

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Variações morfométricas em populações do sapo-de-chifre *Proceratophrys*
Boiei (Anura: Odontophrynidae) no sudeste do Brasil**

Samuli Laurindo Pereira
Magister Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023

SAMULI LAURINDO PEREIRA

**Variações morfométricas em populações do sapo-de-chifre *Proceratophrys*
Boiei (Anura: Odontophrynidae) no sudeste do Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Renato Neves Feio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P436e
2023

Pereira, Samuli Laurindo, 1991-

Estudo de variações morfométricas em populações do sapo-de-chifre *Proceratophrys boiei* (Anura: Odontophrynidae) da Mata Atlântica no sudeste do Brasil / Samuli Laurindo Pereira. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (30 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Renato Neves Feio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2023.

Referências bibliográficas: f. 21-25.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.836>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Sapos. 2. Sapos - Morfologia. 3. Análise multivariada. I. Feio, Renato Neves, 1960-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 597.8

SAMULI LAURINDO PEREIRA

Variações morfométricas em populações do sapo-de-chifre *Proceratophrys Boiei* (Anura: Odontophrynidae) no sudeste do Brasil

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de maio de 2023.

Assentimento:

Samuli Laurindo Pereira
Autor

Renato Neves Feio
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 03/09/2026 às 19:07:47 e pelo orientador em 04/09/2026 às 05:24:38. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **998C.HJ6Z.5KO7** e clique no botão 'Validar documento'.

A minha família, aquela que me dá suporte
e me suporta.

AGRADECIMENTOS

Quero me agradecer por te chego tão longe, pois só vindo até aqui pude encontrar pessoas sensacionais e muito sábias que me mostraram como a vida pode ser incrível.

Dentre elas tenho que falar sobre ao Tibeição, ao Leandrinho, a Talu e a Lê que me suportaram e deram suporte. Vocês fizeram o processo ser mais leve e isso eu não sei nem como retribuir... Talvez um litrão na Rita? Rs

Ah, preciso falar sobre o Flor de Lis que foi a minha primeira morada. Lá tive altas aventuras com a Néia e a Brenda, nossa quanta gente diferente passou pela gente enquanto tomava um café ou conversava nos corredores. Obrigado meninas, vocês são um dos meus pilares de Viçosa.

Depois eu tive o imenso prazer de viver no Paraíso, pensa num lugar bom. Mas assim, bom mesmo, nó-sinhora. É outro pilar que tenho. Valeu Goiano, Arthur e Samuel pela sabedoria compartilha. Obrigado Isa, por querer dividir o tempo e o espaço comigo. E Tati, tá-tá-ti-tá-tá, você mora no meu coração, você é uma amigona e quero muito o seu bem, sempre! Tô doido pra gente tomar uma, duas, três... juntos.

Nossa, teve o pessoal online que me ajudou muito nos momentos mais restritos da pandemia. Obrigado aos professores-doutores Fred e Pedro, vocês conseguiram me guiar num momento obscuro e criaram um ambiente reconfortante com as pessoas que toparam as suas aulas.

E sobre nortear, não posso deixar de comentar sobre o Miltinho e o Renatão, vocês possuem um jeito único de orientar e que se complementam de uma forma bizarra. Posso dizer que sou o profissional que sou por conta de vocês e devo agradecer imensamente não somente pela sabedoria científica, mas pela sabedoria sobre a vida que vocês compartilharam comigo durante esses anos, sou uma pessoa um pouco mais completa com o que vivi e aprendi com vocês. Obrigado por entenderem o meu jeitinho.

Agora vou falar da família, que sem eles nada seria possível. Pois eles que me dão motivação para sair desbravando o mundo, que comemoram as minhas conquistas, que abraçam as minhas ideias mirabolantes, que sentem orgulho de quem sou e que vão me suportar para sempre. Obrigado Cláudio, Elaine, Igara, Erison, Tio Laurindo, Segundo, Renata, Cris, Lorenzo, Valentina e Neli, vocês são o meu porto seguro.

E por último, mas não menos importante...

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Quem mensura o paraíso, a terra, o mar e o céu
De modo a buscar folclore ou excitação
Deixe-o avisado de um idiota ser.
Sebastian Brant, Ship of Fools, 1495. Basel, Suíça

RESUMO

PEREIRA, Samuli Laurindo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2023. **Variações morfométricas em populações do sapo-de-chifre *Proceratophrys Boiei* (Anura: Odontophrynidae) no sudeste do Brasil.** Orientador: Renato Neves Feio.

O *Proceratophrys boiei* é um sapo edêmico da Mata Atlântica. Muito se é conhecido da sua história natural e estudos moleculares, porém o estudo da sua morfologia possui algumas lacunas. O presente trabalho buscou compreender se existem variações morfológicas nas populações genéticas conhecidas via análises estatísticas multivariadas e se estas podem separar as diferentes populações de *P. boiei*. O estudo, que teve amostragem de 163 indivíduos, mostrou que existe uma variação significativa em duas populações distintas ($p < 0,03$), sendo a distância inter-nasal e o comprimento da cabeça os caracteres que mais variaram. Também foi resgatado diferença estatística para dividir as populações como foi proposto em estudos de filogenia molecular, porém a metodologia usada nesse trabalho não conseguiu identificar a estrutura morfológica responsável por isso. Esses resultados podem ser usados como referências para futuros estudos, os quais podem contribuir para a discussão de especiação dentro das diferentes populações.

Palavras-chave: anura; morfometria linear; análise univariada; análise multivariada

ABSTRACT

PEREIRA, Samuli Laurindo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2023. Morphometric variations in horned-frog populations *Proceratophrys Boiei* (Anura: Odontophrynidae) from atlantic forest in southeastern Brazil. Adviser: Renato Neves Feio.

Proceratophrys boiei is an endemic frog in the Atlantic Forest. Much is known about its natural history and molecular studies, but there are still gaps in the study of its morphology. This research aimed to understand if there are morphological variations among the known genetic populations through multivariate statistical analyses and if these variations can differentiate the different populations of *P. boiei*. The study, which included a sample of 163 individuals, revealed significant variation in two distinct populations ($p < 0.03$), with inter-nasal distance and head length being the characters that showed the most variation. Additionally, statistical differences were found that could divide the populations as proposed in molecular phylogenetic studies, but the methodology used in this study was unable to identify the morphological structure responsible for this division. These results can serve as references for future studies, which may contribute to the discussion of speciation within different populations.

Keywords: anura; linear morphometry; univariate analysis; multivariate analysis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	21
ANEXO A	26

1. INTRODUÇÃO

Atualmente temos 43 espécies no gênero *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (FROST, 2023) distribuídas em três agrupamentos morfológicos não monofiléticos: os grupos de *Proceratophrys appendiculata*, *Proceratophrys boiei* e *Proceratophrys cristiceps* (IZECKSOHN *et al.*, 2005; PRADO & POMBAL 2008; AMARO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2022). Além destes, temos um monofilético: grupo *Proceratophrys bigibbosa* (AMARO *et al.*, 2009; MÂNGIA *et al.*, 2018; MAGALHÃES *et al.*, 2020), e espécies que não se enquadram em nenhum desses. No grupo de *Proceratophrys boiei* temos atualmente três espécies: *P. boiei* (WIED-NEUWIED, 1824), *P. renalis* (MIRANDA-RIBEIRO, 1920) e *P. paviotii* (CRUZ, PRADO & IZECKSOHN, 2005). Estas são caracterizadas pela presença de apêndices palpebrais dérmicos com forma triangular e ausência de apêndice dérmico rostral (PRADO & POMBAL, 2008). O *Proceratophrys boiei*, conhecido popularmente como Sapo-de-Chifre, possui ampla distribuição ao longo do domínio da Mata Atlântica e possui maior ocorrência no sudeste dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais, a oeste do estado do Rio de Janeiro, no sudeste de São Paulo e oeste do Paraná, até o leste do estado de Santa Catarina (FROST, 2023), sendo encontrado em áreas de vegetação densa, com cobertura vegetal abundante, até áreas degradadas na borda da floresta, sendo frequentemente encontrado em serrapilheira (HADDAD *et al.*, 2013). Sabendo dessa relação ecológica com a Mata Atlântica, diferentes dados foram levantados, visto a necessidade de conhecer o táxon e o seu habitat, o qual é conhecido pela alta biodiversidade e antropização (ROSSA-FERES *et al.*, 2017; REZENDE *et al.*, 2018).

Dos biomas presentes no Brasil, a Mata Atlântica é a região com a maior riqueza de anuros (> 600 spp.), sendo em sua maioria (80%) endêmicas desse ecossistema (ROSSA-FERES *et al.*, 2017; SEGALLA *et al.*, 2021). Estudos indicam uma relação entre variações ambientais e variações na estrutura de algumas populações de anuros (CARNAVAL & BATES, 2007; CORREA *et al.*, 2015; PAZ *et al.*, 2020). Essas alterações podem ser medidas de diversas maneiras, até mesmo os mais sutis, como a diferença entre os caracteres morfológicos da mesma espécie. Sabendo disso, o uso da morfometria linear torna-se uma ferramenta útil, quando associada a premissas estatísticas, na identificação dessas variações (FONSECA *et al.*, 2020; CASTRO-BONILLA *et al.*, 2022). Estes dados prévios obtidos podem auxiliar na definição de grupos de organismos ou na identificação de novos táxons que possuem características únicas (GODINHO *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2022).

Muitas descrições de anuros vem sido realizadas na última década, sendo em alguns casos vindo da associação de diferentes metodologias (SANTANA *et al.*, 2021; MÂNGIA *et al.*,

2022). No caso do *P. boiei* temos a descrição da espécie muito antiga (MIRANDA-RIBEIRO, 1920) com estudos morfológicos (IZECKSOHN *et al.*, 2005; PRADO & POMBAL, 2008; DIAS *et al.*, 2013) e genéticos produzidos em intervalos distantes ou que apresentam resultados contraditórios e mutuamente excludentes, situação que pode deixar lacunas de conhecimento mesmo em um organismo bem conhecido (AMARO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2021). Somente no intervalo entre o primeiro estudo morfológico (2005) e o presente trabalho foram descritas 24 espécies (FROST, 2023) do gênero, um alto número comparado aos demais vertebrados (SEGALLA, 2021).

Compreender a taxonomia e os estudos publicados previamente indicou uma possível incongruência entre os dados genéticos e morfológicos, então o presente estudo tem como objetivos: avaliar se existem variações nos caracteres morfológicos de diferentes populações de *Proceratophrys boiei* da Mata Atlântica que podem diagnosticar as populações como as unidades genéticas identificadas dentro da espécie (AMARO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2021).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. 1. *Morfometria Linear*

No presente estudo foram mensurados 170 indivíduos de *Proceratophrys boiei* de 41 localidades, sendo estes de diferentes coleções herpetológicas, sob os acrônimos: CFBH, MCNAM, MNRJ, MRCM, MRT, MZUFV, MZUSP, UFMG e ZUEC (Anexo 1). Para a realização da triagem foi considerado o local de coleta, incluindo as áreas amostradas molecularmente (AMARO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2021) e as regiões entre os grupos. Também foi considerado o sexo e a fase de desenvolvimento, selecionando somente indivíduos machos adultos, sendo estes identificados pela presença de fendas vocais (PRADO & POMBAL, 2008). Para efeitos comparativos utilizamos as mesmas unidades genéticas para diferentes populações, sendo: N1, N2 e S (AMARO *et al.*, 2012) (Fig. 1). Foram selecionados 14 características morfológicas, medidas com paquímetro com precisão de 0,01 mm, pela mesma pessoa (SL), sendo elas: comprimento rostro-cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CC); largura da cabeça (LC); distância inter-nasal (DIN); distância inter-ocular (DIO); distância olho-narina (DON); diâmetro do olho (DO); comprimento do braço (CB); comprimento do antebraço (CAnt); comprimento da mão (CM); comprimento do fêmur (CF); comprimento da tíbia (CTi); comprimento do tarso (CTa); comprimento do pé (CP). Todas feitas do lado esquerdo do corpo (Fig. 2).

2. 2. *Análise de Dados*

Todas as análises foram conduzidas no programa Past v 4.02 (HAMMER,). Os dados foram logaritmizados com o intuito de reduzir efeitos de distorção entre as diferentes escalas de tamanhos (REF?). De início foi realizado um teste de *Shapiro-Wilk* em cada característica de cada grupo para avaliar a normalidade dos dados (SHAPIRO & WILK, 1965). A seguir, foi feita uma Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias de cada variável entre os grupos assumidos a priori através do teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (KRUSKAL & WALLIS, 1952) (Tabela 1).

Uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi conduzida, com os caracteres que atenderam os pressupostos de homogeneidade na variância residual, com o intuito de reduzir a influência da alometria e resgatar os caracteres que melhor explicam os resultados. Foi plotado um gráfico para visualização dos componentes no morfoespaço e a distribuição do biplot para uma pesquisa exploratória dos caracteres que formam o modelo gerado.

Com o banco de dados formado pelos caracteres, que cumpriram aos testes anteriores, foi elaborado uma Análise Discriminante (DA). O gráfico de dispersão (Fig. 3 D, E) foi plotado para comparação entre os biplots da PCA e da DA. Também foi calculado o centróide de cada indivíduo e a distância entre eles. Para tal, foram salvos os scores da DA que a posteriori usamos na elaboração de uma Análise Multivariada de Variância (MANOVA) e assim comparar quão bem os grupos estão separados (GOTELLI & ELLISON, 2016).

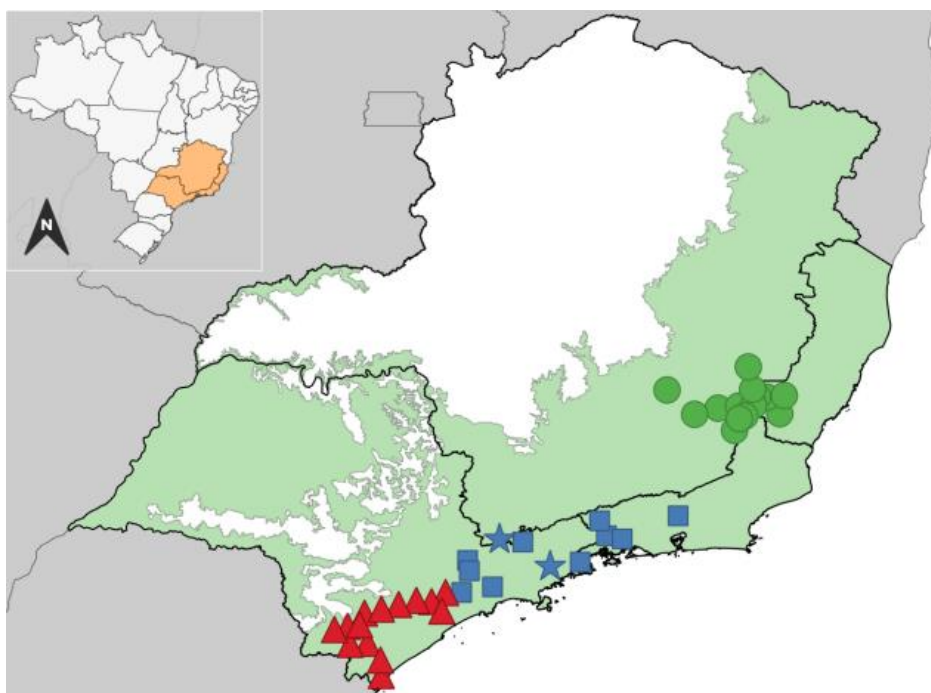


Figura 1: Mapa de distribuição das populações de *Proceratophrys boiei* analisadas no estudo. (círculos) Grupo N1, (quadrados) grupo N2, (triângulos) grupo S e (estrelas) indivíduos mensurados que apresentam variações significativas nas medidas de distância inter-nasal (DIN), comprimento da cabeça (CC) e comprimento do braço (CB) ($p < 0,03$). Em verde temos o bioma Mata Atlântica (IBGE, 2020). Mais informações sobre as localidades no Anexo 1.

Para a realização de análises multivariadas, como os resultados obtidos pela PCA, DA e MANOVA, é necessário seguir pressupostos para que cada tipo de análise seja validada, como remoção de *outliers*, distribuição normal multivariada e covariância igual entre os grupos. Assumindo que as premissas estão corretas, os valores resultantes dessas análises como os valores de Wilk's lambda e Pillai's trace podem ser usados para avaliar se existem agrupamentos com significância estatística.

3. RESULTADOS

3. 1. *Análise de Variância*

Os resultados do teste de normalidade e *one-way* ANOVA estão descritos na (Tabela 1), sendo as medianas, desvio padrão, tamanho mínimo e máximo (mm) dos 12 caracteres que possuem normalidade nos dados, conforme teste de *Shapiro-Wilk*, para cada grupo, tendo: LC ($p = 0,02216$ em N1 e $p = 0,03393$ em N2) e DIO ($p = 0,01441$ em N1) removidos das análises paramétricas subsequentes por não possuírem distribuição normal.

Tabela 1: Medianas, desvio padrão, tamanho mínimo e máximo (mm) dos caracteres de *Proceratophrys boiei*, divididos por grupo, que responderam à normalidade dos testes. Também é apresentado o valor de p do teste de Kruskal-Wallis (K-W). (*) Possui variação significativa entre as medianas.

Carácter	N1 ($n = 44$)	N2 ($n = 49$)	S ($n = 70$)	K-W p (same)
CRC	48,3±4,9 (37,1-57,6)	50,0±4,1 (41,2-59,0)	49,0±4,4 (40,3-60,8)	0,2407
CC	16,2±1,7 (12,4-19,7)	17,4±2,2 (13,2-22,2)	16,9±3,7 (12,6-21,5)	0,0259*
LC				
DIN	2,5±0,4 (1,9-3,7)	3,0±0,5 (2,0-4,1)	2,7±0,4 (1,7-3,8)	1,94E-05*
DIO				
DON	5,6±0,6 (4,3-7,2)	5,4±0,5 (4,0-6,3)	5,7±0,6 (4,3-7,3)	0,1557
DO	4,8±0,5 (3,8-6,1)	4,8±0,5 (3,8-6,2)	5,0±0,6 (3,7-6,7)	0,1281
CB	17,8±2,0 (13,5-21,5)	17,3±2,2 (12,7-23,5)	18,4±1,9 (14,5-24,5)	0,03952*
CAnt	12,0±1,2 (9,3-14,5)	11,9±1,7 (9,5-14,8)	12,3±1,3 (10,3-15,2)	0,304
CM	14,0±1,3 (10,7-16,3)	14,1±1,2 (11,5-17,0)	14,3±1,3 (11,6-19,1)	0,7285
CF	19,8±2,0 (15,5-24,1)	19,9±1,86 (17,0-24,2)	20,2±2,0 (16,7-25,7)	0,6067
CTi	17,9±1,6 (13,9-20,8)	18,3±1,4 (15,3-21,3)	18,3±1,6 (15,3-22,8)	0,6539

CTa	9,1±0,7 (7,6-10,6)	9,3±0,8 (7,5-11,1)	9,5±0,9 (7,5-12,5)	0,14
CP	20,4±2,0 (15,8-24,3)	20,5±1,7 (17,5-24,5)	20,5±1,7 (17,2-25,4)	0,9787

Também foram removidos os *outliers*, no que resultou numa amostragem de $n = 163$ espécimes. Os caracteres morfológicos selecionados foram: CRC, CC, DIN, DON, DO, CB, CAnt, CM, CF, CTi, CTa e CP. Destes, apenas 3 mostraram diferença significativa entre as medianas no teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* ($p = < 0,03$): DIN, CC e CB dos quais foram plotados gráficos de box-plot e violino (Fig. 3 A-C).

3. 2. *Análise de Dados Multivariados*

A PCA foi realizada com os dados logaritmizados. Segundo o modelo de *broken-stick*, somente os 2 primeiros componentes (PC's), totalizando 75,97% da variação (PC1 = 56,622% e PC2 = 19,348%). No gráfico de dispersão a maioria dos dados estão sobrepostos, exceto alguns representantes do grupo N2 que se concentram no eixo negativo do PC2. Como predito nos vetores do *biplot* temos os seguintes caracteres que melhor explicam o modelo: PC1 = DIN (loading: 0,35528) e CB (loading: 0,29717); E em PC2 = CB (loading: 0,31035) e DO (loading: 0,20991).

Os eixos canônicos da DA explicam 100% da variação, tendo o primeiro o *eigenvalue* = 0,36499 representando 79,74% e o segundo o *eigenvalue* = 0,092721 representando 20,26%. Como visto na PCA, o resultado da DA segue o mesmo padrão de distribuição dos dados (Fig. 3 D, E) sendo que os grupos se sobrepõe, salvo os mesmos indivíduos do grupo N2 que agora encontram-se concentrados no lado negativo do eixo 1.

4. DISCUSSÃO

Nesse estudo exploratório foi possível visualizar indícios de variações em caracteres morfológicos em duas populações de *Proceratophrys boiei*. Eles possuem força estatística para dividir as populações como as unidades genéticas propostas (AMARO *et al.*, 2012) e resgatar o resultado de dados de citogenética (SANTOS *et al.*, 2021), porém as limitações da morfometria linear não conseguem mostrar resultados visuais entre as diferentes populações. Seria de enorme colaboração o uso de diferentes abordagens integrativas (dados ecológicos, geológicos e de acústica), além da revisão de dados filogenéticos e morfológicos de ambos os sexos para fomentar a discussão sobre a taxonomia da espécie e até do grupo.

4. 1. Dados Morfométricos

Após o correto tratamento dos dados levantados foram recuperadas 12 medidas dos caracteres morfológicos, onde três possuem significância estatística ($p < 0,03$), sendo eles: DIN, CC e CB, respectivamente. Como observado no *boxplot* (Fig. 3 A-C), as medianas do grupo N2 para essas três variáveis apresentam um comportamento diferente dos outros grupos. Sabendo que somente os dois primeiros caracteres possuem significância na PCA (75,97%), esse resultado indica uma variação nas medidas do crânio, informação relevante visto que a cabeça é um importante dimorfismo sexual nos anfíbios (FONSECA *et al.*, 2020) e que existem variações nos ossos da porção frontal do crânio em diferentes espécies do gênero *Proceratophrys* (IZECKSOHN *et al.*, 2005; PRADO & POMBAL 2008; MÂNGIA *et al.*, 2014, VIEIRA *et al.*, 2022).

A análise exploratória apresentada nesse trabalho nos mostra que é possível discernir duas populações das demais localizadas nas cidades de Camanducaia/MG e São Luiz do Paraitinga/SP (Fig. 1). Na primeira foi observado que existe diferenças entre indivíduos coletados em diferentes localidades do município, sendo o distrito de Monte Verde o local com maior variação. Na segunda foi resgatado que alguns indivíduos não se encontravam em boas condições e a localização aproximada da coleta não estava disponível, fazendo necessário a revisão dos mesmos.

Também seria válido fazer o levantamento de dados na fase larval das populações de *P. boiei*, visto que a forma do condrocrânio na fase larval da espécie e apresenta resultados que corroboram a estrutura genética de Amaro *et al.* (2012) e indica variações na morfologia da mesma população aqui citada (Monte Verde, Camanducaia/MG) (DIAS *et al.*, 2013).

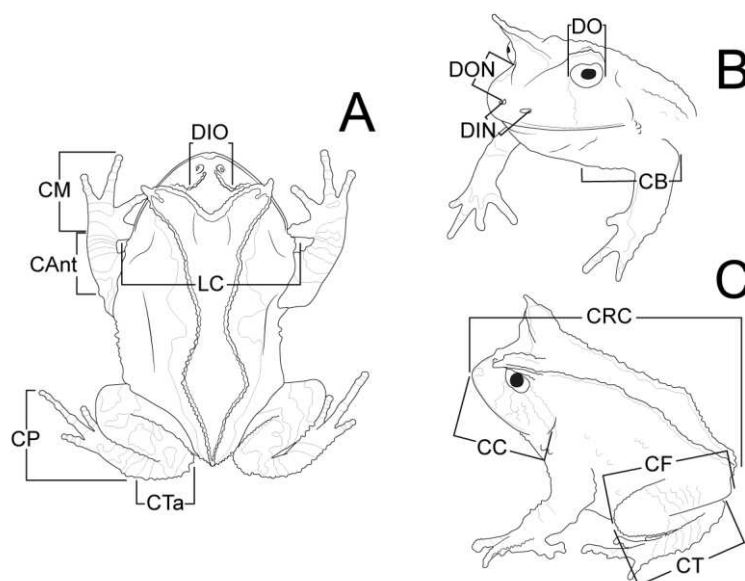


Figura. 2. Representação de *Proceratophrys boiei* em vista dorsal (A), em vista frontolateral (B) e em vista lateral (C) com acrônimos das medidas, descritas acima, feitas com paquímetro digital (0.01 mm de precisão). Créditos da imagem: Samuli Laurindo.

Considerada a análise de morfometria linear e interpretação dos testes estatísticos, diferenças nos caracteres morfológicos, homogeneidade e variância entre os centroides dos grupos pré-definidos geneticamente para as populações de *Proceratophrys boiei*, é possível entrar na discussão da existência de variação de forma dentro das unidades genéticas sugeridas na literatura atual (AMARO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2021).

4. 2. Comparação com Dados de Filogenia Molecular e Dados de Cariótipo

Isso nos mostra que mesmo sem alterações aparentes na morfologia, a pouca variação morfológica existente possui força estatística suficiente para corroborar a filogenia molecular proposta por AMARO *et al.* (2012). Também foi observado que o local de sobreposição da filogenia molecular é próximo ao distrito de Monte Verde, Camanducaia/MG, contudo os dados referentes a essa localidade dos grupos propostos não foram acessíveis à revisão visto que os indivíduos usados foram muito danificados em estudos, o local de coleta do material suplementar refere-se a uma área urbanizada e não existe o registro do coletor. Não foi possível também coletar dados sobre Iperó/SP, localidade indicada como uma possível área de hibridização de *P. boiei*, visto que não foi possível acesso à unidade de conservação no período mais favorável para coleta devido à pandemia da COVID-19.

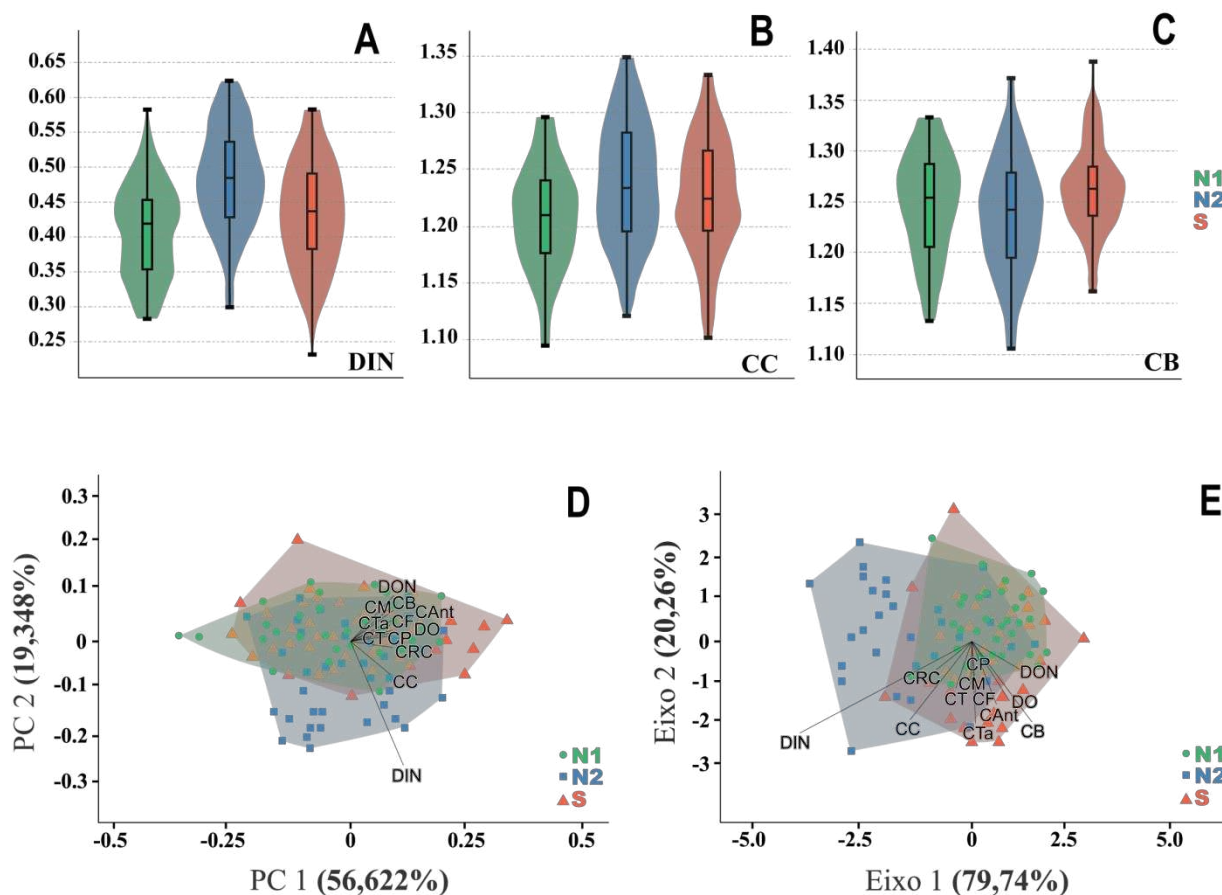


Figura 3: Gráfico de violino das medidas logaritmizadas dos 3 caracteres morfológicos de *Proceratophrys boiei* que apresentam variação significativa (A-C). Gráfico de dispersão dos escores da PCA (D). Gráfico de dispersão dos escores da Análise Discriminante (E). Os símbolos em verde representam o grupo N1, os símbolos em azul representam o grupo N2 e os símbolos em vermelho representam o grupo S.

As análises univariadas ($p < 0,03$) e multivariadas ($PC1 = 56,622\%$ e $PC2 = 19,348\%$) corroboram o trabalho de cariótipos de SILVA *et al.* (2021), onde foi demonstrado uma variação interespecífica nos cromossomos sexuais de *P. boiei* coletados em Monte Verde, Camanducaia/MG. Porém, é necessária uma inclusão de espécimes fêmeas em futuras análises morfométricas para elucidar melhor essa questão.

Apesar dos caracteres morfológicos que demonstram variações não serem observados visualmente, os resultados desse trabalho dão indícios de onde próximas análises devem ser realizadas. Ao usarmos diferentes técnicas como morfometria geométrica, variação cromática e acústica podemos resgatar dados que demonstrem essas mudanças com mais clareza. Considerando o discutido, é possível que processos de especiação, como vicariância ou simpatria, possam ocorrer dentro das populações de *Proceratophrys boiei*, dado que este possui uma alta estrutura genética e ampla distribuição, eventos que possam alterar o seu

fluxo genético como barreira geográficas, mudanças climáticas e hibridização podem favorecer o surgimento de novos táxons (MÂNGIA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2022).

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho usou de conhecimentos prévios de dados de filogenia molecular (AMARO *et al.*, 2012), dados de cariótipo (SILVA *et al.*, 2021), dados morfológicos do gênero e da espécie (IZECKSHON *et al.*, 2005; PRADO & POMBAL, 2008; MÂNGIA *et al.*, 2014; SANTANA *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2022) e incorporou dados de morfometria linear. Através da revisão de literatura e interpretação dos resultados foi possível encontrar variações significativas em duas populações distintas de *Proceratophrys boiei* sendo uma localizada em Monte Verde, Camanducaia/MG e outra em São Luiz do Paraitinga/SP.

Temos como local de interesse para futuras análises integrativas a primeira, visto que dados genéticos corroboram este resultado. Para próximos levantamentos de dados seria indicado o uso de ferramentas de morfometria geométrica, com foco na parte frontal do crânio, variação cromática e acústica. Também seria conveniente usar dados de geomorfologia, paisagem e variáveis ambientais, os quais podem fomentar a discussão de especiação não só para a espécie aqui estudada quanto para outras que estejam em regiões próximas.

REFERÊNCIAS

AMARO, Renata Cecília *et al.* Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 3, p. 880-888, 2012.

BANDEIRA, Lucas N. *et al.* Geographical variation in head shape of a Neotropical group of toads: the role of physical environment and relatedness. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 179, n. 2, p. 354-376, 2017.

CARNAVAL, Ana Carolina; BATES, John M. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. **Evolution**, v. 61, n. 12, p. 2942-2957, 2007.

CASTRO-BONILLA, Michael A. *et al.* Species Delimitation of the Atlantic Forest Endemic *Inga subnuda* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Mimosoid Clade) Subspecies Based on Morphological, Ecological, and Palaeoecological Data. **Systematic Botany**, v. 47, n. 2, p. 417-430, 2022.

CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G. *et al.* Morphological and molecular variation in the Pumpkin Toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 1, p. 94-99, 2011.

CORREA, Fabricio S. *et al.* Effects of oil palm plantations on anuran diversity in the eastern Amazon. **Animal Biology**, v. 65, n. 3-4, p. 321-335, 2015.

CRUZ, Carlos Alberto Gonçalves; PRADO, Gustavo Machado; IZECKSOHN, Eugenio. Nova espécie de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 do sudeste do Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, v. 63, n. 2, p. 289-295, 2005.

DIAS, P. H. dos S. *et al.*, Larval chondrocranium morphology of five species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia; Anura; Odontophrynidae). **Zootaxa**, v. 3683, n. 4, p. 427-438, 2013.

DO NASCIMENTO, Filipe Augusto C. *et al.* Larval morphology and phylogenetic placement of *Boana exastis* (Anura, Hylidae): a comparison with *B. pardalis* and *B. lundii*. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, p. 1-18, 2022.

FROST, DARREL R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (20/03/2023). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001 , 2023.

FONSECA, Roberta AM *et al.* Growing towards disparity: geometric morphometrics reveals sexual and allometric differences in *Aparasphenodon bruno*i (Anura: Hylidae: Lophophryinae) head shape. **Cuadernos de Herpetología**, v. 34, 2020.

GODINHO, Leandro Braga *et al.* A new species of *Proceratophrys* (Anura: Odontophrynidae) from the middle São Francisco River, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 49, n. 2, p. 63-73, 2013.

GOTELLI, Nicholas J.; ELLISON, Aaron M. **Princípios de estatística em ecologia**. ARTMED editora, 2016.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 4(1): 9pp, 2001. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

IZECKSOHN, Eugenio; CARVALHO-E-SILVA, Sérgio Potsch de; DEISS, Isabela. O osteocrânio de *Proceratophrys boiei* (Wied-Neuwied), *P. appendiculata* (Günther), *P. melanopogon* (Miranda-Ribeiro) e *P. laticeps* Izecksohn & Peixoto (Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 225-229, 2005.

KLINGENBERG, Christian Peter. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. **Development genes and evolution**, v. 226, n. 3, p. 113-137, 2016.

LOPES, André Gomes *et al.* Vocalizations, morphological variation, and morphometry of *Pristimantis gutturalis* (Anura: Strabomantidae). **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 21, n. 2, p. 161-180, 2022.

Mângia, S., D. J. Santana, C. A. G. Cruz, and R. N. Feio. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **Boletim do Museu Nacional. Nova Serie, Zoologia**. Rio de Janeiro 531: 1–33, 2014.

MÂNGIA, Sarah *et al.* A new species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe plateau, Ceará state, northeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 74, n. 3, p. 255-268, 2018.

MÂNGIA, Sarah *et al.* Revising the taxonomy of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 58, n. 4, p. 1151-1172, 2020.

MARIANI, Thiago F.; ROMANO, Pedro SR. Intra-specific variation and allometry of the skull of Late Cretaceous side-necked turtle *Bauruemys elegans* (Pleurodira, Podocnemididae) and how to deal with morphometric data in fossil vertebrates. **PeerJ**, v. 5, p. e2890, 2017.

MIRANDA-RIBEIRO, Alipio de. Algumas considerações sobre o gênero *Ceratophrys* e suas espécies. **Revista do Museu paulista**, v. 12, p. 291-304, 1920.

MONTEIRO, Leandro R. Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. **Systematic Biology**, v. 48, n. 1, p. 192-199, 1999.

PAZ, Andrea *et al.* Environmental correlates of taxonomic and phylogenetic diversity in the Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, v. 48, n. 6, p. 1377-1391, 2021.

PRADO, Gustavo M.; POMBAL JR, José P. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 39, n. 1, p. 1-85, 2008.

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

ROSSA-FERES, Denise de C. *et al.* Anfíbios da Mata Atlântica: lista de espécies, histórico dos estudos, biologia e conservação. **Revisões em Zoologia: Mata Atlântica**, v. 1, p. 237-314, 2017.

SANTANA, Diego José *et al.* A new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Odontophrynidae) of the *P. bigibbosa* species group from Southern Brazil. **Vertebrate Zoology**, v. 71, p. 387-401, 2021.

SEGALLA, Magno V. *et al.* List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SILVA, Marcelo João DA *et al.* Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 3, p. 141-147, 2020.

SILVA, Marcelo João DA *et al.* Cytogenetic approaches provide evidence of a conserved diploid number and cytological differences between *Proceratophrys* species (Anura: Odontophrynidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

SOUTO, N. M. *et al.* Snakes as a model for measuring skull preparation errors in geometric morphometrics. **Journal of Zoology**, v. 309, n. 1, p. 12-21, 2019.

SUKUMARAN, Jeet; KNOWLES, L. Lacey. Multispecies coalescent delimits structure, not species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 7, p. 1607-1612, 2017.

VIEIRA, Kleber Silva *et al.* Polymorphism in a Neotropical toad species: ontogenetic, populational and geographic approaches to chromatic variation in *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883)(Amphibia, Anura, Odontophrynidae). **PeerJ**, v. 10, p. e12879, 2022.

TAYLOR, William R; VAN DYKE, George C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, p. 107-119, 1985.

WIED-NEUWIED, MAP zu et al. Verzeichnis der Amphibien welche in zweiten Bande der Naturgeschichte Brasiliens von Prinz Max von Neuwied werden beschreiben Werden. **Isis von Oken**, v. 14, p. 661-673, 1824.

ZELDITCH, Miriam Leah; SWIDERSKI, Donald L.; SHEETS, H. David. Geometric morphometrics for biologists: a primer. **academic press**, 2012.

ANEXO A

Tabela A1: Acrônimo da coleção herpetológica com número de identificação do livro tombo, cidade, estado e clado dos indivíduos, usados no presente estudo. Os exemplares mensurados estão depositados nos seguintes repositórios (acrônimos): Coleção ‘Célio F. B. Haddad’, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP (CFBH); Museu de Ciências Naturais da PUC Minas, Pontifícia Universidade Católica, Belo Horizonte, MG (MCNAM); Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (MNRJ); Coleção ‘Marcio Roberto Costa Martins’, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (MRCM); Coleção ‘Miguel Trefault Rodrigues’, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (MRT); Museu de Zoologia ‘João Moojen’, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (MZUFV); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, SP (MZUSP); Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG (UFMG); Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas ‘Adão José Cardoso’, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP (ZUEC). (*) **Espécimes que apresentam variação significativa nas medidas.**

Voucher	Cidade	Estado	Clado
MZUFV 10621	Araponga	MG	N1
CFBH 25102	Alegre	ES	N1
MZUSP 135034	Alto Caparaó	MG	N1
MZUFV 645	Viçosa	MG	N1
MZUFV 3621	Viçosa	MG	N1
MZUFV 5811	Viçosa	MG	N1
CFBH 33372	Muniz Freire	ES	N1
MRT 12636	Caparaó	MG	N1
MRT 14125	Caparaó	MG	N1
MRT 15416	Caparaó	MG	N1
MRT 3160	Caparaó	MG	N1
MRT 3167	Caparaó	MG	N1
MZUSP 117363	Caparaó	MG	N1
MZUSP 117376	Caparaó	MG	N1
MZUFV 6657	Araponga	MG	N1
MZUFV 7133	Viçosa	MG	N1
MZUFV 8952	Eugenópolis	MG	N1
MZUFV 8994	Eugenópolis	MG	N1
MZUFV 8994	Eugenópolis	MG	N1
MZUFV 8995	Eugenópolis	MG	N1
MZUFV 10204	Araponga	MG	N1

Voucher	Cidade	Estado	Clado
UFMG 18588	Divino	MG	N1
UFMG 18589	Divino	MG	N1
UFMG 18590	Divino	MG	N1
MZUFV 11347	Viçosa	MG	N1
MZUFV 11631	Espera Feliz	MG	N1
MZUFV 11633	Espera Feliz	MG	N1
MZUFV 12826	Pedra Dourada	MG	N1
MNRJ 43630	Faria Lemos	MG	N1
ZUEC 23621	Ibitirama	ES	N1
MZUFV 12908	Mariana	MG	N1
MCNAM 7471	Mariana	MG	N1
MZUFV 13095	Viçosa	MG	N1
MZUSP 137923	Mariana	MG	N1
UFMG 10555	Mariana	MG	N1
UFMG 19912	Mariana	MG	N1
MZUFV 16381	Divino	MG	N1
UFMG 12774	Simonésia	MG	N1
UFMG 12788	Simonésia	MG	N1
UFMG 12821	Simonésia	MG	N1
MZUFV 16401	Divino	MG	N1
MZUFV 16709	Divino	MG	N1
MZUFV 16710	Divino	MG	N1
MZUFV 17076	Divino	MG	N1
MZUFV 17113	Divino	MG	N1
MZUFV 19348	Manhumirim	MG	N1
ZUEC 6149	Viçosa	MG	N1
MNRJ 59544	Resende	RJ	N2
ZUEC 19278	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19279	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19280	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19281	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19282	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19290	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19292	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19294	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19295	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
MZUSP 114363	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114386	São Paulo	SP	N2
ZUEC 23975	Atibaia	SP	N2
ZUEC 9560	Atibaia	SP	N2
MZUSP 133710	Bananal	SP	N2
MZUSP 133711	Bananal	SP	N2
MZUSP 133712	Bananal	SP	N2
MZUSP 146989	Bananal	SP	N2
CFBH 6712	Camanducaia	MG	N2
CFBH 7197	Santo Antônio do Pinhal	SP	N2
CFBH 7198	Santo Antônio do Pinhal	SP	N2
CFBH 14816	São Luiz do Paraitinga	SP	N2

Voucher	Cidade	Estado	Clado
MZUSP 147320	Mairiporã	SP	N2
MZUSP 138780	Mogi das Cruzes	SP	N2
MZUSP 86904	Mogi das Cruzes	SP	N2
MZUSP 86905	Mogi das Cruzes	SP	N2
MNRJ 91411	Paraty	RJ	N2
MNRJ 91412	Paraty	RJ	N2
MNRJ 284	Petrópolis	RJ	N2
ZUEC 10951	Petrópolis	RJ	N2
ZUEC 10952	Petrópolis	RJ	N2
MNRJ 90118	Rio Claro	RJ	N2
MNRJ 92186	Rio Claro	RJ	N2
ZUEC 19283*	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19284*	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19291*	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
ZUEC 19293*	São Luiz do Paraitinga	SP	N2
MRT 3163	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114359	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114384	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114385	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114388	São Paulo	SP	N2
MZUSP 114389	São Paulo	SP	N2
MZUSP 60955	São Paulo	SP	N2
MRCM 2087*	Camanducaia	MG	N2
MRCM 1847*	Camanducaia	MG	N2
MRCM 1841*	Camanducaia	MG	N2
MRCM 1856*	Camanducaia	MG	N2
MRCM 1510*	Camanducaia	MG	N2
CFBH 25669	Iporanga	SP	S
MZUSP 26858	Cotia	SP	S
MZUSP 134267	Eldorado	SP	S
MZUSP 141679	Ibiúna	SP	S
MZUSP 141680	Ibiúna	SP	S
MZUSP 141681	Ibiúna	SP	S
CFBH 6351	Cananéia	SP	S
CFBH 1513	Capão Bonito	SP	S
CFBH 14718	Guapiara	SP	S
CFBH 13488	Guapiara	SP	S
CFBH 2124	Iporanga	SP	S
MZUSP 31351	Iporanga	SP	S
ZUEC 8238	Iporanga	SP	S
MZUSP 135579	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 135582	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 135583	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 135584	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 135586	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 135788	Jacupiranga	SP	S
MZUSP 127613	Juquitiba	SP	S
MZUSP 134660	Juquitiba	SP	S

Voucher	Cidade	Estado	Clado
MZUSP 134663	Juquitiba	SP	S
MZUSP 134664	Juquitiba	SP	S
MZUSP 134665	Juquitiba	SP	S
MZUSP 134666	Juquitiba	SP	S
MZUSP 134667	Juquitiba	SP	S
CFBH 25702	Iporanga	SP	S
CFBH 26822	Iporanga	SP	S
CFBH 26824	Iporanga	SP	S
MZUSP 123409	Piedade	SP	S
MZUSP 123415	Piedade	SP	S
MZUSP 123419	Piedade	SP	S
MZUSP 123420	Piedade	SP	S
MZUSP 123423	Piedade	SP	S
MZUSP 123431	Piedade	SP	S
MZUSP 123438	Piedade	SP	S
MZUSP 123441	Piedade	SP	S
MZUSP 136392	Piedade	SP	S
MZUSP 136393	Piedade	SP	S
CFBH 38626	Juquitiba	SP	S
CFBH 15995	Piedade	SP	S
CFBH 22266	Piedade	SP	S
CFBH 16506	Pilar do Sul	SP	S
CFBH 7562	Pilar do Sul	SP	S
CFBH 1855	Ribeirão Branco	SP	S
CFBH 1857	Ribeirão Branco	SP	S
CFBH 35059	Ribeirão Branco	SP	S
MNRJ 19351	Ribeirão Branco	SP	S
MNRJ 19352	Ribeirão Branco	SP	S
MNRJ 19354	Ribeirão Branco	SP	S
MNRJ 19355	Ribeirão Branco	SP	S
ZUEC 6555	Ribeirão Branco	SP	S
ZUEC 6583	Ribeirão Branco	SP	S
ZUEC 9783	Ribeirão Branco	SP	S
CFBH 35207	Ribeirão Branco	SP	S
MZUSP 117446	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 117447	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 117449	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 117450	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 87635	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 88103	Ribeirão Grande	SP	S
MZUSP 88105	Ribeirão Grande	SP	S
ZUEC 13605	Ribeirão Grande	SP	S
ZUEC 13607	Ribeirão Grande	SP	S
ZUEC 15725	Ribeirão Grande	SP	S
CFBH 367	Ribeirão Branco	SP	S
CFBH 40200	Ribeirão Branco	SP	S
CFBH 27136	Ribeirão Grande	SP	S
CFBH 38441	São Miguel Arcanjo	SP	S

Voucher	Cidade	Estado	Clado
CFBH 38448	São Miguel Arcanjo	SP	S
MZUSP 136631	São Miguel Arcanjo	SP	S
MZUSP 136632	São Miguel Arcanjo	SP	S
MZUSP 136634	São Miguel Arcanjo	SP	S
MZUSP 136635	São Miguel Arcanjo	SP	S
MZUSP 136640	São Miguel Arcanjo	SP	S