated differences in size and shape between some phylogenetic lineages found. With the need to improve the taxonomy of the genus, *A. minuta* was redescribed based on topotypes collected at the type locality, generating new diagnostic characters and a more complete description of the species. Two phylogenetic lineages of the genus found in this study were described morphologically; observing profound morphological differences between them. Based on our results, we suggest continuing studies of this genus.

FORMATAÇÃO:

Os capítulos da dissertação seguem as normas do periódico *Zootaxa*

## INTRODUÇÃO GERAL

**Estado taxonômico atual do gênero *Amazophrynella* (ANURA:  
BUFONIDAE)**



O gênero *Amazophrynella* Fouquet, Recoder, Teixeira, Cassimiro, Amaro, Camacho, Damasceno, Carnaval, Moritz, & Rodrigues 2012, compreende anuros de pequenos tamanhos com divergência prematura entre os bufonídeos (Pramuk *et al.*, 2008; Van Bocxlaer *et al.*, 2010) atualmente representado por quatro espécies nominais: *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941), *A. bokermanni* (Izecksohn, 1993), *A. vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais, 2012 e *A. manaos* Rojas, Carvalho, Gordo, Ávila Farias & Hrbek, 2014 (Rojas *et al.*, 2014). As espécies do gênero encontram-se distribuídas no Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana francesa e presumivelmente em Suriname (Fouquet *et al.*, 2012b; Frost, 2014). Todas as espécies ocorrem no Brasil e só *A. minuta* possui uma vasta distribuição ao longo de sete países do bioma Amazônico.

A história taxonômica do gênero começou em 1941, quando Douglas Melin, um naturalista Sueco, descreveu *Atelopus minutus* na localidade de Missão Taracuí, localizada na margem direita do rio Uauapés, borda da fronteira entre Brasil, Colômbia e Venezuela. Em 1971 Roy McDiarmind, através de um extenso estudo comparativo entre espécies de *Atelopus*, *Dendrophryniscus* e *Oreophrynella* incluiu *Atelopus minutus* como parte do gênero *Dendrophryniscus*.

No ano de 1993, Eugenio Izecksohn descreveu *Dendrophryniscus bokermanni* da localidade de Parintins, estado do Amazonas, Brasil. Recentemente, Fouquet *et al.* (2012b) através de um estudo envolvendo dados moleculares e morfológicos separou as espécies de *Dendrophryniscus* da Amazônia daquelas conhecidas da Mata Atlântica, propondo um novo gênero: *Amazonella* para: *D. minutus* e *D. bokermanni*, como o nome concordava com um gênero de ácaros foi renomeado como o gênero *Amazophrynella* (Fouquet *et al.*, 2012b). Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais, 2012 descreveram *A. vote* da Fazenda de São Nicolau, Cotriguaçu, Mato Grosso, Brasil; e Rojas, Carvalho, Gordo, Ávila Farias & Hrbek, 2014 descreveram *A. manaos* da parte sul dos escudos das Guianas.

Nos estudos de Fouquet *et al.* (2012b) os dados moleculares dos genes mitocondriais 16S, 12S e nuclear RAG-1, evidenciaram uma divergência profunda entre as espécies de *Amazophrynella* e *Dendrophryniscus* (Figura 1), que geravam como resultado a formação de dois clados monofiléticos, agrupando separadamente as

espécies de *Dendrophryniscus* da Mata Atlântica e as espécies da Amazônia. Entretanto, as análises morfométricas mostraram a formação de dois grupos que divergiam no plano morfométrico: o grupo de *Dendrophryniscus* da Mata Atlântica e o grupo da Amazônia.

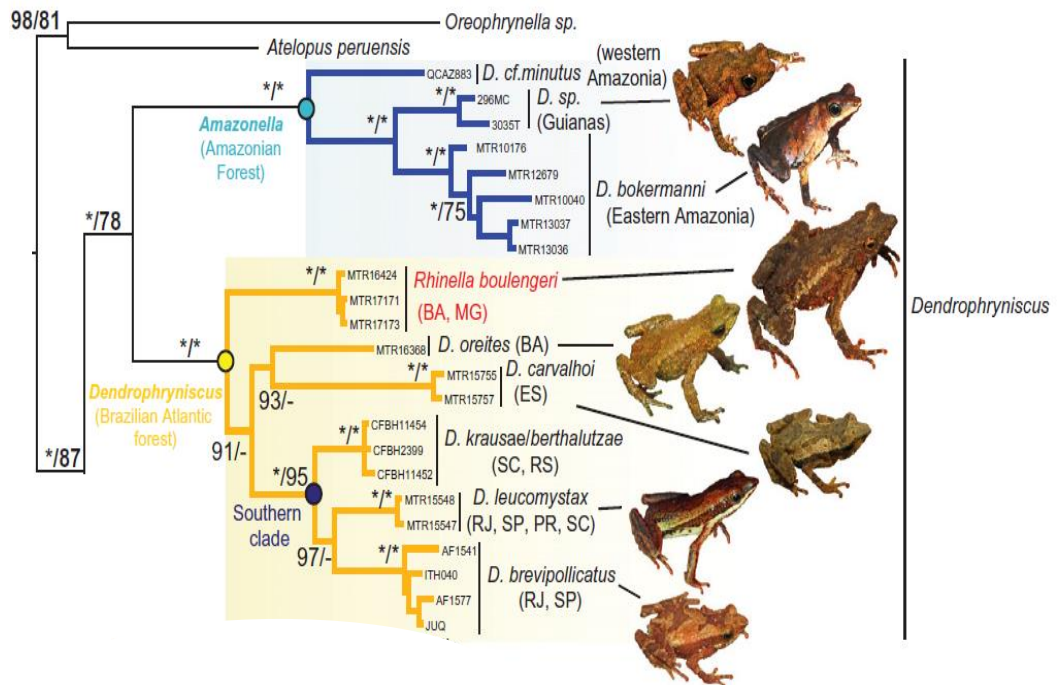


Figura 1. Divergência do gênero *Dendrophryniscus* e *Amazophrynella* com base nos dados moleculares (marcadores 16S, 12S e RAG-1). Retirado de Fouquet *et al.* (2012b)

Dessa forma, o gênero *Amazophrynella* é claramente diferenciado pelos padrões morfológicos e moleculares do seu antigo gênero *Dendrophryniscus*. Entretanto, apesar de *A. minuta* ser considerada como um potencial complexo de espécies crípticas (Rojas *et al.*, 2014), não existem estudos com análises filogenética e morfológica que abranjam amostragens populacionais densas desse grupo.

### O complexo *Amazophrynella minuta* e as implicações na diversidade do gênero

Nas análises moleculares realizadas por Fouquet *et al.* (2012b) foram identificadas um total de duas linhagens de *Amazophrynella minuta* (dados de indivíduos da localidade tipo não foram incluídos): uma linhagem pertencia a uma espécie de *Amazophrynella* distribuída nos escudos das Guianas e a outra da parte este da Amazônia do Equador (mais perto da localidade tipo).

As evidências moleculares indicaram a possível existência de um complexo de espécies dentro de *Amazophrynella minuta*, e adicionando a indisponibilidade de amostras de outros países, incluindo o Brasil, permanecendo um grande mistério taxonômico a quantidade de espécies escondidas e erroneamente chamadas de *A. minuta* (Rojas *et al.*, 2014) (Figura 3).



**Figura 3.** Variações morfológicas do complexo *Amazophrynella* gr. *minuta*, A) Puerto Almendras, Peru (Foto: Giuseppe Gagliardi); B) Reserva Pucacuro, Peru, (Foto: Ian Medina); C) Amazônia do Equador (Foto: Martin Bustamante); D) Taracua, São Gabriel da Cachoeira, Brasil; E) Fundo UNAP, Peru; F) Nuevo Salvador, Peru.

A literatura sobre as discussões taxonômicas de *Amazophrynella minuta* permanece escassa; Duellman (1978) reportou variações geográficas no padrão de coloração ventral. Cannatella & Hoogmoed em Frost (1985) indicaram a provável existência de duas espécies de *Amazophrynella minuta* ocorrendo no Equador, no Peru. Rodrigues & Duellman (1994) descreveram indivíduos com uma coloração ventral

avermelhada, diferente da descrição original. De la Riva *et al.* (2010) reportaram pela primeira vez sua ocorrência dentro do território Boliviano.

Ultimamente muitos estudos sugerem a existência de uma grande quantidade de diversidade escondida nos anuros, e o uso da taxonomia integrada contribuiu para o descobrimento e descrição de uma diversidade críptica e novas espécies para a ciência (e.g. Fouquet *et al.*, 2007; Padial & De la Riva, 2009; Simões *et al.*, 2010; Funk *et al.*, 2011; Ron *et al.*, 2012; Caminer & Ron, 2014). A identificação de linhagens evolutivos independentes é sumamente importante para interpretações de conservação, ecologia de comunidades, padrões macroecológicos e acrescentar o número de espécies numa área (Fouquet *et al.*, 2007; Padial & De la Riva 2009).

Muito pouco foi discutido sobre os padrões taxonômicos e de distribuição de *Amazophrynella minuta*. Um estudo aplicando a taxonomia integrativa poderia revelar unidades evolutivas independentes e identificar espécies novas dentro do complexo de *A. minuta*.

Uma hipótese filogenética que incluía maior quantidade de amostras, incluindo aquelas da localidade tipo, assim como o uso da taxonomia tradicional é crucial para identificar os limites entre as espécies e começar a revelar esta diversidade escondida do gênero.

### **Determinando limites de espécies em anuros.**

Delimitar os limites entre as espécies é um processo fundamental para as ciências biológicas, especialmente em estudos taxonômicos. Num ponto do trabalho de Miralles & Vences (2013), discutem a eficiência do uso de um conjunto integrado de evidências biológicas para a delimitação de espécies. A taxonomia integrativa é uma delas.

Para a descrição de novas espécies, é necessário diagnosticar alguns caracteres morfológicos que em ausência de fluxo genético, torna-se mais evidente (ver Padial *et al.*, 2010). No caso dos padrões bioacústicos, os cantos de anúncio são indicadores de divergências evidentes; pois o reconhecimento é espécie-específico e a modificação dos parâmetros bioacústicos pode influenciar no reconhecimento do macho da espécie pela fêmea (Hold, 1977; Zimmermam, 1983; De la Riva *et al.*, 1997) A abordagem

filogenética é amplamente utilizada nas reconstruções genealógicas, relações sistemáticas, no delineamento de espécies e inferências de processos evolutivos, e na diversificação de um dado taxón em relação à sua distribuição geográfica (Avice, 1987).

A delimitação de espécies tem que estar suportada por várias linhas de evidências independentes e ao mesmo tempo integrada. Viettes *et al.* (2009) e Padial *et al.* (2010) discutem a existência de espécies candidatas não confirmados (Unconfirmed Candidate Species-UCS) quando uma população mostra divergência genética ou morfológica das outras populações dentro da mesma espécie nominal, mas a evidência da linhagem é inconclusiva, e de espécies candidatas confirmadas (Confirmed Candidate Species-CCS) onde a evidência é conclusiva sobre a existência de uma nova espécie, mas os dados disponíveis é considerado insuficiente para fornecer uma descrição precisa da espécie. Estas categorias inclusivas indicam a necessidade de possuir uma quantidade de evidência suficiente para delimitar as espécies, se somado as evidências morfológicas, bioacústicas, genéticas e de distribuição geográfica.

Há uma grande quantidade de estudos indicando a existência de diversidade subestimada de anuros (e.g. Elmer *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2007; Padial & De la Riva, 2009; Caminer & Ron, 2014); este fenômeno exige o estudo da variação espacial em longa escala na riqueza de espécies para identificar áreas que merecem atenção especial de conservação (Viettes *et al.*, 2009) e começar a revelar padrões taxonômicos que desvendem a diversidade escondida em gêneros crípticos. Apesar do aumento nas descrições de espécies de anfíbios na Amazônia, atualmente sabe-se que as regiões tropicais são as menos estudadas no mundo (Fouquet *et al.*, 2007).

Neste estudo consideramos potenciais espécies como aquelas que se apresentem com uma linhagem independente de ancestrais-descendentes; sejam distintas ao menos um caractere morfológico que possam ser utilizados para sua diagnoses e possuam parâmetros bioacústicos diferentes.

### **Problemas taxonômicos do gênero *Amazophrynella***

Em sumario os problemas taxonômicos que atualmente envolvem o gênero *Amazophrynella* incluem:

- A inexistência de uma hipótese filogenética que incluía todas as espécies do gênero e um espaço geográfico insuficiente, que permita identificar linhagens independentes e abordar a sistemática molecular desde uma nova perspectiva taxonômica;
- Uma descrição pouco detalhada de *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941) (espécie tipo do gênero), descrita somente com base em seis espécimes, atualmente depositados na Europa (Suécia) onde os espécimes da série tipo encontram-se em péssimo estado de conservação o que dificulta a comparação dos caracteres diagnósticos;
- A deficiente amostragem de *Amazophrynella minuta* dentro da sua ampla distribuição, e a carência de literatura e dados moleculares dificulta a identificação de novas linhagens;
- A falta de uma abordagem taxonômica que abranja a comparação e descrição de caracteres diagnósticos e análises morfométricas entre as espécies de *Amazophrynella*; e finalmente
- A ausência de dados bioacústicos dos cantos de anúncio entre as espécies de *Amazophrynella* que poderiam contribuir ao refinamento taxonômico do gênero.

### **Objetivos e justificativa**

Durante décadas, as espécies do gênero *Amazophrynella* não receberam um tratamento taxonômico adequado, ocasionando uma subestimação da diversidade de espécies dentro do gênero. A dificuldade de coletas por serem anfíbios de coloração críptica, pequenos e ocasionalmente encontrados perto de poças (Magnusson & Hero, 1991, Fouquet *et al.*, 2012a) junto com a localização tão longe da localidade tipo (Taracuí, município de São Gabriel da Cachoeira, Brasil) correspondem circunstâncias que fazem de *Amazophrynella*, um gênero de difícil estudo.

O objetivo de este estudo foi revisar a taxonomia e sistemática das espécies de *Amazophrynella* e propor uma hipótese filogenética, redescrever *Amazophrynella*

*minuta* da localidade tipo e realizar uma revisão taxonômica parcial do gênero utilizando os dados morfológicos, bioacústicos e genéticos.

## CAPÍTULO I

**Sistemática do gênero *Amazophrynella* (Anfíbia: Anura: Bufonidae):  
revelando a diversidade críptica do complexo *Amazophrynella minuta*,  
com descrição dos cantos de anúncio**



## Introdução

*Amazophrynella* é um gênero de pequenos anuros da família Bufonidae endêmicos de sul América, encontram-se distribuído por toda a Amazônia abrangendo os países da Bolívia, Peru, Brasil, Equador, Colômbia, Venezuela e a região pan-amazônica das Guianas (Fouquet *et al.*, 2012a; Frost, 2013). Atualmente são conhecidas um total de quatro espécies nominais: *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941), *A. bokermanni* (Izecksohn, 1993), *A. vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais, 2012 e *A. manaos* Rojas, Carvalho, Gordo, Ávila, Ávila, Farias & Hrbek 2014 (Rojas *et al.*, 2014).

Todas as espécies do gênero apresentam um claro dimorfismo sexual e se reproduzem em charcos estacionais (Izecksohn, 1968). Seu habitat exclusivo é a serrapilheira e possuem uma atividade diurna (Magnusson & Hero, 1991; Lima *et al.*, 2006; Ávila *et al.*, 2012), no entanto o conhecimento da sua ecologia, comportamento reprodutivo, hipóteses filogenéticas intra e inter- espécies, assim como outras características biológicas da sua história natural e sistemática são escassas.

A monofilia do gênero foi suportada consistentemente pela morfologia, distribuição, comportamento e sinapomorfias moleculares (Fouquet *et al.*, 2012b; Rojas *et al.*, 2014). A existência de um complexo de espécies relacionadas com *A. minuta* é conhecida (Fouquet *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2012b; Rojas *et al.*, 2014). No entanto na atualidade não existem hipóteses filogenéticas que abranjam populações de *A. minuta* ao longo da sua extensa distribuição, não existem estudos que descrevam os cantos de anúncio das espécies do gênero e os trabalhos sobre morfometria são inexistentes.

Neste estudo propomos uma nova hipóteses filogenética do gênero *Amazophrynella*, centrando-nos no complexo *A. minuta*, geramos dados de distancias genéticas, descrevemos os cantos de anúncio de todas as espécies conhecidas, realizamos análises morfométricas e geramos novos dados sobre a distribuição das espécies do gênero. Nosso resultados sugerem a existência de uma diversidade subestimada do complexo *A. minuta*, são descritas os cantos de anúncio das quatro espécies nominais, e nossos análises morfométricas sugerem uma evolução morfológica

conservativa. É necessário continuar os estudos taxonômicos de este gênero, que permita revelar sua diversidade críptica.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostragens herpetológicas**

As amostragens herpetológicas foram realizadas ao longo da distribuição das espécies do gênero *Amazophrynella*. O método aplicado foi de procura ativa. O horário de amostragem foi entre as 8:00 até as 10:00 e das 15:00 até as 17:00 horas, horário de maior atividade das espécies (observação pessoal). Foram aplicados também amostragens nas zonas de reprodução, visando encontrar indivíduos cantando ou se reproduzindo. No apêndice 1 estão listados os indivíduos examinados e as localidades amostradas.

### **Visitas em coleções e museus zoológicos**

Foram visitados e realizadas parcerias das coleções e museus zoológicas. Estas coleções foram estrategicamente selecionadas, com o objetivo de tentar abranger a maior quantidade de lugares onde as espécies do gênero ocorrem. As coleções foram:

- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-H), Brasil.
- Museu de Zoologia da Universidad Nacional da Amazônia Peruana (MZUNAP), Peru.
- Coleção de anfíbios da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT-A), Brasil
- Naturhistoriska Museet, Göteborg (NHMG), Suecia.

### **Coleta de dados**

**Dados moleculares.** O DNA total foi extraído através do método de extração de proteinase K e fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Foram amplificados fragmentos do DNA mitocondrial 16Sar e 16Sbr (Palumbi, 1996) obtendo um total de 480 pb via reação em cadeia da polimerase (PCR).

O processo de amplificação foi conduzido como segue: 92°C (1 min), 35 ciclos de 92°C (1 min), 50°C (50 s), 72°C (5 min). O volume final das reações da PCR foi de 12 µL e continha 4.4 µL ddH<sub>2</sub>O, 1.5 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL de 10 mM dNTPs (2.5mM each dNTP), 1.25 µL de 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 µL da solução de 2 µM de cada primer, 0.3 µL de Taq DNA Polymerase 5 U/µL (Biotools, Espanha) e 1 µL de DNA (cerca de 30 ng/µL). As reações de sequenciamento foram seguindo as indicações do fabricante ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing protocol. O sequenciamento foi realizado num sequenciador automático ABI 3130xl.

Obtivemos um total de 480 pb do gene 16S rDNA de um total de 124 indivíduos. Foram elegidos 47 indivíduos do gênero *Amazophrynella* com os quais se realizaram as análises. Adicionalmente obtivemos sequencias do Genbank de *Amazophrynella* cf. *minuta* e *Amazophrynella* sp. de Darst & Canatella (2004) e Pramuk (2006), e quatro sequencias de *A. bokermanni* de Fouquet *et al.* (2012a).

**Dados morfológicos.** Os caracteres morfológicos foram estudados seguindo ao Kok & Kalamandeen (2008), Cruz & Fussinato (2008) e Fouquet *et al.* (2012b). O sexo foi determinado pela observação de gônadas. A coloração foi notada em vida e em espécimes preservados. Os acrônimos das coleções e museus se encontram disponíveis em Frost (2014) exceto Museu de Zoologia de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana- MZUNAP e Universidade Federal do Mato Grosso- UFMT-A.

As medições morfológicas foram realizadas utilizando um paquímetro digital com uma precisão de 0.01 mm com ajuda de uma lupa estereoscópica para evitar falsas precisões. As medições das variáveis morfométricas para cada espécime foram abreviadas como segue (em inglês):

SVL (Snout Vent Length, comprimento rosto-cloaca) desde a ponta do nariz até a margem posterior da cloaca; HL (Head Length, comprimento da cabeça) borda posterior da mandíbula até a ponta do focinho; HW (Head Length, largura da cabeça) maior largura da cabeça geralmente ao nível das bordas posteriores do tímpano; ED (Eye diameter, diâmetro do olho) da borda posterior das narinas até a borda anterior do olho; IND (Inter-Nasal Distance, distancia internasal) distância entre as margens das narinas; SL (Snout Length, comprimento do focinho) margem anterior do olho até a

ponta do focinho; HL (Hand Length, comprimento da mão) da borda proximal do tubérculo palmar até a ponta do dedo III; UAL (Upper Arm Length, comprimento do antebraço) desde a margem da inserção do corpo até a ponta do cotovelo; THL (Thigh Length, comprimento da coxa) desde a cloaca até a borda exterior do joelho; TL (Tibial Length, comprimento da tibia) desde a borda exterior do joelho até a ponta do calcanhar; TAL (Tarsal Length, comprimento do tarso) desde o calcanhar até a borda do tubérculo metatarsal interno; FL (Foot Length, comprimento do pé) a partir da borda proximal do tubérculo interior do metatarso até a ponta do dedo IV.

Em amostras muito antigas são muito imprecisas realizar as medições da distância Interorbital (IOD) e do tamanho das pálpebras (UEW) pelo estado de conservação das mesmas, que pode ocasionar confusões nas análises morfométricas; por esse motivo não foram incluídas aquelas variáveis nas análises.

**Gravações dos cantos de anúncio.** As vocalizações foram gravadas utilizando um equipamento de gravador digital Handy Recorder H1 com um microfone uni-direcional YOGA HT-81 (numa distância máxima de 1-1.5 metros). Os cantos foram editados utilizando o Software Audacity 1.2.6 para Windows (Mazzoni & Dannenberg, 1999). O programa Praat 4.5.02 para Windows (Boersma & Weenink, 2006) foi utilizado para gerar os audioespectrogramas e oscilogramas.

### **Análises de dados**

**Análise filogenética.** Foram executadas análises filogenéticas utilizando os algoritmos da Máxima verossimilhança (ML). O modelo molecular foi determinado utilizando Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike, 1973) implementado no Modeltest (Posada, 2008). O modelo elegido foi GTR+G+I. com *Partition rate* Optimum, *search depth* 2, com *Edged support* (LW-ELW) positivo e um *start tree* inferido por Neighbor joininh. As análises filogenéticas de Máxima verossimilhança (ML) foram inferidas utilizando o programa Treefinder (Jobbs, 2008). O suporte filogenético foi avaliado via 10000 replicações non-parametric bootstrap (Felsenstein, 1985). Adicionalmente das distâncias não corrigidas (p-distâncias) intra e interespecíficas foram calculadas no MEGA v5. 05 (Tamura *et al.*, 2007).

**Análise estatístico de dados morfométricas.** Foi utilizado análises multivariadas no objetivo de avaliar o grau de variação e diferenciação morfométrica entre as linhagens e espécies de *Amazophrynella*. Foi aplicada uma Análises de Componentes principais (ACP) utilizando-se os resíduos das regressões entre o SVL e o resto das variáveis morfométricas (transformadas em log10) para remover os efeitos globais do comprimento do corpo (Parmalee, 1999).

A Análises de Componentes Principais (ACP) é uma técnica de redução de dados, e usada amplamente para revelar padrões de divergências morfológicas onde conjuntos de variáveis relacionadas são agrupados em componentes capazes de mostrar as tendências de variações de um conjunto de dados (Reis, 1988). Os dois primeiros componentes principais (ACP) resultantes foram usados para realizar uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) e assim testar se existem diferenças significativas entre as variáveis morfométricas das espécies. Foram comparados também as médias do SVL entre as espécies de *Amazophrynella* através de um Análise de Variância (ANOVA) para observar a diferenciação no tamanho. Todas as análises foram realizadas no programa PAST v.2.07 (Hammer *et al.*, 2001) num nível de significância de 5%. Foram utilizados apenas espécimes machos adultos para as análises.

**Análises bioacústicas.** Analisamos os seguintes caracteres quantitativos: comprimento do canto (ms); intervalo entre notas (silêncio entre notas) (ms); comprimento da nota (ms); frequência dominante (Hz); frequência fundamental (Hz), e número de pulsos. Estas variáveis são consideradas como as mais utilizadas nas descrições e análises dos cantos de anúncio nos anuros (e.g. Hold, 1977; Márquez *et al.*, 1995; Köhler & Lotters, 1998; Bosch & De la Riva, 1999, Padial & De la Riva, 2009).

## **Resultados**

### **Análise filogenético.**

Em nossas análises foi observado que o gênero *Amazophrynella* é o grupo irmão de *Dendrophryniscus*. Dentro do gênero *Amazophrynella* pode se distinguir como grupos monofiléticos as quatro espécies nominais: *A. minuta sensu stricto* (90% bootstrap), *A. bokermanni* (95% bootstrap), *A. vote* (99% bootstrap) e *A. manaos* (98% bootstrap). Das populações de anuros denominados como *A. minuta* é possível distinguir a existência de quatro linhagens independentes (Figura 1).

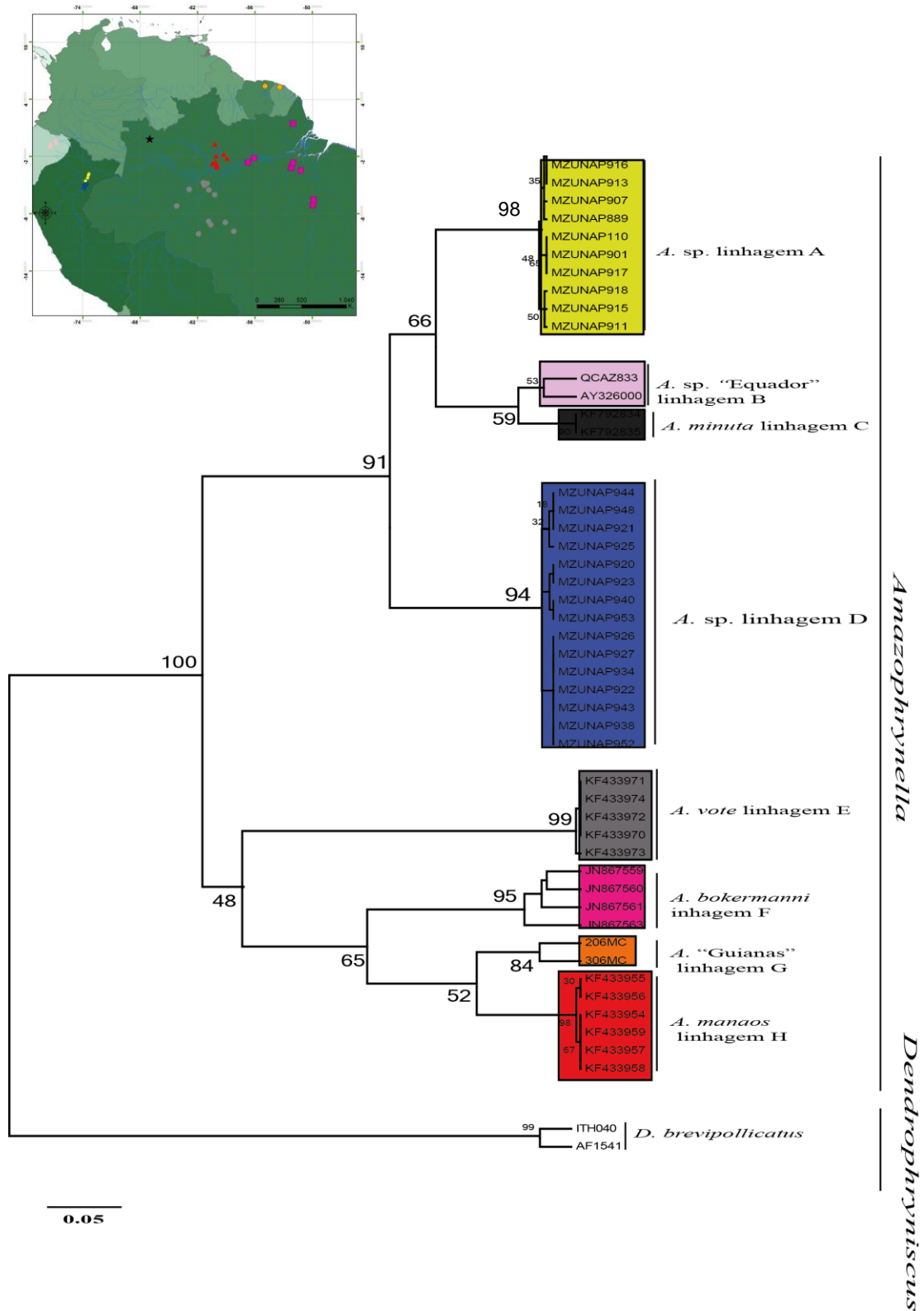


Figura 1. Mapa de distribuição de *Amazophrynella*, os cores representam as linhagens na árvore. Árvore filogenético de Máxima Verossimilhança inferidas a partir do fragmento 16S rDNA.

Na árvore filogenética se observa uma linhagem (A) (98% bootstrap) sem nome, atualmente conhecida como *A. minuta*. Encontra-se representada por espécimes de quatro localidades do norte do rio Amazonas: Puerto Almendras, Fazenda Zamora, Fazenda UNAP e Nauta, Peru. Possui uma divergência de 6% de *A. minuta* e uma diferenciação intraespecífica de 2%. (Tabela 1).

Tabela 1. Distância genética entre linhagens de *Amazophrynella* utilizando o gene 16S rDNA, entre os parênteses se encontram o número de amostras.

<i>Linhagens</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1</b> <i>A. manaos</i> (24)								
<b>2</b> <i>A. amazonicola</i> (16)	0,13							
<b>3</b> <i>A. minuta</i> (8)	0,15	0,06						
<b>4</b> <i>A. matsensii</i> (13)	0,13	0,09	0,09					
<b>5</b> <i>A. vote</i> (5)	0,12	0,14	0,14	0,15				
<b>6</b> <i>D. brevipollicatus</i> (2)	0,20	0,21	0,20	0,21	0,23			
<b>7</b> <i>A. bokermanni</i> (4)	0,11	0,14	0,13	0,14	0,13	0,19		
<b>8</b> <i>A. sp. Guianas</i> (2)	0,06	0,13	0,14	0,13	0,13	0,21	0,09	
<b>9</b> <i>A. aff. Minuta</i> (2)	0,12	0,08	0,04	0,08	0,14	0,18	0,12	0,13

No clado (B) se distingue a verdadeira *Amazophrynella minuta sensu stricto* da localidade tipo: Missão Taracua, município de São Gabriel da Cachoeira, margem direita do rio Uaupés. Esta linhagem é táxon irmão de *A. aff. minuta* (Equador), possuindo uma divergência molecular de 4% com esta linhagem e uma divergência intraespecífica de 1%.

Na árvore filogenética é distinguida a linhagem (C) (90% bootstrap), esta linhagem também pertence ao complexo *Amazophrynella minuta*, está formada por indivíduos localizados no Equador (dados morfológicos não disponíveis). Esta linhagem encontra-se compartilhando um ancestral em comum com a linhagem de *A. minuta sensu stricto*.

A linhagem (D) (94% bootstrap) é outra linhagem nomeada atualmente como *A. minuta*. Se encontra formada por espécimes de três localidades (Jenaro Herrera, Requena e Nuevo Salvador) no lado sul do rio Amazonas, margem direita do rio Ucayali, Peru. Este linhagem é irmão do clado representado por *A. minuta*, *A. aff. minuta* (Equador) e *A. sp.* linhagem A. Possui uma distância genética de 9% ao respeito de *A. minuta* e uma divergência intraespecífica de 1%.

A linhagem (E) refere-se à espécie de *Amazophrynella vote*. Encontra-se representada por indivíduos de duas localidades: Parque Nacional Nascente do Lago Jarí e Parque Estadual Matupiri, no Brasil. Nossas análises indicam a existência de uma distância genética de 13% em relação de *A. minuta* e *A. bokermanni*, e uma distância genética intraespecífica de 2%.

Uma linhagem (F) é distinguida, *A. bokermanni*. Esta linhagem é representada por quatro indivíduos do rio Tapajós, Amazonas, Brasil. A distância molecular com *A. minuta* é de 12% e apresenta uma diversidade genética intraespecífica de 3%.

A linhagem (G) (89% bootstrap) não nomeado dentro do complexo de *A. minuta* está conformado por dois espécimes dos Escudos das Guianas Francesas, previamente reconhecidos por Fouquet *et al.* (2007, 2012b) e Rojas *et al.* (2014). Esta linhagem possui uma divergência com *A. minuta* de 14% e uma diversidade genética intraespecífica de 2%.

Finalmente a linhagem (H), descrita recentemente como *A. manaos*. É representado por espécimes de três localidades (Presidente Figueiredo, Mineração taboca e Campus da UFAM). Esta linhagem é irmão de *A. sp.* (Guianas). *A. manaos* possui uma divergência molecular em relação a *A. minuta* de 14% e uma diferenciação intraespecífica de 1%.

### **Análises morfométricas**

As análises morfométricas foram realizadas com um total de noventa e oito indivíduos que incluíam todas as linhagens de *Amazophrynella* encontrados neste trabalho, exceto *Amazophrynella sp.* (Guianas) e *Amazophrynella aff. minuta* (Equador).

Da linhagem (A) do complexo *A. minuta*, foram obtidas as medidas de 15 espécimes; 13 espécimes da linhagem D, 23 espécimes de *A. minuta*; 14 espécimes de *A. vote*, 29 espécimes de *A. manaos* e 6 de *A. bokermanni*.

O primeiro componente principal (tamanho) explicou 35.9% da variação total. Os *loadings* mostraram uma relação positiva de todos os componentes, exceto ED e UAL, HAL e THL. O segundo componente principal (forma) explicou o 19.78% da variação (Tabela 2).



Tabela 2. Os dois primeiros componentes principais construídos com as medidas morfológicas (log10-resíduos das regressões) de todas as linhagens de *Amazophrynella*.

Variáveis	Axis 1	Axis 2
<b>HW</b>	0,4964	-0,2242
<b>HL</b>	0,6369	-0,1806
<b>SL</b>	0,09561	0,2442
<b>ED</b>	-0,1668	0,6219
<b>IND</b>	-0,03297	0,2897
<b>UAL</b>	-0,4091	-0,4925
<b>HAL</b>	-0,1892	-0,3349
<b>THL</b>	-0,08091	-0,09015
<b>TAL</b>	0,023	0,01665
<b>TL</b>	0,2969	0,1504
<b>FL</b>	0,1039	-0,0006795
<b>Eigenvalor</b>	0,00584597	0,00321859
<b>%Variação</b>	35,937	19,785

Os dois primeiros componentes principais testados utilizando a Análises de Variância Multivariada (MANOVA) para observar a existência de diferenças significativa no espaço morfológico entre as linhagens de *Amazophrynella*, demonstraram a existência de diferenças significativa entre os grupos formados (*Pillai trace*= 0.001,  $p < 0.05$ ).

As linhagens de *Amazophrynella* encontram-se agrupadas devido a suas similaridades na forma. *A. bokermanni* é a mais distintiva, agrupando-se separadamente das outras espécies do gênero. *A. vote* encontra-se dentro do espaço morfométrico das linhagens de *A. minuta*, evidenciado se também nas análises moleculares, no qual esta espécie é grupo irmão de este complexo de espécies (Figura 2).

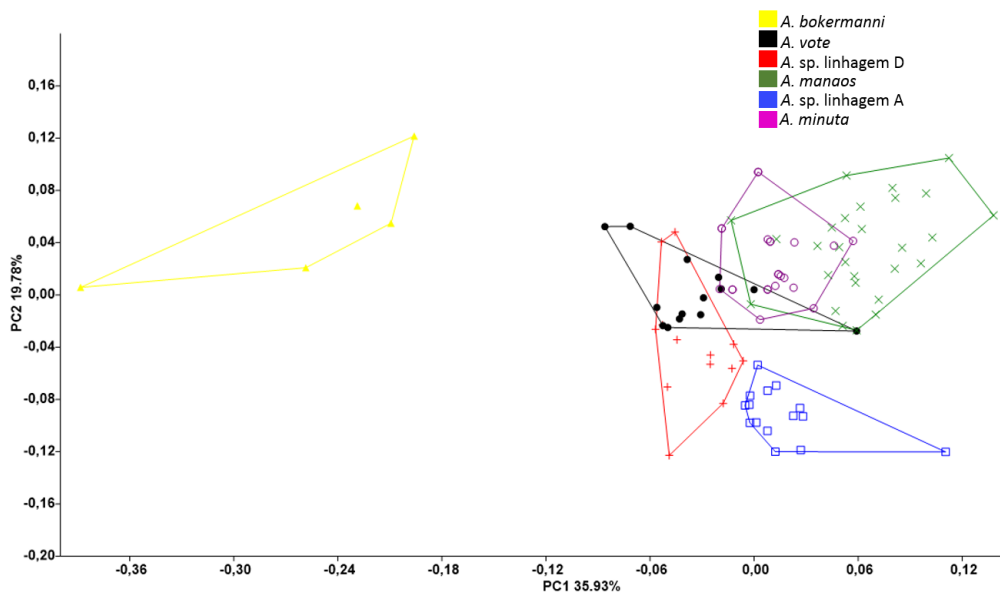


Figura 2. Análise morfométricas de *Amazophrynella* construído utilizando os dois primeiros componentes principais.

Nas análises de componentes principais realizadas somente com às linhagens correspondentes do complexo *Amazophrynella minuta* (*A. sp. linhagem A*, *A. sp. linhagem D* e *A. minuta sensu stricto*) o primeiro componente principal (tamanho) explicou o 41.35% da variação total, foram obtidos *loadings* positivos, exceto em ED, IND, UAL, HAL e THL, o segundo componente principal (forma) explicou o 18.86% da variação (Tabela 3).

Tabela 3. Os dois primeiros componentes principais construídos com as medidas morfológicas (log10-resíduos das regressões) do complexo de *Amazophrynella*.

Variáveis	Axis 1	Axis 2
HW	0,4961	-0,2249
HL	0,6369	-0,1821
SL	0,09696	0,2407
ED	-0,1666	0,6231
IND	-0,03361	0,2928
UAL	-0,4101	-0,4909
HAL	-0,1899	-0,3338
THL	-0,08111	-0,09014
TAL	0,02365	0,01416
TL	0,2962	0,1534
FL	0,1036	0,0001164
Eigenvalor	0,00415468	0,00189497
% Variação	41,356	18,863

Morfometricamente os indivíduos do complexo *Amazophrynella minuta* apresentam divergências morfológicas na forma. Todas as espécies do complexo possuem uma separação no espaço morfométrica dos componentes principais (Figura 3).

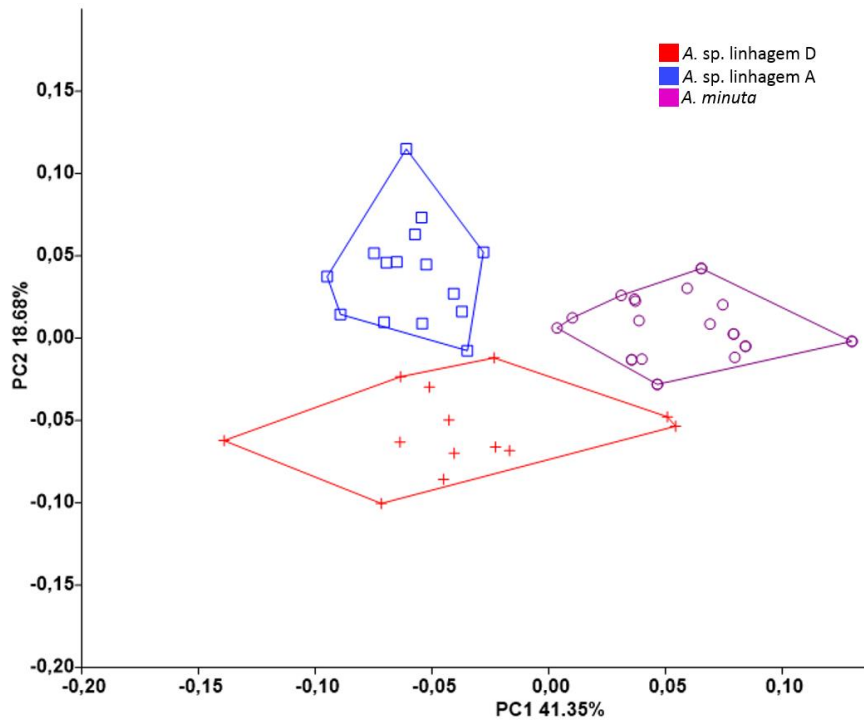


Figura 3. Análise morfométrica do complexo *Amazophrynella minuta* construída utilizando os dois primeiros componentes principais.

As Análises de Variância entre os tamanhos (SVL) de todas as linhagens de *Amazophrynella* indicaram diferenças significativas ( $F_{37,75}=0,001$ ,  $p<0,05$ ). O maior tamanho pertence a *A. bokermanni* enquanto *A. sp.* (linhagem D) mostrou um tamanho menor, as outras espécies possuem tamanhos relativamente similares, especialmente entre *A. minuta* e *A. vote*, e entre *A. manaos* e *Amazophrynella sp.* (linhagem A) (Figura 4).

O teste de Tukey para comparação par em par entre as espécies e linhagens do gênero, mostrou diferenças significativas no comprimento focinho-cloaca (SVL) ( $p\leq 0,05$ ) entre todas as espécies e linhagens exceto entre *A. minuta sensu stricto* vs. *A. minuta* e *A. vote* ( $p=0,905$ ) e entre *A. manaos* vs. *A. sp.* linhagem A ( $p=0,91$ ).

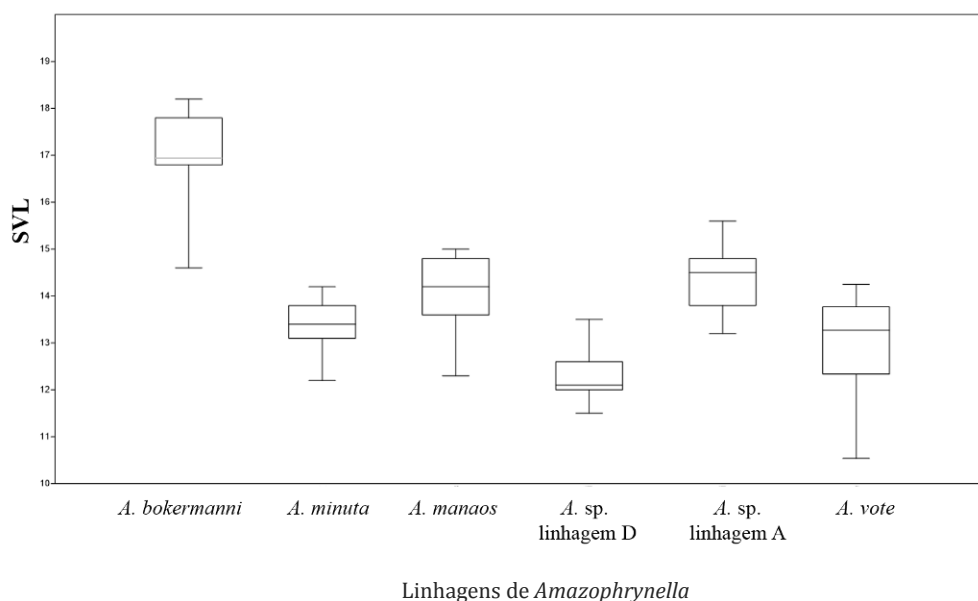


Figura 4. Comparações no tamanho (SVL) entre machos das linhagens de *Amazonophrynella* encontrados neste estudo

As comparações medias dos tamanhos do corpo entre todas as linhagens de *Amazonophrynella* se encontram na tabela 4.

Tabela 4. Médias das medidas morfométricas (mm) entre as variáveis morfológicas de espécimes machos das espécies de *Amazonophrynella*. Significado das abreviaturas encontra-se em material e métodos.

<b>Espécie/ Variável</b>	<i>A. minuta</i> (n=15)	<i>A. manaos</i> (n=29)	<i>A. bokermanni</i> (n=5)	<i>A. vote</i> (n=14)	<i>A. sp.</i> (linhagem A) (n=15)	<i>A. sp.</i> (linhagem D) (n=13)
<b>SVL</b>	13.5±0.6 (12.5-14.2)	14.2±0.7 (12.3-15.0)	16.8±1.4 (14.6-18.2)	13.1±0.7 (12.0-14.1)	14.5±0.7 (13.3-15.4)	12.1±0.6 (11.5-13.5)
<b>HW</b>	4.2±0.2 (4.0-4.3)	4.2±0.3 (3.7-4.7)	3.2±0.3 (2.5- 3.3)	4.0±0.7 (3.3-4.4)	4.4±0.3 (4.2- 4.6)	3.6 ±0.2 (3.1-3.8)
<b>HL</b>	4.9±0.2 (4.8-5.3)	5.3±0.3 (4.7-5.6)	3.4±0.4 (2.8- 3.8)	4.6±0.3 (4.0-5.2)	5.2±0.3 (5.0- 6.2)	4.3 ±0.3 (3.9-4.8)
<b>SL</b>	2.3±0.1 (2.2-2.5)	2.7±0.2 (2.3-2.7)	3.0±0.4 (2.2- 3.1)	2.1±0.2 (1.9-2.6)	2.4±0.2 (2.2- 2.5)	2.0 ±0.3 (1.6-2.3)
<b>ED</b>	1.4±0.1 (1.3-1.5)	1.3±0.1 (1.2-1.6)	1.8±0.2 (1.5- 2.0)	1.3±0.1 (1.2-1.5)	1.2±0.1 (0.9- 1.2)	1.1 ±0.1 (0.9-1.2)

<b>IND</b>	1.2±0.1 (1-1.3)	1.1±0.1 (1.0-1.4)	1.4±0.2 (1.0-1.5)	1.1±0.1 (1.0-1.3)	1.2±0.1 (1.0-1.3)	1.0 ±0.1 (0.8-1.2)
<b>UAL</b>	3.8±0.2 (3.2-4.1)	3.6±0.4 (2.9-4.1)	5.5±0.6 (5.0-5.6)	3.9±0.5 (2.8-3.9)	4.5±0.3 (4.2-5.3)	3.5 ±0.4 (2.9-4.2)
<b>HAL</b>	2.8±0.2 (2.6-3.0)	2.8±0.6 (1.9-2.9)	3.4±0.6 (2.8-4.2)	2.7±0.3 (2.3-3.2)	3.2±0.2 (2.8-3.3)	2.7 ±0.2 (2.3-3.1)
<b>THL</b>	6.8±0.2 (6.4-7.2)	6.7±0.3 (2.3-3.1)	8.7 ±1.4 (7.2-8.9)	6.5±0.7 (5.4-7.2)	7.7±0.6 (6.3-8.0)	6.2 ±0.4 (5.1-6.3)
<b>TAL</b>	6.7±0.3 (6.3-7.1)	6.9±0.6 (4.2-7.3)	8.3±1.0 (6.7-9.2)	5.7±0.7 (4.8-7.0)	7.2±0.6 (6.1-7.9)	5.8 ±0.3 (5.1-6.3)
<b>TL</b>	4.1±0.2 (3.8-4.6)	4.6±0.4 (4.3-6.3)	5.4±1.4 (2.9-6.2)	3.8±1.0 (4.2-7.0)	4.2±0.6 (6.3-8.0)	3.8 ±0.2 (3.6-4.3)
<b>FL</b>	4.8±0.4 (4.2-5.2)	5.2±0.5 (4.7-6.1)	6.3±1.3 (3.9-7.6)	4.4±0.6 (3.2-5.4)	5.1±0.4 (4.7-6.0)	4.3 ±0.4 (5.5-3.0)

## Análise Bioacústicas

### *Amazophrynella vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Ribeiro & Morais, 2012 (Figura 5A).

O canto foi gravado próximo de um pequeno corpo d'água de pouca profundidade rodeado de serapilheira e pequenos troncos caídos com pouca entrada do sol na localidade de Matupiri (4° 49' 56.8" S, 61° 00' 09.1" W). A temperatura de gravação foi de 26.4 °C no horário das 8 -10 horas da manhã. O canto de anúncio foi gravado de dois indivíduos. É um canto tipo trinado de uma nota multipulsionada emitida durante intervalos irregulares contínuos. As notas (Figura 6A) apresentam uma modulação ascendente aumentando em seu trecho final.

O comprimento da nota encontra-se dentro numa faixa entre 0.13-0.17 segundos ( $x = 0.15 \pm 0.03$ .  $n=30$  notas). O canto possui uma frequência fundamental com uma amplitude de 3152.77-3589.66 Hz ( $x = 3299.37 \pm 41.60$ .  $n=30$ ) e uma frequência máxima que varia entre 3755.96-4515.78 Hz ( $x=4167.526 \pm 132.40$ .  $n=30$ ). Apresenta uma estrutura harmônica, com uma média de  $4 \pm 0.8$  harmônicos visíveis no espectrograma. O silêncio entre notas tem uma duração média de  $0.6 \pm 1.2$  segundos e uma amplitude entre 0.5-3.1 segundos ( $n= 20$  notas).

O canto possui um total de  $1581 \pm 120.2$  pulsos, e as notas apresentam uma amplitude de 49-62 pulsos ( $x=56.5 \pm 5.08$ ,  $n=30$ ) (Tabela 4).

*Amazophrynella bokermanni* (Izecksohn, 1993) (Figura 5B).

O canto foi gravado de 1 indivíduo. Possui uma nota de tipo multipulsionada emitida entre intervalos regulares contínuos. Foi gravado em cativeiro, dentro do saco onde estava acondicionado. A temperatura de gravação foi de  $26^\circ\text{C}$  no horário das 9-11 horas da manhã.

O canto encontra-se composto por notas simples com um comprimento entre 0.09-0.12 segundos ( $x=0.11 \pm 0.01$ ,  $n=22$ ), as notas são estruturalmente similares entre si, apresentando modulação ascendente (Figura 6B), alcançando uma maior amplitude no meio. Possui uma frequência fundamental que varia entre de 3078.34-3277.82 Hz ( $x=3240.88 \pm 76.20$ ,  $n=22$ ) e uma frequência absoluta na faixa de 3407.65-3794.91 Hz ( $x=3757.97 \pm 154.52$ ,  $N=22$ ).

O canto apresenta estrutura harmônica com uma média de  $3 \pm 0.4$  harmônicos visíveis. O silêncio entre notas tem uma média de  $0.6 \pm 0.4$  segundos e uma amplitude entre 0.6-1.2 ( $n=18$ ). As notas apresentam uma média de pulsos que varia entre  $49 \pm 2.3$  (amplitude: 47.5-56.8,  $n=22$ ).

*Amazophrynella* sp. (linhagem A) (Figura 5C).

Foram gravados dois cantos de anúncio em pequenas poças de águas estacionais de pouca profundidade e abundante vegetação arbustiva e arbórea com pouca entrada da luz. A temperatura de gravação variou entre  $25^\circ\text{C}$  -  $26.3^\circ\text{C}$ . Os dois cantos foram gravados durante a manhã entre as 10-11 horas. É um canto composto por uma nota simples (não multipulsionadas) emitida em intervalos irregulares. Os cantos correspondem à localidade de Puerto Almendras ( $3^\circ 49' 41.08''$  S,  $73^\circ 22' 7.68''$  W), região Loreto, Peru.

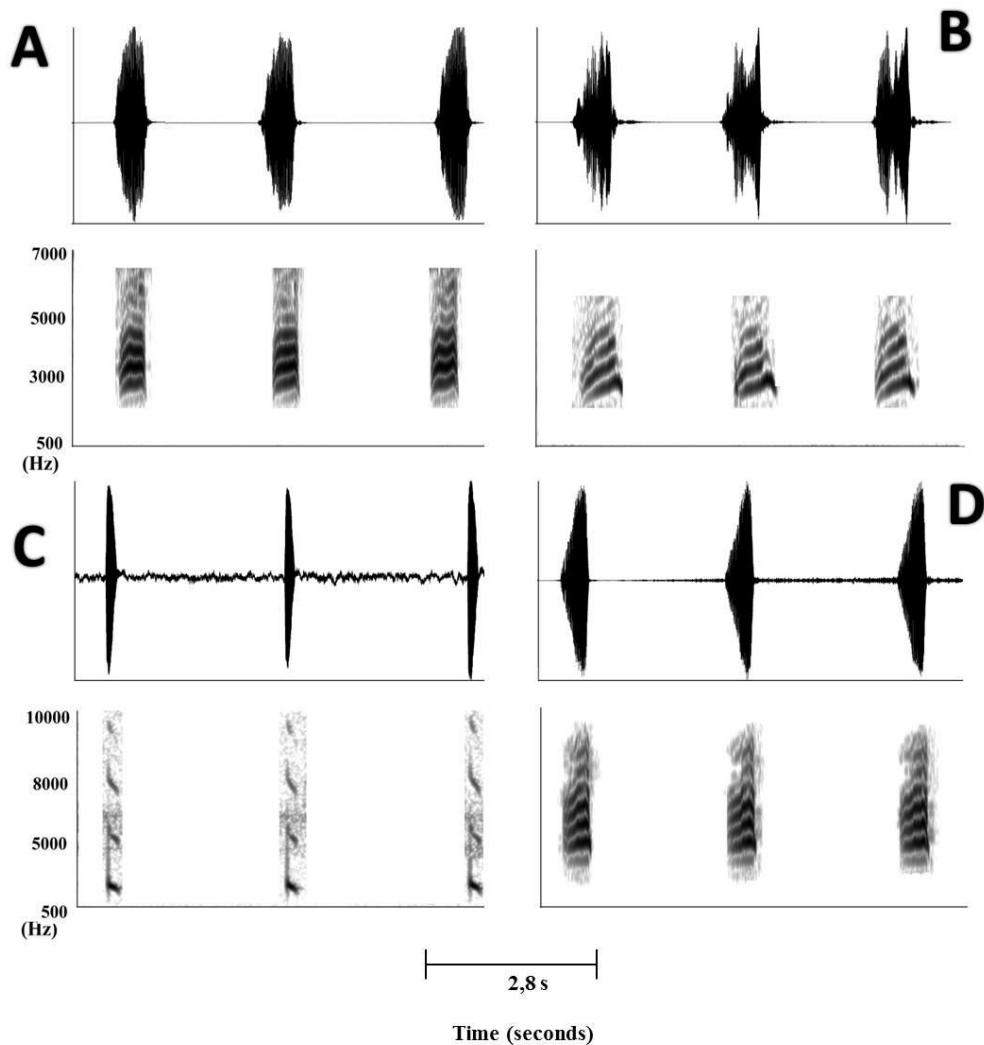


Figura 5. Oscilograma e espectrograma de três notas dos cantos de: **A)** *Amazophrynella vote* **B)** *A. bokermanni* **C)** *A. sp* (linha A) **D)** *A. manaos*

As notas apresentam uma modulação descendente, alcançando sua máxima frequência quase no princípio da nota (Figura 6C). O comprimento das notas encontra-se numa faixa de 0,01- 0,016 segundos ( $x=0.013 \pm 0.001$ ,  $n=35$  notas). Apresenta uma estrutura harmônica com uma média de  $3 \pm 0.32$  harmônicos visíveis no espectrograma. A frequência fundamental encontra-se dentro de uma faixa entre 45.97-125.9 ( $x=45.9 \pm 33.5$ ,  $n=35$  notas) e uma frequência absoluta que varia entre 3184.9-3480.9 ( $x=3314.7 \pm 74.5$ ,  $n=35$  notas). O silêncio entre as notas possui uma média de  $1.6 \pm 1.5$  segundos e uma amplitude entre 1.1- 5.42 segundos ( $n=35$  notas).

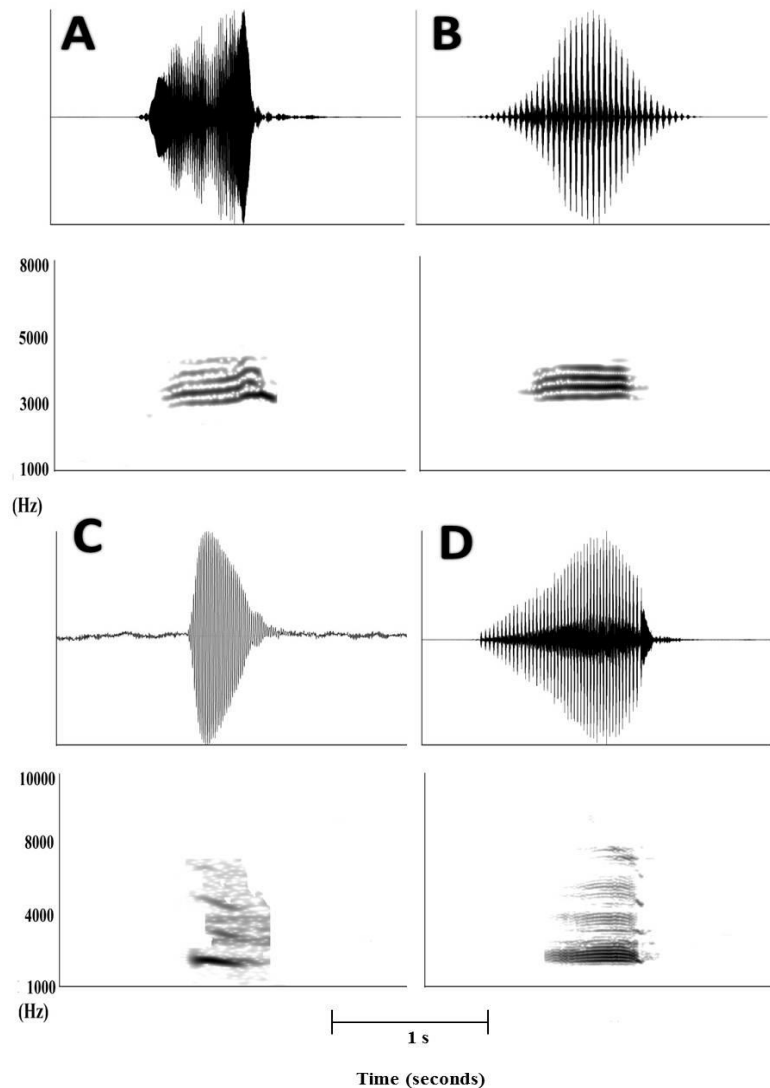


Figura 6. Oscilograma e espectrograma de uma nota dos cantos de: **A)** *Amazophrynella vote*; **B)** *A. bokermanni*; **C)** *A. sp.* (linhagem A) **D)** *A. manaos*

*Amazophrynella manaos* **Rojas, Carvalho, Gordo, Ávila Farias & Hrbek, 2014**  
(Figura 5D).

Foram gravados cantos de três indivíduos em duas localidades: Reserva Florestal Adolpho Ducke (02° 55' 52" S, 59°58' 29" W) e Campus da Universidade Federal do Amazonas- UFAM (3° 05' 37" S, 59°58' 26" W), Estado de Amazonas, Brasil. Todos os cantos foram gravados perto de pequenos corpos de águas de pouca profundidade e



abundante vegetação que apresentava pouca entrada de luz, próximos de igarapés de maior longitude. A temperatura de gravação variou entre 26°C- 27.5°C, gravados durante o dia entre as 9:30-12:00 horas da manhã.

O canto de (n=3) é um canto trinado forte conformado por uma única nota simples multipulsionada. O comprimento das notas encontra-se dentro de uma faixa entre 0.13-0.14 segundos ( $x = 0.14 \pm 0.005$ , n= 20 notas). Apresentam uma modulação ascendente, alcançando sua máxima frequência quase ao final da nota (Figura 6D).

Apresenta uma estrutura harmônica, com uma média de  $4 \pm 0.7$  harmônicos visíveis no espectrograma. As notas apresentam uma amplitude de 38-51 pulsos ( $x=48 \pm 4.4$  n= 20). A frequência fundamental varia entre 2557.5-2668.4 Hz ( $x = 2631.34 \pm 25.5$ , n= 20 notas) e apresenta uma frequência absoluta na faixa de 3407.1-3442.2 Hz ( $x = 3409.1 \pm 25.5$ , n= 20 notas). O silêncio entre notas tem uma média de  $0.6 \pm 0.2$  segundos com uma amplitude entre 0.4-1.2 segundos (n=20).

Tabela 4. Comparação entre as variáveis bioacústicas de algumas espécies do gênero *Amazophrynella* (canto do indivíduo da localidade tipo não disponível), número de notas analisadas e número de cantos se encontram nas descrições dos cantos de anúncio.

Variável/ Espécie	Tipo de canto	Duração do canto (s)	Frequência fundamental (Hz)	Frequência absoluta (Hz)	Pulsos por nota	Silêncio entre notas (s)
<i>A. bokermanni</i>	Trinado	$0.11 \pm 0.01$ (0.09 – 0.12)	$3240.8 \pm 76.2$ (3078.3– 3277.8)	$3757.9 \pm 154.$ 5 (3407.65– 3794.9)	$49 \pm$ 2.3 (47.5– 56.8)	$0.6 \pm 0.4$ (0.6 – 1.2)
<i>A. vote</i>	Trinado	$0.15 \pm 0.03$ (0.13 – 0.17)	$3299.37 \pm$ 41.6 (3152.7– 3589.6)	$4167.52 \pm$ 132.4 (3755.9– 4515.7)	$56.5 \pm$ 5.1 (49– 62)	$0.6 \pm 1.2$ (0.5-3.1)
<i>A. manaos</i>	Trinado	$0.14 \pm 0.005$ (0.13 – 0.14 )	$2631.3 \pm 25.5$ (2557.5– 2668.4)	$3409.07 \pm$ 25.5 (3407.09– 3442)	$48 \pm$ 4.4 (38– 51)	$0.6 \pm 0.2$ (0.4–1.2)
<i>A. sp.</i> (linhagem A)	Trinado	$0.013 \pm$ 0.001 (0.01– 0.016)	$45.97 \pm 33.57$ (45.9 – 125.9)	$3314.7 \pm 74.5$ (3184.9– 3480.9)	0	$1.63 \pm$ 1.57 (1.1 – 5.4)

## História natural

Todas as espécies de *Amazophrynella* compartilham as seguintes características ecológicas: seu habitat é a serrapilheira (figura 7); todas eles possuem uma atividade diurna; possuem um claro dimorfismo sexual no tamanho (SVL); possuem um saco gular indistinguível, reproduzem-se em charcos estacionais pequenos com pouca correnteza e pouco profundos, colocam seus ovos ao redor de pequenos galhos caídos.



Figura 7. Características gerais dos habitats das espécies de *Amazophrynella*. A) Serrapilheira, onde as espécies ocorrem; B) Vegetação ao redor de uma pequena poça reprodutiva das espécies do gênero.

*Amazophrynella minuta* foi registrada em atividade durante o dia, especialmente em horas da manhã (8:00-10:00). A localidade tipo apresenta uma estrutura de bosque tipo campinarana recoberto por árvores com um diâmetro pequeno. Os espécimes foram observados perto de corpos de água cantando (9:30-10:00). Os machos cantam escondidos debaixo de folhas secas e corpos d'água pouco profundos.

*Amazophrynella vote* encontra-se em reprodução entre a finais de novembro até inícios de abril. O seu canto de anúncio pode ser escutado nas manhãs. Os machos

possuem um saco gular indistinguível. Seus ovos são ligeiramente pigmentados, depositando um promedio de 265-375 ovos (n=3) (Avila *et al.*, 2012).

A reprodução de *Amazophrynella bokermanni* ocorre durante a estação chuvosa desde a metade do mês de novembro até finais do mês de Março. Vocaliza perto de corpos de águas escondidos em pequenos troncos e a serapilheira, pertencente ao grupo de *A. minuta*, *A. bokermanni* que depositam seus ovos em pequenas poças de água e possuem ovos pigmentados gelatinosos (Izecksohn, 1993).

*Amazophrynella* sp. linhagem A e *A. sp.* linhagem D encontram-se em época de reprodução entre Dezembro até inícios de Abril. Apresentam um amplexo de tipo axilar. Vocalizam perto de pequenas poças de água estacionais de pouca profundidade rodeados por uma abundante vegetação.

O canto de anúncio de *Amazophrynella manaos* pode ser escutado em términos da estação seca e inícios das chuvas no mês de novembro até meados do mês de abril. Os machos cantam durante o dia escondidos na serapilheira perto de pequenas poças de água próximos aos igarapés, mais também foram escutados cantando no período da tarde entre as 15h30min-16 horas. Pode ser encontrado em florestas primarias e fragmentos de bosques.

## **Distribuição**

*Amazophrynella minuta* só é conhecida da localidade tipo Missão Taracua e na cidade de São Gabriel da Cachoeira (aproximadamente 110 km). Sua distribuição pode abranger o extremo norte da região Amazonas, Brasil e países adjacentes como Colômbia ou Venezuela (Figura 8).

*Amazophrynella vote* foi registrada nas localidades de Aripuanã, Parque Estadual Igarapés do Jurena, Fazenda São Nicolau na parte norte do Estado de Mato Grosso, Brasil. No estado do Amazonas, foi encontrada nos municípios de Canutama, Tapauá, Beruri, Manicoré e Novo Aripuanã No estado de Rondônia ocorre no município do Ji-Paraná. Novos registros desta espécie indicam sua ocorrência no Parque Estadual do Matupiri e Reserva de Desenvolvimento Sustentável Igapó Açu, estado do Amazonas, Brasil (Ávila *et al.*, 2012).

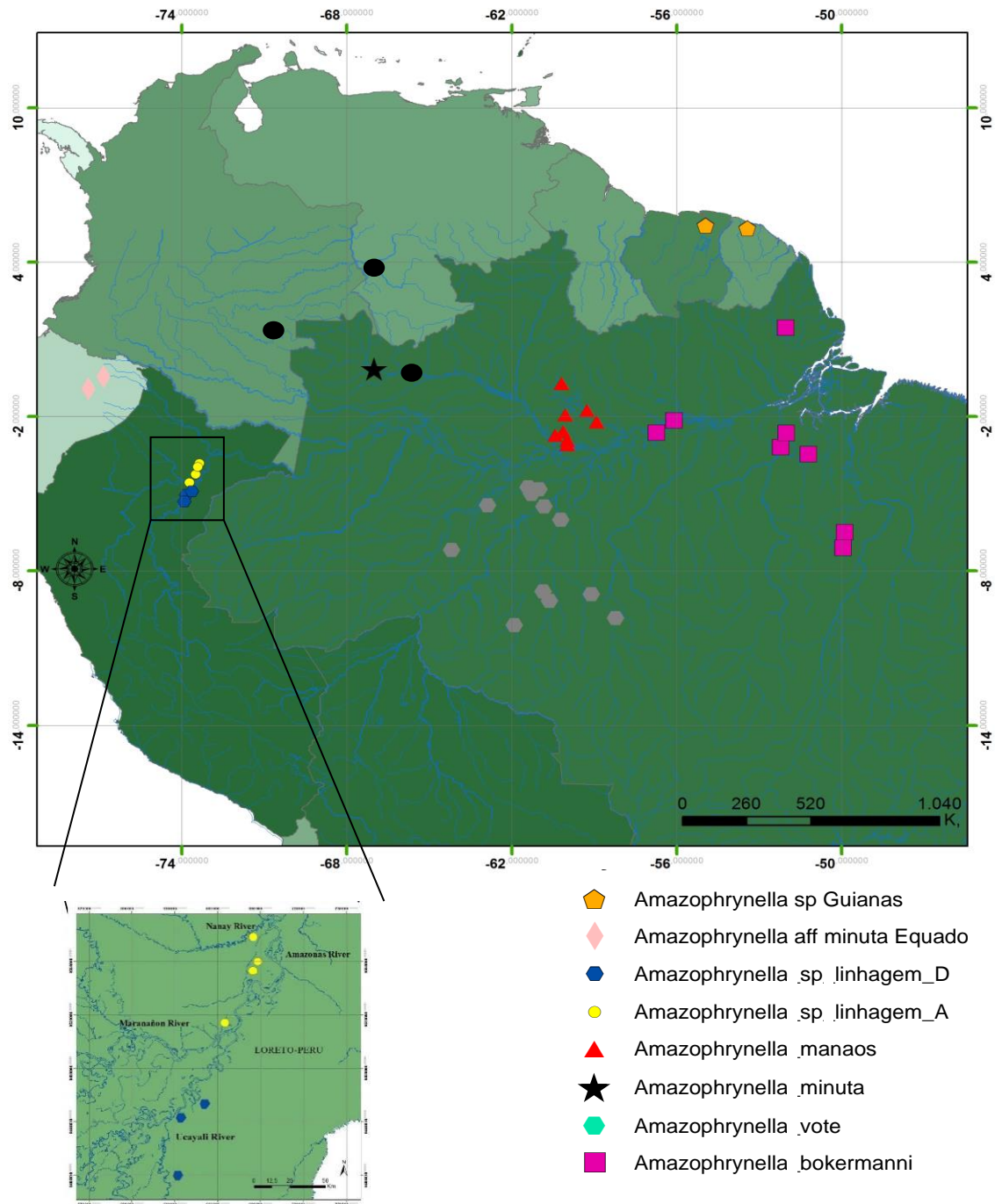


Figura 8. Mapa de distribuição de todas as linhagens e espécies de *Amazophrynella* encontradas neste estudo.

*Amazophrynella bokermanni* é conhecido da sua localidade tipo, Parintins, estado do Amazonas, Brasil (Izceksohn, 1993). A sua distribuição abrange possivelmente os estado do Pará, Amapá e Maranhão, Brasil. Foram encontrados indivíduos nas localidades de Juruti (30 km da localidade tipo). A distribuição abrange

as localidades de Ramal dos Cocos, município de Altamira, Parque de Desenvolvimento Virola Jatobá, município de Anapu e localidade de Itapuama, rio Tapajós (Fouquet *et al.*, 2012b).

*Amazophrynella manaos* encontra-se distribuída na parte sul este da região dos escudos das Guianas. É conhecido das localidades de Mineração Taboca, Campus da Universidade Federal do Amazonas, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Presidente Figueiredo, Reserva ZF-2 e Parque Estadual rio Negro Setor Sul, rio Cuieiras. Ao sul e este limita sua distribuição pelo rio Amazonas e rio Negro. Aparentemente se encontra restrito na parte central-sul dos escudos das Guianas.

*Amazophrynella* sp. linhagem A é conhecida de quatro localidades: Puerto Almendras, Fundo Zamora, Fundo UNAP e cidade de Nauta. Estas localidades se encontram geograficamente na margem esquerda do rio Amazonas ao sudeste da cidade de Iquitos. Indivíduos desta linhagem ocorrem só no Peru. Sua distribuição encontra-se limitada provavelmente pelo rio Nanay ao norte e rio Marañón ao sul. Indivíduos foram observados ao longo de toda a rodovia Iquitos-Nauta. Sua distribuição pode se estender mais ao norte do rio Amazonas, região Loreto-Peru.

*Amazophrynella* sp. linhagem D é conhecido de três localidades: Jenaro Herrera, Requena e Nuevo Salvador. Estas localidades se encontram geograficamente situadas na margem direita do rio Ucayali. A distribuição desta linhagem encontra-se limitada pelo rio Marañón ao norte e o rio Amazonas ao nordeste. A sua extensão se estende mais ao sul ou sudeste da região Loreto, Peru, incorporando a reserva indígena dos Matsés.

A linhagens de *Amazophrynella* sp. “Guianas” se encontram distribuídos na região dos escudos das Guianas no país das Guianas Francesas, enquanto a linhagem de *A. aff. minuta* (Equador) se distribui no sul do país do Equador.

## **Discussão**

O presente estudo revelou uma diversidade desconhecida dentro do gênero *Amazophrynella*; estes dados corroboram com trabalhos realizados por outros autores, que demonstraram a existência de uma subestimação na riqueza de anfíbios na região

amazônica e no mundo (Elmer *et al.*; 2007; Fouquet *et al.*; 2007; Padial & De la Riva, 2009, Viettes *et al.*, 2009; Funk *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2014).

O fragmento do gene 16S rDNA é comumente usado como barcode para os anfíbios, sendo confiável na identificação das espécies (Vences *et al.*, 2005) avaliar a monofilia e descobrir linhagens divergentes (e.g. Padial *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2010 e Padial *et al.*, 2012).

A hipótese filogenética obtida, demonstrou a existência de outras linhagens independentes de *Amazophrynella*: a linhagem de *A. aff. minuta* (Equador) (linhagem irmão de *A. minuta*) e *A. sp.* das “Guianas” (táxon irmão de *A. manaos*), linhagens que possivelmente representem espécies novas. Evidentemente é necessário uma revisão morfológica e análises filogenéticas e bioacústicas mais completas que permitam demonstrar a validade destas linhagens como espécies. A filogenia obtida também ajudará em futuras considerações taxonômicas que abranjam indivíduos de diferentes localidades, assim como populações da Colômbia, Venezuela, da região panamazonica das Guianas, Bolívia, Equador e Peru.

Todas as linhagens encontradas demonstraram uma alta divergência molecular ( $\geq 4\%$ ). Provavelmente está alta taxa de distância genética se deve as características ecológicas destes animais que não são migradores potenciais, são incapazes de cruzar rios e possuem tamanhos corporais.

Fouquet *et al.* (2007) e Fusinato *et al.* (2013) mencionam que as grandes distâncias genéticas entre espécies de anuros estão relacionadas com a ocupação de nicho especializado, isolamento de populações, fluxo genético restrito e fatores ecológicos, como a preferência de habitats e alimento. A necessidade de maiores pesquisas adicionais dos diversos aspectos evolutivos do gênero é necessária para conhecer mais a fundo quais são os fatores que moldaram e ainda moldam a história evolutiva deste gênero.

Morfométricamente as espécies de *Amazophrynella* apresentam uma similaridade na forma, sendo separadas pelo tamanho de *A. bokermanni*. Na análises morfométricas aplicadas somente nas linhagens do complexo de *A. minuta* evidenciou-se uma separação das linhagens no plano dos componentes principais, esta separação morfométrica na forma e no tamanho é também observada na separação filogenética.

Os fenômenos biológicos que podem estar causando esta divergência são os fatores evolutivos que imperam no meio de cada linhagem (Reis, 1988) tais como a alimentação, níveis proteicos do alimento, tamanhos das presas, seleção de nicho ecológico e seleção sexual. As sinapomorfias morfológicas encontradas entre as espécies de *Amazophrynella* revelaram a existência de um processo de evolução morfológica geralmente conservada. Este fenômeno pode possibilitar a existência de espécies crípticas (Bickford *et al.*, 2007; Galetti *et al.*, 2008) não descritas.

Interessantemente uma sinapomorfia potencial reside nos padrões bioacústicos. Os cantos de anúncio descritos e analisados mostraram uma estrutura geral de uma nota. *Amazophrynella manaos*, *A. vote* e *A. bokermanni* que compartilham variáveis similares nos cantos de anúncio (Duração do canto, Frequência fundamental e Frequência absoluta), relacionados também com os esquemas filogenéticos e de distribuição.

O canto de *A. sp.* linhagem A, encontra-se com menos similaridades entre as três espécies, estas dissimilaridades incluem a duração do canto (menor), a frequência fundamental baixa e a ausência de pulsos nas notas, provavelmente o canto de anúncio de *A. minuta* e *A. sp.* linhagem D possuem um padrão muito similar com o canto de *A. sp.* linhagem A.

A diferença existente na distribuição entre *A. sp.* linhagem A (lado esquerdo do rio Amazonas, Peru) e *A. sp.* linhagem D (lado direito do rio Amazonas, Peru) provavelmente evidencia padrões biogeográficos dos rios como barreiras que impedem o fluxo genético e isolam populações de anuros, como foi demonstrado em outros estudos (ver Simões *et al.*, 2008, Simões *et al.*, 2011, Ribas *et al.*, 2012, Funk *et al.*, 2011), no entanto maiores estudos devem ser realizados para testar se nas espécies deste gênero os rios amazônicos funcionam como barreira vicariante de especiação.

Os limites de distribuição de *Amazophrynella* abrangem atualmente sete países da América do Sul: *A. minuta* distribuída no Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana Inglesa, Suriname e a parte noroeste do Brasil (borda da fronteira entre Colômbia, Brasil e Venezuela), *A. vote*, restrito só no Brasil, nos estado de Rondônia, e a parte sul do Estado do Amazonas. *A. bokermanni* distribuído só no Brasil, em todo o estado do Pará, Maranhão e Amapá e parte oeste do estado do Amazonas, *A. manaos*, que ocorre também só no Brasil na parte noroeste dos escudos das Guianas, norte da cidade de

Manaus, *A. sp.* linhagem A e *A. sp.* linhagem D, são conhecidas só para a região Loreto-Peru, os limites de distribuição destas espécies não se encontram atualmente definidos, mas tudo indica que *A. sp.* linhagem A distribuiu-se pela parte norte da região Loreto até o Equador e *. sp.* pela parte sul, abrangendo o departamento peruano de Ucayali.



## **CAPÍTULO II**

**Redescrição de *Amazophrynella minuta* da localidade tipo e descrição morfológica de duas linhagens do complexo *Amazophrynella minuta***

## Introdução

O gênero *Amazophrynella*, Fouquet 2012, está constituído por pequenos anuros bufonídeos de linhagem basal (Pramuk *et al.*, 2008; Van Bocxlaer *et al.*, 2010), endêmicos de sul América, encontram-se distribuídos por toda a Amazônia, abrangendo os países da Bolívia, Peru, Brasil, Equador, Colômbia, Venezuela e a região pan-amazônica das Guianas (Fouquet *et al.*, 2012b; Frost, 2013).

*Amazophrynella minuta* (Melin, 1941), descrita para a Missão Taracua, rio Uaupés, região da fronteira Brasil, Colômbia e Venezuela, possui um histórico taxonômico confuso. Muitas populações de *A. minuta* morfologicamente distintas têm sido tratadas como uma espécie única (Rojas *et al.*, 2014).

As dificuldades no delineamento de espécies em populações nomeadas como *A. minuta* reside na ausência de uma revisão taxonômica adequada e comparações morfológicas e filogenéticas entre populações de diferentes localidades ao longo da sua extensa distribuição. Uma grande problemática é o estado de conservação atual da série tipo, que dificulta a comparação dos caracteres morfológicos. O gênero *Amazophrynella* permanece em grande parte sem uma resolução taxonômica (Rojas *et al.*, 2014), e as lacunas existentes entre os limites das espécies impedem conhecer a diversidade real de escondida em este gênero críptico (Fouquet *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2012b).

Neste trabalho redescrevemos a espécie *Amazophrynella minuta* e descrevemos duas novas espécies do complexo *Amazophrynella* são descritas em este trabalho, erroneamente nomeados como *A. minuta*. Apresentamos evidências morfológicas e moleculares.

## Redescrição de *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941)

(Figura 1)

*Amazophrynella minuta* (Melin, 1941)

*Sinônimos.*

*Atelopus minutus* Melin, 1941

*Dendrophryniscus minutus* (McDiarmid, 1971, Zimmerman & Rodrigues, 1990; Magnusson & Hero, 1991, Lima *et al.*, 2006)

*Amazonella minuta* (Fouquet *et al.*, 2012b)

*Amazophrynella minuta* (Fouquet *et al.*, 2012a)

*Comentários iniciais.* Foi descrita como *Atelopus minutus* por Douglas Melin em 1941 da localidade de Missão Taracuí, margem direita do rio Uaupés, município de São Gabriel da Cachoeira, Brasil, usando somente seis espécimes, a descrição apresenta somente desenhos em vista dorsal e lateral da cabeça, ventre e o pé direito. Os espécimes foram coletados em março de 1924. Atualmente o holótipo e síntipos se encontram depositadas na coleção de Naturhistoriska Museet, Göteborg, Suécia (NHMG), Europa (Figura 1).



Figura 1. *Amazophrynella minuta* da localidade tipo, Taracuí, Rio Uaupés, Amazonas Brasil em amplexo.



Figura 2. Estado atual dos sítipos de *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941); NHMG 462, 465, Taracua, Rio Uaupés, Amazonas, Brasil.

*Nova diagnose.* *Amazophrynella minuta* pode ser distinguida pela combinação dos seguintes caracteres: 1) Cabeça pontiaguda (em vista ventral); 2) nariz pontiaguda (em vista lateral); 3) textura dorsal e ventral da pele fortemente granular; 4) corpo coberto por abundantes espículas abundantes brancos pequenos e ponteados; 5) grandes tubérculos na região dorso-lateral; em vida 6) garganta e peito marrom escuro; 7) abdômen de coloração laranja-amarelo intenso; 8) manchas ou ocelos irregulares no abdômen.

As características que distinguem *A. minuta* com as outras espécies de *Amazophrynella* em vida são: o padrão de coloração ventral do abdômen, textura da pele e forma do focinho (Figura 3). *A. bokermanni* apresenta um abdômen branco com manchas pretas (Izecksohn, 1993); *A. vote* possui uma coloração avermelhada com pequenos pontos (Ávila *et al.*, 2012); *A. manaos* tem o abdômen branco com manchas ou pontos negros, *A. sp.* “buriti” (linhagem A) e *A. sp.* “matses” (linhagem D) possuem a mesma coloração do abdômen.

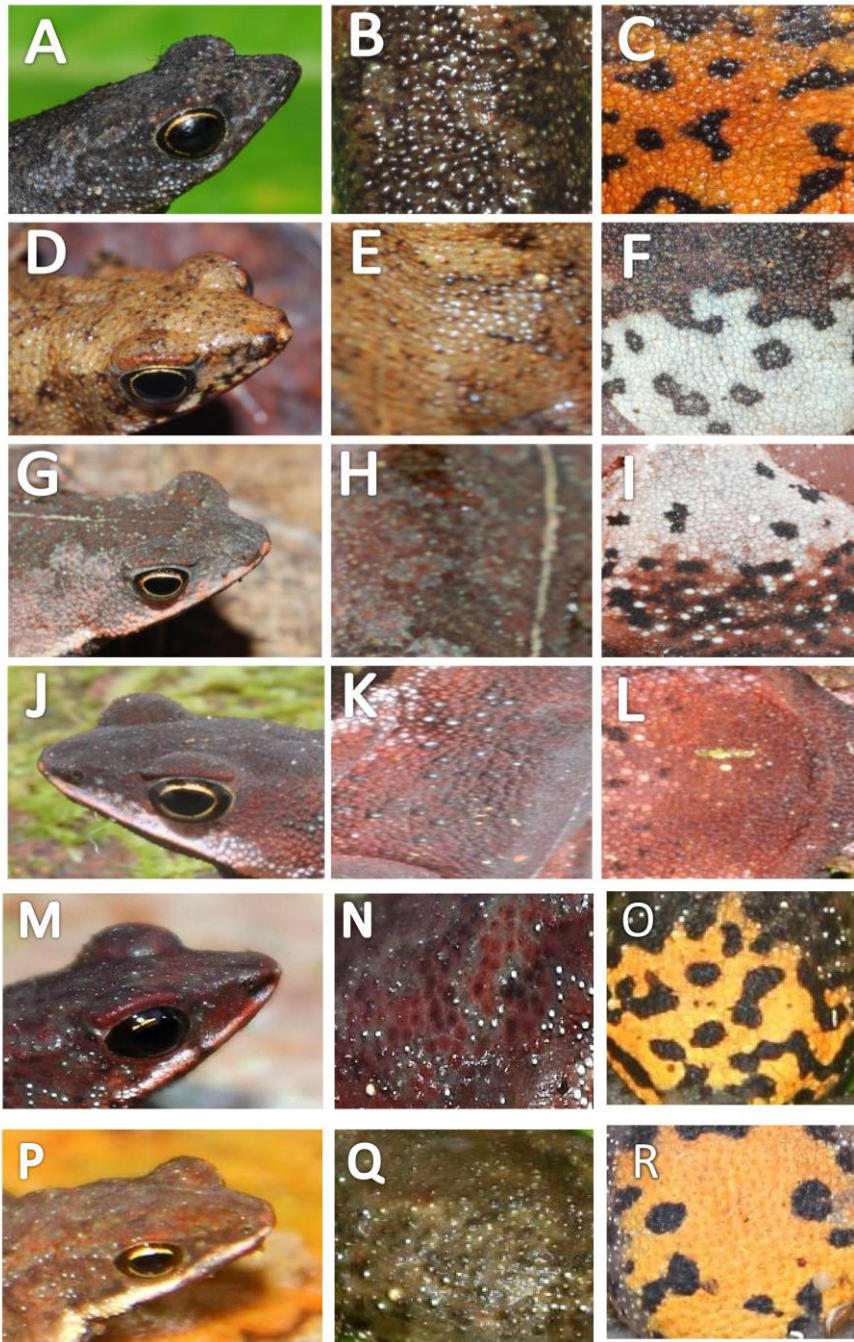


Figura 3. Comparação de algumas características diagnosticas do gênero *Amazophrynella*. A, B, C) *Amazophrynella minuta* (INPA-H 312725); D, E, F) *A. manaos* (espécie não coletada); G, H, I) *A. bokermanni* (INPA-H 31863); J, K, L) *A. vote* (INPA-H 31870); M, N, O) *A. sp.* “buriti” (linhagem A); P, Q, R) *A. sp.* “matses” (linhagem D). A, D, G, J, M, P são as formas do focinho e cabeça; B, E, H, K, N, Q a textura dorsal da pele; C, F, I, L, O, P textura ventral da pele e formas das manchas.

Outra característica que distingue *A. minuta* das outras *Amazophrynella* spp. é a textura dorsal e ventral da pele. *A. bokermanni* apresenta uma textura granular; em *A. vote* é finamente granular, *A. manaos* apresenta uma textura granular. *A. sp. "buriti"* (linhagem A) é granular, em *A. sp. "matses"* (linhagem D) é ligeiramente granular. A presença de grandes tubérculos na região dorsolateral se encontra ausente nas outras espécies do gênero.

A culminação do focinho de *A. bokermanni* é triangular; mas a maior diferença entre esta espécie vs. *A. minuta* e a fórmula dos dedos I>II em *A. bokermanni* e I<II em *A. minuta*; *A. vote* apresenta um focinho arredondado, em *A. manaos* sp. nov. é ligeiramente truncado, *A. sp. "buriti"* (linhagem A) possui um focinho aguçado com uma culminação triangular, em *A. sp. "matses"* (linhagem D) o focinho é triangular com culminação truncada.

O padrão de coloração do pescoço e do peito em *A. bokermanni* é amarronzado; marrom em *A. vote*, escuro em *A. manaos*, em *A. sp. "buriti"* (linhagem A) em *A. sp. "matses"* (linhagem D) é cinza escuro, e em *A. minuta* é marrom escuro.

*Redescrição e variação* (Figura 4). Machos adultos, comprimento médio focinho-cloaca (SVL)  $13.5 \pm 0.57$  (12.4 - 14.2), fêmeas  $17.5 \pm 0.61$  (17.1-18.9). Corpos delgados. Cabeça comprida assim como larga; comprimento médio da cabeça  $9 \pm 0.16$  (4.7-5.2), 36.2% do SVL; largura média da cabeça  $2 \pm 0.15$  (4.0 - 4.3), 31.1% do SVL; cabeça pontiaguda. Focinho de perfil pontiagudo em vista lateral; comprimento médio do focinho  $2.27 \pm 0.14$  (2.1 - 2.5), 46.3% do largura da cabeça. Tímpano externo não visível. Saco gular ausente em machos. Olhos proeminentes; comprimento médio dos olhos  $1.4 \pm 0.08$  (1.2 - 1.5), 29.38% do comprimento médio da cabeça. Narinas mais perto da ponta do nariz que dos olhos; distância internasal  $1.2 \pm 0.10$  (1.0- 1.3), 28.57% da largura da cabeça.

Textura do corpo espiculado com tubérculos de tamanhos médios. Textura do dorso fortemente tubercular. Abundantes grânulos espinhosos agrupados na região axilar. Superfícies dorsolaterais cobertos por tubérculos. Alguns espécimes apresentam um ou dois grandes tubérculos nos flancos. Textura da superfície ventral extremadamente granular, outros apresentam tubérculos pequenos disseminados na garganta e o abdômen.



Figura 4. Variação entre indivíduos de *Amazophrynella minuta* da localidade tipo. A-C) fêmeas adultas; D-E) machos adultos.

Membros anteriores delgados. Tubérculos cônicos e espinhosos visíveis nas superfícies dos antebraços. Comprimento médio do antebraço  $3.8 \pm 0.24$  (3.3-4.1); presença de espículas espinhosas abundantes na inserção da parte superior do braço, comprimento médio da mão de  $2.8 \pm 0.24$  (2-2.9); dedos sem membranas. Fórmula dos dedos: I <II <IV <III; primeiro dedo curto, o terceiro dedo duas vezes o tamanho do segundo, o quarto maior do que o primeiro e segundo; tubérculo palmar grande e arredondado; tubérculo supranumerário arredondado: um no I dedo, dois no II e IV e três no III. Ponta dos dedos não expandidos.

Membros posteriores delgados. Comprimento médio da coxa  $6.8 \pm 0.22$  (6.3-7.3), 50.37% do SVL; comprimento médio da canela  $6.7 \pm 0.26$  (6.3-7.1); espículas cônicas e espinhosas presentes na coxa e canela, comprimento médio do tarso  $4.1 \pm 0.22$  (3.7-4.4); comprimento médio do pé  $4.8 \pm 0.34$  (4.5-5.3). Alguns espécimes apresentam um agrupamento de espículas marrom-amareladas da superfície oculta das coxas. Membrana basal presente nos pés. Fórmula dos dedos do pé: I <II <III <V <IV. Primeiro dedo muito curto, o segundo metade do tamanho do terceiro, quinto menor do que o segundo e terceiro. Tubérculo metatarsal oval. Tubérculo subarticular visível: dois em I, II e V dedo, três no III e IV. Ponta dos dedos não expandidos.

*Coloração em vida.* Os adultos apresentam uma pupila circular negra e íris dourado; alguns espécimes apresentam uma linha avermelhada desde a ponta do nariz até a inserção do antebraço; coloração do dorso marrom ou avermelhado escuro; um ou dois tubérculos grandes de coloração vermelha na região dorso-lateral; coloração do abdômen amarelo intenso; manchas irregulares marrons no abdômen; garganta e peito marrom claro; manchas amarelas na inserção do braço em vista ventral; grânulos amarelos e brancos presentes na região axilar, cobrindo o antebraço e braço; antebraço e braço com barras transversais escuras; coxas recobertas com pequenas manchas negras em vista ventral; espículas pequenas nas coxas e canela de coloração branca e amarelas; alguns indivíduos apresentam uma coloração amarela com manchas negras na região posterior da coxa cobrindo a cloaca; tarso com barras transversais marrons, coloração das mãos e pés vermelho intenso.

*Coloração em preservação.* A mesma cor que em vida, mas a coloração diminui em preservação, a coloração do dorso torna-se mais escuro. Também detectamos uma perda da coloração ventral que torna-se menos brilhante. A coloração axilar amarela se perde rapidamente. A coloração dos dedos se reduz drasticamente em intensidade (Figura 5).



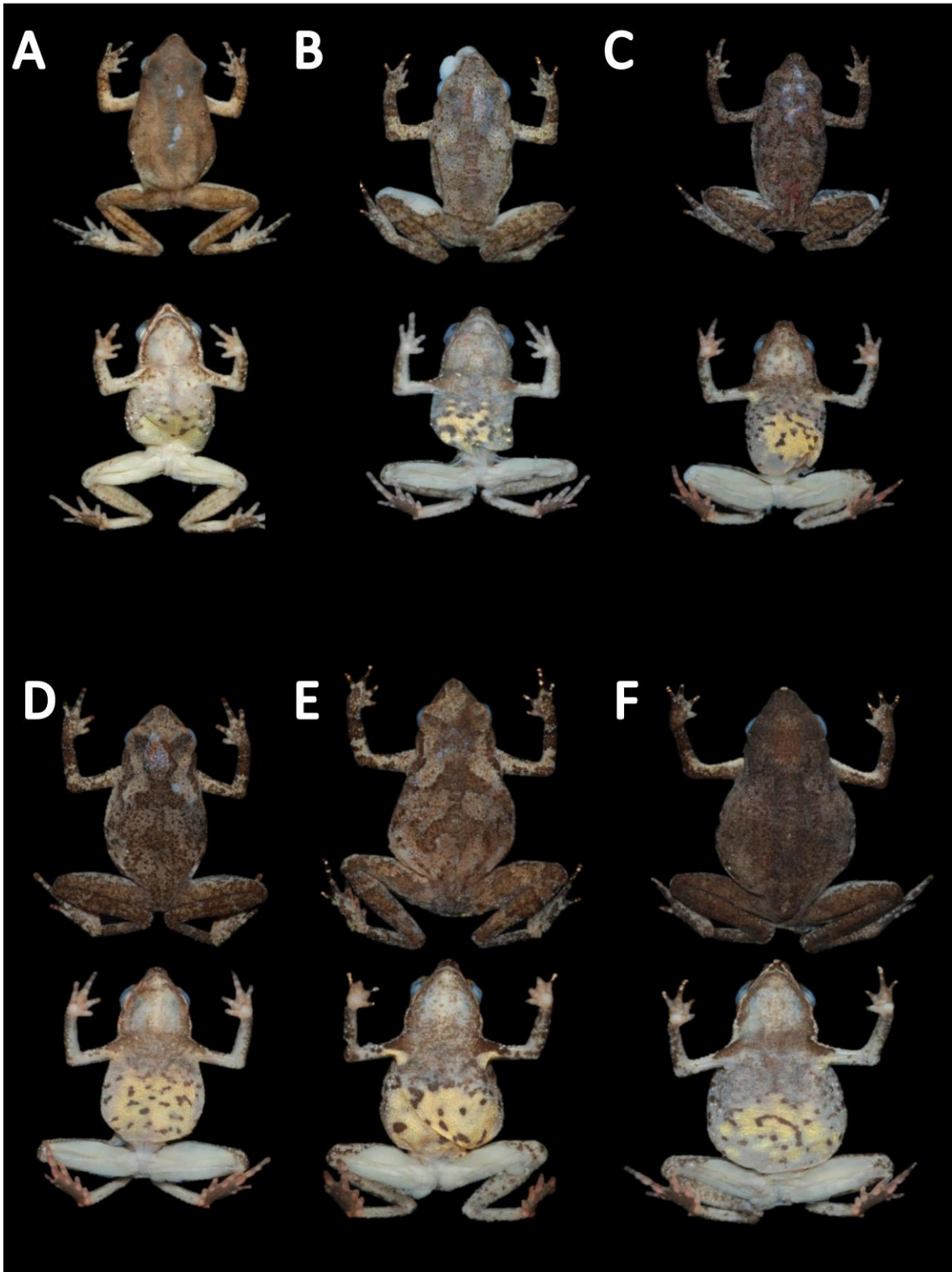


Figura 5. Topótipos de *Amazonophrynella minuta* em preservação. A-C) espécimes machos (INPA-H 32736, 32723, 32722); D-F) espécimes fêmeas (INPA-H 32731, 32725, 32723).

*Amazophrynella* sp. “buriti”

*Sinônimos.*

*Dendrophryniscus minutus* (Rodrigues & Duellmam , 1994)

*Holótipo.* MZUNAP- 901 macho adulto, coletado em Puerto Almendras (3° 49' 41.08"S, 73° 22' 7.68" W), dez quilômetros da cidade de Iquitos, Província de Maynas, Distrito de San Juan, Comunidade de Nina-Rumi, Peru, por Ian Pool Medina e Rommel Rojas em 15 de Janeiro de 2013 as 10 horas da manhã (Figura 6).

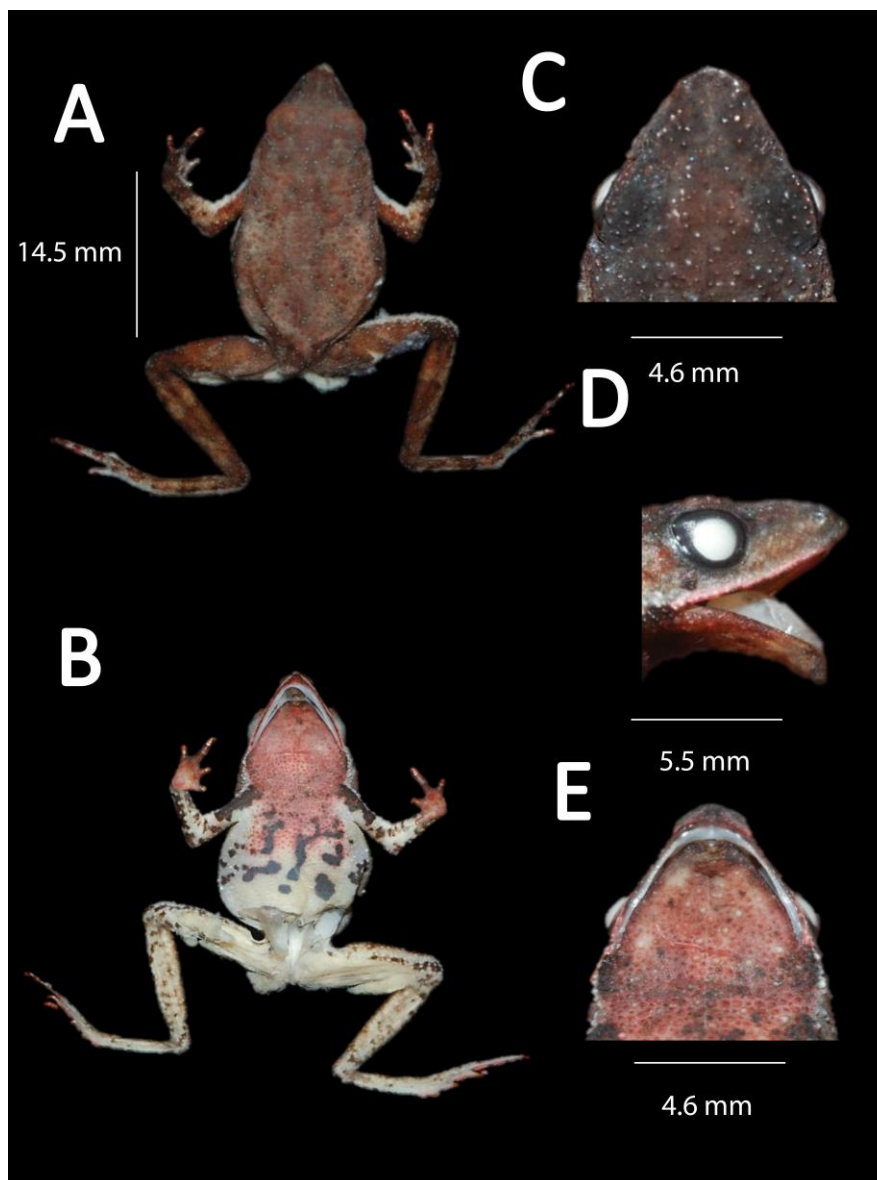


Figura 6. Indivíduo de *Amazophrynella* sp. “buriti” (MZUNAP-901). A) Vista dorsal, B) Vista ventral, C) Vista dorsal da cabeça, D) Vista lateral da cabeça, E) Vista ventral da cabeça.

*Paratopótipos*. MZUNAP 906; MZUNAP 915; MZUNAP 110; MZUNAP 907, MZUNAP 917; MZUNAP 889; MZUNAP 910; MZUNAP 911; MZUNAP 916; MZUNAP 913; MZUNAP 914 (fêmeas adultas) coletados em Puerto Almendras o dia 15 de Janeiro de 2013 por Ian Pool Medina e Richard Curto (Figura 7).

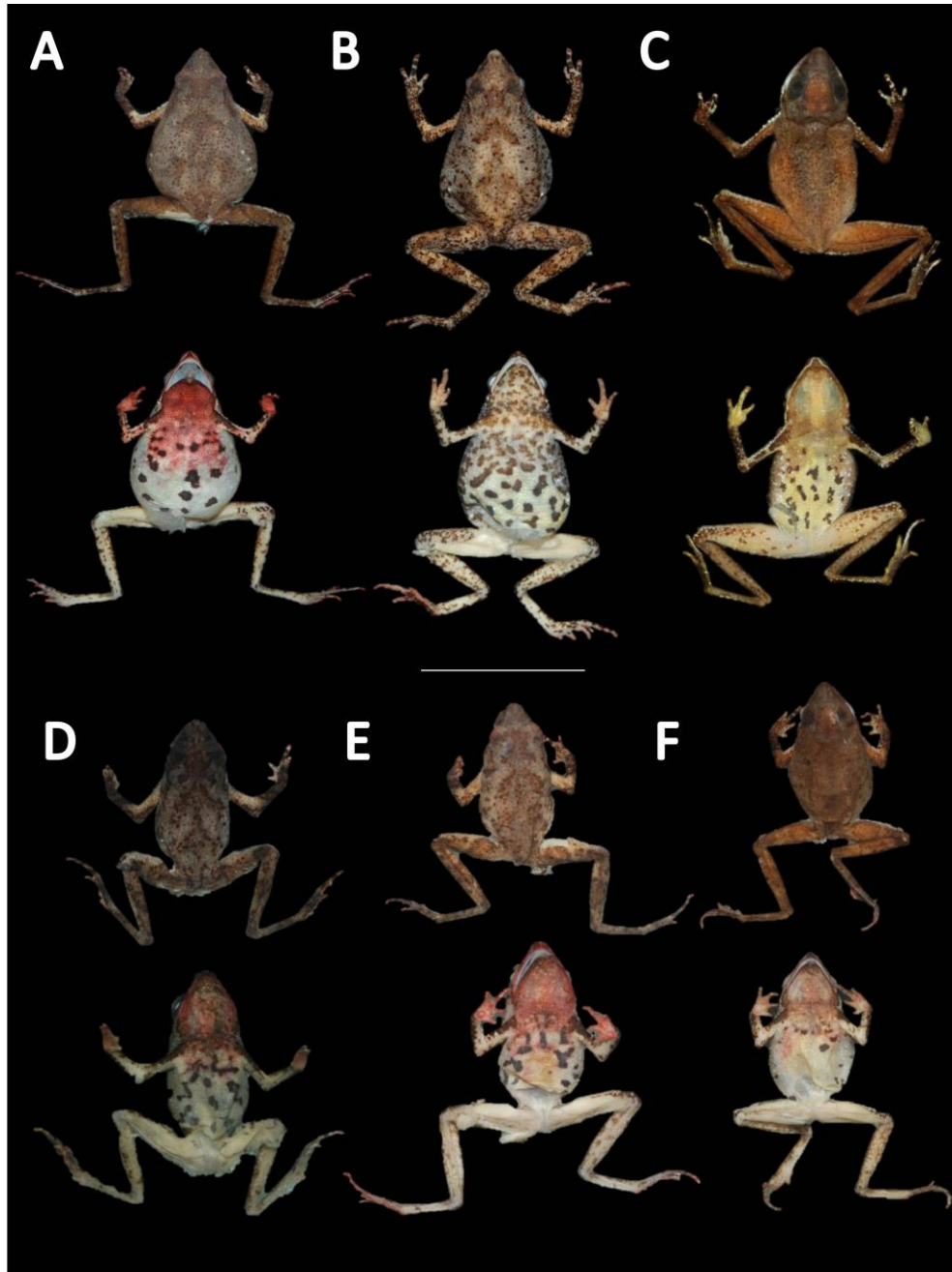


Figura 7. Indivíduos de *Amazophrynella* sp. “buriti” A-C) fêmeas adultas, MZUNAP 905, MZUNAP 905, MZUNAP 242; D-F) machos adultos, MZUNAP 887, MZUNAP 908, MZUNAP 902.

*Parátipos* MZUNAP 908, MZUNAP 924, MZUNAP 886, MZUNAP 900, MZUNAP 888, MZUNAP 919, MZUNAP 902 (machos adultos), MZUNAP 887, MZUNAP 905, MZUNAP 920 (fêmeas adultas) coletados na Fazenda Zamora, (3° 57' 58"S, 73° 25' 07" W), distrito de San Juan Bautista, Km 58 da rodovia Iquitos- Nauta, por Richard Curto e Ian Pool Medina em 17 de Janeiro de 2013. MZUNAP 918, MZUNAP 909 (fêmeas adultas) coletado na localidade de Nauta (4°34'09" S, 73°43'25" W) Província de Maynas, cem quilômetros da cidade de Iquitos, por Ian Pool Medina em 22 de Junho de 2012; MZUNAP 242 Província de Maynas coletado na localidade de Fazenda da Universidade Nacional de la Amazonia Peruana - UNAP (4° 00' 11" S; 73° 26' 04" W) Província de Maynas, 31.5 quilômetros da cidade de Iquitos, rodovia Iquitos- Nauta.

*Diagnoses.* *Amazophrynella* sp. "buriti" encontra-se dentro do gênero *Amazophrynella* pela combinação das seguintes sinapomorfias: Tamanhos pequenos, focinhos alongados e corpos achatados, cabeças com projeções triangulares, pálpebras menores que os comprimentos dos olhos, cristas craniais não visíveis, glândulas parótidas ausentes tímpano e saco vocal indistinto, corpos recobertos por grânulos de textura finamente granular até fortemente granulada ou verrugosa. A nova espécie apresenta os seguintes caracteres diagnósticos: 1) focinho aguçado (em vista dorsal); 2) ponta do focinho com uma pequena protuberância triangular (em vista dorsal e ventral); 3) cabeça afiada (em vista lateral); 4) textura do corpo espiculado recoberto por grânulos de tamanho médios irregularmente dispersos; 5) membranas basais no I e II dedo 6) coloração ventral amarela clara; 7) dorso de coloração castanha com pequenos grânulos brancos-esverdeados.

*Comparação com outras espécies.* Além dos caracteres diagnósticos, *Amazophrynella* sp. "buriti" distingue-se de (caracteres da nova espécie em parênteses): *A. minuta*, pela culminação do focinho pontiagudo (aguçado) (em vista ventral e dorsal); textura dorsal fortemente granulada com tubérculos cônicos (textura espicular com tubérculos arredondados); dedos das mãos sem membranas (membranas basais no I e II dedo); tubérculo palmar arredondado (elíptico); dedos das mãos dilatados (não dilatados); agrupamento de grânulos espinhosos agrupados na região axilar (grânulos espinhosos menos abundantes). De *A. bokermanni* a sua principal diferença é o tamanho do primeiro dedo, I>II em *A. bokermanni* (I<II em *A. sp. "buriti"*); tamanhos maiores em

machos e fêmeas (tamanhos menores); padrão de coloração do abdômen é branco com pontos castanhos (amarelo pálido com manchas marrão). De *A. vote* se diferencia pelo focinho arredondado (aguçado); cristas sub-rostrais não convergindo (convergindo); textura dorsal finamente granular (textura espicular médio granulada); coloração ventral marrom-avermelhado (amarelo); pontos brancos cobrindo o abdômen (manchas castanhas). De *A. sp.* “matses” distingue-se pela ausência de membranas basais no I e III dedo da mão (membranas presentes), ausência de protuberância triangular na ponta do nariz (protuberância presente) ausência de grânulos brancos esverdeados no corpo (grânulos marrons) ocelos negros cobrindo o abdômen (manchas castanhas) e tubérculo palmar elíptico (arredondado).

*Descrição do holótipo.* Corpo delgado; cabeça comprida como larga; comprimento da cabeça 37.3% do SVL; largura da cabeça 31.7% do SVL. Perfil da cabeça em vista ventral triangular; focinho aguçado em vista dorsal e lateral; ponta do focinho com uma pequena protuberância pontiaguda triangular; comprimento do focinho 44.1% o comprimento da cabeça; tímpano não visível; saco gular indistinto; olhos circulares proeminentes, abrangendo 21.4% do comprimento da cabeça; narinas mais perto da ponta do nariz que dos olhos; distância internasal igual que o diâmetro do olho; presença de uma linha de grânulos pequenos e espinhosos desde a ponta da boca até a região do antebraço.

Textura da pele no dorso espiculada, coberto com tubérculos abundantes de tamanhos pequenos e forma arredondados; grânulos espinhosos na base do antebraço de abundância regular; textura ventral granulada, um pouco maior que o dorso, os grânulos são redondos não pontiagudos; membros anteriores delgados; grânulos espinhosos nas superfícies dos antebraços; comprimento do braço 34.4% do SVL; comprimento da mão 66% do comprimento do braço; presença de pequenas espinhas que se expandem nas bordas de todo o braço e antebraço; dedos delgados; fórmula dos dedos I <II <IV <III tubérculo palmar arredondado; tubérculo supranumerário arredondado: dois no I dedo, dois no II e IV e três no III; membranas basais no I e II dedo.

Membros posteriores delgados; espículas triangulares presentes desde a coxa até a canela (em vista ventral); comprimento dos pés 66% o comprimento da coxa; fórmula dos dedos do pé: I <II <III <V <IV; tubérculo metatarsal arredondado; tubérculos

subarticulares redondos: dois em I, II e V dedo, três no III e IV; ponta dos dedos não expandidos.

*Medidas do holótipo (mm).* SVL: 14.5; HW: 4.6; HL: 5.5; SL: 2.4; ED: 1.2; IND: 1.2; UAL: 5.0; HAL: 3.3; THL: 8.1; TAL: 7.2; TL: 4.5; FL: 5.3.

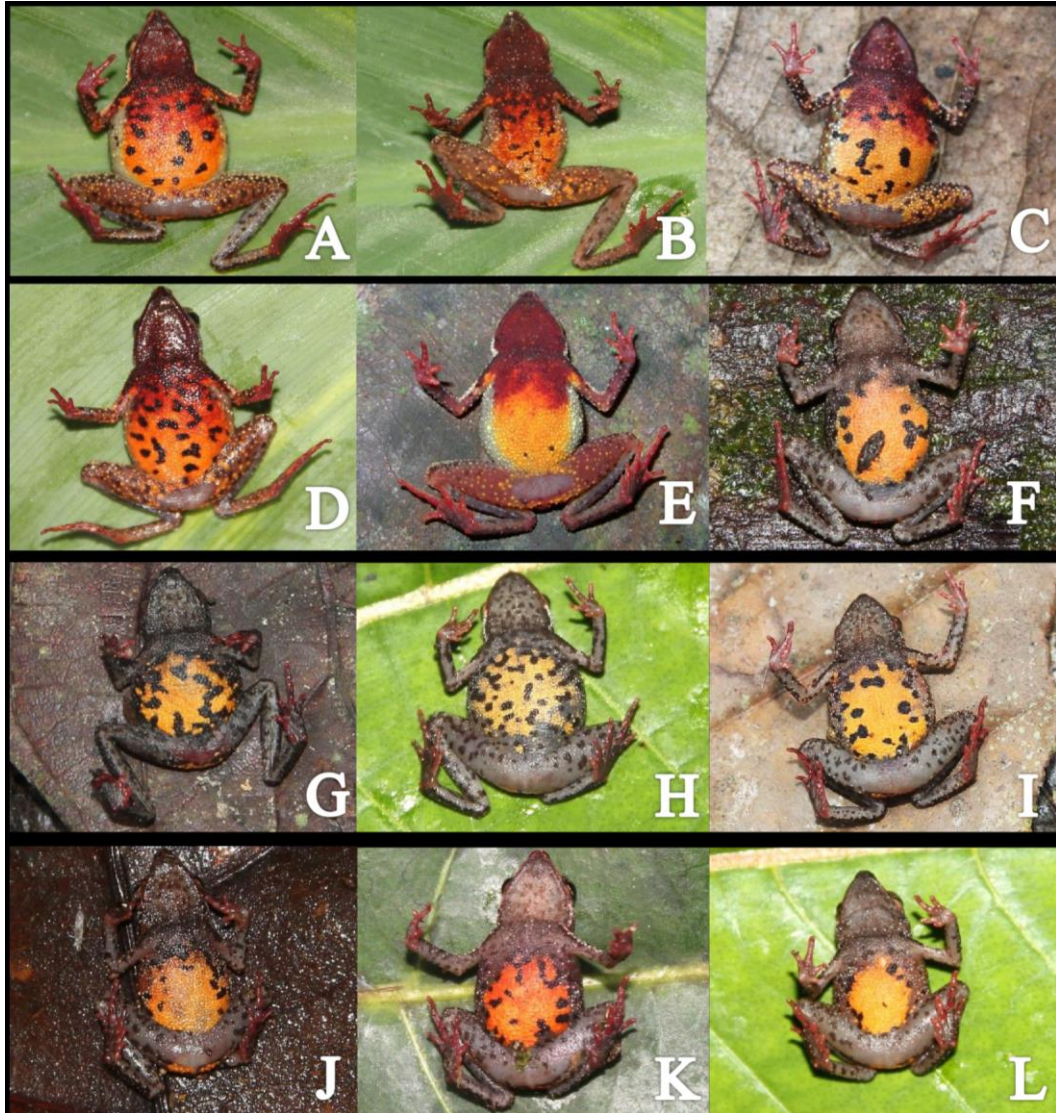


Figura 8. Padrões de variação no ventre de *Amazophrynella* sp. “buriti” note-se a presença de manchas grandes e a coloração do ventre amarelo-laranja intenso. A-F) espécimes fêmeas (Foto E ©Guissepe Gagaliardi); G-L) espécimes machos.

*Varição morfológica.* Existem variações no padrão de coloração ventral do abdômen. Alguns espécimes apresentam uma coloração amarela intensa. No período de reprodução a coloração da garganta e peito do macho e da fêmea torna-se vermelho intenso. Outros espécimes apresentam uma coloração amarela nos tubérculos das coxas. Foi observado também que alguns indivíduos possuem uma mancha de coloração

amarela cobrindo a cloaca. Alguns machos apresentam uma coloração amarelo-clara na superfície interior das coxas. As manchas amarelas cobrindo a superfície do abdômen às vezes se tornam mais claras. Regularmente são manchas arredondas, mais também foram observadas manchas sem forma de diferentes tamanhos (Figura 8).

*Coloração em álcool.* Em álcool de 70° nota-se uma perda da coloração ventral, ficando menos colorido. A coloração das mãos e pés se perde rapidamente. O dorso torna-se mais escuro

*Etimologia.* Nomeamos esta espécie como “*buriti*” em honra ao fruto da palmeira *Mauritia flexuosa*, um fruto conhecido e consumido em toda a Amazônia.

### ***Amazophrynella* sp. “matses”**

*Sinônimos.*

*Dendrophryniscus minutus* (Gordo, 2006)

*Holótipo.* MZUNAP 921 macho adulto, coletado da localidade de Nuevo Salvador (5° 18' 10"S, 73° 54' 01" W), distrito de Requena, Província de Requena, Loreto, Peru, por Ian Pool Medina, Richard Curto e Rommel Rojas em 05 de Fevereiro de 2013 as 14:45 horas (Figura 9).

*Paratopótipos.* MZUNAP 920, MZUNAP 922, MZUNAP 923, MZUNAP 925, MZUNAP 926 (machos adultos) MZUNAP 927, MZUNAP 944, MZUNAP 938, MZUNAP 936 (fêmeas adultas) coletados as 15h30min. Todos os paratopótipos foram coletados aos redores de uma poça de água.

*Paratipos.* MZUNAP 934, MZUNAP 936 MZUNAP 940, MZUNAP 948 MZUNAP 943, MZUNAP 952, MZUNAP 953 (machos adultos), coletados em Nuevo Salvador, (5° 2' 33"S, 73° 50' 02" W), distrito de Requena, por Richard Curto em 06 de Janeiro de 2013; MZUNAP 928, MZUNAP 929, MZUNAP 930, MZUNAP 931, MZUNAP 933, MZUNAP 934, MZUNAP 935, MZUNAP 936, MZUNAP 937, MZUNAP 939, MZUNAP 941, MZUNAP 942, MZUNAP 946, MZUNAP 947, MZUNAP 949 , (fêmeas adultas) coletado na comunidade de Jenaro Herrera, distrito de Requena (4° 53'54.49" S, 73°37'05.63" W) em 06 de Janeiro de 2013 por Rommel Rojas; MZUNAP 932, MZUNAP 945, MZUNAP 950, (fêmeas adultas), coletados em Nuevo Salvador,

(5° 2' 33"S, 73° 50' 02" W), distrito de Requena, por Ian Pool Medina em 07 de Janeiro de 2013 (Figura 10).

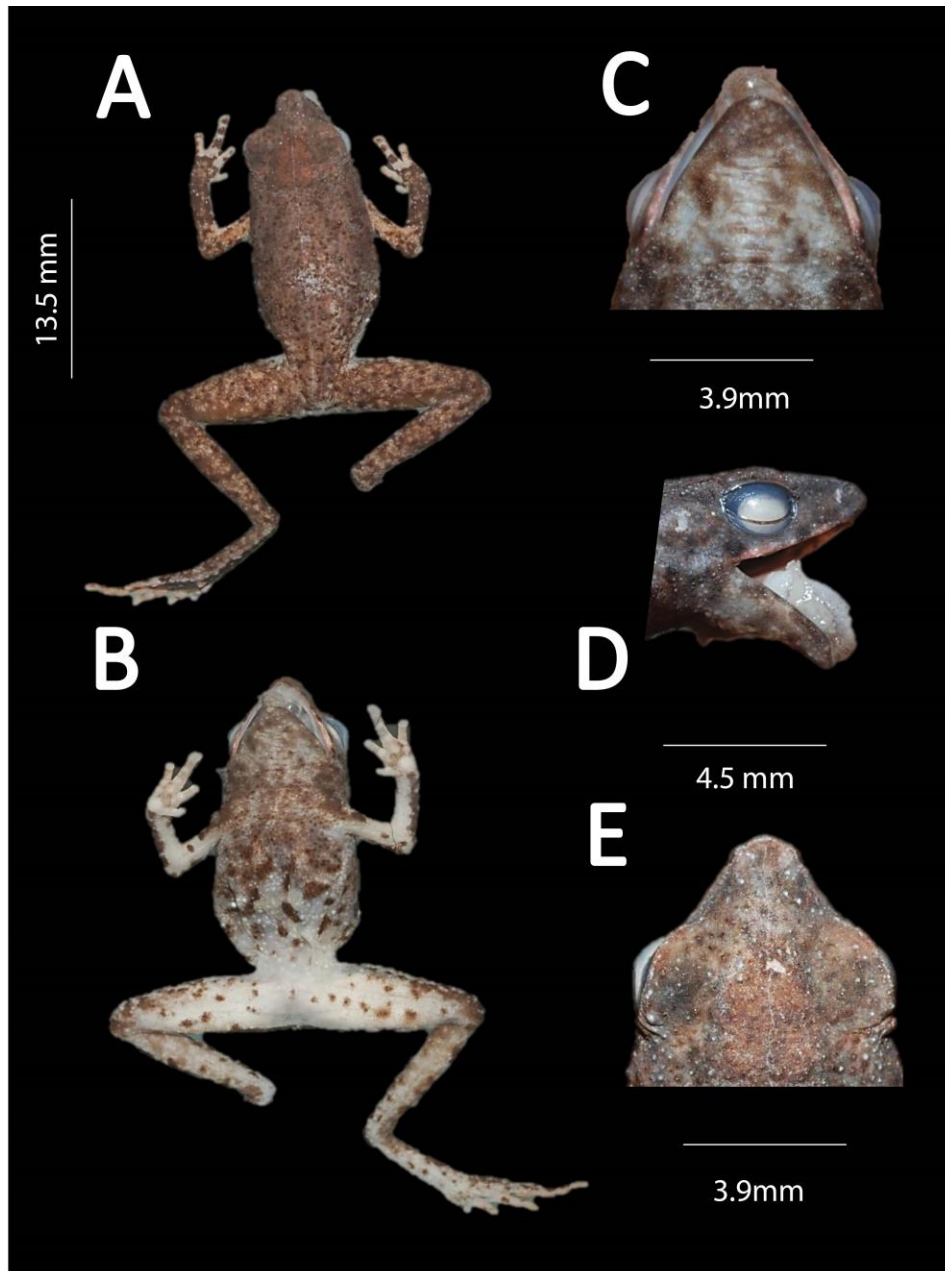


Figura 9. Indivíduo de *Amazophrynella* sp. “matses” (MZUNAP 921); A) vista dorsal; B) vista ventral; C) forma da cabeça (vista dorsal); D) forma da cabeça (vista lateral); E) forma da cabeça (vista lateral).

*Diagnosis.* *Amazophrynella* sp. “matses” é diagnosticada das outras *Amazophrynella* spp. pela combinação dos seguintes caracteres: 1) tamanhos menores do gênero: fêmeas



17.1mm  $\pm$  0.7 (16.5-17.7mm), machos 12mm  $\pm$  0.6 (11.5-13.5mm); 2) protuberância nasal inchada nas bordas; 3) tubérculos palmares elípticos; 4) ponta dos dedos das mãos inchados, 5) presença de ocelos negros de tamanhos médios cobrindo o ventre.

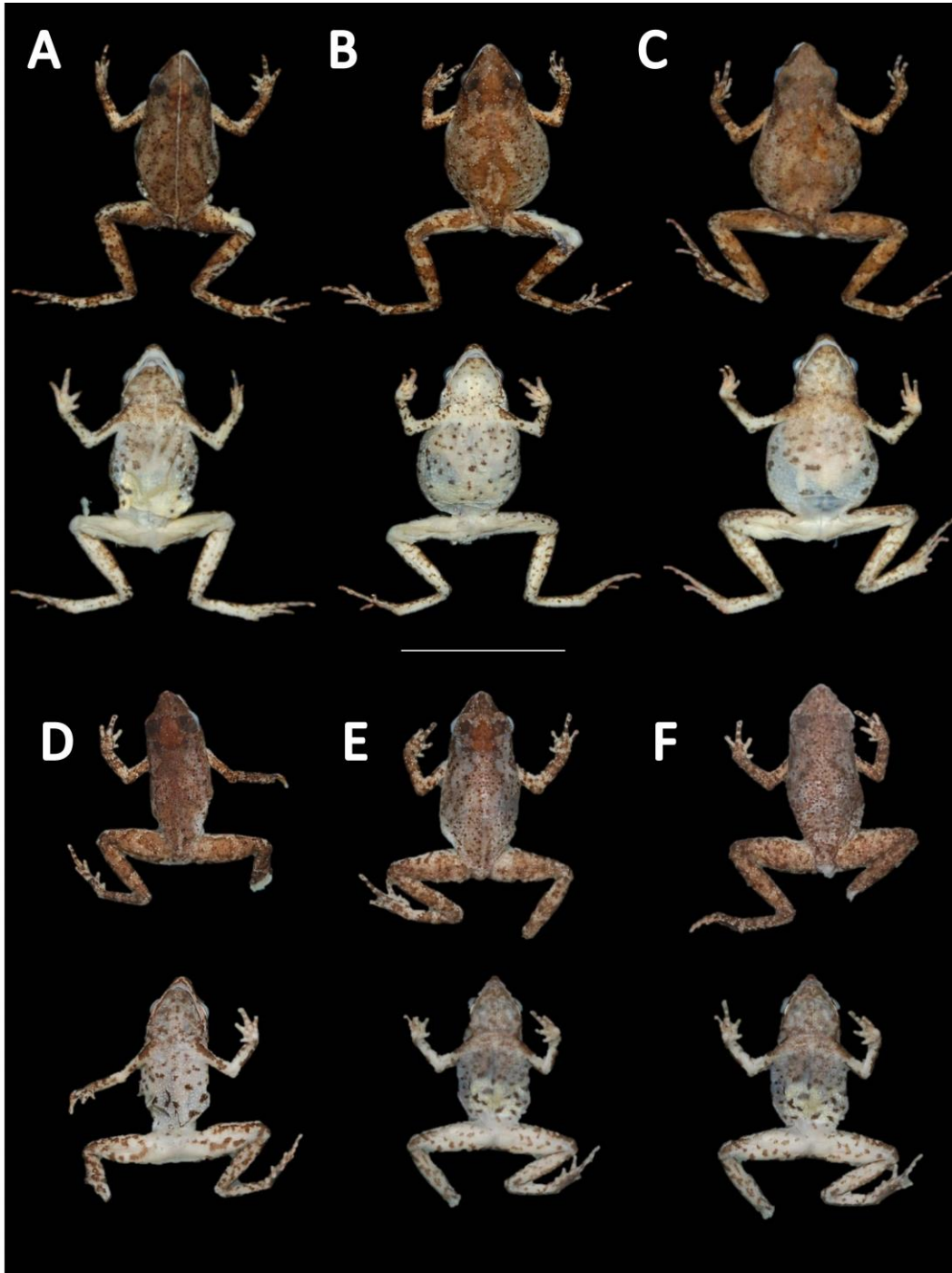


Figura 10. Indivíduos de *Amazonophrynella* sp. “matses”. A-C) fêmeas adultas, MZUNAP 928, MZUNAP 931, MZUNAP 947; D-F) machos adultos, MZUNAP 922, MZUNAP 920, MZUNAP 923.

*Comparação com outras espécies.* *Amazophrynella* sp. “matses” se distingue das outras *Amazophrynella* spp. (caracteres da nova espécie entre parênteses): De *A. minuta* pelo maior tamanho nos machos (tamanhos menores em machos), culminação do focinho pontiagudo sem protuberância nasal inchada nas bordas (truncado com protuberância nasal inchada nas bordas; figura 11), textura do corpo granulada (textura do corpo espiculado). De *A. bokermanni* sua principal diferença é o tamanho do primeiro dedo da mão (I<II em *A. sp. nov. “matses”* e I>II em *A. bokermanni*), coloração do ventre branco com manchas negras (amarelo intenso com ocelos negros). De *A. vote* pela culminação do focinho arredondado (truncado, em vista ventral), coloração ventral amarronzado com pontos avermelhados (amarela com ocelos negros). *A. manaos* apresenta dedos das mãos não inchados (inchados), textura do corpo médio granular (textura espiculado), ventre branco com ocelos ou listras negras (ventre amarelo intenso com ocelos negros). De *A. sp. “buriti”*, distingue-se pela presença de membrana basais no I e III dedo (ausente, figura 12), nariz aguçada (nariz truncada), ausência de protuberância nasal inchada nas bordas (protuberância nasal inchada), presença de espículas brancas esverdeadas no corpo (ausentes), manchas cobrindo o ventre (ocelos de tamanhos médios–pequenos).

*Medidas do holótipo (mm).* SVL: 13.5; HW: 3.9; HL: 4.5; SL: 2.2; ED: 1.1; IND: 1.1; UAL: 4.0; HAL: 2.8; THL: 5.9; TAL: 5.7; TL: 4.2; FL: 5.3.

*Descrição do holótipo.* Corpo delgado; cabeça comprida como larga; comprimento da cabeça 33.4% do SVL; largura da cabeça 28.8% do SVL. Perfil da cabeça em vista ventral triangular; focinho pontado (em vista lateral); ponta do focinho truncado (em vista dorsal); comprimento do focinho 48.8% o comprimento da cabeça; tímpano e saco vocal indistintos; olhos circulares, abrangendo 24.4% do comprimento da cabeça; narinas mais perto da ponta do nariz que dos olhos.

Textura do dorso espiculado, coberto com inúmeros grânulos pequenos arredondados distribuídos irregularmente; poucos grânulos espinhosos na base do antebraço; textura ventral com abundantes grânulos maiores do que no dorso ; membros anteriores delgados; menores que os posteriores; comprimento do braço 29.6% do SVL; pequenas espinhas se expandem nas bordas de todo o braço e antebraço em pouca abundância; dedos delgados e compridos; fórmula dos dedos I <II <IV <III tubérculo

palmar elíptico presente; tubérculo supranumerário arredondado: dois no I dedo, dois no II e três no IV e III dedo; dedos sem membranas interdigitais. Ponta dos dedos inchados.

Membros posteriores delgados; maiores que as os membros superiores; espículas pequenas triangulares presentes desde a coxa até a canela; comprimento dos pés 89.8% o comprimento da coxa; fórmula dos dedos do pé: I <II <III <V <IV; tubérculo metatarsal arredondado; tubérculos subarticulares redondos: dois em I, II e V dedo, três no III e IV dedo; ponta dos dedos dilatados.

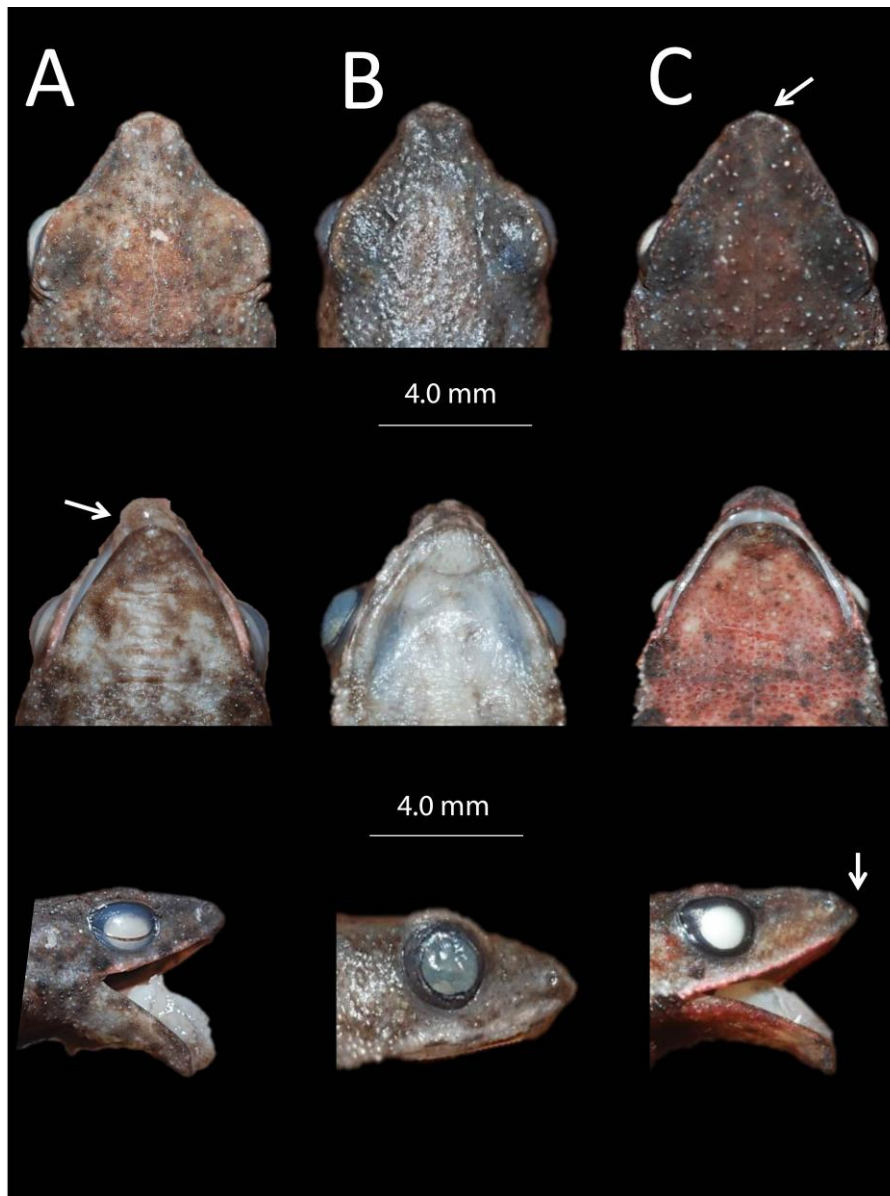


Figura 11. Formas das cabeças em vista, dorsal, ventral e lateral de: A) *Amazophrynella* sp. "matses" (MZUNAP 921); B) *A. minuta* (INPA-H 32740), C) *A. sp.* "buriti" (MZUNAP 908). A seta em *A. sp.* "matses" indica a protuberância nasal nas bordas; e em *A. sp.* "buriti" indica a protuberância triangular no final do focinho (escala=3.2mm).

*Coloração do holótipo.* Coloração dorsal castanha com barras transversais triangulares marrons claras, banda longitudinal branca na mandíbula pouco visível que estende-se desde ponta do focinho até a boca. Iris dourado, pupilas negras. Cor da garganta e peito marrom-acinzentado; cor do abdômen amarelo intenso; ocelos pequenos negros cobrindo o abdômen e a região da garganta e peito. Coxas gris-amarronzado com ocelos negros pequenos dispersos. Grânulos marrons - avermelhados cobrindo tudo o corpo. Pés e mãos vermelhos.



Figura 12. Comparação entre as mãos e os pés de: A) *Amazophrynella* sp. “buriti” (MZUNAP 901), B) *A. minuta* (INPA-H 32740, topótipo) da localidade tipo, C) *A. sp.* “matses” (MZUNAP 931). As setas indicam a existência ou ausência de membranas no I e III dedos da mão e a forma do tubérculo palmar de *A. sp.* “buriti” e *A. sp.* “matses”.

*Varição morfológica.* Variações intraespecíficas são evidentes, especialmente nos padrões de coloração ventral (Figura 13). Em alguns espécimes existe uma abundância maior dos ocelos negros cobrindo as regiões da garganta, peito, abdômen e coxas. Alguns espécimes apresentam manchas tipo listras no ventre, devido à união dos ocelos. Os padrões dorsais são quase invariáveis. Alguns indivíduos possuem uma linha marrom que se estende desde a ponta do focinho até a cloaca. A coloração do dorso pode variar entre castanho-claro até marrom claro. A mancha amarela do ventre pode se estender desde a metade do abdômen até o peito.

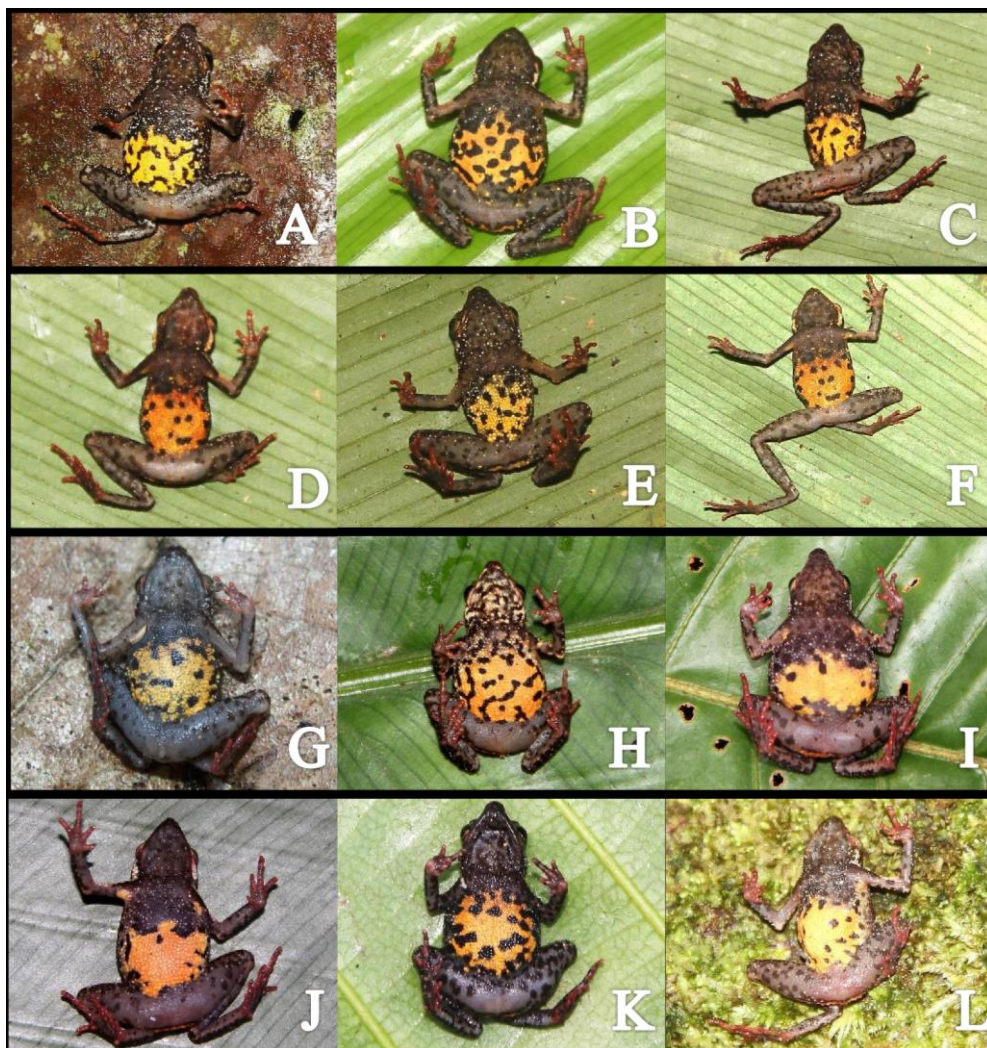


Figura 13. Padrões de variação no ventre de *Amazophrynella* sp. “matses”, nota-se a presença de manchas grandes e a coloração do ventre amarelo intenso. A-C) espécimes fêmeas; G-L) espécimes machos. Nota-se a menor quantidade de ocelos e manchas no ventre.

*Coloração em álcool.* Coloração dorsal torna-se mais escura. Se observa a perda gradativa da coloração ventral, especialmente da coloração amarela do abdômen que se torna branca. Os ocelos negros ficam evidentes na região ventral.

*Etimologia.* Nomeamos esta espécie como “*matses*” em honra à tribo indígena dos Matsés, território onde a espécie foi encontrada pela primeira vez.

## DISCUSSÃO

Em este trabalho duas novas espécies do gênero *Amazophrynella* foram descritas baseadas em caracteres morfológicos e moleculares. As novas espécies descritas para o gênero revelaram uma diversidade subestimada concordando com os dados de Fouquet *et al.* (2007), Fouquet *et al.* (2012b) e Rojas *et al.* (2014). Estes resultados indicam a existência de novos desafios que direcionem em revelar os verdadeiros padrões taxonômicos de este a este gênero.

As novas espécies formam parte das espécies do complexo *A. minuta*, evidentemente diferenciadas pelos padrões morfológicos e de distribuição geográfica. *A. “buriti”* sp. nov. e *A. “matses”* sp. nov. foram nomeados erroneamente como *A. minuta* por um longo tempo devido à uma identificação errada e ausência de uma revisão taxonômica adequada. Nossa hipóteses filogenética baseada no fragmento 16S DNA (barcode para os anfíbios) (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007) demonstrou a existência de outros linhagens independentes de *Amazophrynella*: a linhagem de *A. aff. minuta* do este da Amazônia (Equador), *A. sp.* das “Guianas” (táxon irmão de *A. manaos*), evidenciando-se a existência de um maior número de potenciais candidatos a novas espécies.

Com a redescrição de *A. minuta* foram identificados caracteres morfológicos que ajudarão em distinguir futuras novas espécies de *Amazophrynella*. Este gênero críptico está começando em ser revelado. Não se descarta a existência de outras espécies erroneamente nomeadas como *A. minuta*, distribuídas no Equador y a região das Guianas.

Com as novas espécies descritas neste trabalho, o número de espécies dentro do gênero *Amazophrynella* aumenta para seis: *A. minuta*, *A. bokermanni*, *A. vote*, *A. manaos*, *A. “buriti”* sp. nov. e *A. “matses”* sp. nov. Enquanto populações denominadas como *A. minuta* ainda apresentam diferenças morfológicas notáveis, sendo necessários maiores revisões taxonômicas que abranjam um estudo morfológico, filogenético e bioacustico das populações não analisadas. Estes resultados sugerem que a taxonomia do gênero *Amazophrynella* ainda encontram-se longe de ser resolvida.

*Amazophrynella* “buriti” sp. nov. e *A.* “matses” sp. nov. conhecidas só para o Peru. Os limites de estas duas novas espécies ainda não estão completamente definidas, provavelmente *A.* “buriti” sp. nov. encontra-se distribuído em toda a parte noreste do lado esquerdo do rio Amazonas, Peru, abrangendo localidades no este e norte da cidade de Iquitos, esta espécie foi encontrada em ambientes de areia branca, chamadas de campinaranas ou varillales. *A.* “matses” sp. nov. ocorre no lado direito do rio Amazonas, Peru, margem direta do rio Ucayali, provavelmente esta espécie se distribuía mais ao sudeste do Peru, abrangendo as localidades de Pucallpa, região Ucayali Peru.

Os estudos taxonômicos deste gênero devem integrar a taxonomia num contexto integrativo (filogenética, morfologia, morfometria e bioacústica). Por outro lado é necessário um estudo evolutivo deste gênero, que envolva maiores detalhes sobre sua história, origem e dispersão, e assim contribuir para o conhecimento dos eventos de especiação neste grupo de anuros.



## CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo utilizou a taxonomia integrativa para revelar uma grande diversidade subestimada dentro do gênero *Amazophrynella*.

1. Foram encontradas oito linhagens dentro do gênero: quatro pertencem as espécies nominais do gênero, e outras quatro representam potenciais espécies novas.
2. As distâncias genéticas entre linhagens evidenciou alta divergência.
3. A análise morfométrica revelou divergências entre algumas linhagens, sendo a espécie de maior diferenciação *A. bokermanni*. Dentro do complexo *A. minuta* as divergências morfométricas mostraram diferenciação entre as linhagens.
4. Os cantos de anúncio das espécies do gênero *Amazophrynella* apresentam divergências em forma e estrutura.
5. Todas as espécies do gênero possuem um comportamento ecológico similar.
6. A redescrição morfológica de *A. minuta* ajudará futuras considerações taxonômicas e comparação dos caracteres diagnósticos entre potenciais espécies novas.
7. Duas novas espécies de *Amazophrynella* foram descritas, distribuídas somente no Peru.
8. Identificamos outras espécies do gênero *Amazophrynella* dentro do complexo de *A. minuta*; ainda, não se deve descartar a possibilidade de que *A. bokermanni* também seja um complexo de espécies.
9. Análises morfológicas, bioacústicas e genéticas são ferramentas importantes para contribuir ao conhecimento da taxonomia e sistemática das espécies de anuros.

## Bibliografia

Ávila, R.W., Carvalho, V.T., Gordo, M., Ribeiro, K. & Morais, D. (2012) A new species of *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae) from southern Amazonia. *Zootaxa*, 3484, 65–74.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T. & Neigel, J.E. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522

Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, & I. Das, (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology Evolution*. 22, 148–155.

Boersma, P. & Weenick D. (2006). Praat: doing phonetics by computer. Version 4.5.02. Publicado pelos autores.

Bosch, J., De La Riva, I. & Marquez, R. (1999). Advertisement calls of seven species of hyperoliid frogs, from Equatorial Guinea. *Amphibia-Reptilia*, 21, 246-255.

C. Vriesendorp, N. Pitman, J. I. Rojas M., B. A. Pawlak, L. Rivera C., L. Calixto M., M. Vela C. & P. Fasabi R. (eds.). (2006). Perú: Matsés. Rapid Biological Inventories Report 16. Chicago, Illinois: The Field Museum.

Caminer, M., Ron, S. (2014). Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. *Zookeys*, 379, 1-68.

Crawford, A.J., Lips, K.R. & Bermingham, E. (2010) Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama.

Cruz, C.A.G. & Fusinato, L.A. (2008) A new species of *Dendrophryniscus*, Jiménez de la Espada, 1871 (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rain Forest of Rio Grande do Sul, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 3, 22–26.

Darst, C.R. & Cannatella, D.C. (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 462–75.

De la Riva, I. Marquez & R. Bosch, J. (1997) Description of the advertisement calls of some South American Hylidae (Amphibia: Anura): Taxonomic and methodological consequences. *Bonner zoologische Beiträge*, 47, 175-185.

De la Riva, I., Köhler, J. Lötters, S., & Reichle, S. (2000) Ten years of research on Bolivian amphibians : updates checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. *Revista Espanola de Herpetologia.*, 14, 19-164.

Duellman, W.E. (1978) The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publications, University of Kansas Museum of Natural History*, 65, 1–352.

Elmer, K.R., Dávila, J.A. & Lougheed, S.C. (2007) Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *Evolutionary Biology*, 7, 247- 260.

Felsenstein, J. (1981) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791

Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. & Gemmell, N.J. (2007) Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2, e1109.

Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira Jr., M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. & Rodrigues, M.T. (2012b) Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 823–838.

Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira Jr., M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. & Rodrigues, M.T. (2012a) *Amazonella* Fouquet *et al.*, 2012 (Anura: Bufonidae) junior homonym of *Amazonella* Lundblad,

1931 (Acari: Unionicolidae): proposed replacement by *Amazophrynella* nom. nov. *Zootaxa* 3244, 68.

Frost, D.R (1985) *Amphibians species of the world*. Allen Press Association of Systematics Collections. 732 pp.

Frost, D.R. (2013) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.4 (9 January, 2013) American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. (Accessed on 20 May 2013).

Funk, C.W., Caminer, M. & Ron, M. R. (2011) High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society*, 8 pp. doi:10.1098/rspb.2011.1653.

Fusinatto, L.A. Alexandrino, J. Haddad, C.F.B., Brunes, T.O., Sequeira, F. (2013) Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS ONE* 8(11).

Galetti Jr, P. M., Rodrigues, F. P., Solé-Cava, A., Miyaki, C. Y., Carvalho, D., Eizirik, E., Veasey, *et al.* (2008) Genética da conservação brasileira. pp.244-274. In: *Fundamentos de Genética da Conservação*. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Harper, D.A.T. (ed.). 1999. *Numerical Palaeobiology*. John Wiley & Sons

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

Hodl, W. (1977) Call differences and calling site segregation in anuran species from Central Amazonian Floating meadows. *Oecologia*, 28, 357-363.

Izecksohn, E. (1993) Nova espécie de *Dendrophryniscus* da região amazônica (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 10, 407–412.

Jobb, G. (2008) *TREEFINDER version of March 2011*, distributed by the author, Munich, Germany. Available from: <http://www.treefinder.de/> (27/05/2013).

Kohler, J.S. & Lotters. (1998) Advertisement calls of two Bolivian Leptodactylus (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*, 20, 215-219.

Lima, A.P., Magnusson, W.E., Menin, M., Erdtmann, L.K., Rodrigues, D.J., Keller, C. & Hödl, W. (2006) *Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central – Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonian*. Áttema Design Editorial, Manaus, 168pp.

Magnusson, W.E. & Hero, J.H. (1991) Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs. *Oecologia*, 86, 310–318.

Marqués, R., De La Riva, I. & Bosch, J. (1993) Advertisement calls of Bolivian species of Hyla (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica*, 25, 426-443.

Mazzoni, D. & Dannenberg, R. (1999) Audacity 1.2.6. <http://audacity.sourceforge.net/about/license>. Publicado pelos autores

McDiarmid, R.W. (1971) Comparative morphology and evolution of frogs of the Neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History*, 12, 1–66.

Melin, D.E. (1941) Contributions to the knowledge of the Amphibia of South America. *Göteborgs Kungl. Vetenskaps- och Vitterhets-samhälles. Handlingar. Serien B, Matematiska och Naturvetenskapliga Skrifter*, 1, 1–71.

Miralles, A. & Vences, M. (2013) New Metrics for Comparison of Taxonomies Reveal Striking Discrepancies among Species Delimitation Methods in Madascincus Lizards. *PLoS ONE* 8, 7: e68242. doi:10.1371/journal.pone.0068242.

Padial, J. M. & De la Riva, I. (2009) Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155: 97 – 122.

Padial, J.M., A. Miralles, I. De la Riva & M. Vences. (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7, 16.

Padial, J.M., Chaparro, J.C., Castro Viejo-Fisher, S., GUYASAMIN, J., Lehr, E., Delgado, A., Vaira, M., Texeira, JR., Aguayo, R. & De la Riva, I. (2012) A revision of species diversity in the Neotropical genus *Oreobates* (Anura: Strabomantidae), with the description of three new species from the Amazonian slopes of the Andes. *American museum novitates*, 3755, 55pp.

Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In*: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, K.B. (Eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 205–247.

Posada D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biological and Evolution*, 25, 1253-1256

Pramuk, J.B. (2006) Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146, 407–452. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 13777–13782

Reis, S.(1998) Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. *Revista Brasileira de Zoologia* 5(4). 571-580.

Ribas, C. C., A. Aleixo, Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y. & Cracraft, J. (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 279, 681–689.

Rodríguez, L.O. & Duellman W.E. (1994) *Guide to the Frogs of the Iquitos Region. Amazonian Peru*. University of Kansas Natural History Museum, special Publications, 22, 80 pp.

Rojas, R., Carvalho, V., Ávila, R., Gordo, M., Farias. I. & Hrbek, T. (2014) A new species of *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae) from the southwestern part of the Brazilian Guiana Shield. *Zootaxa*, 3753 (1): 079–095

Ron, S. Venegas, P., Toral, E., Read, E., Ortiz, D., Manzano, A. (2012) Systematics of the *Osteocephalus buckleyi* species complex (Anura: Hylidae) from Ecuador and Peru. *Zookeys* 229: 1-52.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY. 1626 pp.

Simões, P., A Lima., W. Magnusson, W. Hodl. . & A. Amezquita. (2008) Acoustic and Morphological Differentiation in the Frog *Allobates femoralis*: Relationship with the Upper Madeira River and Other Potential Geological Barriers. *Biotropica* 40(5): 607-614.

Simões, P., Lima, A. & Farias, I (2010) The description of a cryptic species related to the pan-Amazonian frog *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Anura: Aromobatidae). *Zootaxa*, 2406, 1 –28.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.

Vences, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D. R. (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers of Zoology*, 2: 5

Vieites, D.R., et al. (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 8267–8272.

Zimmerman. B.L. (1983) A comparison of structure features of call of open and forest habitat of frogs species in the central Amazonian. *Herpetologica*, 39, 235-146.

## ANEXOS

### Anexo 1. Espécimes examinados

*Amazophrynella vote*. Machos. INPA-H 31867, INPA-H 31870, INPA-H 31886, INPA-H 31883, INPA-H 31869, INPA-H 31880, INPA-H 31887 (Parque nacional Matupiri), INPA-H 28718, INPA-H 28715, INPA-H 28711, INPA-H 28713, INPA-H 28719, INPA-H 28714, INPA-H 28724 (Parque Nacional Nascentes do Lago Jarí), Fêmeas. INPA-H 31882, INPA-H 31874, INPA-H 31880, INPA-H 31884, INPA-H 31870, INPA-H 31866, INPA-H 31873, INPA-H 31872, INPA-H 31885, INPA-H 31879, INPA-H 31878, INPA-H 31871, INPA-H 31875, INPA-H 31868, INPA-H 31877 (Parque Estadual do Matupiri), INPA-H 28721, INPA-H 28720, INPA-H 28722, INPA-H 28723, INPA-H 28716, INPA-H 28712.

*Amazophrynella bokermanni*. Machos. MTAZL H 0495, EH 1485, MTAZL H 0499, MTAZL H 0506, EH1503 (Rio Tapajós), Fêmeas. J153, J156, J158, J157, J155 (Juruti)

*Amazophrynella minuta* (Taracua). Machos. INPA-H 32721, INPA-H 32722, INPA-H 32723, INPA-H 32724, INPA-H 32725, INPA-H 32726, INPA-H 32727, INPA-H 32728, INPA-H 32729, INPA-H 32730, INPA-H 32731, INPA-H 32732, INPA-H 32733 Fêmeas. INPA-H 32735, INPA-H 32736, INPA-H 32737, INPA-H 32738, INPA-H 32739, INPA-H 32740.

*Amazophrynella manaos*. Machos. INPA- H 30655, INPA-H 6983, INPA-H6984, INPA-H 6987, INPA-H7797 (Campus UFAM), INPA-H 29568, INPA-H 29571, INPA-H 29570, INPA-H 29572, INPA-H 29569 (Mineração Taboca), INPA-H 21028, INPA-H 21170, INPA-H 21060, INPA-H 20991, INPA-H 20992, INPA-H 20993, INPA-H 20994, INPA-H 20995, INPA-H 20996, INPA-H 20997, INPA-H 20998, INPA-H 20999, INPA-H 21000, INPA-H 21001, INPA-H 21002, INPA-H 21003 (Reserva Adolpho Ducke), INPA-H 21451, INPA-H 21398, INPA-H 21821 (Reserva ZF2), INPA 1859 (Parque Estadual Rio Negro Setor Sul, rio Cuieiras). Fêmeas. INPA-H 20986; INPA-H 21217, INPA-H 20968 até INPA-H 21014 (Reserva Adolpho Ducke), INPA-H 30577, INPA-H 30575, INPA-H 30573, INPA-H 30572, INPA-H 30576 (Presidente Figueredo), INPA-H 21442, INPA-H 21400 (Reserva ZF2),

*Amazophrynella* sp. “buriti”. Machos. MZUNAP 901 (Puerto Almendras) MZUNAP 908, MZUNAP 924, MZUNAP 886, MZUNAP 900, MZUNAP 888, MZUNAP 919, MZUNAP 902, MZUNAP 887 (Fundo Zamora) Fêmeas. MZUNAP 906; MZUNAP 915; MZUNAP 110; MZUNAP 907, MZUNAP 917; MZUNAP 889; MZUNAP 910; MZUNAP 911; MZUNAP 916; MZUNAP 913; MZUNAP 914 (Puerto Almendras), MZUNAP 905, MZUNAP 920 (fundo zamora), MZUNAP 918, MZUNAP 909 (Nauta), MZUNAP 242 (Fundo UNAP).

*Amazophrynella* sp. “matses”. Machos. MZUNAP 921, MZUNAP 958, MZUNAP 922, MZUNAP 923, MZUNAP 925, MZUNAP 926, MZUNAP 934, MZUNAP 955 MZUNAP 940, MZUNAP 948 MZUNAP 943, MZUNAP 952, MZUNAP 953 (Nuevo salvador). Fêmeas. MZUNAP 927, MZUNAP 944, MZUNAP 938, MZUNAP 936 (Nuevo salvador), MZUNAP 928, MZUNAP 929, MZUNAP 930, MZUNAP 931, MZUNAP 933, MZUNAP 955, MZUNAP 935, MZUNAP 950, MZUNAP 937, MZUNAP 939, MZUNAP 941, MZUNAP 942, MZUNAP 946, MZUNAP 947, MZUNAP 949 (Jenaro herrera), MZUNAP 932, MZUNAP 945, MZUNAP 950 (Requena)



**Anexo 2.** Localidades, número do GeneBank e de Museu dos indivíduos utilizados para a construção da árvore filogenético.

<b>Espécie/Linhagem</b>	<b>Localidade</b>	<b>Número no Genbank</b>	<b>Número de Museu</b>
<i>A. manaos</i>	Campus da UFAM, Brasil	KF433954	INPA-H 6983
<i>A. manaos</i>	Campus da UFAM, Brasil	KF433955	INPA-H 6984
<i>A. manaos</i>	Campus da UFAM, Brasil	KF433956	INPA-H 6987
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Brasil	KF433957	INPA-H 30577
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Brasil	KF433958	INPA-H 30574
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Brasil	KF433959	INPA-H 30573
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Brasil	KF433970	INPA-H 28720
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Brasil	KF433971	INPA-H 28722
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Brasil	KF433972	INPA-H 28723
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Brasil	KF433973	INPA-H 28716
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Brasil	KF433974	INPA-H 28721
<i>A. minuta</i>	Taracuá, Brasil		INPA-H 32734
<i>A. minuta</i>	Taracuá, Brasil		INPA-H 32735
<i>A. bokermanni</i>	Rio Aripuanã, margem esquerdo, Brasil	JN867559	
<i>A. bokermanni</i>	Rio Aripuanã, margem direita, Brasil	JN867560	
<i>A. bokermanni</i>	Rio Abacaxis, Brasil	JN867561	
<i>A. bokermanni</i>	Rio Abacaxis, Brasil	JN867563	
<i>A. sp. "Guianas"</i>	Guianas francesas: Lac Toponowini	JN86754377	296MC
<i>A. sp. "Guianas"</i>	Guianas francesas: Mitaraka	JN867544	305 MC
<i>A. aff. minuta</i>	Equador	DQ158262	QCAZ 883
<i>A. aff. minuta</i>	Lagarto Cocha, Peru	AY 36000	
<i>A.sp. "buriti" linhagem A</i>	Fundo Zamora		MZUNAP 916

A.sp. "buriti" linhagem A	Fundo Zamora		MZUNAP 913
A.sp. "buriti" linhagem A	Fundo Zamora		MZUNAP 907
A.sp. "buriti" linhagem A	Puerto Almendras		MZUNAP 889
A.sp. "buriti" linhagem A	Puerto Almendras		MZUNAP 110
A.sp. "buriti" linhagem A	Puerto Almendras		MZUNAP 901
A.sp. "buriti" linhagem A	Puerto Almendras		MZUNAP 917
A.sp. "buriti" linhagem A	Puerto Almendras		MZUNAP 918
A.sp. "buriti" linhagem A	Fundo Zamora		MZUNAP 915
A.sp. "buriti" linhagem A	Fundo Zamora		MZUNAP 911
A.sp. "matses" linhagem D	Fundo Zamora		MZUNAP 944
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 948
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 921
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 925
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 920
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 923
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 940
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 953
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 926
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 927
A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 934

A.sp. "matses" linhagem D	Nuevo Salvador		MZUNAP 922
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 943
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 938
A.sp. "matses" linhagem D	Jenaro Herrera		MZUNAP 952

**Anexo 3.** Artigo publicado na Zootaxa como parte do mestrado



<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3753.1.7>

<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:753637FD-6478-4152-91B1-807250422F2B>

## A new species of *Amazophrynella* (Anura:Bufonidae) from the southwestern part of the Brazilian Guiana Shield

ROMMEL R. ROJAS<sup>1,2,7</sup>, VINÍCIUS TADEU DE CARVALHO<sup>1,3,4</sup>, MARCELO GORDO<sup>5</sup>, ROBSON W. ÁVILA<sup>6</sup>, IZENI PIRES FARIAS<sup>1</sup> & TOMAS HRBEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coleção de Anfíbios e Répteis, Campus II, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Biologia, ICB, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

<sup>6</sup>Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, Campus do Pimenta, Rua Cel. Antônio Luiz, 1161, Bairro do Pimenta, CEP 63105-100, Crato, CE, Brazil

<sup>7</sup>Corresponding author. E-mail: [rommelrojaszamora@yahoo.es](mailto:rommelrojaszamora@yahoo.es)

### Abstract

*Amazophrynella* is a genus of the family Bufonidae, currently represented by three species. The type species of the genus, *Amazophrynella minuta*, however, is a complex of species occurring throughout the Amazonian biome. This group remains problematic taxonomically; the difficulty lays principally in the lack of diagnostic characters in the original description of *A. minuta*, the lack of molecular data and refined taxonomic comparison of individuals through its wide distribution. We describe a new species of the genus *Amazophrynella*, distributed in the southwestern part of the Guiana Shield of Brazil based on a series of morphological and molecular characters. The new species differs from others of the genus by presenting a slightly truncated triangular snout, ventral texture covered by many fine granules, white belly covered with black spots and by fifteen molecular autapomorphies in the 16S rDNA fragment. Uncorrected p-distances of a fragment of the 16S mitochondrial rDNA gene revealed high divergence among other *Amazophrynella* species (9%–14%). Additionally we provide a new diagnosis of topotypic material of *Amazophrynella minuta* including molecular data. Our results show the existence of a subestimated diversity in the genus *Amazophrynella*.

**Key words:** Amphibian, Anura, Bufonidae, *Amazophrynella*, Brazil

### Resumo

*Amazophrynella* é um gênero da família Bufonidae, atualmente representado por três espécies. *Amazophrynella minuta* é considerada como um complexo de espécies que se distribui por todo o bioma amazônico. Este grupo permanece taxonomicamente problemático, sendo as principais dificuldades a ausência de caracteres diagnósticos na descrição original de *A. minuta*, a inexistência de dados moleculares e comparações taxonômicas detalhadas dos indivíduos, através de sua extensa distribuição. Descrevemos uma nova espécie do gênero *Amazophrynella*, distribuída no sudoeste da região do escudo da Guiana baseados em caracteres morfológicos e moleculares. A nova espécie difere de outras do gênero por apresentar um focinho triangular ligeiramente truncado, textura ventral coberto por muitos grânulos finos, barriga branca coberta por manchas pretas e quinze automorfias moleculares no fragmento do 16S rDNA. As distâncias não corrigidas (p - distâncias) no fragmento 16S rDNA revelaram uma alta divergência entre as outras espécies de *Amazophrynella* (9%–14%). Adicionalmente providenciamos uma nova diagnose do material topotípico de *Amazophrynella minuta*, incluindo dados moleculares. Nossos resultados mostram a existência de uma diversidade subestimada dentro do gênero *Amazophrynella*.

## Resumen

*Amazophrynella* es un género perteneciente a la familia Bufonidae representada actualmente por tres especies. *Amazophrynella minuta* es considerada como un complejo de especies que se distribuye por todo el bioma amazónico. Este grupo permanece taxonómicamente problemático, siendo la principal dificultad la ausencia de los caracteres diagnósticos en la descripción original de *A. minuta*, inexistencia de los datos moleculares y comparaciones taxonómicas refinadas a lo largo de su amplia distribución. Describimos una nueva especie del género *Amazophrynella*, distribuida en la parte suroeste de la región del escudo de Guyana basados en caracteres morfológicos y moleculares. La nueva especie difiere de otras del género por presentar una nariz triangular ligeramente truncada, textura ventral cubierta por muchos gránulos finos, vientre blanco cubierto por manchas negras y quince automorfias moleculares en el gen 16S rDNA (9%–14%). Adicionalmente proveemos una nueva diagnosis del material topotípico de *Amazophrynella minuta*, incluyendo datos moleculares. Nuestros resultados indican la existencia de una diversidad subestimada dentro del género *Amazophrynella*.

## Introduction

*Amazophrynella* Fouquet, Recoder, Teixeira, Cassimiro, Amaro, Camacho, Damasceno, Carnaval, Moritz, & Rodrigues 2012, is a genus of small, early diverging bufonid frogs (Pramuk *et al.*, 2008; Bocxlaer *et al.*, 2010). The genus is currently represented by three nominal species: *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941), *A. bokermanni* (Izecksohn, 1993) and *A. vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais, 2012 (Frost, 2013). All species of *Amazophrynella* present a clear sexual size dimorphism, reproduce in seasonal puddles and share this characteristic only with *Dendrophryniscus leucomystax* (Izecksohn, 1968). Their exclusive habitat is leaf litter and they have a diurnal activity (Magnusson & Hero, 1991; Lima *et al.*, 2006; Ávila *et al.*, 2012). Currently there are no studies describing the bioacoustic patterns of any species of *Amazophrynella*.

Until 2012 species of the genus *Amazophrynella* were placed in the genus *Dendrophryniscus*. In 2012 Fouquet *et al.* (2012a) recognized that species of *Dendrophryniscus* from the Amazon and Atlantic rainforest represent morphologically and molecularly deeply divergent lineages, and thus the authors proposed a new genus: *Amazonella* for the Amazonian species, but because this name was already occupied by a genus of Acari, the name had to be changed to *Amazophrynella* (Fouquet *et al.*, 2012b). The type species of the genus is *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941) described from the Taracú mission, on the right bank of the Uaupés River, near the Brazil-Colombia-Venezuela border. Melin (1941) collected only six individuals, all part of the type series, which are deposited in the Naturhistoriska Museet, Göteborg, Sweden (NHMG). Possibly due to lack of material other than the type series, and a relatively generalized diagnosis of the species, the name *Amazophrynella minuta* has been used for individuals from many different populations sampled throughout the Amazonian biome (e.g. Duellman, 1978; Zimmerman & Rodrigues, 1990; Magnusson & Hero, 1991; Rodrigues & Duellman, 1993; Lima *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2012a). However, it is unlikely that many or all of these publications refer to the true *A. minuta*; what is referred to as *A. minuta* in the literature likely represents a complex of species (Fouquet *et al.*, 2012a).

Herein, we describe a new species of the *Amazophrynella minuta* species complex using molecular and morphological data. The species is described from municipality of Manaus, state of Amazonas, Brazil. We also rediagnose *Amazophrynella minuta* based on newly collected specimens from its type locality.

## Material and methods

We analyzed 57 specimens identified as *Amazophrynella minuta* (Melin, 1941) originating from six localities near Manaus, Brazil deposited in the Collection of Amphibians and Reptiles of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia—INPA (INPA-H). This material was compared with twenty specimens (fourteen males and six females, see appendix 1) of recently collected *A. minuta* from the type locality (Taracú mission, on the right bank of the Uaupés River, municipality of São Gabriel da Cachoeira, Brazil). Further comparisons were made with photographed material of the two syntypes deposited in the Naturhistoriska Museet, Göteborg, Sweden (NHMG), and the original description of the species (Melin, 1941).

In addition to this material we analyzed five specimens of *Amazophrynella bokermanni* (Izecksohn, 1993) from near the type locality deposited in the Collection of Amphibians and Reptiles of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia—INPA, Manaus, Amazonas, Brazil (INPA-H), the holotype of *Amazophrynella vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais 2012, deposited in the Coleção Zoológica de Vertebrados of the

Universidade Federal de Mato Grosso—UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil (UFMT-A) and seventeen *A. vote* paratypes deposited in the Collection of Amphibians and Reptiles of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia—INPA, Manaus, Amazonas, Brazil (INPA-H). List of specimens examined is found in Appendix 1.

Measurements were obtained with Mitotuyo® digital calliper (0.1 mm precision) with an ocular micrometer in a Zeiss stereomicroscope. Measurements were: snout-vent length (SVL); head length (HL); head width (HW), upper eyelid width (UEW); eye diameter (ED); snout length (SL); eye to nostril distance (END); internarial distance (IND); interorbital distance (IOD); hand length (HAL); upper arm length (UAL); thigh length (THL); tibial length (TL); tarsal length (TAL) and foot length (FL) following Cruz & Fussinato (2008). Sex was determined based on gonadal analysis.

Total DNA was extracted from muscle tissue using standard phenol/chloroform extraction (Sambrook *et al.*, 1989). A 480 bp fragment of the 16S rDNA was PCR amplified using the 16Sar and 16Sbr primers (Palumbi, 1996). Amplification was carried out under the following conditions: 60 s hot start at 92°C followed by 35 cycles of 92°C (60 sec), 50°C (50 sec) and 72°C (1.5 min). Final volume of the PCR reaction was 12 µL and contained 4.4 µL ddH<sub>2</sub>O, 1.5 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL of 10 mM dNTPs (2.5mM each dNTP), 1.25 µL of 10x buffer (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 µL of each 2 µM primer, 0.3 µL of 5 U/µL DNA Taq Polymerase (Biotools, Spain) and 1 µL of DNA (about 30 ng/µL). Sequencing reactions were carried out according to the manufacturer's recommendation for the ABI BigDye Terminator cycle sequencing mix, using 16Sa and an annealing temperature of 50°C. Sequencing reactions were precipitated using standard EDTA/EtOH protocol, and resolved in an ABI 3130xl automatic sequencer.

We obtained 16S rDNA sequence data from sixteen specimens of the new species (Genbank numbers: KF433954-69), including three topotypes and nine additional paratypes as well as five paratypes of *A. vote* (Genbank numbers: KF433970-74), two specimens of *A. bokermanni* (Genbank numbers: KF433975-76) and two specimens of *A. minuta* from its type locality (Genbank numbers: KF792834-35) (Table 1) deposited in the tissue collection of the Laboratório de Evolução e Genética Animal of the Universidade Federal do Amazonas (CTGA-ICB/UFAM). The dataset also included three sequences of *A. bokermanni* (Genbank numbers: JN867559, JN867561, JN867563) from Fouquet *et al.* (2012a) and three sequences of *A. aff. minuta* (Genbank numbers: AY326000, DQ158420, EU201057) from Darst and Canatella (2004), Pramuk (2006) and Fouquet *et al.* (2007). Sequences were aligned using the Clustal W algorithm (Thompson *et al.*, 1996) implemented in BioEdit (Hall, 1999) and alignment was adjusted as necessary against the secondary structure of the 16S rDNA. A second dataset was constructed via inclusion of sequences of three specimens of the new species and *A. vote*, and two specimens of *A. bokermanni* and *A. minuta* from its type locality, in the aligned dataset of Fouquet *et al.* (2012a) kindly provided by A. Fouquet. New sequences were aligned manually to conform to the existing 16S rDNA alignment used in Fouquet *et al.* (2012a).

Evolutionary lineages are diagnosed by discontinuities in character variation among lineages, and correspond to phylogenetic species. The existence of lineages is therefore a necessary and sufficient prerequisite for inferring the existence of a species under the different conceptualizations of the Phylogenetic Species Concept (PSC) (Cracraft, 1983; Baum & Donoghue, 1995). The existence of lineages in a non tree-based context (Cracraft, 1983) was inferred using Population Aggregation Analysis performed at the level of an individual (Davis & Nixon, 1992; Rach *et al.*, 2008) using the first dataset (*Amazophrynella* species only). The existence of lineages in a phylogenetic tree-based context (Baum & Donoghue, 1995) was performed using Maximum Likelihood analysis (Felsenstein, 1981) in the program Treefinder (Jobb, 2008) using the GTR+I+G model of substitution, selected via Akaike information criterion as implemented in Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Phylogenetic support was assessed via non-parametric bootstrap (Felsenstein, 1985). Additionally uncorrected pairwise genetic distances between species of *Amazophrynella* (first dataset) were calculated in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2007).

**TABLE 1.** Individuals used in the molecular analyses. Information includes classification (sample), collecting locality (locality), genbank accession number for the 16S rDNA fragment (Genbank accession number), INPA-H voucher number (museum number), whether individual is a topotype or is part of a type series (specimen status).

Sample	Locality	Genbank accession number	Museum number (INPA-H)	Specimen status
<i>A. manaos</i>	Campus of UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil	KF433954	6983	paratopotype
<i>A. manaos</i>	Campus of UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil	KF433955	6984	paratopotype

...continued on the next page

**TABLE 1.** (Continued)

Sample	Locality	Genbank accession number	Museum number (INPA-H)	Specimen status
<i>A. manaos</i>	Campus of UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil	KF433956	6987	paratopotype
<i>A. manaos</i>	Fazenda of UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil	KF433957	7797	
<i>A. manaos</i>	Fazenda of UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil	KF433958	7798	
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil	KF433959	30577	paratype
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil	KF433960	30576	paratype
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil	KF433961	30573	paratype
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil	KF433962	30571	
<i>A. manaos</i>	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil	KF433963	30575	paratype
<i>A. manaos</i>	Mineração Taboca, Presidente Figueiredo municipality, Amazonas, Brazil	KF433964	29566	
<i>A. manaos</i>	Mineração Taboca, Presidente Figueiredo municipality, Amazonas, Brazil	KF433965	29567	
<i>A. manaos</i>	Mineração Taboca, Presidente Figueiredo municipality, Amazonas, Brazil	KF433966	29568	paratype
<i>A. manaos</i>	Mineração Taboca, Presidente Figueiredo municipality, Amazonas, Brazil	KF433967	29569	paratype
<i>A. manaos</i>	Mineração Taboca, Presidente Figueiredo municipality, Amazonas, Brazil	KF433968	29570	paratype
<i>A. manaos</i>	Parque Estadual Rio Negro Setor Sul, rio Cuieiras, Amazonas, Brazil	KF433969	1859	paratype
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Amazonas, Brazil	KF433970	28720	paratype
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Amazonas, Brazil	KF433971	28722	paratype
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Amazonas, Brazil	KF433972	28723	paratype
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Amazonas, Brazil	KF433973	28716	paratype
<i>A. vote</i>	Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Amazonas, Brazil	KF433974	28721	paratype
<i>A. bokermanni</i>	Juruti, Pará, Brazil	KF433975	31864	
<i>A. bokermanni</i>	Juruti, Pará, Brazil	KF433976	31861	
<i>A. minuta</i>	Taracua, Amazonas, Brazil	KF792834	32729	topotype
<i>A. minuta</i>	Taracua, Amazonas, Brazil	KF792835	32730	topotype

## Results

### *Amazophrynella manaos* sp. nov.

(Figure 1)

*Dendrophryniscus minutus* (McDiarmid, 1971; Zimmerman & Rodrigues, 1990; Magnusson & Hero, 1991; Lima *et al.*, 2006)

*Amazonella minuta* (Fouquet *et al.*, 2012a)

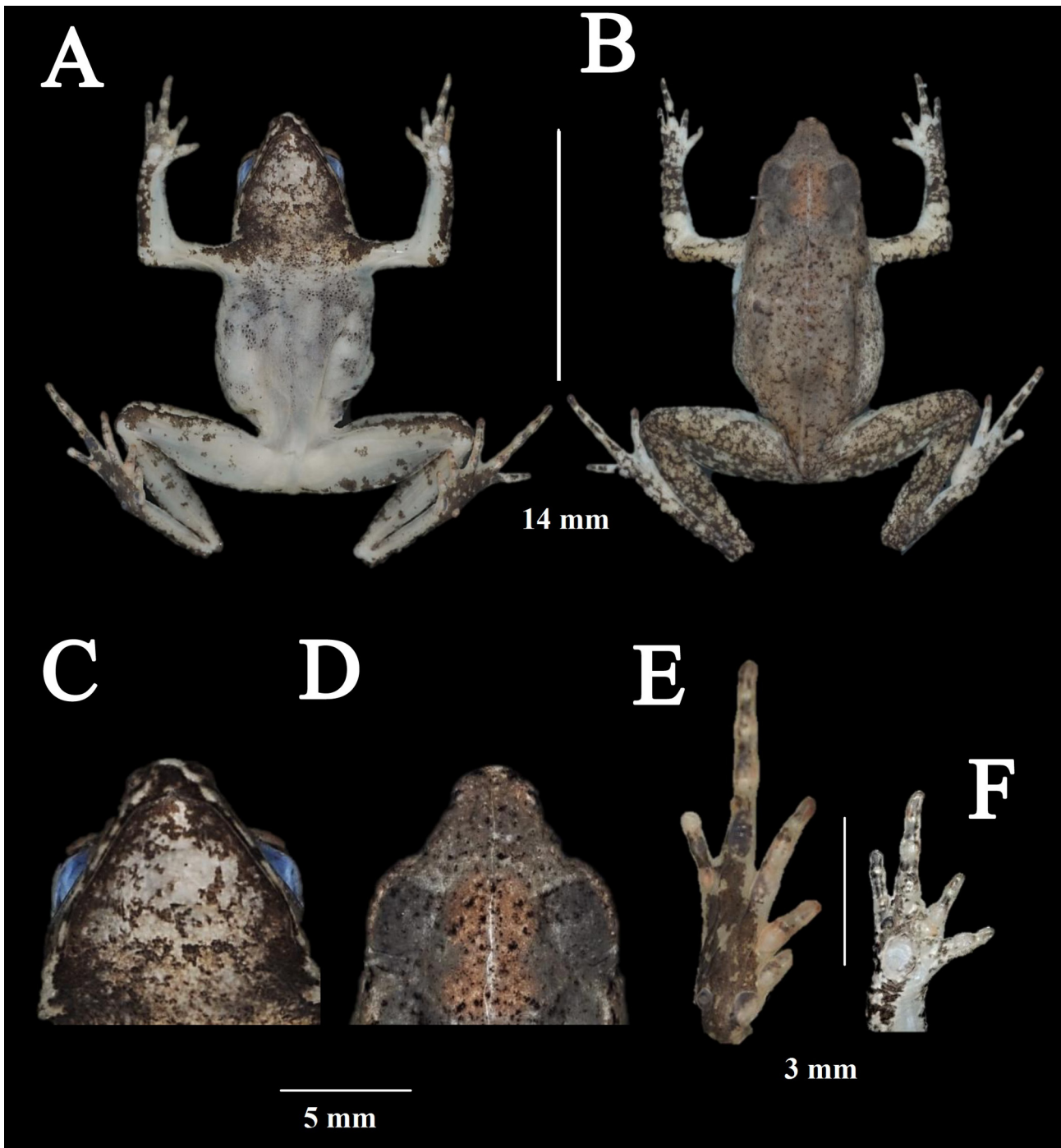
*Amazophrynella minuta* (Fouquet *et al.*, 2012b)

**Holotype.** INPA-H 31866, adult male, collected in forest remnants of the campus of the Universidade Federal do Amazonas—UFAM (03° 05' 56"S, 59°58' 09" W), municipality of Manaus, Amazonas State, by Vinicius Tadeu de Carvalho and Rommel Roberto Rojas, on June 26, 2012 at 16:35 h.

**Paratypes.** INPA-H 29568, INPA-H 29571, INPA-H 29570, INPA-H 29572, INPA-H 29569 (adult males), collected in Mineração Taboca (0° 42' 59" S, 60° 10' 24" W), municipality of Presidente Figueiredo, Amazonas State, by Vinicius Tadeu de Carvalho, on December 17, 2011; INPA-H 6983, INPA-H 6984, INPA-H 6987 (adult males), collected on the campus of the Universidade Federal do Amazonas—UFAM (03° 05' 37" S, 59° 58' 26"



W), Amazonas State, by Ana Cristina de Oliveira Cordeiro, on February 10, 2010; INPA-H 20986; INPA-H 21217 (adult females), INPA-H 21028, INPA-H 21170, INPA-H 21060 (adult males), collected in the Reserva Florestal Adolpho Ducke (02° 55' 37" S, 59° 58' 14" W), by Albertina P. Lima, in December 1992; INPA-H 30577, INPA-H 30575, INPA-H 30573, INPA-H 30572, INPA-H 30576 (adult females), collected at the municipality of Presidente Figueiredo (01° 56' 20" S, 60° 02' 14" W), Amazonas State, by André Luiz Ferreira da Silva, on January 5, 2012; INPA-H 21442, INPA-H 21400 (adult females), INPA-H 21451, INPA-H 21398, INPA-H 21821 (adult males), collected at Reserve ZF-2 (02°35' 20"S, 60°06' 55"W), municipality of Presidente Figueiredo, Amazonas State, by Albertina P. Lima, in December 1997; INPA-H 1859 (adult male), collected at Parque Estadual Rio Negro Setor Sul, Cuieiras River (02° 43' 27" S, 60° 24' 22" W), municipality of Manaus, Amazonas State, by Vinicius Tadeu de Carvalho and Lucécia Bonora, on January 10, 2007.



**FIGURE 1.** Holotype of *Amazophrynella manaos* sp. nov. (INPA-H 31866): A) Dorsal view, B) Ventral view, C) Dorsal view of head, D) Ventral view of head, E) Ventral view of the right foot, F) Ventral view of right hand.

**Diagnosis.** The new species is assigned to the genus *Amazophrynella* by the combination of the following generic characters: small size, depressed body, eardrum and parotid glands not visible, presence of granulate bodies, presence of subarticular tubercles on hands, elongated snout, and via phylogenetically nested position within the genus *Amazophrynella*. The new species is characterized by: 1) triangular snout with a slightly truncate culmination (in ventral view); 2) ventral surface covered with high density fine granules; 3) white abdomen; 4) black patches or stripes on the abdomen; 5) fifteen molecular autapomorphies in the 16S rDNA (Table 2). Divergence from its nominal sister taxon is 9%.

**TABLE 2.** Species level diagnostic characters observed in the 16S rDNA gene of *Amazophrynella manaos* sp. nov. and other species of *Amazophrynella*. First line indicates position of the character within the 16S rDNA gene (*Xenopus laevis* 16S rDNA gene was used as reference). (-) indicates a deletion.

Position (pb)	308	340	346	370	443	446	452	455	467	478	522	530	537	558	583
<i>A. manaos</i>	C	A	T	A	G	C	C	T	C	G	T	T	G	C	A
<i>A. vote</i>	T	C	C	C	A	T	A	A	T	A	C	A	A	A	G
<i>A. minuta</i>	T	C	C	T	A	T	A	A	T	A	C	G	A	A	G
<i>A. bokermanni</i>	T	C	C	G	T	T	-	A	T	A	C	G	A	T	G

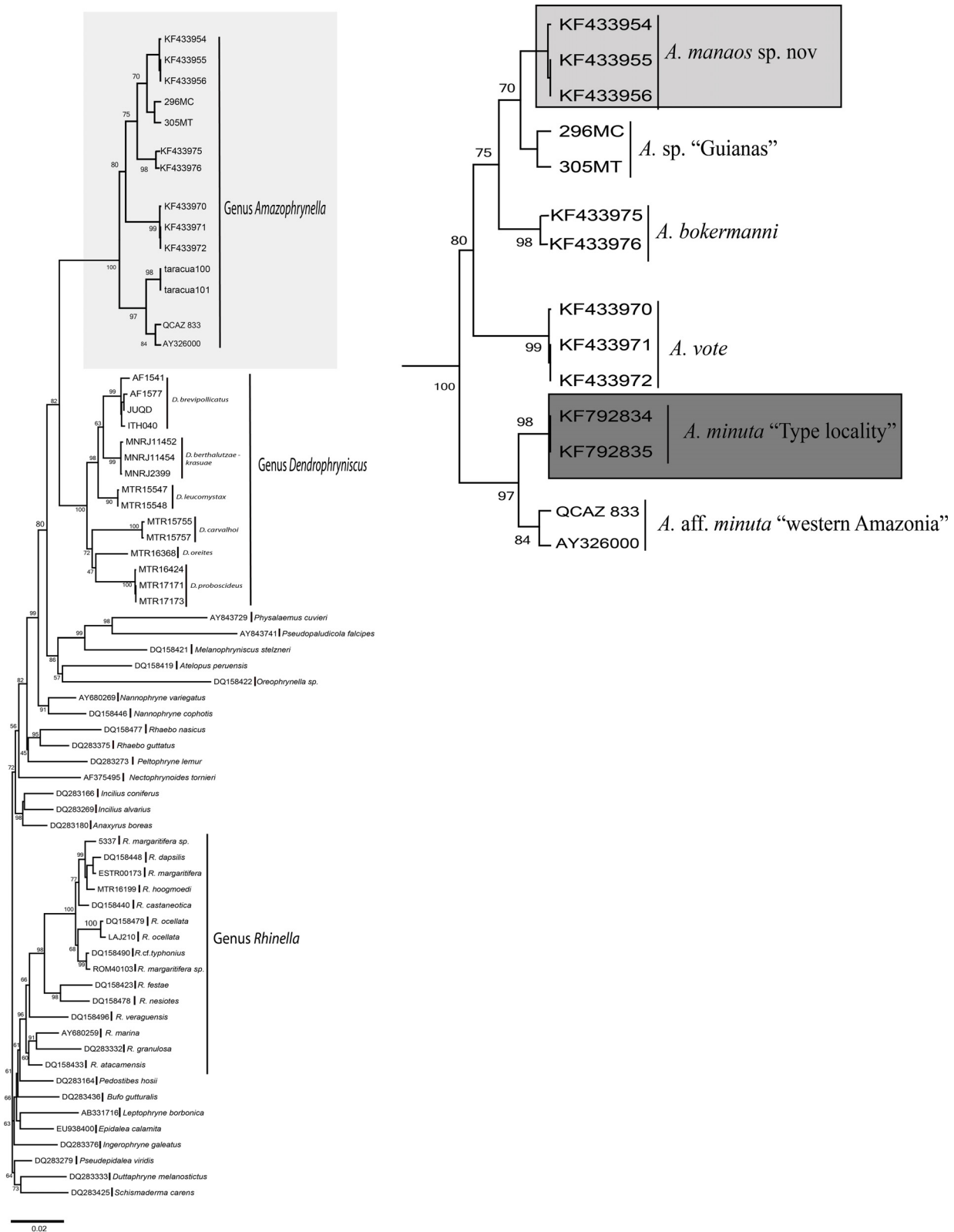
**Molecular phylogeny and genetic distance.** Phylogenetic analysis of nominal and hypothetical taxa of the genus *Amazophrynella* indicates the existence of six lineages (Figure 2). Basal divergence is between the clade composed of an undescribed *Amazophrynella* species from western Amazônia and *A. minuta* specimens sampled from the type locality, and a clade comprising all other species and lineages. The *A. minuta* + *A. aff. minuta* “western Amazonia” clade is supported by 97% bootstrap value while the other clade is supported by 80% bootstrap value. The new species, *A. manaos* is sister to a possibly a new species of *Amazophrynella* from the Guiana Shield (bootstrap support 70%) and both are sister to *A. bokermanni* (bootstrap support 75%). The recently described *A. vote* (italicize) is sister to *A. bokermanni* + (*A. manaos* + *A. sp.* “Guianas”) with a bootstrap support of 80%. Smallest uncorrected 16S rDNA *p*-distances (4%) was observed between *A. manaos* sp. nov. and *A. sp.* “Guianas”. Greatest intrageneric distance (14%) was observed between *A. manaos* sp. nov. and *A. minuta*, and *A. sp.* “Guianas” and *A. minuta* (see Table 3).

**TABLE 3.** Uncorrected *p*-distances among *Amazophrynella* species and the sister genus *Dendrophryniscus*. Molecular distances are based on the 480 bp fragment the 16S rDNA. Included are *A. minuta* from its type locality and hypothetical species *Amazophrynella* sp. “Guianas” and *A. aff. minuta* “western Amazonia” from Fouquet *et al.* (2012a); both species pertain to the *A. minuta* species complex.

16S rDNA	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>A. sp.</i> “Guianas”	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <i>A. aff. minuta</i> “western Amazonian”	0.13	-	-	-	-	-	-	-
3 <i>D. brevipollicatus</i>	0.21	0.19	-	-	-	-	-	-
4 <i>D. berthaltutzae</i>	0.20	0.16	0.08	-	-	-	-	-
5 <i>D. krasuae</i>	0.19	0.16	0.08	0.00	-	-	-	-
6 <i>A. manaos</i>	0.04	0.12	0.20	0.18	0.18	-	-	-
7 <i>A. vote</i>	0.12	0.12	0.20	0.19	0.19	0.11	-	-
8 <i>A. minuta</i>	0.14	0.04	0.20	0.16	0.16	0.14	0.11	-
9 <i>A. bokermanni</i>	0.10	0.13	0.19	0.19	0.19	0.09	0.12	0.13

**Characterization of topotypic material of *Amazophrynella minuta*.** Topotypic material of *A. minuta* was collected in mission Taracua, right bank of the middle Uaupés River in the last week of August 2013. Adult males measured  $13.5 \pm 0.57$  mm (12.4–14.2 mm), females  $17.5 \pm 0.61$  mm (17.1–18.9 mm) in snout vent length. The specimens (Figure 3) were characterized by a pointed head (in ventral view); pointed snout (in lateral view); roughly granular dorsal and ventral skin; a scattering of abundant pointed spicules on the body; big warts on the

dorso-lateral region; dark gray brown throat and chest; intense yellow-orange coloration of the abdomen; and by irregular black blotches or ocelli on the abdomen. Fingers are unwebbed. Formula of the fingers: I<II<IV<III. Tips of the fingers are unexpanded. Webbing on the base of the foot. Formula of the toe: I<II<III<V<IV. Tips of the toes are unexpanded.

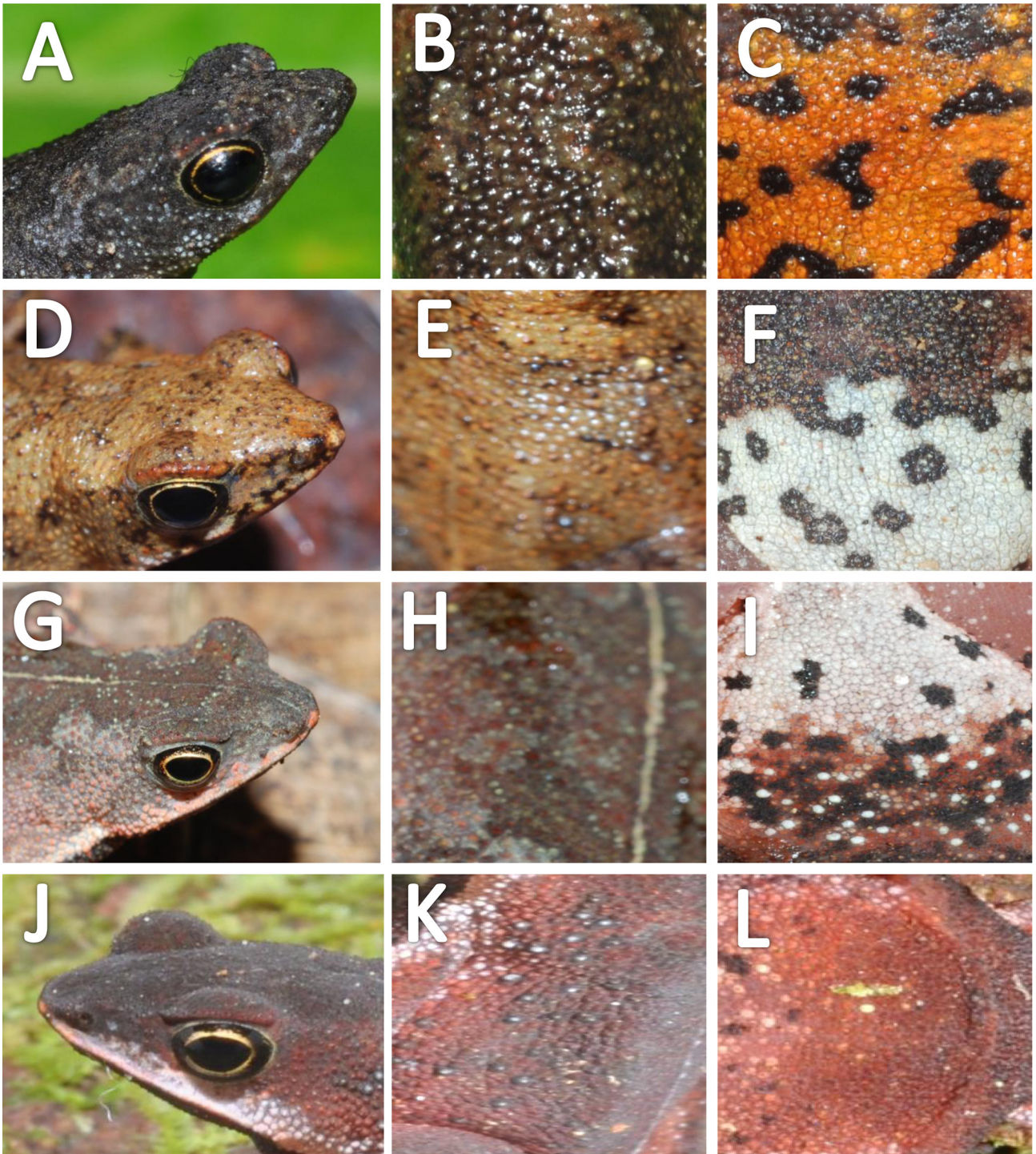


**FIGURE 2.** Phylogenetic relationship of *Amazophrynella* species inferred using the maximum-likelihood criterion. Analysis was performed with 480 bp of 16S rDNA under the GTR+I+G model of molecular evolution. Branch support values are based on 1000 bootstrap pseudoreplicates..



**FIGURE 3.** Specimens of *Amazophrynella minuta* from Taracua mission, Uaupés River, municipality of São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil (INPA-H 32727 and INPA-H 32735).

**Comparisons with other species.** The new species can be differentiated from the three other nominal species of *Amazophrynella* by the following characters (characters of compared species in parentheses): a) from *A. minuta* (Melin, 1941) by the triangular snout with a slightly truncate culmination (snout pointed), absence of spiny tubercles on dorsum (prickly warty skin on dorsum), skin of axillary region and forearm finely granular (rough granular skin on forearm and axillary region, especially on the neck), venter white with black spots and dark-brown chest in life (venter bright reddish-orange, with small black blotches and throat light brown) (Figure 4A-C and Figure 5A, Table 4); b) from *A. bokermanni* (Izecksohn, 1993), by finger I shorter than finger II (finger I longer than finger II), smaller SVL, with males reaching 15.8 mm and females 24.7 mm (maximum SVL of males and females 22 mm and 28 mm, respectively) (Figure 4G-I, Figure 5B); and c) from *A. vote* Ávila, Carvalho, Gordo, Kawashita & Morais, 2012, by snout triangular with a slight culmination (rounded), slightly smaller SVL in males (14.7–15.8 mm vs. 16.4 mm—Ávila *et al.*, 2012), and white abdomen with black spots or stripes and blackish to dark-brown chest and throat in life (abdomen reddish-brown with small white dots and brown spots) and subrostral crest converging anteriorly (subrostral crest not converging anteriorly) (Figure 4D-F, Figure 5C).



**FIGURE 4.** Some diagnostically morphological and color characters between the species of *Amazophrynella* (in life), type of snout (A,D,G,J); texture of the dorsal surface (B,E,H,K) and texture of ventral surface (C,F,I,L) of A–C) *A. minuta* (INPA-H 312725); D–F) *A. manaos* **sp. nov.** (unvoucher specimens); G–I) *A. bokermanni* (INPA-H 31863); J–L) *A. vote* (INPA-H 31870).

**Description of the holotype.** Small species; body slender; head longer than wide; head triangular; head length 36% SVL; upper eyelids close to 60% of interorbital distance; snout elongate; snout profile slightly truncated in lateral view; eyes prominent, 31% of head width; nostril is closer to the tip of the snout than to the eyes; tympanums not visible; parotid gland absent. Body covered by abundant rounded granules; texture of dorsal skin granular; abundant granules grouped in the axillar region; texture of the ventral skin granular. Forelimbs slender; upper arm covered by tiny conical tubercles. Fingers unwebbed; formula of the fingers: I<II<IV<III; palmar

tubercle rounded; supernumerary tubercle ovoid: one in finger I, two in the II and IV and three in the III; tip of the fingers unexpanded. Hind limbs slender; femur length 52% of SVL; conical tiny granules present on the thigh and tibia; tarsus length approximately 30% of SVL; foot length 68% of thigh length; webbing at the base of toes; formula of the toes: I<II<III<V<IV; elliptical inner metatarsal tubercle present; subarticular tubercles rounded and distinct, nearly the same size as fingertips: two in toe I, II and V , three in the III and IV; tiny triangular spines along rear edge of feet; tips of the toes unexpanded.

**TABLE 4.** Comparison of morphological and color characters of the *Amazophrynella* (Fouquet *et al.*, 2012a) species. For all species original descriptions and direct examination of specimens was used. We used adults specimens from all the species.

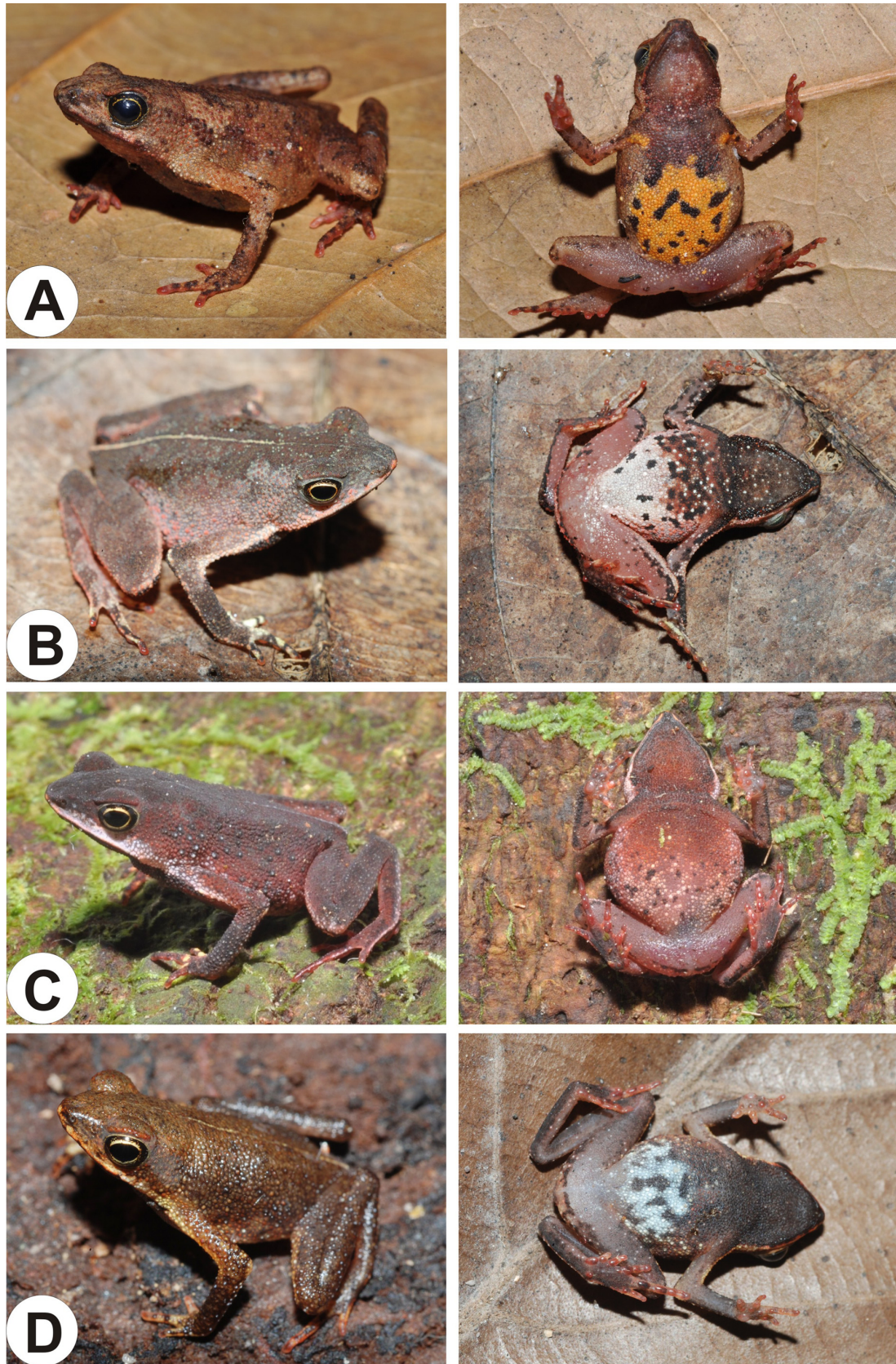
Species	<i>A. manaos</i>	<i>A. bokermanni</i>	<i>A. vote</i>	<i>A. minuta</i>
Source	This study	Izecksohn, 1993 + material studied	Ávila <i>et al.</i> , 2012 + material studied	Melin, 1941 + material studied
Males SVL in mm, mean ± SD (range)	15.0 ± 0.6 (14.0–15.8)	22.0 ± 3.7 (16.4–27.7)	16.4 ± 1.3 (15.2–19.3)	13.6 ± 0.8 (12.3–15.8)
Females SVL in mm, mean ± SD (range)	20.6 ± 1.8 (15.9–24.7)	20.1 ± 4.7 (19.4–30.6)	22.7 ± 1.6 (21.4–25.7)	17.9 ± 0.6 (17.9–18.9)
Dorsal skin texture	Fine granules, medium density	Fine granules, medium density	Fine granules, low density	Rough granules, high density
Ventral skin texture	Fine granules, high density	Fine granules, medium density	Fine granules, medium density	Rough granules, high density
Ventral coloration	White with black blotches	White with black spots	Red-brown with white dots	Yellow-orange with brown blotches
Snout profile	Slightly truncated	Pointed	Rounded	Pointed
Relative size finger I and II	I<II	I>II	I<II	I<II
Gular region	Blackish to dark-brown	Grayish-brown	Brown	Light-brown

**Measurement of the holotype (in mm).** SVL: 13.9; HL: 5.1; HW: 4.1; EW: 1.1; ED: 1.3; SL: 2.3; END: 1.4; IND: 1.0; IOD: 1.8; HAL: 3.0; UAL: 4.1; THL: 7.2; TL: 6.9; TAL: 4.4 and FL: 4.9.

**Coloration of the holotype.** In life, dorsal color pattern of the holotype dark-brown with transversal black and light-brown bars, more evident on limbs; thin cream medial line extending from head to cloaca, a white longitudinal stripe on upper jaw extending from nostril to forearm; arms white ventrally; throat and chest region blackish; belly white with large black spots, thighs and tibiae predominantly grey ventrally with few small black dots; palms and soles reddish (Figure 5D). Coloration of preserved specimens is nearly identical to that described in life but black spots on the belly are less evident.

**Variation.** Variation exists among individuals within the same locality as well as between localities. In some individuals the coloration of the throat extends onto the chest and the belly has few black spots; other specimens show a ventral pattern of black stripes that extend dorsally to the upper part of the lateral region. Juveniles have a less pronounced pattern on the belly, with few black spots. Individuals from some localities have a thin clear brown line that extends from the rostrum to the cloaca along the central dorsum (Figure 6).

**Distribution and natural history.** *Amazophrynella manaos* **sp. nov.** is distributed throughout the southwestern part of the Brazilian Guiana region. It was collected in eight localities in the state of Amazonas, Brazil: Mineração Taboca, Campus of the Universidade Federal do Amazonas, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Presidente Figueiredo, Reserva ZF-2 , REBIO Uatumã, RDS Uatumã and Parque Estadual Rio Negro Setor Sul, Cuieiras River. To the south and west its distribution is likely to be delimited by the Amazon and Negro Rivers, respectively. It thus appears to be restricted to the south-central portion of the Guiana Shield (Figure 7). It occurs in primary forests and forest fragments, and is found in leaf litter—often fallen fronds of the buriti palm (*Mauritia flexuosa*)—generally close to creeks. The species is diurnal, is clearly sexually dimorphic in size (Figure 9, Table 5, online supplement 1) with females being distinctly larger than males. The amplexus is cephalic (Figure 9). Reproductive period is from November to April (Magnusson & Hero, 1991).



**FIGURE 5.** Dorsal and ventral view of male specimens of: A) Topotype of *Amazophrynella minuta*, Taracúá, Brazil (INPA-H 32732); B) *Amazophrynella bokermanni*, Juruti, State of Pará, Brazil (INPA-H 31861); C) *Amazophrynella vote*, Parque Estadual do Matupiri, State of Amazonas, Brazil (INPA-H 31870); D) Holotype of *Amazophrynella manaos* **sp. nov.** campus of the Universidade Federal do Amazonas-UFAM, State of Amazonas, Brazil (INPA-H 31866).

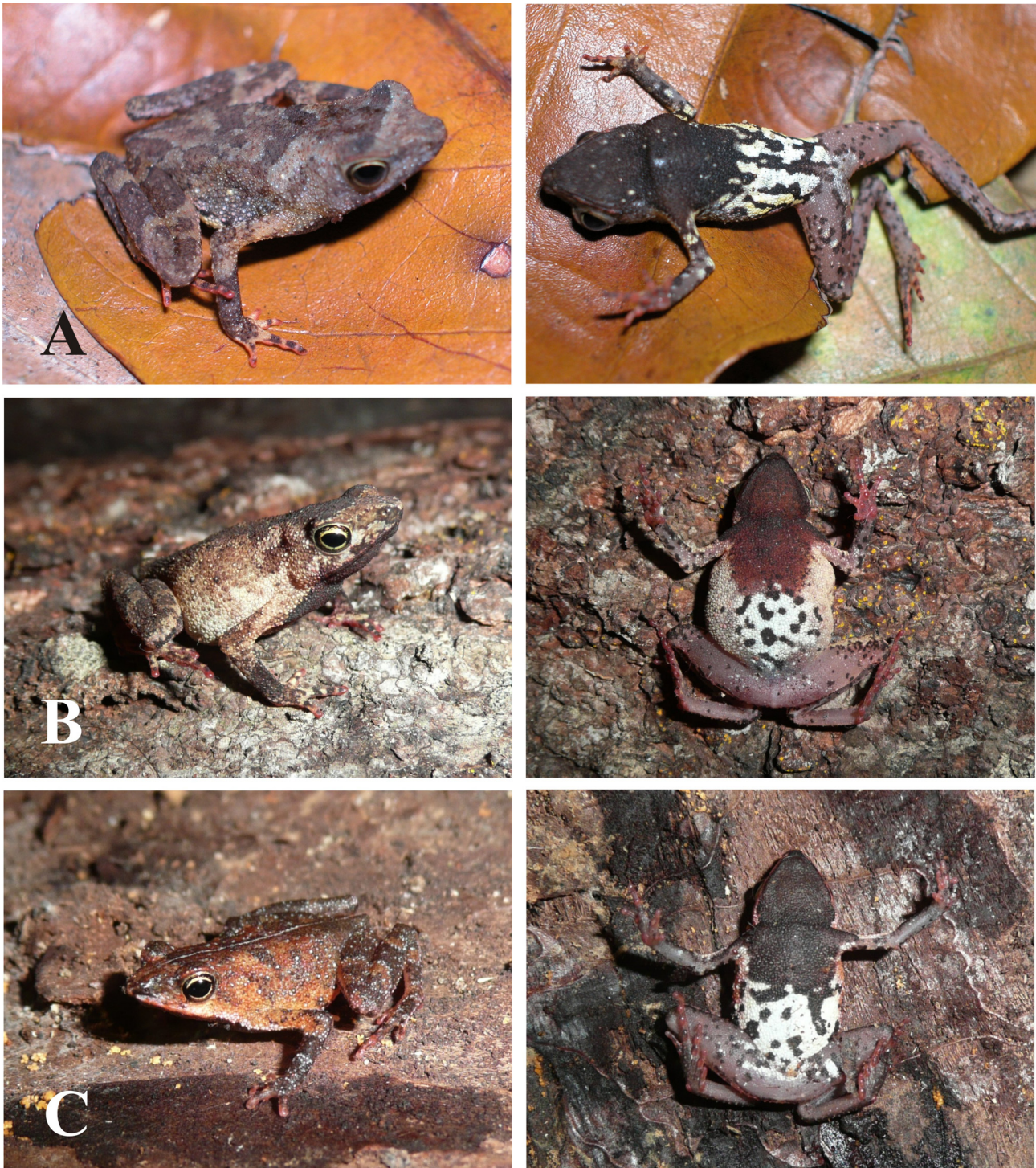


FIGURE 6. Patterns of variation in *Amazophrynella manaos* sp. nov., dorsal and ventral views.

**Etymology.** We name the species in honor of the Manaus Amerindian tribe that inhabited the region of the present day city of Manaus, Amazonas, Brazil, where the species is distributed.

### Discussion

*Amazophrynella minuta* (Melin, 1941) was described as *Atelopus minutus*. Since the original description, all *Amazophrynella* specimens collected throughout the Amazonian biome including the Meta River llanos of



Colombia (Frost, 2013), were treated as the taxon described by Melin (1941) (see Duellman, 1978; Rodriguez & Duellman, 1994; Duellman & Mendelson, 1995; Lima *et al.*, 2006).

In 1993, Izecksohn recognized that populations from the eastern Amazon basin represent a different species, *Dendrophryniscus bokermanni*. More recently Fouquet *et al.* (2012a) recognized that species of *Dendrophryniscus* from the Amazon and Atlantic rainforest form deeply divergent, reciprocally monophyletic groups, and thus based on this observation and shared derived morphological characteristics of these two lineages, the authors proposed a new genus *Amazophrynella* for the Amazonia species. In the same year, Ávila *et al.* (2012) described a new species, *Amazophrynella vote*, from the upper Purus, Madeira and Tapajós River basins in state of Mato Grosso and the southern portion of the state of Amazonas, Brazil.

**TABLE 5.** Measurements (mm) of adult male specimens (including the holotype) and adult females in the type series *Amazophrynella manaos* **sp. nov.** Mean  $\pm$  standard deviation, ranges are in parentheses. Abbreviations are defined in Methods.

Character	Males (n=29)	Females (n=28)
SVL	15.0 $\pm$ 0.6 (14.0–15.8)	20.6 $\pm$ 1.8 (15.9–24.7)
HW	4.5 $\pm$ 0.3 (4.2–4.9)	5.6 $\pm$ 0.6 (4.8–6.9)
HL	5.5 $\pm$ 0.3 (5.1–6.4)	6.8 $\pm$ 0.5 (5.3–7.5)
SL	2.7 $\pm$ 0.1 (2.4–2.7)	3.1 $\pm$ 0.4 (2.1–3.6)
EW	1.2 $\pm$ 0.1 (1.0–1.3)	1.4 $\pm$ 0.2 (1.5–2.1)
ED	1.5 $\pm$ 0.1 (1.3–1.7)	1.7 $\pm$ 0.2 (1.8–2.3)
IOD	2.0 $\pm$ 0.1 (1.8–2.3)	2.5 $\pm$ 0.2 (1.8–2.9)
IND	1.2 $\pm$ 0.1 (1.1–1.6)	1.9 $\pm$ 0.1 (1.6–2.2)
END	2.0 $\pm$ 0.4 (1.0–2.4)	2.6 $\pm$ 0.4 (1.7–2.8)
HAL	3.1 $\pm$ 0.3 (2.4–3.7)	4.2 $\pm$ 0.5 (3.2–4.8)
UAL	4.0 $\pm$ 0.4 (3.2–4.8)	5.3 $\pm$ 0.4 (4.2–5.9)
THL	7.2 $\pm$ 0.6 (6.3–10.5)	10.2 $\pm$ 0.9 (6.1–11.9)
TL	6.8 $\pm$ 0.7 (5.3–8.1)	10.2 $\pm$ 0.7 (6.3–11.8)
TAL	5.9 $\pm$ 0.5 (5.4–7.3)	6.5 $\pm$ 0.6 (5.5–7.5)
FL	7.4 $\pm$ 0.7 (6.6–8.8)	7.5 $\pm$ 0.6 (5.3–8.9)

*Amazophrynella manaos* **sp. nov.** is one more species that was mistakenly called *A. minuta*, despite clear morphological differences (see Table 4). *Amazophrynella manaos* **sp. nov.** is diagnosable by at least four morphological and phenotypic characters, and by 15 molecular apomorphies in the 16S rDNA fragment which has become standard in analyses of amphibian biodiversity (Vences *et al.*, 2005). The phylogenetic analysis of the said 16S rDNA fragment also clearly support the sister taxon relationship of *Amazophrynella manaos* **sp. nov.** and *Amazophrynella bokermanni*, and its nested position within the genus *Amazophrynella*. The species status is further supported by a 9% uncorrected p-divergence from its nominal sister taxon (*A. bokermanni*), a divergence normally associated with interspecific divergences (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.* 2007).

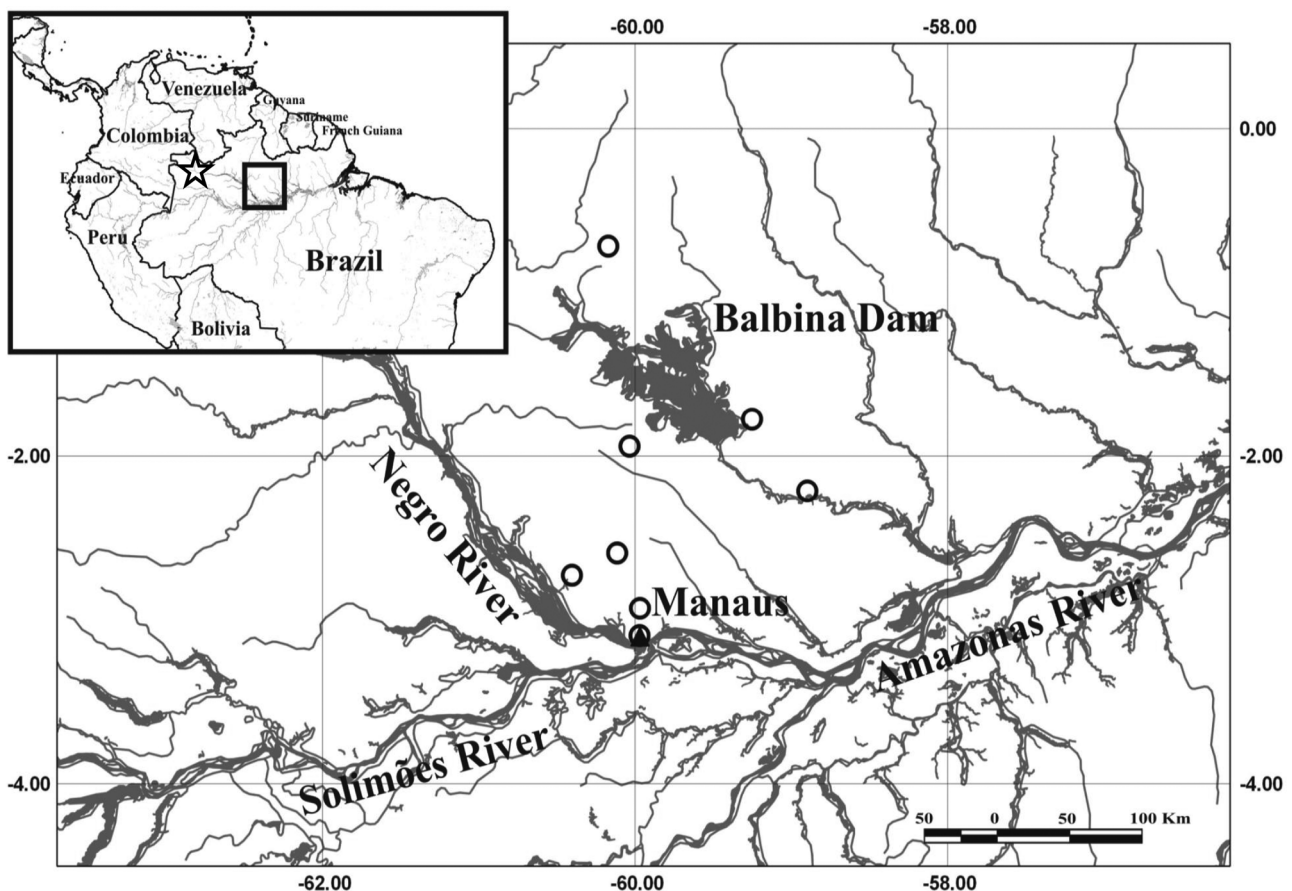
*Amazophrynella minuta* its only know from its type locality and from the vicinity of the city of São Gabriel da Cacheoeria, approximately 110 km south-east of the type locality (observation of RRRZ and VTC). It is possible its distribution comprises the upper rio Negro basin, west of Santa Isabel do Rio Negro. The inclusion of additional localities in the rio Negro basin, and the compilation of additional lines of evidence (e.g. vocalizations, osteology and DNA sequence data) could better delimit the distribution of this species, making the identification more accurate.

The presented phylogenetic analysis together with uncorrected p-divergence estimates among lineages suggest the existence of additional taxa that previously have been referred to as *Amazophrynella minuta* or were considered part of the *Amazophrynella* spp. complex (sensu Fouquet *et al.*, 2012a). Given that species are lineages with independent evolutionary trajectories (de Queiroz, 2007), these lineages will represent species. However, one of the lineages, for example the geographically close *Amazophrynella* aff. *minuta* “western Amazonian” (sensu

Fouquet *et al.* 2012a) may be *A. minuta*. Without a detailed morphological analysis of representative individuals from the western Amazon and other lineages it is difficult to speculate if the western Amazon and other lineages are new nominal taxa.

### Acknowledgements

We thank Richard C. Vogt for kindly providing access to the Collection of Amphibians and Reptiles of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia—INPA. Marcia Lima de Queiroz and Maria Alrismar dos Santos Brasil, for help in the Collection of Amphibians and Reptiles of INPA. RRRZ was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and VTC by a fellowship from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for collecting permit (N°39792-1). TH and IPF were supported by a Bolsa de Pesquisa scholarship from CNPq during the study. Funding for this work came from CNPq/SISBIOTA Processo No. 563348/2010-0 and SISBIOTA/FAPEAM. We are grateful to Mario Nunes and Jessica Motta for their assistance in the laboratory. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript. We thank the people of the community of Taracua. Sr. Maximiliano Correia Menezes (representative of the Amerindian village of Taracua and FOIRN), Sr. Gabriel Correia Menezes, Sr. Joao Filho Menezes and Sra. Vera Correia for hospitality and logistic support in Taracua. We thank Junior Menezes, Max Junior Menezes, and Bene Menezes for field support. Federação de Organizações Indígenas do Rio Negro-FOIRN for permit the accesses to Amerindian land. We thank Göran Nilson and Anders Larsson (Naturhistoriska Museet, Göteborg) for their attention and for sending color photographs of the syntypes of *A. minuta*. The authors thank Antoine Fouquet for discussions regarding the *Amazophrynella minuta* complex. This article forms a portion of RRRZ Master thesis at the Diversidade Biológica graduate program of UFAM.



**FIGURE 7.** Geographical distribution of *Amazophrynella manaos* sp. nov. triangle marks the type locality and circles localities of paratypes. Star marks the type locality of *A. minuta*.



**FIGURE 8.** Type habitat of *Amazophrynella manaos* sp. nov. within a primary forest showing small temporary ponds near fallen logs used by the species.



**FIGURE 9.** Amplexus of *Amazophrynella manaos* sp. nov. (unvouchered specimens).

## Literature cited

- Ávila, R.W., Carvalho, V.T., Gordo, M., Ribeiro, K. & Morais, D. (2012) A new species of *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae) from southern Amazonia. *Zootaxa*, 3484, 65–74.
- Baum, D.A. & Donoghue, M.J. (1995) Choosing among alternative “phylogenetic” species concepts. *Systematic Botany*, 20, 560–573.  
<http://dx.doi.org/10.2307/2419810>
- Bocxlaer, I. Van, Loader, S.P., Roelants, K., Biju, S.D., Menegon, M. & Bossuyt, F. (2010) Gradual adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. *Science*, 327, 679–682.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1181707>
- Cracraft, J. (1983) Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1, 159–187.  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-6781-3\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-6781-3_6)
- Cruz, C.A.G. & Fusinato, L.A. (2008) A new species of *Dendrophryniscus*, Jiménez de la Espada, 1871 (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rain Forest of Rio Grande do Sul, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 3, 22–26.  
[http://dx.doi.org/10.2994/1808-9798\(2008\)3\[22:ansodj\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.2994/1808-9798(2008)3[22:ansodj]2.0.co;2)
- Darst, C.R. & Cannatella, D.C. (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 462–75.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2003.09.003>
- Davis, J.I. & Nixon, K.C. (1992) Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41, 421–435.
- de Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886.
- Duellman, W.E. & Mendelson, J.R. (1995) Amphibians and reptiles from northern Departamento Loreto, Peru: Taxonomy and biogeography. *University of Kansas Science Bulletin*, 55, 329–376.
- Duellman, W.E. (1978) The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publications, University of Kansas Museum of Natural History*, 65, 1–352.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 396–376.  
<http://dx.doi.org/10.1007/bf01734359>
- Felsenstein, J. (1981) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.  
<http://dx.doi.org/10.2307/2408678>
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. & Gemmell, N.J. (2007) Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, 2, e1109.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001109>
- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira Jr., M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. & Rodrigues, M.T. (2012a) Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonian and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 823–838.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.023>
- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira Jr., M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. & Rodrigues, M.T. (2012b) *Amazonella* Fouquet *et al.*, 2012 (Anura: Bufonidae) junior homonym of *Amazonella* Lundblad, 1931 (Acari: Unionicolidae): proposed replacement by *Amazophrynella* nom. nov. *Zootaxa*, 3244, 68.
- Frost, D.R. (2013) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.4 (9 January 2013) American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> (accessed 20 May 2013)
- Jobb, G. (2008) TREEFINDER version of March 2011, distributed by the author, Munich, Germany. Available from: <http://www.treefinder.de/> (accessed 27 May 2013)
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Izecksohn, E. (1968) Nova espécie de *Dendrophryniscus* do Estado do Rio de Janeiro (Amphibia, Salientia). *Revista Brasileira Biologia*, 28, 357–362.  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81751993000300006>
- Izecksohn, E. (1993) Nova espécie de *Dendrophryniscus* da região amazônica (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 10, 407–412.  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81751993000300006>
- Lima, A.P., Magnusson, W.E., Menin, M., Erdtmann, L.K., Rodrigues, D.J., Keller, C. & Hödl, W. (2006) *Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central—Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonian*. Áttema Design Editorial, Manaus, 168 pp.
- Magnusson, W.E. & Hero, J.H. (1991) Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs. *Oecologia*, 86, 310–318.  
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00317595>
- McDiarmid, R.W. (1971) Comparative morphology and evolution of frogs of the Neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History*, 12, 1–66.

- Melin, D.E. (1941) Contributions to the knowledge of the Amphibia of South America. *Göteborgs Kungl. Vetenskaps- och Vitterhets-samhälles. Handlingar. Serien B, Matematiska och Naturvetenskapliga Skrifter*, 1, 1–71.
- Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, K.B. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 205–247.
- Pramuk, J.B. (2006) Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146, 407–452.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00212.x>
- Pramuk, J.B., Robertson, B., Sites, J.W. & Noonan, B.P. (2008) Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography*, 17, 72–83.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00348.x>
- Rach, J., DeSalle, R., Sarkar, I.N., Schierwater, B. & Hadrys, H. (2008) Character-based DNA barcoding allows discriminations of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society of London*, 275, 237–247.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.1290>
- Rodríguez, L.O. & Duellman, W.E. (1994) *Guide to the Frogs of the Iquitos Region. Amazonian Peru*. University of Kansas Natural History Museum, special Publications, 22, 80 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY, 1626 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.  
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1996) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Vences, M., Teschke, M., van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D. (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2, 7–12.
- Zimmerman, B.L. & Rodrigues, M.T. (1990) Frogs, snakes, and lizards of INPA-WWF reserves near Manaus, Brazil. In: Gentry, A.H. (Eds.), *Four Neotropical Rainforests*. Yale University Press, Connecticut, USA, pp. 426–454.

#### APPENDIX 1. Specimens examined.

- Amazophrynella bokermanni*—INPA-H 31861, INPA-H 31864, INPA-H 31863, INPA-H 31862, INPA-H 31865, municipality of Juruti, Pará State, Brazil (50 km from type locality).
- Amazophrynella vote*—INPA-H 12256, 12331, 12255, 12342, 12343, 12366, 12267, Cachoerinha, Madeira River, municipality of Manicoré, INPA-H 12326, Lago do Açaí, Aripuanã River, municipality of Novo Aripuanã, INPA-H 21558, Parque Estadual do Guariba, municipality of Manicoré, INPA-H 27412, 27417-27419, 27421-27423, 27425-27426, Parque Nacional Nascentes do Lago Jari, Tapauá municipality, Amazonas State, Brazil. UFMT-A 11138, Fazenda São Nicolau, municipality of Cotriguaçu, Mato Grosso State, Brazil.
- Amazophrynella minuta*—INPA-H 32725, INPA-H 32723, INPA-H 32729, INPA-H32730, INPA-H32736, INPA-H32731 (females) and INPA-H 32724, INPA-H32728, INPA-H 32733, INPA-H 32735, INPA-H 32722, INPA-H 32738, INPA-H 32737, INPA-H 32739. INPA-H 32720, INPA-H 32732, INPA-H 32726, INPA-H 32730, INPA-H 32740, INPA-H 32734, INPA-H 32721 (males), Taracuá, right bank of the Uaupés River, Amazonas State, Brazil.

**ONLINE SUPPLEMENT 1.** Raw measurements of the 57 individuals of *Amazophrynella manaos* sp. nov. examined in this study.