

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Sinais cruzados: interferência reprodutiva na comunicação acústica em duas espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae)

Eduardo Borges de Oliveira
Magister Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025

EDUARDO BORGES DE OLIVEIRA

Sinais cruzados: interferência reprodutiva na comunicação acústica em duas espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae)

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

Coorientador: Renato Christensen Nali

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

O48s
2025

Oliveira, Eduardo Borges de, 1999-
Sinais cruzados: interferência reprodutiva na comunicação
acústica em duas espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae)
/ Eduardo Borges de Oliveira. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Renato Neves Feio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Animal, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.465>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Anuros - Reprodução. 2. Eficiência reprodutiva. 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. 597.878

EDUARDO BORGES DE OLIVEIRA

Sinais cruzados: interferência reprodutiva na comunicação acústica em duas espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae)

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: 23 de abril de 2025.

Assentimento:

Eduardo Borges de Oliveira
Autor

Renato Neves Feio
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 20/07/2025 às 10:42:09 e pelo orientador em 21/07/2025 às 06:08:47. 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 **BXQX.C686.WWKL** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa jornada, pude contar com uma rede de apoio que, além de todo o suporte, me deu motivos para seguir em frente. Isso tornou essa experiência não só enriquecedora, mas também mais leve e feliz. Por isso, não poderia deixar de expressar minha gratidão a vocês.

A Deus, por despertar em mim a curiosidade e o amor pela natureza, além de todo o cuidado ao longo do caminho.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me dar asas e raízes na medida certa, nunca encontrarei palavras suficientes para agradecer todo o apoio e incentivo durante minha formação. Elaine e Evandro, cada noite de saudade longe de casa, desde os meus 15 anos, teve um propósito: ser uma pessoa tão boa quanto vocês. Aos meus irmãos, Everaldo e Luan, obrigado pelo apoio e, principalmente, pela paciência com a invasão de sapos dentro de casa e suporte para que eu realizasse esse trabalho.

À Laísa, que no início dessa jornada era minha namorada, em janeiro de 2024 virou minha noiva e, agora, finalizamos essa etapa casados. Saiba que, sem seu apoio, paciência e amor, nada teria seguido tão bem. Você, que escutou todas as minhas dúvidas, me ajudou nos treinos de apresentações, sempre esteve atenta a tudo. Foi imersa no mundo da biologia animal, realizando o trabalho de campo junto comigo e vivenciando momentos juntos em Ibitipoca que jamais serão esquecidos, tem uma grande parte sua nesse trabalho.

Ao meu orientador, Renato N. Feio, que, conforme conversamos na primeira vez que nos vimos, foi um grande facilitador de todo o processo. Sou muito grato por abrir as portas do museu para mim, pelas risadas e pelas dicas e parceria ao longo dessa caminhada que se estenderam para vida pessoal e profissional.

Ao meu coorientador, que foi e continua sendo também meu orientador, Renato C. Nali. Sou imensamente grato por toda a confiança e pelo conhecimento compartilhado ao longo desses anos no LECEAN, que, por sinal, já são muitos. Desde a graduação, quando fui o primeiro voluntário do seu laboratório, até hoje, sigo aprendendo e crescendo com sua orientação. Você me ensinou sobre anfíbios, sobre pesquisa e, acima de tudo, sobre compromisso e paixão pela ciência. Ter tido a responsabilidade de conduzir um projeto seu foi uma honra, e saber que continuo nessa caminhada ao seu lado só reforça o quanto essa trajetória foi significativa para mim. Obrigado por tudo!

Aos colegas do ambiente acadêmico, que me fizeram crescer e, espero, ter contribuído nem que seja com uma dica ou uma risada com vocês

também. Aos do museu, pelo acolhimento e boas conversas na churrasqueira, e aos do LECEAN, pelas ideias, discussões e confraternizações que tornaram essa jornada ainda mais rica.

A todas as pessoas que me auxiliaram em campo, especialmente Felipe Messias, com quem dividi o enorme prazer de explorar o PEI ao longo de muitos meses. E aos demais que, em algum momento, estiveram comigo no trabalho de campo ou em laboratório: Raoni, Davi, Renato Nali, Renato Feio, Pedro, Laísa e Vinícius. Além de todo o apoio e estadia fornecido pelos funcionários do PEI e a prontidão da Clarisse para várias demandas.

À Universidade Federal de Viçosa, representada pelo programa de pós-graduação em Biologia Animal, pela excelência em toda sua infraestrutura e corpo técnico.

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). Além do financiamento dos projetos FAPEMIG APQ-04419-22 e APQ-00063-22.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.
Isaac Newton

RESUMO

OLIVEIRA, Eduardo Borges de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2025. **Sinais cruzados: interferência reprodutiva na comunicação acústica em duas espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae).** Orientador: Renato Neves Feio. Coorientador: Renato Christensen Nali.

A interferência reprodutiva ocorre em qualquer interação interespecífica durante o processo de aquisição de parceiros, podendo impactar o sucesso reprodutivo. Embora reconhecida como um fator potencialmente determinante na coexistência de espécies simpátricas, ainda é pouco explorada nos estudos ecológicos, gerando uma lacuna de conhecimento sobre seus impactos na dinâmica populacional e no isolamento reprodutivo. Entre os anfíbios anuros, a vocalização é o principal meio de comunicação para a atração de parceiros e competição entre machos, sendo um componente fundamental das interações ecológicas. Diante disso, este estudo investigou a resposta de *Bokermannohyla feioi* e *Bokermannohyla ibitipoca* a playbacks coespecíficos e heteroespecíficos, analisando suas vocalizações de anúncio e agressivas, além de respostas comportamentais relacionadas a movimentações. Os experimentos ocorreram entre outubro de 2023 e fevereiro de 2024 no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil, local onde ocorre atividade reprodutiva simultânea de ambas as espécies. Os resultados indicam que machos de *B. feioi* modularam suas vocalizações e exibiram respostas agressivas tanto em interações coespecíficas quanto heteroespecíficas, sugerindo um comportamento mais ativo nos dois cenários. Além disso, foi identificado e descrito um canto agressivo para a espécie, cuja estrutura variou de acordo com o contexto da interação, apresentando diferenças acústicas entre as respostas para sinais coespecíficos vs. heteroespecíficos. Em contraste, machos de *B. ibitipoca* interagiram acusticamente principalmente com playbacks coespecíficos, demonstrando uma menor tendência de resposta a sinais heteroespecíficos. Esses resultados sugerem diferenças na percepção e resposta das espécies à sobreposição de sinais acústicos, o que pode ter implicações reprodutivas e ecológicas na dinâmica de comunicação e isolamento reprodutivo.

Palavras-chave: dissertação; anuros; interferência reprodutiva; playback; *Bokermannohyla*; bioacústica; agressividade

ABSTRACT

OLIVEIRA, Eduardo Borges de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2025.
Crossed signals: reproductive interference in acoustic communication in two species of *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae). Adviser: Renato Neves Feio. Co-adviser: Renato Christensen Nali.

Reproductive interference occurs in any interspecific interaction during the mate acquisition process, potentially impacting reproductive success. Although recognized as a potentially significant factor in the coexistence of sympatric species, it remains underexplored in ecological studies, leading to a knowledge gap regarding its effects on population dynamics and reproductive isolation. In frogs, vocalization is the primary form of communication for mate attraction and male competition, playing a fundamental role in ecological interactions. The present study investigated the responses of *Bokermannohyla feioi* and *Bokermannohyla ibitipoca* to conspecific and heterospecific calls in playback experiments, analyzing their advertisement and aggressive calls, as well as behavioral movement responses. The experiments were conducted in the Ibitipoca State Park, Minas Gerais State, Brazil, where both species breed simultaneously. We found that males of *B. feioi* modulated their vocalizations and responded aggressively in both conspecific and heterospecific interactions, suggesting a more active behavior in both contexts. We also described an aggressive call for the species, with its structure varying according to the interaction context, showing acoustic differences between conspecific and heterospecific responses. In contrast, males of *B. ibitipoca* interacted acoustically mainly with conspecific calls, with a tendency to respond less to heterospecific signals. These findings suggest differences in species perception and responses to signal overlap, which may have reproductive and ecological implications for communication dynamics and reproductive isolation.

Keywords: dissertation; anurans; reproductive; interference; playback; *Bokermannohyla*; bioacoustics; aggressiveness

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplo de fotografias para a identificação de dois indivíduos de <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> utilizando marcas naturais, no Parque Estadual do Ibitipoca, Lima Duarte, MG, Brasil.....	28
Figura 2 – Gráficos dos resultados estatisticamente significativos para <i>Bokermannohyla feioi</i> , Lima Duarte, sudeste do Brasil. Legenda: Os colchetes com asterisco indicam a diferença significativa entre momentos ou entre tratamento heteroespecífico vs. coespecífico. Variáveis: A: Frequência máxima; B: N° de pulsos; C: N° de notas de anúncio por minuto; D: N° de notas B; E: Duração da nota; F: <i>Bokermannohyla feioi</i>	29
Figura 3 - – Gráficos dos resultados estatisticamente significativos para <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> . Legenda: Os colchetes com asterisco indicam a diferença significativa entre momentos ou entre tratamento heteroespecífico versus coespecífico. Variáveis: A: Frequência máxima; B: N° de notas de anúncio por minuto; C: Duração do conto; D: Pico de Amplitude; E: Esforço do canto; F: <i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	31
Figura 4 - - Média de variáveis com resultados estatisticamente significativos para Nota agressiva por tratamento para <i>Bokermannohyla feioi</i>	38
Figura 5 - Boxplot do tempo de latência inicial por tratamento - T1 e T3.....	39
Figura 6 – Gráficos demonstrando as proporções de comportamentos de presença (sim) e ausência (não) para <i>Bokermannohyla feioi</i> no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. A: Virou para a caixa; B: locomoveu para a caixa; C: Parou de vocalizar durante o estímulo; D Parou de Vocalizar após o estímulo; E: Emitiu “notas C”(nota agressiva).	44
Figura 7 - Gráfico indivíduos vocalizando exposto para todos os tratamentos.....	45
Figura 8 - Gráficos demonstrando as proporções de comportamentos de presença (sim) e ausência (não) para <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> . no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil – A: Parou de vocalizar durante o estímulo; B: Parou de vocalizar após o estímulo; C: Saiu da toca.	47
Figura 9 – Vocalizações de <i>Bokermannohyla feioi</i> em Lima Duarte, MG, Brasil. A: Oscilograma destacando notas de anúncio emitidas naturalmente pelo macho (pontilhado cinza), notas de anúncio médias da população provenientes do <i>playback</i> construído (pontilhado cinza claro) e notas agressivas emitidas naturalmente pelo macho (pontilhado vermelho). B: oscilograma e espectrograma de uma nota de anúncio, com múltiplos pulsos; C: Oscilograma e espectrograma da nota agressiva, descrita neste trabalho. Vocalização	

registrada a 19 °C de temperatura do ar, massa do indivíduo de 3,8 g e CRC = 40,4mm.
Voucher não coletado. 63

Figura 10- Boxplot com variáveis com resultados estatisticamente significativos em
comparação entre os tratamentos (coespecífico e heteroespecífico) 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados acústicos das análises pos-hoc para os tratamentos coespecífico e heteroespecíficos realizados com <i>Bokermannohyla feioi</i> , em comparação com os 3 minutos de tratamento	32
Tabela 2 - Resultados acústicos das análises pos-hoc para os tratamentos coespecífico e heteroespecíficos realizados com <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> em comparação com os 3 minutos de tratamento	32
Tabela 3 - Porcentagens de ocorrência (presença) dos comportamentos observados nos tratamentos coespecíficos (C) e heteroespecíficos (H), para <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> e <i>B. feioi</i> , no sudeste do Brasil. As porcentagens representam a frequência de presença dos comportamentos, sendo a ausência inferida pela diferença para 100%.	43
Tabela 4- Caracterização das notas agressivas em <i>Bokermannohyla feioi</i> , Lima Duarte, MG, Brasil, descritas a partir de estímulos de <i>playback</i> coespecíficos (N = 11 machos e 38 notas).	62
Tabela 5 Espécimes coletados e tombados na Coleção de anfíbios da UFJF.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 REFERÊNCIAS.....	16
2. CAPÍTULO 1: Interações Acústicas entre Espécies do Gênero <i>Bokermannohyla</i>	18
2.1 INTRODUÇÃO	18
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1 Área de estudo.....	19
2.2.2 Amostragem de indivíduos e construção das faixas de <i>playback</i>	20
2.2.3 Experimentos de <i>playback</i> e variáveis medidas	22
2.2.4 Análises estatísticas – dados acústicos quantitativos	24
2.2.5 Análises estatísticas – dados de presença e ausência dos comportamentos	26
2.3 RESULTADOS	27
2.3.1 Amostragem geral	27
2.3.2 Resultados das variáveis quantitativas	28
2.3.2.1 Resumo das alterações significativas em <i>Bokermannohyla feioi</i>	28
2.3.2.2 Resumo das alterações significativas em <i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	30
2.3.2.3 Resultados detalhados para <i>Bokermannohyla feioi</i> (T1 e T3).....	33
2.3.2.4 Resultados detalhados para <i>Bokermannohyla ibitipoca</i> (T2 e T4).....	39
2.3.3 Variáveis comportamentais de presença e ausência.....	43
2.3.3.1.....	44
2.4 DISCUSSÃO	49
2.5 CONCLUSÃO	54
2.6 REFERÊNCIAS.....	55
3. CAPÍTULO 2 : Descrição da nota agressiva de <i>Bokermannohyla feioi</i> (Napoli & Caramaschi, 2004) e análise de sua emissão em contextos coespecífico e heteroespecífico ...	59
3.1 AGRADECIMENTOS	65
3.2 REFERÊNCIAS.....	66

APÊNDICE A – Tabela Espécimes coletados e tombados na Coleção de anfíbios da UFJF..	68
APÊNDICE B – Produções Técnicas e Científicas.....	69
ANEXO A - Normas	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

Interferência Reprodutiva: Um Fator Subestimado na Ecologia das Espécies

Em estudos ecológicos, indivíduos e populações são simultaneamente afetados por uma diversidade de forças seletivas, como a seleção sexual, que influencia a aquisição de parceiros, e as interações interespecíficas, frequentemente associadas a mecanismos de isolamento reprodutivo (Kaplan & Denno 2007; Carranza 2009). Em geral, estudos em seleção sexual tendem a focar exclusivamente nas interações intraespecíficas, negligenciando um importante fator, que é a interferência reprodutiva (Andreani *et al.*, 2023). Este fenômeno, que engloba qualquer interação interespecífica que ocorra durante o processo de aquisição de parceiros, pode ter impactos profundos na coexistência e no sucesso reprodutivo de espécies sincronopatria (Hochkirch *et al.*, 2007; Gröning & Hochkirch 2008). A interferência reprodutiva pode, em muitos casos, ser tão ou mais importante que a seleção sexual e a competição por recursos (Gröning & Hochkirch 2008), regulando a coexistência, a competição interespecífica e a evolução de nichos ecológicos, porém é pouco mencionada nos textos clássicos de ecologia (Begon 2009).

Essas interações são possíveis em várias etapas do processo reprodutivo, incluindo o bloqueio ou redução da eficiência dos sinais emitidos para o acasalamento, o processo de corte mal direcionada, a ocorrência de acasalamentos heteroespecíficos e a produção de descendentes híbridos, que podem ser férteis ou inférteis (Gröning & Hochkirch 2008; Mitchell, *et al.*, 2022). O efeito da interferência pode se manifestar diferentemente entre as espécies, sendo menos comum que apenas uma delas sofra as consequências. Na maioria dos casos conhecidos, a interação resulta em custos negativos de aptidão para ambas as espécies envolvidas (D'Amore *et al.*, 2009; Kyogoku 2020).

Para espécies que dependem de sinais acústicos para a reprodução, como é o caso da maioria dos anfíbios anuros (Toledo *et al.*, 2015), a interferência reprodutiva através de vocalizações sobrepostas pode interferir diretamente no sucesso reprodutivo. Espécies filogeneticamente próximas são mais suscetíveis à interferência reprodutiva devido à presença de barreiras de acasalamento incompletas, além de similaridades na morfologia e/ou vocalizações (Mitchell *et al.*, 2022; Nali *et al.*, 2023). Em ambientes onde há coexistência de espécies com vocalizações sobrepostas, há um aumento no risco de reconhecimento incorreto da espécie, o que pode afetar negativamente a aptidão de pelo menos uma das espécies envolvidas (Gröning & Hochkirch 2008). Essas dinâmicas de sinalização acústica, além de

influenciar na comunicação sexual, são determinantes para o sucesso reprodutivo e a coexistência de espécies próximas.

Nos anuros, a comunicação acústica desempenha um papel crucial no reconhecimento específico e na segregação comportamental (Nali & Prado, 2014; Toledo *et al.*, 2015; Tumulty *et al.*, 2022). Estudos mostram que essa forma de comunicação é altamente variável, sendo influenciada por fatores como o tamanho corporal, variáveis ambientais e contexto social (Koehler *et al.*, 2019; Turin & Nali, 2024). No entanto, há evidências de que, em condições de simpatria, a sobreposição dos cantos pode levar à interferência nas interações reprodutivas, resultando em adaptações comportamentais e acústicas para evitar o mascaramento, competição direta por parceiros e eventuais conflitos físicos heteroespecíficos (Vieira *et al.*, 2016; Andreani *et al.*, 2023).

O gênero *Bokermannohyla* é composto por espécies de anuros da família Hylidae, endêmicas do Brasil, com distribuição predominantemente associada a ambientes de altitude e formações de Mata Atlântica e Cerrado (Faivovich *et al.*, 2005). Essas espécies são conhecidas por sua diversidade de cantos, que desempenham papéis cruciais na comunicação intra e interespecífica, especialmente em contextos reprodutivos e seleção sexual (Nali *et al.*, 2014; Malagoli *et al.*, 2021; Bang *et al.*, 2023). Além disso, a ocorrência de hibridação entre espécies do gênero já foi documentada, ressaltando a importância do papel da sobreposição de nichos e da competição acústica em contextos ecológicos e evolutivos (Nali *et al.*, 2023), que complicam a resolução de filogenias (Faivovich *et al.*, 2025). Esses fatores tornam *Bokermannohyla* um modelo relevante para investigar os mecanismos de seleção sexual e as consequências da competição em cenários de interferência reprodutiva.

Bokermannohyla feioi havia sido sinonimizada, com base na taxonomia tradicional por Walker *et al.* (2015), com *Bokermannohyla nanuzae* (Bokermann & Sazima, 1973). Porém, Pezzuti *et al.* (2021) descreveu a morfologia larval de diferentes localidades para a então *B. nanuzae* e sugeriu a possibilidade de que *B. feioi* pudesse ser um nome válido, baseado em dados morfológicos dos girinos. Recentemente, *B. feioi* foi revalidada por Brunes *et al.* (2023), com base em análises moleculares, proposição que se manteve na filogenia do gênero (Faivovich *et al.*, 2025). Esse nome se aplica às populações com distribuição em regiões montanhosas no interior da Mata Atlântica de Minas Gerais e ocorrência em gradiente altitudinal variando de 840 a 1.400 metros acima do nível do mar. É conhecida na Serra do Ibitipoca, município de Lima Duarte (localidade-tipo), na Mantiqueira Sul; em diversas localidades da região do Quadrilátero Ferrífero, no extremo sul do Espinhaço Meridional; na Serra Negra, município de Itamarandiba, na encosta leste do Espinhaço Meridional; e no Alto

Cariri, município de Santa Maria do Salto, divisa dos estados de Minas Gerais e Bahia (Brunes *et al.* 2023). Atualmente é conhecido o canto de anúncio de *B. feioi* como notas com múltiplos pulsos, descrito por Napoli e Caramaschi (2004), e uma segunda nota descrita por Walker *et al.* (2015), denominada de “Nota B” e sem função social elucidada.

Bokermannohyla ibitipoca é endêmica da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, sendo conhecida em áreas de altitude da Mata Atlântica, principalmente em Minas Gerais e alguns locais do Espírito Santo, com a localidade-tipo sendo também na Serra do Ibitipoca, MG. É encontrada em mata de galeria, no chão entre raízes ou perto de corpos d’água, onde comumente utiliza esses ambientes como sítio de vocalização e desova em tocas (Cruz *et al.* 2009). Os estudos sobre sua vocalização são escassos, com apenas a descrição de seu canto de anúncio e soltura (Napoli & Caramaschi, 2004; Pereira-Silva *et al.*, 2019). As duas espécies foram descritas da mesma localidade do local de estudo, tem habitats sobrepostos, como as áreas de montanha, e utilização do mesmo microambiente, seja para reprodução ou abrigo e alimentação (Caramaschi & Feio, 1990; Napoli & Caramaschi, 2004).

Esta dissertação de mestrado é composta por dois capítulos, organizados no formato de manuscritos científicos. No primeiro capítulo, utilizamos as espécies *Bokermannohyla feioi* e *Bokermannohyla ibitipoca* como modelos para investigar possíveis interferências reprodutivas e suas respostas a sinais acústicos. Foram realizados experimentos de *playback* para analisar as respostas vocais das espécies em contextos coespecíficos e heteroespecíficos, com foco em alterações nos parâmetros acústicos e em comportamentos não acústicos, como movimentações. Essa abordagem permitiu avaliar a ocorrência e o grau de atuação da interferência reprodutiva nas interações entre as espécies, fornecendo *insights* relevantes para a ecologia comportamental. O segundo capítulo é dedicado ao estudo do comportamento vocal de *B. feioi*, com ênfase nas vocalizações agressivas, que foram observadas como respostas agressivas no capítulo 1, mas que até então não haviam sido descritas. Os resultados demonstram que essa vocalização difere significativamente do canto de anúncio da espécie, e ocorre em resposta tanto para simulação de coespecíficos, quanto heteroespecíficos (*B. ibitipoca*), apresentando modificações em alguns de seus parâmetros acústicos.

Este trabalho amplia o conhecimento sobre a interferência reprodutiva em anuros neotropicais, evidenciando como a sobreposição de vocalizações pode afetar interações coespecíficas e heteroespecíficas. Os achados reforçam o papel da competição acústica na seleção sexual e nas dinâmicas de coexistência entre espécies simpátricas. Além disso, a descrição inédita da vocalização agressiva de *Bokermannohyla feioi* contribui para a

compreensão da diversidade acústica no gênero, destacando a importância das interações vocais na ecologia e evolução desses anfíbios.

1.1 REFERÊNCIAS

- ANDREANI, Tainã Lucas *et al.* Acoustic plasticity in *Boana goiana* (Lutz, 1968) (Anura, Hylidae): how males respond to successive interactions with conspecific competitors. **Bioacoustics**, v. 32, n. 4, p. 422-433, 2023.
- BANG, Davi Lee *et al.* Vocal Repertoire of Two *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae) Species, with an Overview of Advertisement Call Diversity in the Genus. **Journal of Herpetology**, v. 57, n. 2, p. 211-219, 2023.
- CARRANZA, Juan. Defining sexual selection as sex-dependent selection. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 3, p. 749, 2009.
- D'AMORE, Antonia; Kirby, Erik; Hemingway, Valentine. Reproductive interference by an invasive species: an evolutionary trap. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 4, n. 3, p. 325-330, 2009.
- FAIVOVICH, Julian *et al.* The phylogenetic relationships of Bokermann's treefrogs: species groups, reproductive biology, and biogeography (Anura: Hylidae: *Bokermannohyla*). **Cladistics**, 2025.
- GRÖNING, Julia; HOCHKIRCH, Axel. Reproductive interference between animal species. **The Quarterly review of biology**, v. 83, n. 3, p. 257-282, 2008.
- HOCHKIRCH, Axel; GRÖNING, Julia; BÜCKER, Amelie. Sympatry with the devil: reproductive interference could hamper species coexistence. **Journal of Animal Ecology**, v. 76, n. 4, p. 633-642, 2007.
- KAPLAN, Ian; DENNO, Robert F. Interspecific interactions in phytophagous insects revisited: a quantitative assessment of competition theory. **Ecology Letters**, v. 10, n. 10, p. 977-994, 2007.
- KOEHLER, Joern *et al.* The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, n. 1, p. 1-124-1-124, 2017.
- KYOGOKU, Daisuke. When does reproductive interference occur? Predictions and data. **Population Ecology**, v. 62, n. 2, p. 196-206, 2020.

- MALAGOLI, Leo Ramos *et al.* A new reproductive mode in anurans: Natural history of *Bokermannohyla astartea* (Anura: Hylidae) with the description of its tadpole and vocal repertoire. **PLoS One**, v. 16, n. 2, p. e0246401, 2021.
- MITCHELL, Christina *et al.* Reproductive interference and Satyrism: mechanisms, outcomes and potential use for insect control. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 3, p. 1023-1036, 2022.
- TOLEDO, Luís F. *et al.* The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethologica**, v. 18, p. 87-99, 2015.
- TUMULTY, James P.; LANGE, Zachary K.; BEE, Mark A. Identity signaling, identity reception, and the evolution of social recognition in a Neotropical frog. **Evolution**, v. 76, n. 1, p. 158-170, 2022.
- TURIN, Rubens AF; NALI, Renato C. Movement or plasticity: acoustic responses of a torrent frog to stream geophony. **Behavioral Ecology**, v. 35, n. 1, p. arad117, 2024.
- VIEIRA, Raísa Romênia Silva; BATISTA, Vinícius Guerra; BASTOS, Rogério Pereira. Acoustic communication in two species of the *Hypsiboas albopunctatus* group (Anura: Hylidae) in sympatry and allopatry. **Zoologia (Curitiba)**, v. 33, n. 02, p. e20150037, 2016.

2. CAPÍTULO 1: INTERAÇÕES ACÚSTICAS ENTRE ESPÉCIES DO GÊNERO *BOKERMANNOHYLA*

2.1 INTRODUÇÃO

As interações reprodutivas interespecíficas, também conhecidas como interferência reprodutiva, têm sido observadas em diferentes grupos de organismos (Gröning & Hochkirch 2008). Nos anfíbios anuros, que utilizam vocalizações com diferentes funções, como atração e competição por parceiros e estabelecimento de territórios, essa forma de interferência pode ocorrer por meio da sobreposição do canto, especialmente entre espécies filogeneticamente próximas (D'Amore *et al.*, 2009). Espécies do gênero *Bokermannohyla* são um excelente modelo para o estudo da interferência reprodutiva, visto que podem compartilhar habitats similares, apresentam interações agressivas, diversidade de canto com sobreposição de sinais acústicos e até mesmo hibridação (Nali & Prado, 2012; Bang *et al.*, 2023; Nali *et al.*, 2023).

O gênero *Bokermannohyla* é atualmente dividido em grupos monofiléticos com base em evidências moleculares (Brunes *et al.*, 2023; Faivovich *et al.*, 2025). *Bokermannohyla feioi* integra o grupo *B. nanuzae*, composto por espécies associadas a ambientes montanos do Espinhaço Mineiro, enquanto *Bokermannohyla ibitipoca* está filogeneticamente relacionada a espécies da Mata Atlântica, embora sua posição exata ainda apresente incertezas. Estudos anteriores mostraram que espécies próximas filogeneticamente têm maior propensão a interferir na comunicação umas das outras, seja por meio de vocalizações ou *displays* visuais (Gröning & Hochkirch 2008; Herrick *et al.* 2018). As espécies-alvo deste estudo têm suas distribuições restritas a locais de altitude na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais. *Bokermannohyla feioi* e *B. ibitipoca* compartilham habitats montanhosos (Cruz *et al.* 2009), o que potencializa a possibilidade de sobreposição acústica e interfere diretamente na capacidade de machos atraírem fêmeas. Em ambientes naturais, há evidências de que machos ajustam suas vocalizações de forma a maximizar a relação sinal-ruído, diminuindo os efeitos negativos da sobreposição do canto (Márquez *et al.*, 2001; Andreani *et al.*, 2023). Apesar de pertencerem a linhagens distintas dentro do gênero, ambas as espécies compartilham o mesmo ambiente acústico, o que torna plausível a ocorrência de sobreposição de sinais. Ainda assim, não há um estudo específico da interferência entre espécies de *Bokermannohyla*, dificultando a compreensão de quanto isso afeta o sucesso reprodutivo de cada espécie.

As vocalizações de anúncio de *Bokermannohyla feioi* e *B. ibitipoca* são acusticamente distintas entre si, conforme descrições originais. O canto de anúncio de *B. feioi* é composto por notas múltiplas e pulsadas, com pulsos iniciais espaçados e uma porção final com dezenas de pulsos sobrepostos, frequência dominante entre 1,9–2,4 kHz, além de modulação de frequência e bandas laterais bem definidas (Napoli *et al.*, 2004). Já *B. ibitipoca* emite cantos de anúncio com uma a quatro notas pulsadas, com durações e intervalos desiguais e aumento progressivo da amplitude de frequência; a frequência dominante varia entre 0,4–0,6 e 1,7–1,9 kHz, também com modulação de frequência no final da última nota e presença de bandas laterais (Napoli & Caramaschi, 2004). Apesar dessas diferenças acústicas claras, é possível que as duas espécies tenham interrelações ecológicas, devido ao compartilhamento de habitat e de sítios reprodutivos, semelhanças morfológicas e a presença de machos satélites, justificando o estudo em um contexto de interferência reprodutiva.

Neste capítulo, investigamos as interações acústicas entre *Bokermannohyla feioi* e *Bokermannohyla ibitipoca*, com o objetivo de avaliar as respostas dos machos a estímulos e possíveis interferências reprodutivas entre as espécies. Por meio de experimentos de *playback*, analisamos respostas acústicas e comportamentais de movimentação, em contextos coespecíficos e heteroespecíficos. De acordo com o conhecimento sobre a comunicação acústica em anfíbios anuros, e a diferença que existe entre as vocalizações das duas espécies, postulamos as seguintes hipóteses: (1) machos responderiam de forma mais intensa a vocalizações de indivíduos da mesma espécie, indicando um comportamento voltado à comunicação intraespecífica; e (2) apresentariam menor ou nenhuma resposta a estímulos de indivíduos de outra espécie, o que poderia refletir um mecanismo de isolamento reprodutivo. Buscamos compreender como sinais vocais influenciam as interações entre essas espécies, considerando tanto os aspectos de competição e corte quanto os possíveis mecanismos de isolamento reprodutivo. Essa abordagem visa ampliar o conhecimento acerca dos processos ecológicos envolvidos nas interações acústicas e na interferência reprodutiva entre as espécies.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo

O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIb), localizado no município de Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil (21°42'37,35"S; 43°53'46,93"O), está situado próximo ao povoado de

Conceição do Ibitipoca, Sul de Minas Gerais, com altitudes variando entre 1.050 a 1.784 m acima do nível do mar. Sua vegetação é composta por campos altimontanos, campos rupícolas, fragmentos florestais naturais e uma floresta de montanha em variados estágios sucessionais (Cruz *et al.* 2009). Os locais de amostragem foram próximos da sede do parque, onde já se confirmou a presença de ambas as espécies em sincronopatria (Cruz *et al.* 2009), em três diferentes riachos dentro de um raio de 500 m (21°42'44,03"S 43°53'48,21"O).

2.2.2 Amostragem de indivíduos e construção das faixas de *playback*

Foi utilizada a metodologia de amostragem de busca ativa em sítios reprodutivos (procura de anfíbios em sítios reprodutivos como lagoas, brejos e riachos; McDiarmid 1994; Bernarde, 2012). Desta forma, foram inspecionados três riachos rochosos em interior de mata (Nali & Prado, 2012; Lima *et al.*, 2014;) entre outubro de 2023 e fevereiro de 2024, aproximadamente das 17h00 até 22h00, horário que concentra maior atividade reprodutiva. Evidências de reprodução e agressividade foram observadas a cada evento de amostragem, pelos métodos de animal-focal, todas as ocorrências e amostras por sequência (Altmann, 1974).

Todos os machos gravados foram capturados e identificados por fotos padronizadas das regiões do corpo com manchas características ou cicatrizes (Del lama *et al.*, 2011), sendo mais evidente na parte dorsal dessas espécies, incluindo a região da cabeça (método de identificação por marcas naturais). As fotos foram montadas em pranchas com o código de identificação e localidade, com duplicata do mesmo indivíduo em ângulos e iluminações diferentes. Posteriormente, as fotos foram comparadas par a par (Figura 1; Oliveira, 2024). Em seguida, os indivíduos foram medidos no comprimento rostro-cloacal com um paquímetro analógico (precisão de 0,05 mm) e pesados com dinamômetro (precisão de 0,1 g). A temperatura do ar foi medida com termômetro digital após cada gravação (ver abaixo). Foram coletados alguns indivíduos das espécies como material-testemunho, sendo estes eutanasiados com pomada lidocaína 5%, fixados em formol 10% e preservados em etanol 70% (McDiarmid 1994). Os espécimes foram depositados na Coleção de Anfíbios da Universidade Federal de Juiz de Fora (CAUFJF; Apêndice I), localizada no Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

O estudo da interferência reprodutiva nas espécies foi feito utilizando experimentos de *playback* e avaliando a resposta de machos a cantos de sua e da outra espécie (ver desenho experimental abaixo). Para tanto, construiu-se uma faixa padronizada do canto de *B. ibitipoca*, e uma faixa do canto de *B. feioi*. Para a construção destas faixas, utilizamos gravações feitas no local de estudo no mês de fevereiro de 2023. As gravações para montagem dos *playbacks* padrão das populações foram realizadas com um microfone unidirecional (Sennheiser ME66) acoplado a um gravador (Marantz Professional - PMD660) a uma distância aproximada de 0,8 m de cada macho focal. As gravações foram feitas em formato WAV, com resolução de 16 bits e taxa de amostragem de 44.100 Hz (Köhler *et al.*, 2017). As análises das vocalizações foram feitas usando o software Raven Pro 1.3 (Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY) com FFT (Fast Fourier Transformation) = 512. A terminologia bioacústica seguiu Köhler e colaboradores (2017), sendo que, no caso de *B. feioi*, os termos nota e canto são intercambiáveis. Consideramos os seguintes parâmetros acústicos: 1) frequência dominante (Hz); 2) largura de banda (90%) (Hz); 3) frequência mínima (Hz) e frequência máxima (Hz); 4) intervalo entre notas (s); e 5) duração de cada nota. A variável frequência mínima foi aferida pela medida *Frequency 5%* do Raven, enquanto a frequência máxima foi aferida pela medida *Frequency 95%* deste programa. A frequência dominante foi aferida pela medida *Peak Frequency*, e a largura de banda foi aferida pela medida *Bandwidth 90%* deste programa. Foram gravados aproximadamente 3 minutos de áudio por indivíduo, utilizando luz vermelha apenas quando necessário, para diminuir a interferência da luminosidade na atividade de vocalização (Nali & Prado, 2014).

Foram analisados cantos de indivíduos vistos vocalizando, gravados, coletados e que tiveram as medidas morfométricas aferidas. Para *B. feioi*, analisamos 400 notas (N = 8 machos), sendo ca. 50 notas por indivíduo ao longo dos 3 minutos, calculando-se a média para cada parâmetro selecionado, correspondendo respectivamente a: 1) 2.314,9 Hz; 2) 1.577,6 Hz; 3) 664,9 e 4.302,4 Hz; 4) 1,3 s; 5) 0,6 s. Para *B. ibitipoca*, foram analisadas 604 notas (N= 11 machos), sendo em média 20 notas para cada um dos três minutos de gravação para cada indivíduo, uma vez que essa espécie canta com intervalo de tempo menor entre uma nota e outra. Como essa espécie tem o canto de anúncio com grupo de pulsos bem definidos, variando de um até cinco, aferiu-se o número de grupos de pulsos que mais se repetia nas gravações. Este fator foi também considerado na seleção do canto para a faixa de *playback* desta espécie, tendo em vista que variações no número de grupos de pulsos podem também ser importantes no contexto social. Assim, as médias das variáveis de canto para *B. ibitipoca*

foram: 1) 1.414,13 Hz; 2) 1.304,70 Hz; 3) 202,53 e 4.090,10 Hz; 4) 0,78 s; 5) 0,23 s; e o número de grupo de pulsos que mais se repetiu foi de único grupo

Para a montagem das faixas de *playbacks*, utilizamos o software Reaper v6 8.1 - DAW (Digital Audio Workstation). Replicamos o canto de nossas gravações que mais se aproximou das médias dos parâmetros analisados, espaçados com intervalo médio obtido. Os ruídos foram minimizados ou retirados quando possível, recortando-se apenas a faixa de frequência da nota de anúncio de cada espécie, de maneira a não comprometer os parâmetros acústicos das gravações. As faixas construídas foram de 3 minutos cada, sendo uma faixa de *B. feioi* e uma de *B. ibitipoca*, da seguinte forma: um minuto de silêncio, um minuto de emissão dos cantos médios e, posteriormente, mais um minuto de silêncio. O início e o final das gravações foram demarcados por um *beep* em frequência grave, fora da faixa de frequência da vocalização das espécies.

2.2.3 Experimentos de *playback* e variáveis medidas

Para os experimentos de *playback*, foram utilizadas as faixas conforme explicações anteriores. Para cada réplica, a fonte sonora foi posicionada a 0,8 m do macho focal. Utilizamos uma caixa de som JBL Go 2 (Resposta de Frequência Dinâmica: 180Hz – 20kHz; Potência de Som: 3 watts) para tocar o arquivo de som em formato WAV. Para padronizar o volume da caixa durante os experimentos, o valor médio de nível de pressão sonora (SPL) foi medido para cantos de 10 machos de cada espécie, utilizando um Decibelímetro digital (MSL-1355B), sendo determinado como 74 dB para *B. feioi*, e 70dB para *B. ibitipoca*. Todos os experimentos foram realizados com os respectivos valores de SPL.

Durante cada réplica, os machos focais foram gravados com os mesmos equipamentos e procedimentos explicitados anteriormente, em um ângulo de 90° com relação ao posicionamento da fonte sonora, para facilitar a medição de variáveis acústicas de resposta. O primeiro minuto da gravação, em silêncio, funcionou como período de controle (“antes”), seguido pelo segundo minuto da gravação, onde reproduzimos a vocalização do macho (“durante”; período de experimento), e, por fim, o terceiro minuto ocorreu em silêncio (“depois”; período pós-*playback*; Giasson e Haddad, 2006; Nali & Prado, 2014). Esse procedimento foi realizado para quatro tratamentos diferentes distribuídos nas duas espécies-

focais: T1) Canto de anúncio de *B. feioi* tocado para indivíduos dessa mesma espécie; T2) Canto de anúncio de *B. ibitipoca* tocado para indivíduos dessa mesma espécie; T3) Canto de anúncio de *B. ibitipoca* tocado para indivíduos de *B. feioi*; e T4) Canto de anúncio de *B. feioi* tocado para indivíduos de *B. ibitipoca*. Assim, os tratamentos 1 e 2 consistem em respostas coespecíficas, enquanto os tratamentos 3 e 4 consistem em respostas heteroespecíficas. Cada indivíduo foi testado apenas uma vez por tratamento, garantindo a independência dos dados. Em casos de repetição do mesmo macho em diferentes tratamentos, estes não foram feitos na mesma noite (e.g. Nali & Prado, 2014).

As respostas dos machos focais foram analisadas em dois grupos: (1) variáveis quantitativas acústicas, e (2) variáveis comportamentais do tipo presença e ausência do comportamento (acústicas e não acústicas), incluindo aqui a emissão da vocalização em sítio escondido ou exposto (ver descrição abaixo).

Com relação às variáveis quantitativas acústicas (grupo 1), aquelas relacionadas diretamente com a medição de parâmetros acústicos tiveram a utilização do software Raven Pro 1.6, para cada um dos três minutos de experimento. Os parâmetros comuns a ambas as espécies foram: Frequência dominante (Hz), Frequência máxima (Hz), Frequência mínima (Hz), Pico de Amplitude (U), Duração da nota (s), Esforço de canto (somatória do tempo vocalizando por minuto, com notas de qualquer tipo). Contamos também o número de notas totais para cada minuto do experimento, o número de pulsos por nota para *B. feioi* e número de grupo de pulsos para *B. ibitipoca*. Também anotamos e quantificamos os diferentes tipos de notas (anúncio ou agressiva) ao analisar os três minutos, o que ocorreu especificamente para *B. feioi*. Quando ocorreu a nota determinada como agressiva (ver Capítulo 2), medimos o tempo de latência, ou seja, o tempo que o indivíduo demorou para emitir a nota agressiva após o início do *playback*.

Com relação às respostas comportamentais acústicas de presença e ausência (parte do grupo 2), observamos os seguintes comportamentos:

- Parou de Vocalizar Durante o Tratamento - Quando o indivíduo alvo parou de cantar após o início do *playback* (2º minuto);
- Parou de Vocalizar Após o Tratamento - Quando o indivíduo alvo parou de vocalizar após o fim do *playback* (3º minuto);
- Presença de Nota Agressiva - Quando o indivíduo emite pelo menos uma nota “C”, uma vocalização descrita apenas para *B. feioi* como agressiva (Capítulo 2).

Como respostas comportamentais não acústicas de presença e ausência (parte do grupo 2), observamos os seguintes comportamentos:

- Virou para a caixa - quando o indivíduo focal girou o corpo se posicionando na direção da fonte sonora que emitia o *playback*;
- Locomoveu-se Para a Caixa - quando o indivíduo alvo se deslocou em direção a fonte sonora;
- Saiu da Toca – Quando indivíduo alvo que estava vocalizando entocado saiu de toca durante ou após a execução do *playback*.

Por fim, para dar suporte às nossas conclusões sobre a competição de nicho acústico, anotamos também a presença do indivíduo vocalizando exposto vs. escondido, para ambas as espécies. Este dado foi anotado ao avistar o indivíduo pela primeira vez, ou seja, independe do tipo de tratamento realizado.

2.2.4 Análises estatísticas – dados acústicos quantitativos

As análises dos experimentos basearam-se nas médias de cada parâmetro do canto de anúncio analisados, com a utilização de modelos. O objetivo é identificar se há uma diferença significativa na vocalização em resposta aos tratamentos coespecíficos e heteroespecíficos, e como essas respostas variam ao longo dos diferentes momentos do experimento (antes, durante e após o *playback*). Diferentes tipos de notas foram comparados somente entre eles, garantindo a comparação de notas de mesma natureza, exceto para a variável esforço do canto em *B. feioi*, em que consideramos o somatório de todas as notas (nota de anúncio + notas “B” + notas agressivas).

Os dados foram inicialmente filtrados para remover valores ausentes (NA) apenas nas variáveis específicas de cada análise, mantendo o máximo de informações possíveis. Outliers foram identificados e removidos utilizando a Regra do Intervalo Interquartil (IQR Rule), (Hubert & Van der Veen, 2008). Valores menores que $Q1 - 1,5 \times IQR$ ou maiores que $Q3 + 1,5 \times IQR$ foram considerados discrepantes e excluídos da análise. No caso da variável nº de pulsos, além dos valores ausentes, também foram excluídos valores iguais a zero para evitar distorções nas médias. Em seguida, realizamos o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, que é um teste estatístico amplamente utilizado para avaliar se uma

amostra de dados segue uma distribuição normal (Da Silva *et al.*, 2022). Este teste foi aplicado a todas as variáveis numéricas do conjunto de dados.

Para avaliar as diferenças nos parâmetros acústicos quantitativos entre tratamentos e momentos, foram utilizados Modelos Lineares Mistos (LMM) e Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM). Estes modelos foram escolhidos devido à capacidade de lidar com a estrutura hierárquica dos dados, onde múltiplas observações são feitas para os mesmos indivíduos ao longo do tempo, ou seja, no nosso caso, comparando o primeiro, segundo e terceiro minutos de cada experimento. A estrutura desses modelos permite considerar tanto os efeitos fixos quanto os efeitos aleatórios, proporcionando uma análise robusta e adequada às características dos dados (Da Silva *et al.*, 2022). Estes modelos também permitem o uso de diferentes distribuições de dados: Poisson para dados de contagem, Gaussian para dados contínuos com distribuição normal e Gamma para dados contínuos com distribuição não-normal (Da Silva *et al.*, 2022).

Os efeitos fixos no modelo representam os fatores de interesse que queremos analisar diretamente, sendo o tratamento (coespecífico ou heteroespecífico) e momento (primeiro, segundo ou terceiro minuto). No caso deste estudo, foram incluídas também as interações entre o tratamento aplicado e o momento em que a medição foi feita. Os indivíduos foram considerados como efeitos aleatórios, capturando a variabilidade inerente a cada um, a qual não pode ser explicada pelos efeitos fixos.

Os LMMs foram aplicados para as variáveis contínuas, sendo: frequência dominante, frequência máxima, frequência mínima, duração das notas, pico de amplitude e esforço de canto. Já os GLMMs foram utilizados para variáveis de contagem. Para *B. feioi*, isso incluiu o número de notas de anúncio, número de notas “B”, conforme descrito por Walker *et al.*, (2015), número de notas agressivas (ver Capítulo 2) e número de pulsos. Para *B. ibitipoca*, isso incluiu o número de notas de anúncio e número de grupo de pulsos. Todas tiveram distribuição de Poisson e função de ligação log.

As análises foram realizadas no software R, utilizando os pacotes *lme4* para ajuste dos modelos e *emmeans* para comparações *post hoc*, que foram realizadas para identificar diferenças significativas entre os diferentes momentos dentro de cada tratamento (Zar 2010; Da Silva *et al.*, 2022).

Os parâmetros padronizados foram obtidos ajustando o modelo em uma versão padronizada do conjunto de dados. Intervalos de Confiança (IC) de 95% e valores-p foram calculados usando uma aproximação da distribuição de Wald-t. O método de graus de liberdade usado foi o Kenward-Roger, e o ajuste do valor-p foi feito pelo método de Tukey

para correção de comparações múltiplas dentro de um grupo de três estimativas relacionadas (antes, durante e depois).

Os resultados de cada modelo foram sumarizados utilizando o pacote *report*. Para a visualização dos dados, foram gerados gráficos de linhas com barras de erro representando a média (quando distribuição normal) ou mediana (quando distribuição não normal) $\pm$ erro padrão (SE) das variáveis que apresentaram alguma diferença significativa.

Para as notas agressivas em *Bokermannohyla feioi*, não foram comparados os três momentos experimentais, pois essas vocalizações ocorreram apenas durante o *playback* (2º minuto). Definimos essa vocalização como agressiva pois esta foi emitida exclusivamente em resposta ao estímulo sonoro, indicando uma reação do macho à presença de um "invasor" em seu sítio de vocalização (ver Capítulo 2). Dessa forma, as análises foram estruturadas para comparar as variáveis entre os diferentes tratamentos.

No caso de presença da “nota agressiva” em *B. feioi*, comparamos o Tempo de Latência (TL) entre os tratamentos T1 (coespecífico) e T3 (interespecífico), para verificar se há um tempo de resposta diferente de um macho exposto a um coespecífico vs. heteroespecífico. Para essa análise, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e o teste de Levene para avaliar a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos. Devido à falta de normalidade e/ou não homogeneidade das variâncias, foi realizado o teste de Mann-Whitney, uma alternativa não paramétrica, para comparar as medianas dos TL entre os tratamentos (Da Silva *et al.*, 2022).

Também para analisar a resposta de machos de *B. feioi* a um coespecífico vs. heteroespecífico, investigamos a diferença em oito parâmetros acústicos da nota agressiva entre os tratamentos coespecífico vs. heteroespecífico. Novamente, a normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Com nestes resultados, as variáveis que seguiram uma distribuição normal foram analisadas utilizando o teste t de Welch, enquanto as variáveis não normais foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney (Da Silva *et al.*, 2022).

2.2.5 Análises estatísticas – dados de presença e ausência dos comportamentos

As anotações de presença e ausência durante os experimentos de *playback* permitiram a análise de dados e comparações para os tratamentos heteroespecíficos vs. coespecíficos, dentro de cada espécie. Nos casos em que não foi possível visualizar o indivíduo, os dados

foram classificados como "não se aplica" e não foram incluídos nas análises. Isso ocorreu especialmente com *B. ibitipoca*, que costuma vocalizar em tocas, o que dificultou a observação direta. Por essa razão, a espécie focal para a maioria destas análises foi *B. feioi*. Estes dados foram inicialmente organizados em uma tabela, onde as colunas representavam os diferentes comportamentos observados, e as linhas correspondiam aos tratamentos aplicados (coespecífico e heteroespecífico). As respostas comportamentais foram codificadas como 'S' para ocorrência do comportamento e 'N' para a ausência.

Os dados foram processados no R, onde primeiramente todas as linhas com valores ausentes (NA) foram excluídas para garantir a integridade das análises. Em seguida, para cada comportamento binário (presença e ausência), foi realizada uma análise por meio do Teste Exato de Fisher, que é útil quando as amostras são pequenas e as suposições do teste qui-quadrado não são atendidas. As tabelas de contingência para cada comportamento foram montadas no formato 2x2, contabilizando as frequências de 'S' e 'N' para cada tratamento (heteroespecífico x coespecífico). A análise foi feita para cada espécie focal.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Amostragem geral

Ao todo, foram realizadas 68 réplicas de *playback* ao longo de cinco meses de coleta, divididos nos quatro tratamentos. Destes, 64 continham respostas acústicas suficientes para as análises quantitativas, e 68 para as análises de comportamentos de presença e ausência. O número total de réplicas do experimento com gravações que entraram na análise foi: T1= 15, T2= 19, T3= 19 e T4= 16. Durante os experimentos, a temperatura do ar variou, no geral, entre 16°C a 24°C; separando-se entre os tratamentos, a temperatura do ar variou entre 16° C a 23°C para T1, 17°C a 21°C para T2, 17° a 21°C para T3, e 17°C a 24°C para o T4.

Consideramos como tratamentos ideais aqueles em que foram feitos os três minutos de gravação, houve interferência externa mínima (som ou luzes) nas gravações ou comportamento de vocalização, e nos quais foi possível identificar os indivíduos, seja por meio de coleta e eutanásia, ou por fotoidentificação de padrões de manchas e cicatrizes (Del lama *et al.*, 2011). Foram coletados e eutanasiados 24 indivíduos ao longo do experimento,

sendo cinco *B. ibitipoca* e 19 *B. feioi*. Considerando os indivíduos identificados por fotografia e soltos, a taxa de recaptura foi baixa, de apenas 8%, com dois indivíduos recapturados de um total de 24 identificados. Apenas um indivíduo identificado foi utilizado duas vezes para o mesmo tratamento, e consideramos a primeira réplica neste caso. Assim, levando em conta a baixa recaptura, utilizamos nas análises também as 16 gravações onde não foi possível a identificação individual, por exemplo, em caso de escape. Durante as observações dos machos focais, observamos duas brigas (combates físicos), sendo uma entre machos de *B. ibitipoca* e *B. feioi* (19/12/2023) e uma entre dois machos de *B. ibitipoca* (23/11/2023).

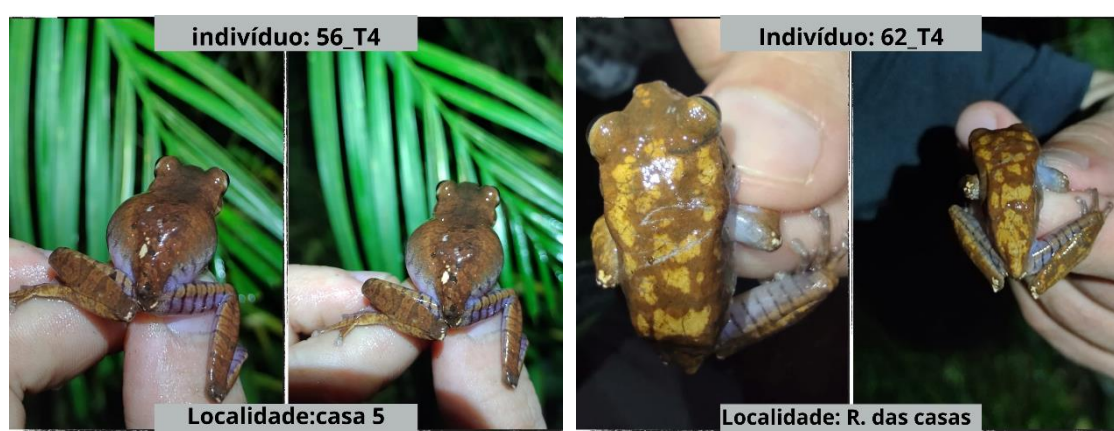


Figura 1 - Exemplo de fotografias para a identificação de dois indivíduos de *Bokermannohyla ibitipoca* utilizando marcas naturais, no Parque Estadual do Ibitipoca, Lima Duarte, MG, Brasil.

2.3.2 Resultados das variáveis quantitativas

2.3.2.1 Resumo das alterações significativas em *Bokermannohyla feioi*

No tratamento coespecífico (T1), a frequência máxima diminuiu em 59 Hz entre o 1º e o 2º minuto (Figura 2A), enquanto a duração da nota apresentou uma redução significativa no 3º minuto em comparação com os demais (Figura 2-E). O número de pulsos diminuiu em 10 no 2º minuto em relação ao 1º minuto (Figura 2-B). O número de notas de anúncio e o número de notas do tipo “B” foram menores no 3º minuto em comparação com os dois anteriores (Figura 2-C;D), enquanto as notas agressivas foram emitidas exclusivamente no 2º minuto. Os resultados estatísticos estão resumidos na Tabela 1.

No tratamento heteroespecífico (T3), a frequência máxima aumentou em 77 Hz entre o 1º e o 2º minuto, mas diminuiu em 82 Hz no 3º minuto em relação ao 1º (Figura 2-A). O número de pulsos diminuiu em 12 unidades no 2º minuto em comparação com o 1º minuto (Figura 2-B), enquanto o número de notas de anúncio e o número de notas do tipo B também foram menores no 3º minuto em comparação com os dois minutos anteriores (Figura 2-C;D). Notas agressivas foram emitidas exclusivamente no 2º minuto. Os resultados estatísticos estão resumidos na Tabela 1

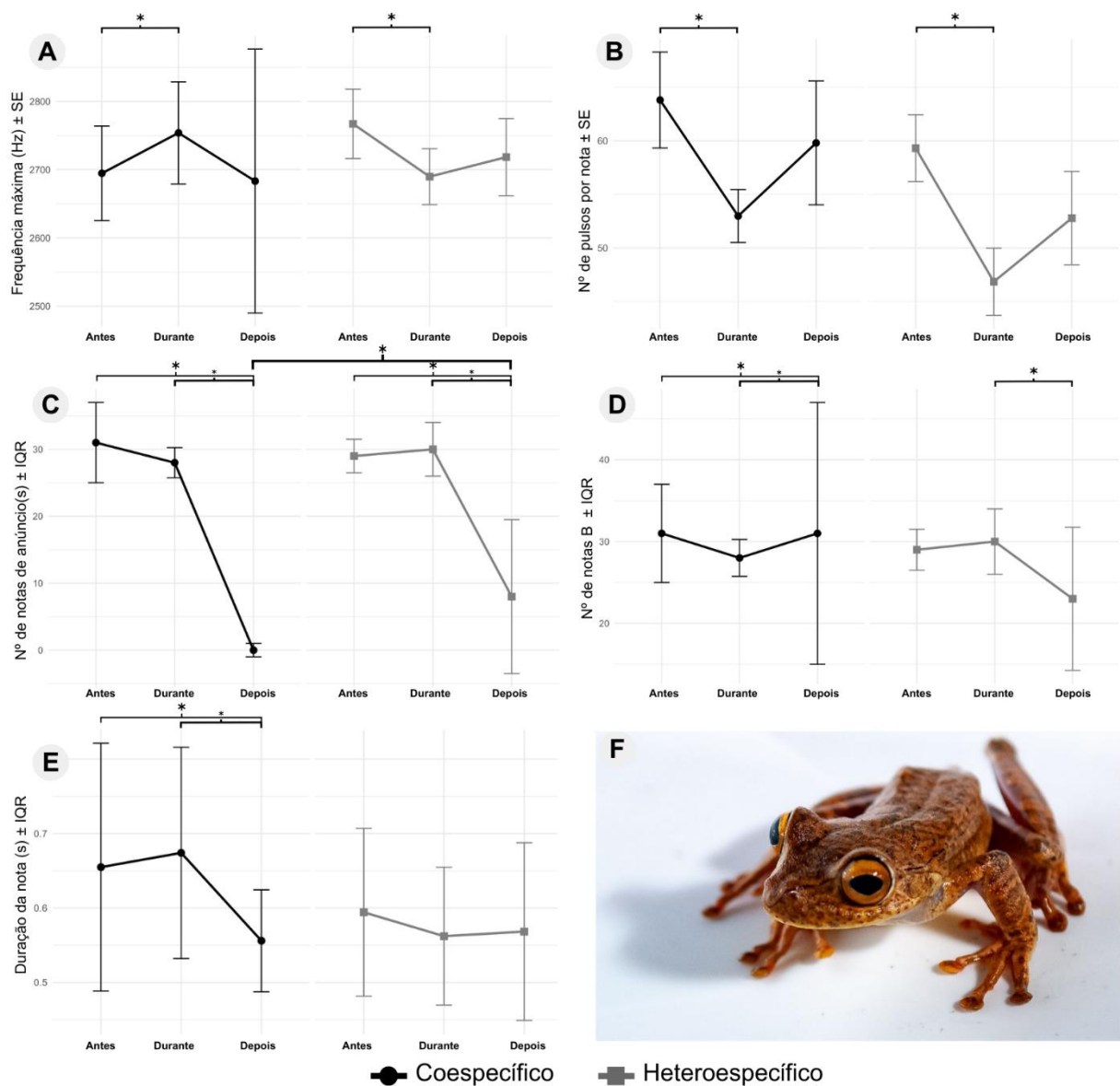


Figura 2 – Gráficos dos resultados estatisticamente significativos para *Bokermannohyla feioi*, Lima Duarte, sudeste do Brasil. Legenda: Os colchetes com asterisco indicam a diferença significativa entre momentos ou entre tratamento heteroespecífico vs. coespecífico. Variáveis: A: Frequência máxima; B: Nº de pulsos; C: Nº de

notas de anúncio por minuto; D: Nº de notas B; E: Duração da nota; F: *Bokermannohyla feioi*

2.3.2.2 Resumo das alterações significativas em *Bokermannohyla ibitipoca*

No tratamento coespecífico (T2), a duração da nota diminuiu no 3º minuto em comparação com os dois anteriores (Figura 3-C). O pico de amplitude também apresentou redução no 3º minuto em relação aos dois primeiros (Figura 3-B). O número de notas de anúncio foi menor no 2º minuto em relação ao 1º e diminuiu ainda mais no 3º minuto em comparação com todos os momentos (Figura 3-D). Por fim, o esforço do canto foi reduzido no 3º minuto em relação aos demais (Figura 3-E)

No tratamento heteroespecífico (T4), a frequência máxima aumentou no 3º minuto em relação ao 2º minuto (Figura 3A). O pico de amplitude apresentou redução significativa no 3º minuto em relação aos dois anteriores (Figura 3B). O número de notas foi menor no 3º minuto em comparação com todos os momentos (Figura 3-D), e o esforço do canto também diminuiu no 3º minuto em relação aos demais (Figura 3-E). Os resultados estatísticos estão resumidos na Tabela 2

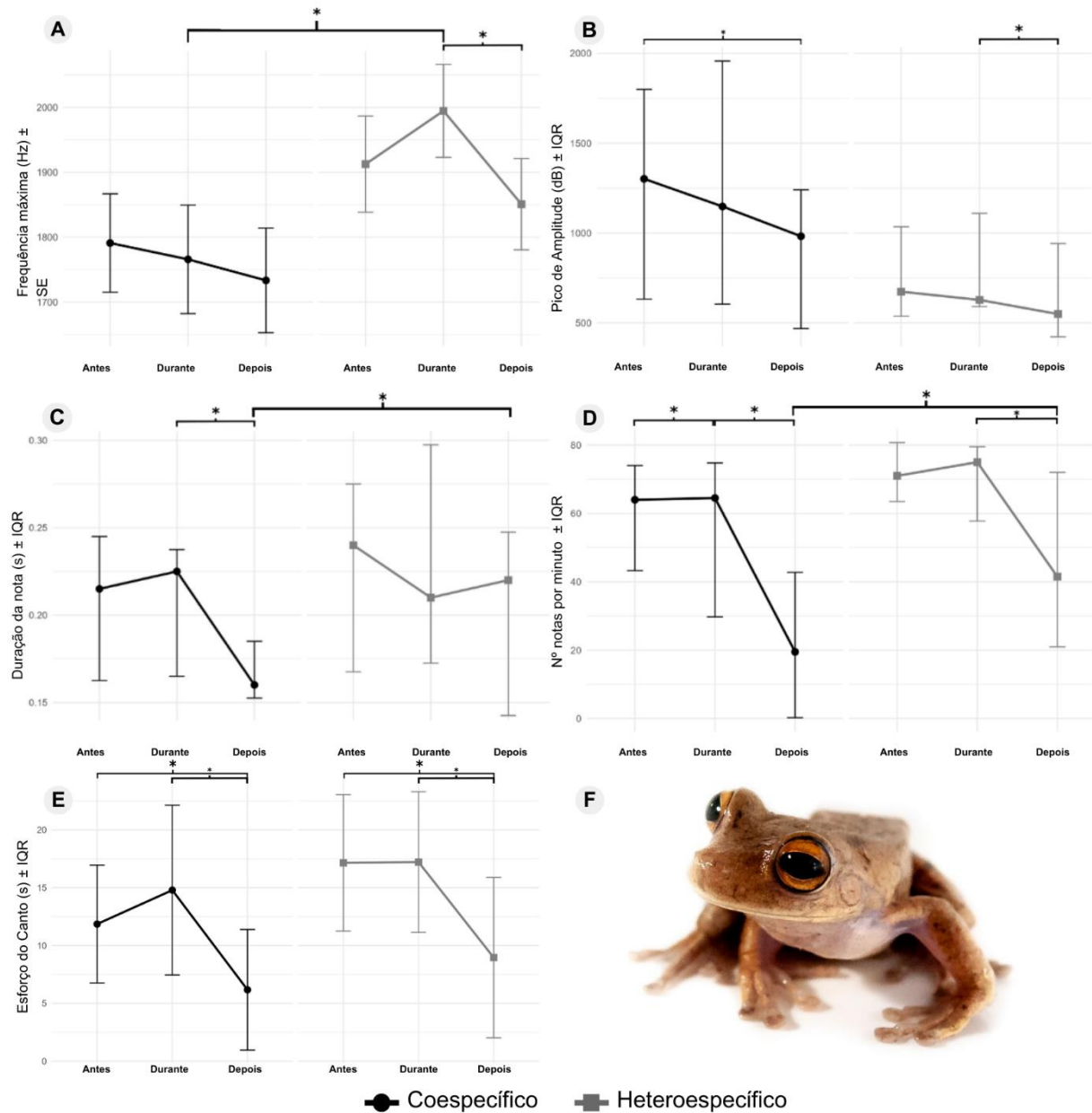


Figura 3 - – Gráficos dos resultados estatisticamente significativos para *Bokermannohyla ibitipoca*. Legenda: Os colchetes com asterisco indicam a diferença significativa entre momentos ou entre tratamento heteroespecífico versus coespecífico. Variáveis: A: Frequência máxima; B: Nº de notas de anúncio por minuto; C: Duração do conto; D: Pico de Amplitude; E: Esforço do canto; F: *Bokermannohyla ibitipoca*

Tabela 1 - Resultados acústicos das análises pos-hoc para os tratamentos coespecífico e heteroespecíficos realizados com *Bokermannohyla feioi*, em comparação com os 3 minutos de tratamento

Tratamento	Frequência dominante						Frequência máxima						Frequência mínima						Duração da nota					
	Min 1 x Min 2		Min 1 x Min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3	
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
T1	0,253	-0,021	0,997	-0,001	0,598	0,020	0,055	59,250	0,928	-14,010	0,142	-73,270	0,310	-0,039	0,2186	-0,068	0,758	-0,029	0,996	-0,004	0,040	-0,166	0,034	-0,170
T3	0,998	-0,001	0,6506	0,013	0,621	0,014	0,003	-77,42	0,014	-82,060	0,984	-4,64	0,746	-0,018	0,101	-0,062	0,309	-0,044	0,274	0,068	0,472	-0,062	0,994	0,005
Tratamento	Pico de Amplitude						Esforço do canto						Nº de pulsos						Nº de notas de anúncio					
	Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3	
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
T1	0,267	0,293	0,154	0,507	0,699	0,213	0,999	-0,009	0,257	0,514	0,241	0,523	0,025	-10,480	0,501	6,290	0,732	-4,190	0,762	2,410	0,001	-17,910	0,001	-20,320
T3	0,370	-0,204	0,850	-0,101	0,845	0,103	0,682	0,159	0,227	0,392	0,568	0,233	0,004	-12,400	0,143	8,760	0,705	-3,640	0,935	1,060	0,001	-14,820	0,001	-15,880

Legenda: T1: tratamento coespecífico; T2: tratamento heteroespecífico P: p-value; B: estimate. **Vermelho**: Estatisticamente significativo

Tabela 2 - Resultados acústicos das análises pos-hoc para os tratamentos coespecífico e heteroespecíficos realizados com *Bokermannohyla ibitipoca* em comparação com os 3 minutos de tratamento

Tratamento	Frequência dominante						Frequência máxima						Frequência mínima						Duração da nota					
	Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3	
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
T2	0,994	0,000	0,502	-0,060	0,560	-0,050	0,863	25,200	0,183	99,100	0,381	73,900	0,975	0,005	0,647	0,026	0,525	0,031	0,941	0,020	0,001	-0,320	-0,290	0,001
T4	0,394	-0,060	0,970	-0,010	0,276	-0,070	0,220	-82,100	0,420	61,600	0,013	143,800	0,496	-0,029	1,000	0,000	0,496	-0,029	0,020	0,959	0,529	-0,080	0,702	-0,060
Tratamento	Pico de Amplitude						Número de grupo de pulsos						Número de notas de anúncio						Esforço do canto					
	Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3		Min 1 x Min 2		Min 1 x min 3		Min 2 x min 3	
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
T2	0,695	0,090	0,009	-0,290	0,055	0,213	0,953	0,090	0,701	-0,280	0,851	-0,190	0,017	0,137	0,000	-0,814	0,000	-0,677	0,443	0,275	0,001	-0,930	0,025	-0,654
T4	0,990	-0,010	0,067	-0,250	0,048	-0,260	0,989	0,040	1,000	0,000	0,989	0,040	0,514	0,051	0,000	-0,422	0,000	0,370	0,689	0,179	0,005	-0,719	0,039	-0,539

Legenda: T1: tratamento coespecífico; T2: tratamento heteroespecífico; P: p-value; E: estimate. **Vermelho**: Estatisticamente significativo

2.3.2.3 Resultados detalhados para *Bokermannohyla feioi* (T1 e T3)

2.3.2.3.1 Frequência dominante

A análise da frequência dominante nos tratamentos coespecífico e heteroespecífico não revelou diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre os momentos avaliados. No tratamento coespecífico, as comparações entre o 1º e o 2º minuto (estimativa de $\beta = -0,0214$; SE = 0,0135; $p = 0,2525$), o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,0014$; SE = 0,0207; $p = 0,9973$) e o 2º e o 3º minuto ($\beta = 0,0200$; SE = 0,0207; $p = 0,5982$) não mostraram diferenças significativas. No tratamento heteroespecífico, as comparações entre o 1º e o 2º minuto (estimativa de $\beta = -0,0007$; SE = 0,0123; $p = 0,9983$), o 1º e o 3º minuto ($\beta = 0,0134$; SE = 0,0152; $p = 0,6506$) e o 2º e o 3º minuto ($\beta = 0,0141$; SE = 0,0151; $p = 0,6212$) não diferiram significativamente.

Entre os tipos de interação (coespecífica vs heteroespecífica) comparando o mesmo momento, também não foram identificadas diferenças significativas em nenhum momento, com β variando entre 0,0313 e 0,0521 e p-valores superiores a 0,4.

O modelo ajustado demonstrou um R^2 condicional elevado (0,75), indicando que a variabilidade dos dados foi majoritariamente explicada pelos efeitos aleatórios, enquanto o R^2 marginal dos efeitos fixos foi de 0,04. Assim, o tipo de interação não influenciou significativamente a frequência dominante.

2.3.2.3.2 Frequência máxima

As comparações entre os momentos no tratamento coespecífico indicaram uma diferença marginalmente não significativa entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -59,25$; SE = 24,8; $t = -2,387$; $p = 0,0550$). As demais comparações não apresentaram diferença significativa, tanto entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -14,01$; SE = 37,9; $t = -0,369$; $p = 0,9276$), quanto entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -73,27$; SE = 37,9; $t = -1,932$; $p = 0,1422$). No tratamento heteroespecífico, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na frequência máxima entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -77,42$; SE = 22,5; $t = -3,438$; $p = 0,0037$), assim como entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -$

82,06; SE = 27,8; $t = -2,956$; $p = 0,0138$). A comparação entre o 2º e o 3º minuto, entretanto, não apresentou diferença significativa ($\beta = -4,64$; SE = 27,8; $t = -0,167$; $p = 0,9847$).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos coespecífico e heteroespecífico nos momentos avaliados. As estimativas foram 64,15 (SE = 83,9; $t = 0,765$; $p = 0,4500$) para o 2º minuto, -72,53 (SE = 83,9; $t = -0,865$; $p = 0,3936$) para o 1º minuto, e -4,48 (SE = 90,1; $t = -0,050$; $p = 0,9606$).

O modelo ajustado apresentou um bom desempenho geral, com R^2 condicional = 0,75, enquanto os efeitos fixos contribuíram menos (R^2 marginal = 0,04). Esses resultados indicam que as frequências máximas das vocalizações podem ser ajustadas em resposta à presença de uma espécie diferente, sugerindo que *B. feioi* responde de maneira distinta dependendo da interação interespecífica vs. coespecífica, sendo uma alteração estatisticamente significativa no tratamento heteroespecífico (T3).

2.3.2.3.3 Frequência mínima

No tratamento coespecífico, as comparações entre os momentos avaliados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, conforme os seguintes resultados: entre o 1º e o 2º minuto, a estimativa foi de -0,0392 (SE = 0,0268; $z = -1,461$; $p = 0,3101$); entre o 1º e o 3º minuto, a estimativa foi de -0,0682 (SE = 0,0410; $z = -1,666$; $p = 0,2186$) e entre o 2º e o 3º minuto, a estimativa foi de -0,0290, SE = 0,0410; $z = -0,709$; $p = 0,7581$). De forma semelhante, o tratamento heteroespecífico também não apresentou diferenças significativas. Entre o 1º e o 2º minuto, $\beta = -0,0178$ (SE = 0,0243; $z = -0,730$; $p = 0,7455$). Comparando o 1º e o 3º minuto, $\beta = -0,0617$ (SE = 0,0301; $z = -2,050$; $p = 0,1005$). Para o 2º e o 3º minuto, o valor foi de -0,0439 (SE = 0,0300; $z = -1,463$; $p = 0,3090$).

A comparação entre os tratamentos coespecífico e heteroespecífico também não revelou diferenças significativas em nenhum dos momentos avaliados. Para 1º minuto $\beta = 0,0469$ (SE = 0,0745; $z = 0,629$; $p = 0,5293$), para o 2º minuto, $\beta = 0,0683$ (SE = 0,0745; $z = 0,917$; $p = 0,3594$), e para o 3º minuto, $\beta = 0,0535$ (SE = 0,0830; $z = 0,644$; $p = 0,5197$).

O modelo apresentou um bom ajuste geral, com um R^2 condicional de 0,61. Contudo, os efeitos fixos explicaram apenas uma pequena proporção da variação observada (R^2 marginal = 0,06). Esses dados sugerem que as variações na frequência mínima não parecem ser influenciadas pelos tratamentos coespecífico ou heteroespecífico, nem pelos diferentes

momentos avaliados. A maior parte da variação é explicada por fatores individuais dos indivíduos.

2.3.2.3.4 Duração da nota

No tratamento coespecífico, não houve diferença significativa na duração da nota entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -0,00429$; SE = 0,0478; $t = -0,090$; $p = 0,9956$). Entretanto, foi observada uma diminuição significativa na duração da nota entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,16608$; SE = 0,0661; $t = -2,513$; $p = 0,0401$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,17037$; SE = 0,0661; $t = -2,577$; $p = 0,0343$).

No tratamento heteroespecífico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os momentos. Entre o 1º e o 2º minuto, $\beta = 0,06765$ (SE = 0,0434; $t = 1,559$; $p = 0,2742$), entre o 1º e o 3º minuto, $\beta = -0,06217$ (SE = 0,0528; $t = -1,178$; $p = 0,4718$), enquanto para o 3º e o 2º minuto, $\beta = 0,00547$ (SE = 0,0528; $t = 0,104$; $p = 0,9941$).

Ou seja, independentemente do tratamento, não há diferenças significativas na duração da nota entre o 1º e o 2º minuto. Isso reforça que o efeito observado no 3º minuto reflete uma redução acentuada na duração da nota após a finalização do *playback*.

2.3.2.3.5 Pico de amplitude

No tratamento coespecífico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os minutos. Entre o 1º e o 2º minuto, $\beta = 0,293$ (SE = 0,189; $z = 1,551$; $p = 0,2671$); entre o 1º e o 3º minuto, $\beta = 0,507$ (SE = 0,274; $z = 1,848$; $p = 0,1540$); e entre o 2º e o 3º minuto, $\beta = 0,213$ (SE = 0,265; $z = 0,807$; $p = 0,6990$). No tratamento heteroespecífico, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os minutos. Entre o 1º e o 2º minuto, $\beta = -0,204$ (SE = 0,152; $z = -1,346$; $p = 0,3698$); entre o 1º e o 3º minuto, $\beta = -0,101$ (SE = 0,187; $z = -0,543$; $p = 0,8499$); e entre o 2º e o 3º minuto, $\beta = 0,103$ (SE = 0,186; $z = 0,553$; $p = 0,8450$).

O modelo apresentou um R^2 condicional de 0,73, indicando um bom poder explicativo geral; entretanto, o R^2 marginal de 0,21 sugere que os efeitos fixos explicam apenas uma parcela menor da variação no pico de amplitude.

2.3.2.3.6 Número de pulsos

As comparações post hoc do modelo de Poisson ajustado revelaram, no tratamento coespecífico, uma diminuição do número de pulsos do 1º para o 2º minuto ($\beta = 10,48$; $p = 0,0253$). As demais comparações não apresentaram significância, tanto entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 6,29$; $p = 0,5013$), quanto entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -4,19$; $p = 0,7317$). No tratamento heteroespecífico, também houve uma diminuição significativa entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 12,40$; $p = 0,0041$). As comparações entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 8,76$; $p = 0,1431$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -3,64$; $p = 0,7045$) não apresentaram diferenças significativas.

Não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos coespecífico e heteroespecífico em nenhum dos momentos analisados: 1º minuto ($p = 0,8668$), 2º minuto ($p = 0,7314$), e 3º minuto ($p = 0,7524$).

2.3.2.3.7 Número de notas de anúncio

Houve diferenças significativas no número de notas entre os momentos avaliados no tratamento coespecífico. A comparação entre o 1º e o 2º minuto não foi significativa ($\beta = 2,41$; $p = 0,7623$), enquanto o número de notas no 3º minuto foi significativamente menor em comparação ao 1º minuto ($\beta = -20,32$; $p < 0,0001$) e ao 2º minuto ($\beta = -17,91$; $p < 0,0001$). No tratamento heteroespecífico, de forma semelhante, também foram encontradas diferenças significativas no número de notas entre os momentos. A comparação entre o 1º e o 2º minuto não revelou diferença significativa ($1,06$; $p = 0,9352$), enquanto o número de notas no 3º minuto foi significativamente menor em comparação ao 1º minuto ($-15,88$; $p < 0,0001$) e ao 2º minuto ($-14,82$; $p < 0,0001$).

Entre os tratamentos, não foram observadas diferenças significativas no número de notas no 1º minuto ($\beta = -0,0066$, $SE = 0,148$, $z = -0,044$, $p = 0,9646$) e no 2º minuto ($\beta = -0,0521$, $SE = 0,148$, $z = -0,351$, $p = 0,7255$). Entretanto, no 3º minuto, o tratamento coespecífico representou uma redução mais acentuada no número de notas em comparação ao heteroespecífico ($\beta = -0,4308$, $SE = 0,177$, $z = -2,431$, $p = 0,0150$).

2.3.2.3.8 Número de notas B

No tratamento coespecífico, foram observadas diferenças significativas no número de notas B emitidas entre o 1º e 3º minuto para o tratamento coespecífico ($\beta = -2,728$, SE = 1,031; $p = 0,0222$), e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -2,520$, SE = 1,038; $p = 0,0402$). No entanto, entre o 1º e o 2º minuto, não foi observada diferença significativa ($\beta = 0,208$, SE = 0,373; $p = 0,8433$). No tratamento heteroespecífico, não houve diferença entre o 1º e o 2º ($\beta = -0,375$, SE = 0,392; $p = 0,6044$), nem entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -1,705$, SE = 0,769; $p = 0,0682$). Houve diferença entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -2,079$, SE = 0,750; $p = 0,0154$).

O modelo apresentou um poder explicativo com um R^2 condicional de 0,61, indicando que ele explicou 61% da variação total nos dados. O R^2 marginal foi de 0,47, o que significa que os efeitos fixos explicaram 47% da variação observada.

2.3.2.3.9 Parâmetros acústicos das notas agressivas

As notas agressivas apareceram sempre após o início do estímulo de *playback*, permitindo a comparação entre os tratamentos coespecíficos vs. heteroespecífico neste momento. As notas agressivas foram mais longas no tratamento coespecífico comparado ao heteroespecífico ($p = 0,0106$; Figura 4A). Entre as variáveis com distribuição não normal, pico de amplitude mostrou diferença significativa ($p = 0,03918$), sendo maior no tratamento coespecífico (Figura 4-B). As demais variáveis (Frequência dominante, Frequência máxima, Frequência mínima, N° de pulsos, Esforço do canto e N° de notas de anúncio) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

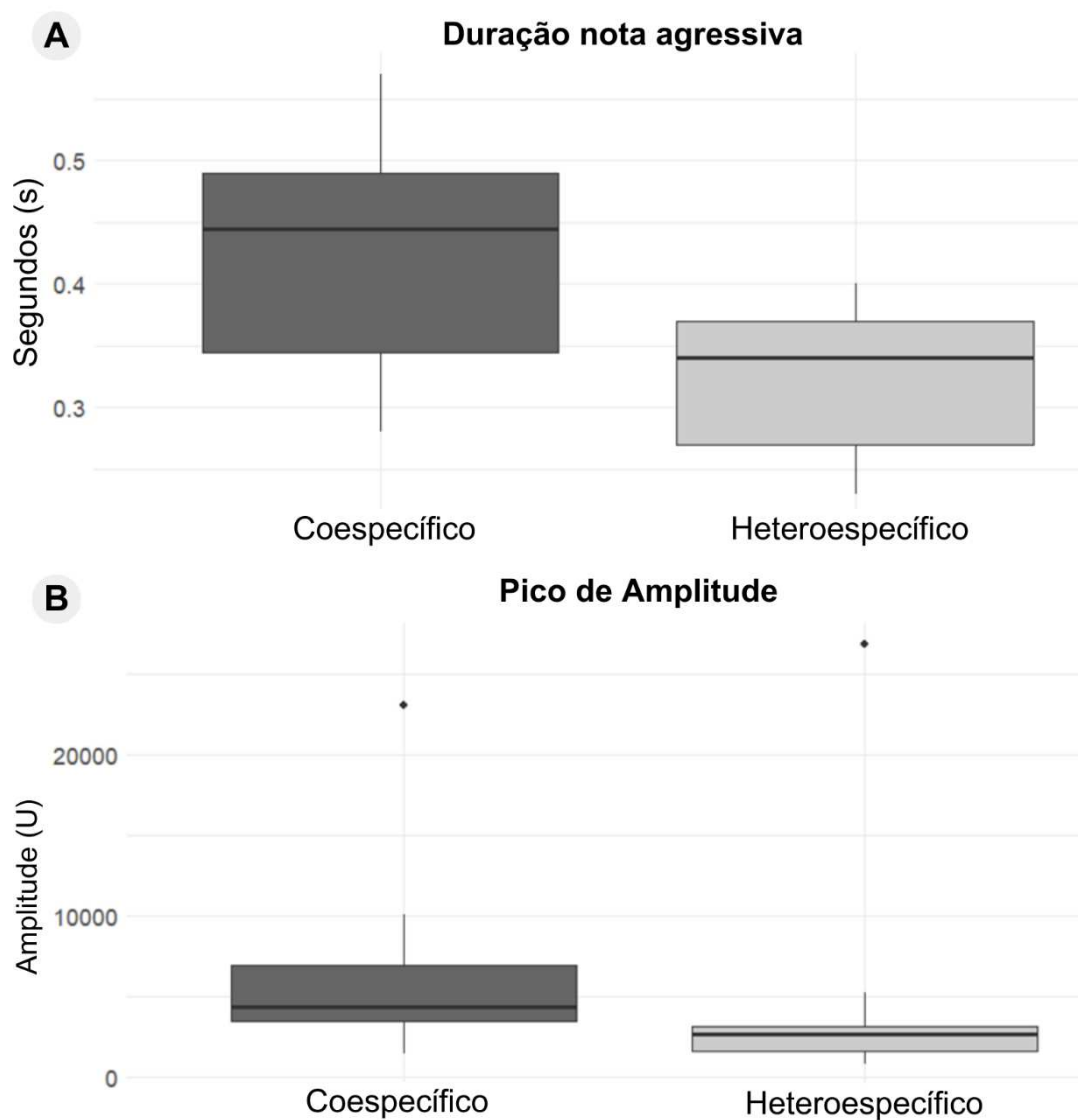


Figura 4 - - Média de variáveis com resultados estatisticamente significativos para Nota agressiva por tratamento para *Bokermannohyla feioi*.

2.3.2.3.10 Tempo de latência na emissão da nota agressiva

Em resposta ao tratamento heteroespecífico, os machos apresentaram um tempo de latência maior em comparação com aqueles no tratamento coespecífico (Mann-Whitney $W = 17$, $p = 0,0017$; Figura 5).

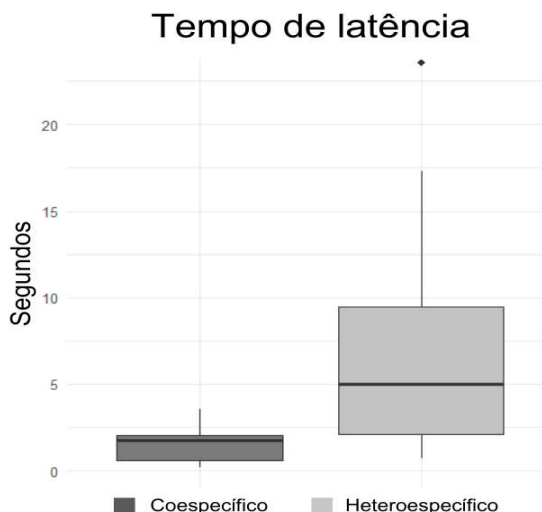


Figura 5 - Boxplot do tempo de latência inicial por tratamento - T1 e T3

2.3.2.3.11 Esforço de canto

No tratamento coespecífico, não foram observadas diferenças significativas entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -0,00918$, $SE = 0,209$, $z = -0,044$, $p = 0,9989$), entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 0,51376$, $SE = 0,326$, $z.ratio = 1,574$, $p = 0,2568$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = 0,52294$, $SE = 0,325$, $z.ratio = 1,610$, $p = 0,2413$). De forma semelhante, no tratamento heteroespecífico, não foram observadas diferenças significativas no tratamento heteroespecífico entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,15908$, $SE = 0,191$, $z.ratio = 0,834$, $p = 0,6817$), entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 0,39217$, $SE = 0,239$, $z.ratio = 1,644$, $p = 0,2272$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = 0,23309$, $SE = 0,230$, $z.ratio = 1,014$, $p = 0,5681$).

O poder explicativo modelo foi significativo, com um R^2 condicional de 0,31, sugerindo que o modelo explica 31% da variação nos dados, enquanto a parte explicada apenas pelos efeitos fixos foi de 0,13 (R^2 marginal). O modelo sugere que nem o tratamento (coespecífico vs. heteroespecífico) nem o momento (1º, 2º ou 3º minuto) tiveram efeitos significativos sobre o esforço de canto. Além disso, as interações entre tratamento e momento não foram significativas.

2.3.2.4 Resultados detalhados para *Bokermannohyla ibitipoca* (T2 e T4)

2.3.2.4.1 Frequência dominante

As comparações entre os momentos para a frequência dominante não revelaram diferenças significativas no tratamento coespecífico. A comparação entre o 1º e o 2º minuto não foi significativa ($\beta = 0,00$; $p = 0,9936$), assim como entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,06$; $p = 0,5024$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,05$; $p = 0,5595$). No tratamento heteroespecífico, também não foram observadas diferenças significativas na frequência dominante. A comparação entre o 1º e o 2º minuto não foi significativa ($\beta = -0,06$; $p = 0,3938$), assim como entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,01$; $p = 0,9702$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,07$; $p = 0,2755$).

O modelo ajustado demonstrou elevado poder explicativo total (R^2 condicional = 0,72), porém os efeitos fixos contribuíram de forma limitada (R^2 marginal = 0,03).

2.3.2.4.2 Frequência máxima

Não foram observadas diferenças significativas no tratamento coespecífico entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 25.2$, $p = 0,8632$), entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 99.1$, $p = 0,1825$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = 73.9$, $p = 0,3814$). No tratamento heteroespecífico, as comparações entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -82.1$, $p = 0,2199$) e entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 61.6$, $p = 0,4202$) não foram significativas. No entanto, a diferença entre o 2º e o 3º minuto foi estatisticamente significativa ($\beta = 143.8$, $p = 0,0131$), indicando uma variação relevante nesse intervalo.

As comparações de cada momento entre os tratamentos indicaram uma diferença significativa entre tratamento coespecífico e heteroespecífico no 2º minuto ($\beta = -229$, $SE = 106$, $t = -2.158$, $p = 0,0381$), isto é, uma maior frequência máxima no tratamento heteroespecífico neste minuto. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos no 1º minuto ($\beta = -122$, $SE = 106$, $t = -1.146$, $p = 0,2597$) nem no 3º minuto ($\beta = -159$, $SE = 109$, $t = -1.455$, $p = 0,1539$). A variação explicada pelo modelo ajustado indicou que a maior parte está associada aos efeitos aleatórios dos indivíduos (R^2 condicional = 0,81), enquanto os efeitos fixos explicaram apenas uma pequena fração da variação total (R^2 marginal = 0,11).

2.3.2.4.3 Frequência mínima

No tratamento coespecífico, não foram observadas diferenças significativas entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,0054$, $p = 0,9751$), entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = 0,0258$, $p = 0,6466$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = 0,0313$, $p = 0,5254$). De forma semelhante, no tratamento heteroespecífico, não houve diferenças entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = -0,0287$, $p = 0,4961$), entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,0000188$, $p = 1,0000$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,0287$, $p = 0,4955$).

O modelo ajustado demonstrou que a maior parte da variação está associada aos efeitos aleatórios (R^2 condicional = 0,74), enquanto a variação explicada pelos efeitos fixos foi mínima (R^2 marginal = 0,00596).

2.3.2.4.4 Duração da nota

No tratamento coespecífico, houve diferença entre o 3º e o 1º minuto ($\beta = -0,32$, $p = 0,0005$) e entre o 3º e o 2º minuto ($\beta = -0,29$, $p = 0,0013$). No entanto, a comparação entre o 1º e o 2º minuto não apresentou significância estatística ($\beta = 0,02$, $p = 0,9405$). Para o tratamento heteroespecífico, nenhuma das comparações foi significativa, incluindo o 3º e o 1º minuto ($\beta = -0,08$, $p = 0,5290$), o 3º e o 2º minuto ($\beta = -0,06$, $p = 0,7024$) e o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,02$, $p = 0,9592$).

O modelo ajustado indicou um poder explicativo total moderado a substancial (R^2 condicional = 0,55) e uma contribuição dos efeitos fixos moderada (R^2 marginal = 0,14).

2.3.2.4.5 Pico de amplitude

No tratamento coespecífico, foram observadas reduções significativas no pico de amplitude entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,39$, $p = 0,0088$) e uma redução marginalmente não significativa entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,29$, $p = 0,0549$). No entanto, a diferença entre o 1º e o 2º minuto não foi significativa ($\beta = 0,09$, $p = 0,6946$). Para o tratamento heteroespecífico, houve uma redução não significativa entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,25$, $p = 0,0673$) e uma redução significativa entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,26$, $p = 0,0479$). Não houve diferença entre o 1º e o 2º ($\beta = -0,01$, $p = 0,9900$).

O modelo ajustado apresentou um poder explicativo total substancial (R^2 condicional = 0,73), com uma contribuição moderada dos efeitos fixos (R^2 marginal = 0,20).

2.3.2.4.6 Número de grupo de pulsos

Não foram observadas diferenças significativas no número de grupos de pulsos entre os momentos analisados. No tratamento coespecífico, a comparação entre o 3º e o 1º minuto apresentou $\beta = -0,28$ ($p = 0,7010$), entre o 3º e o 2º minuto apresentou $\beta = -0,19$ ($p = 0,8505$) e entre o 1º e o 2º minuto apresentou $\beta = 0,09$ ($p = 0,9532$). Para o tratamento heteroespecífico, os resultados também não indicaram diferenças significativas: entre o 3º e o 1º minuto, obtivemos um valor de $\beta = 0,00$ ($p \approx 1,0000$), entre o 3º e o 2º minuto, um valor de $\beta = 0,04$ ($p = 0,9888$) e entre o 1º e o 2º minuto, um valor de $\beta = 0,04$ ($p = 0,9888$).

O modelo ajustado apresentou um poder explicativo fraco ($R^2 = 0,05$), indicando que os tratamentos, os momentos e as interações entre ambos não explicam os números de grupos de pulsos.

2.3.2.4.7 Número de notas de anúncio

No tratamento coespecífico, após análises post hoc realizadas sobre os dados do modelo de Poisson ajustado para o número de notas de anúncio, não foram observadas diferenças significativas entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,1365$, $p = 0,0169$). Em contrapartida, foi observada uma redução significativa no número de notas entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,8138$, $p < 0,0001$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,6773$, $p < 0,0001$). No tratamento heteroespecífico, não houve diferença entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,0514$, $p = 0,5142$). No entanto, houve uma redução significativa no número de notas entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,4216$, $p < 0,0001$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,3702$, $p < 0,0001$).

O modelo ajustado exibiu um poder explicativo total substancial (R^2 condicional = 0,96), embora a porção atribuída apenas aos efeitos fixos tenha sido moderada (R^2 marginal = 0,23). Isso indica que os efeitos fixos explicam parte significativa da variabilidade nos dados, mas a maior porção da variação é capturada pelos efeitos aleatórios.

2.3.2.4.8 Esforço de canto

No tratamento coespecífico, não foram observadas diferenças significativas no esforço de canto entre o 1º e o 2º minuto ($\beta = 0,275$, $p = 0,4430$). Em contrapartida, foi observada uma redução significativa entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,930$, $p = 0,0013$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,654$, $p = 0,0252$). No tratamento heteroespecífico, não houve diferença entre o 1º e o 2º minuto não foi significativa ($\beta = 0,179$, $p = 0,6892$). No entanto, houve uma redução significativa entre o 1º e o 3º minuto ($\beta = -0,719$, $p = 0,0048$) e entre o 2º e o 3º minuto ($\beta = -0,539$, $p = 0,0393$).

O modelo de Poisson ajustado demonstrou um poder explicativo total substancial, com R^2 condicional de 0,63, enquanto o R^2 marginal, atribuído exclusivamente aos efeitos fixos, foi de 0,17. Isso sugere que uma parte considerável da variabilidade nos dados é capturada pelos efeitos aleatórios, embora os efeitos fixos ainda contribuam de maneira significativa.

2.3.3 Variáveis comportamentais de presença e ausência

As proporções de presença e ausência variaram entre os diferentes tratamentos, como resumido na **Tabela 3**. Os resultados estatísticos detalhados são demonstrados para cada variável nos itens 2.3.3.2 e 2.3.3.3.

Tabela 3 - Porcentagens de ocorrência (presença) dos comportamentos observados nos tratamentos coespecíficos (C) e heteroespecíficos (H), para *Bokermannohyla ibitipoca* e *B. feioi*, no sudeste do Brasil. As porcentagens representam a frequência de presença dos comportamentos, sendo a ausência inferida pela diferença para 100%.

Espécie	Tratamento	Virou para a caixa	Locomoveu -se para a caixa	Parou de vocalizar durante o estímulo	Parou de vocalizar após o estímulo	Presença da nota agressiva	Saiu da toca
<i>B. feioi</i>	T1 (C)	91%	46%	7%	92%	79%	NA
	T3 (H)	85%	31%	11%	63%	67%	NA
<i>B. ibitipoca</i>	T2 (C)	NA	NA	21%	35%	NA	47%
	T4 (H)	NA	NA	7%	47%	NA	0%

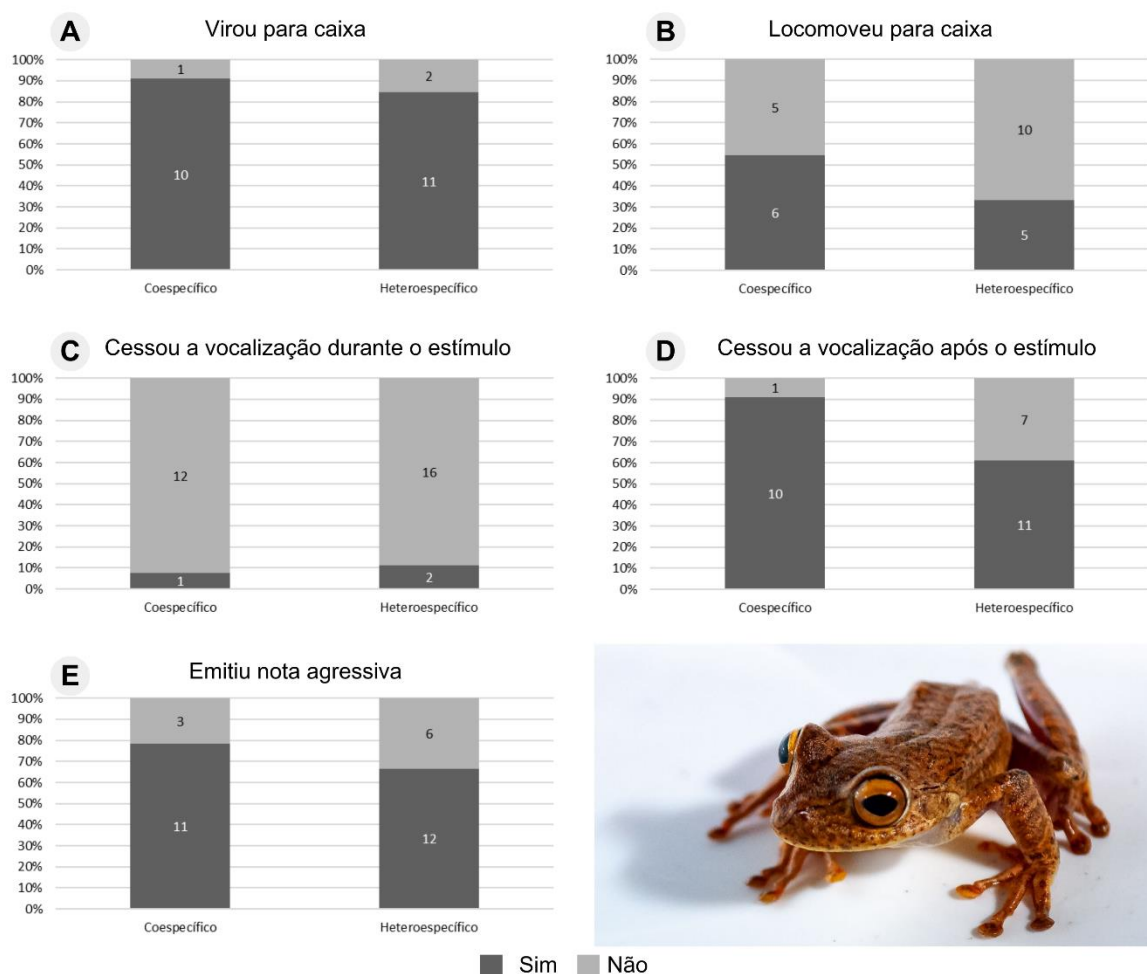


Figura 6 – Gráficos demonstrando as proporções de comportamentos de presença (sim) e ausência (não) para *Bokermannohyla feioi* no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. A: Virou para a caixa; B: locomoveu para a caixa; C: Parou de vocalizar durante o estímulo; D: Parou de vocalizar após o estímulo; E: Emitiu “notas C” (nota agressiva).

2.3.3.1. Análise de vocalização exposta

Com relação ao ambiente utilizado pelas espécies para vocalização, observamos uma diferença entre as proporções de indivíduos que vocalizaram expostos ou escondidos (Figura 7). O teste Exato de Fisher mostrou diferenças estatisticamente significativas para o uso do sítio de vocalização entre as espécies (*odds ratio* = 0,12, IC 95% [0,03, 0,39], $p < 0,001$). *Bokermannohyla feioi* vocalizou mais empoleirada em galhos e pedras (i.e., exposta), enquanto *B. ibitipoca* usou principalmente tocas entre as raízes próximas à água como sítio de vocalização (i.e., escondida).

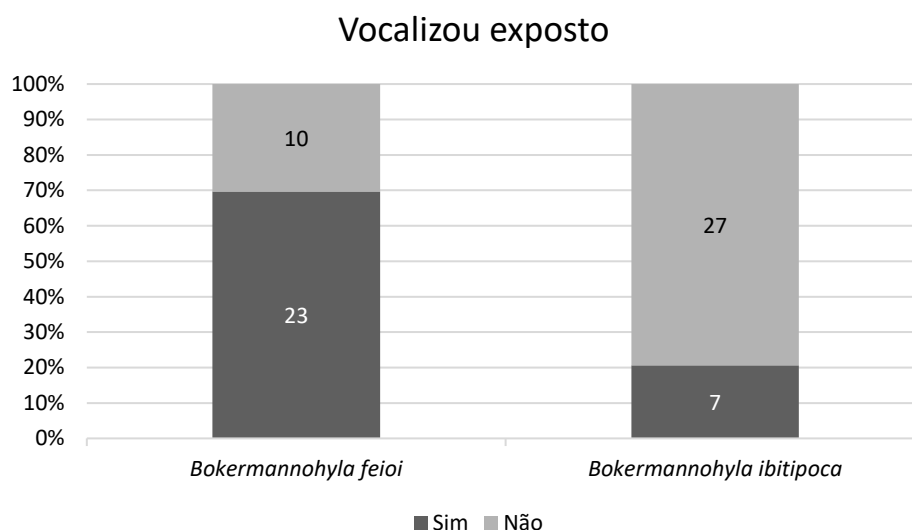


Figura 7 - Gráfico indivíduos vocalizando exposto para todos os tratamentos

2.3.3.2. Resultados de presença e ausência em *Bokermannohyla feioi* (T1 e T3)

2.3.3.2.1 Virou para caixa

Observou-se que 91% dos indivíduos no tratamento coespecífico viraram-se para a caixa, em comparação com 85% no tratamento heteroespecífico (Figura 6-A), uma diferença não significativa (Teste exato de Fisher: $p = 0,49$; *Odds Ratio* = Infinito; Intervalo de Confiança de 95 % = 0,08 a Infinito), indicando que a probabilidade de um indivíduo virar para a fonte sonora não é influenciada pelo tratamento aplicado.

2.3.3.2.2 Locomover para a caixa

Observou-se que 46% dos indivíduos no tratamento coespecífico se locomoveram para a caixa, em comparação com 31% no tratamento heteroespecífico (Figura 6-B), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,4657$; *Odds Ratio* = 1,84; Intervalo de Confiança de 95% = 0,32 a 11,19). Assim, a probabilidade de um indivíduo se locomover para a caixa não foi influenciada pelo tipo de tratamento.

2.3.3.2.3 Cessar vocalização durante o estímulo

Observou-se que 7% dos indivíduos no tratamento coespecífico pararam de vocalizar durante o estímulo, em comparação com 11% no tratamento heteroespecífico (Figura 6-C), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 1$; Odds Ratio = 0,62; Intervalo de Confiança de 95% = 0,01 a 13,01. Ou seja, a probabilidade de um indivíduo parar de vocalizar durante o estímulo foi influenciada pelo tipo de tratamento.

2.3.3.2.4 Cessar vocalização após o estímulo

Observou-se que 92% dos indivíduos no tratamento coespecífico pararam de vocalizar após o estímulo, em comparação com 63% no tratamento heteroespecífico (Figura 6-D), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,1006$; Odds Ratio = 6,63; Intervalo de Confiança de 95% = 0,68 a 340,56). Assim, a probabilidade de um indivíduo parar de vocalizar após o tratamento não foi influenciada pelo tipo de tratamento.

Observou-se que 79% dos indivíduos no tratamento coespecífico emitiram nota agressiva durante o playback, em comparação com 67% no tratamento heteroespecífico (Figura 6-E), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,6942$; Odds Ratio = 1,80; Intervalo de Confiança de 95% = 0,29 a 13,89). Assim, a probabilidade de um indivíduo emitir nota agressiva não foi influenciada pelo tipo de tratamento.

3.3.3.3. Resultados comportamentais de presença e ausência em *Bokermannohyla ibitipoca* (T2 e T4)

Dado que os indivíduos dessa espécie comumente vocalizam entre as raízes e em tocas (conforme explicitado no item 3.3.3.1), conseguimos contabilizar apenas as variáveis Parou de Vocalizar Durante o estímulo; Parou de Vocalizar Após o estímulo e Saiu da Toca (Tabela 3). *Bokermannohyla ibitipoca* não emitiu nenhuma vocalização diferente ao longo do experimento, sendo assim, não consideramos nenhuma nota com função agressiva como no

caso de *B. feioi*. Os resultados estatísticos detalhados encontram-se nos itens 3.3.3.3.1 a 3.3.3.3.3.

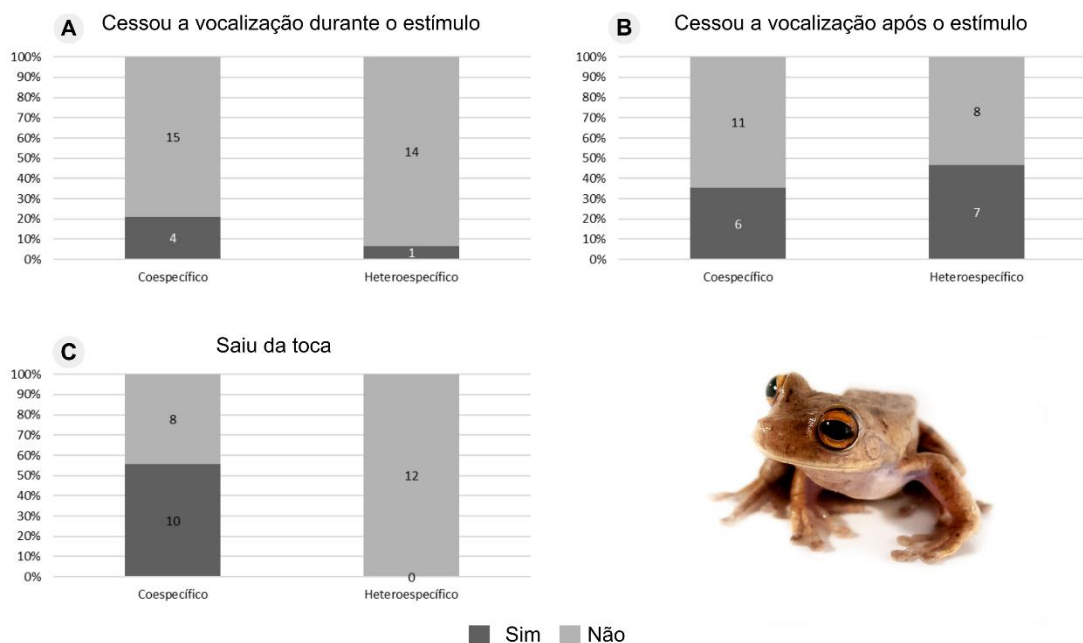


Figura 8 - Gráficos demonstrando as proporções de comportamentos de presença (sim) e ausência (não) para *Bokermannohyla ibitipoca*. no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil – A: Parou de vocalizar durante o estímulo; B: Parou de vocalizar após o estímulo; C: Saiu da toca.

3.3.3.3.1. Cessar vocalização durante o tratamento

Os resultados indicam que 21% dos indivíduos no tratamento coespecífico pararam de cantar durante a execução do playback, em comparação com 7% no tratamento heteroespecífico (Figura 8-A), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,3547$; Odds Ratio = 3,61; Intervalo de Confiança de 95% = 0,31 a 196,52). Assim, não há evidências suficientes para afirmar que existe uma associação significativa entre o tratamento e essa variável resposta.

3.3.3.3.2. Cessar vocalização após o tratamento

Os resultados indicam que 35% dos indivíduos no tratamento coespecífico pararam de cantar após a execução do playback, em comparação com 47% no tratamento heteroespecífico (Figura 8-B), uma diferença não significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,7198$; Odds Ratio = 0,63; Intervalo de Confiança de 95% = 0,12 a 3,21). Assim, não há evidências suficientes para afirmar que existe uma associação significativa entre o tratamento e essa variável resposta.

3.3.3.3.3. Saiu da toca

Observou-se que 47% dos indivíduos no tratamento coespecífico saíram da toca após o playback, enquanto que, no tratamento heteroespecífico, nenhum saiu (Figura 8-C), uma diferença significativa (Teste Exato de Fisher: $p = 0,0081$; Odds Ratio = Infinito; Intervalo de Confiança de 95% = 1,55 a Infinito). Portanto, há evidências suficientes para afirmar que existe uma associação significativa entre o tratamento e a resposta, em que machos de *B. ibitipoca* saíram mais da toca em resposta a coespecíficos.

2.4 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que machos de *B. feioi* e *B. ibitipoca* exibiram respostas variadas à simulação de um macho intruso (*playback*), tanto para estímulos coespecíficos quanto heteroespecíficos. Além disso, as respostas ocorreram de diferentes formas, sejam elas comportamentais acústicas ou de movimentações, comprovando a ocorrência de interferência reprodutiva (Gröning e Hochkirch, 2008). No entanto, as respostas diferiram entre as espécies. Nossos resultados indicam que machos de *B. feioi* ajustam suas vocalizações durante o *playback*, tanto em interações coespecíficas quanto heteroespecíficas, sugerindo que essa espécie interage ativamente à presença de *B. ibitipoca* no ambiente. Entretanto, machos de *B. ibitipoca* tendem a responder principalmente a estímulos da própria espécie, demonstrando menor interação com a presença de *B. feioi* durante o *playback*. Esses padrões refletem a assimetria na percepção e resposta entre as duas espécies, o que pode ser compreendido dentro do contexto de interferência reprodutiva (Andreani *et al.*, 2023).

De acordo com Gröning e Hochkirch (2008), a interferência reprodutiva é mais comum entre espécies que entram em contato secundário, e sua intensidade pode variar dependendo da sobreposição de nichos e sinais. A interferência é menos prevalente em pares de espécies que já coexistem naturalmente, como é o caso de *B. feioi* e *B. ibitipoca* no PEIb, devido à habituação, que é uma redução na intensidade da resposta comportamental a estímulos repetidos, quando não relacionada à fadiga sensorial ou motora (Rankin *et al.* 2009). Entretanto, ainda assim pode se manifestar em contextos competitivos, como o uso de sinais acústicos (Kyogoku, 2020). Isso pode criar uma “armadilha evolutiva”, onde as espécies invadidas ficam presas em um ciclo de baixa eficiência reprodutiva, principalmente devido a interações com espécies invasoras (D’Amore *et al.* 2009). Embora D’Amore e colaboradores (2009) enfoquem em espécies invasoras e nativas, os princípios de redução de sucesso reprodutivo devido à sobreposição de sinais e interações diretas também podem ser aplicados em casos de simpatria natural, como o que ocorre aqui, mesmo com as vocalizações de anúncio diferindo entre as espécies. A presença de sinais que são confundidos ou mascarados por outras espécies pode reduzir drasticamente a capacidade de acasalamento de machos ou até levar fêmeas a acasalar com espécies erradas, causando híbridos inférteis ou a perda de oportunidades de acasalamento (D’Amore *et al.* 2009). Apesar de não termos observado nenhum amplexo (coespecífico ou heteroespecífico) durante nossa amostragem, não descartamos essa possibilidade e nem mesmo a potencial ocorrência de híbridos, como já

registrado para esse gênero (Nali *et al.* 2023). Nossos resultados indicam a relevância de investigações moleculares para verificar a possível ocorrência de híbridos neste sistema, ainda que as espécies não sejam irmãs (Faivovich *et al.* 2025).

A única variável acústica espectral de machos de *B. feioi* que apresentou alterações estatisticamente significativas durante o estímulo foi a frequência máxima, aumentando em resposta a cantos coespecíficos, e diminuindo em resposta à cantos heteroespecíficos. Esse resultado sugere uma tentativa de evitar a sobreposição acústica, na qual os animais ajustam suas vocalizações para minimizar interferências e garantir que seus sinais sejam percebidos (Brumm & Slabbekoorn, 2005). Esse caso é conhecido, por exemplo, em uma rã-de-corredeira, que permanece em seu território, mas aumenta suas frequências de vocalização para evitar o mascaramento do som da corredeira (Turin & Nali, 2024). A modulação em diferentes direções pode indicar uma estratégia específica de machos de *B. feioi* para escapar de conflitos acústicos tanto com coespecíficos quanto com *B. ibitipoca*, evitando a perda de oportunidades de acasalamento. Assim, este ajuste de frequência poderia aumentar a eficiência reprodutiva em um ambiente competitivo e acusticamente dinâmico, apesar de *B. feioi* modular outras variáveis comportamentais em sua resposta.

Por outro lado, a menor responsividade de machos de *B. ibitipoca* aos estímulos de *B. feioi* sugere que *B. ibitipoca* prioriza interações coespecíficas e aparentemente não considera *B. feioi* uma ameaça competitiva relevante. Essa assimetria pode refletir uma diferenciação no investimento energético das duas espécies, onde machos de *B. feioi* precisam gerenciar mais ativamente a competição, enquanto machos de *B. ibitipoca* mantém foco em sua própria reprodução (Gerhardt, 1991). Esse padrão pode ser explicado pela escolha do sítio de vocalização diferente entre as espécies, um mecanismo que pode ter auxiliado no reconhecimento específico e isolamento reprodutivo nessas espécies (Vieira *et al.*, 2016). Além disso, *B. ibitipoca* já apresenta uma vocalização com frequências naturalmente divergentes em comparação à *B. feioi* no Parque Estadual do Ibitipoca (Napoli & Caramaschi, 2004; Napoli *et al.*, 2004; V. P. Delpenho, com. pessoal), o que indica que modulações adicionais nesta variável não seriam vantajosas. Apesar da menor responsividade de *B. ibitipoca* em relação a *B. feioi*, as espécies podem competir fisicamente através de confrontos físicos, como observado no presente estudo, o que sugere que as espécies possuem gasto energético para manter dominância em seu nicho, o que precisa ser melhor investigado.

Considerando algumas variáveis acústicas temporais e quantitativas, os machos de ambas as espécies reduziram a duração da nota e o número de notas no tratamento coespecífico no 3º minuto, e diminuiram o esforço de canto em ambos os tratamentos no 3º

minuto, i.e., quando houve o cessamento do estímulo. É possível que a diminuição da atividade vocal esteja relacionada com o fato de o possível competidor parar de vocalizar repentinamente, uma vez que vocalizar em coro é mais eficiente (Ryan *et al.*, 1981). Por outro lado, essa mudança pode ser interpretada como uma estratégia de economia energética, onde *B. feioi* e *B. ibitipoca* reduzem suas exposições vocais após a interação para evitar desgaste desnecessário ou conflitos prolongados, uma vez que o competidor cessou sua atividade vocal. Se verdadeiro, a maior queda no número de notas no tratamento coespecífico em comparação ao tratamento heteroespecífico reforça que a presença de rivais da mesma espécie representa um maior custo competitivo. Esse resultado foi observado em *B. feioi*, mas não houve diferença em *B. ibitipoca*, possivelmente pela menor exposição física destes machos quanto ao sítio de vocalização (ver abaixo).

O pico de amplitude também diminuiu significativamente no 3º minuto para o tratamento coespecífico em machos de *B. ibitipoca*, refletindo alterações mais pronunciadas em interações coespecíficas. Essas alterações indicam que as vocalizações de *B. ibitipoca* são adaptáveis ao contexto da interação, sugerindo modulações comportamentais possivelmente ligadas à dinâmica de territorialidade ou economia de energia na emissão vocal em contextos de maior competição (Wells, 20007; Nali & Prado, 2014). A amplitude das vocalizações em anuros está frequentemente ligada à condição física dos machos e ao contexto competitivo, sendo que indivíduos em melhor condição corporal tendem a emitir cantos de maior amplitude, possivelmente aumentando seu sucesso reprodutivo (Davies *et al.*, 1978). Além disso, em cenários de alta competição, os machos podem modular a amplitude vocal para se destacar entre os concorrentes, embora isso envolva um custo energético significativo (Gerhardt & Huber, 2002; Wells, 20007).

Observamos uma diminuição significativa no número de pulsos da nota de anúncio emitida por *B. feioi* durante os *playbacks*. Essa redução pode indicar uma transição para um comportamento mais agressivo, caracterizado pela emissão de vocalizações potencialmente mais energéticas (Lingnau *et al.*, 2004). Como a nota agressiva de *B. feioi* naturalmente possui menos pulsos (presente estudo, Capítulo 2), a diminuição de pulsos na nota de anúncio durante o estímulo pode representar uma modificação do canto que o torna mais semelhante à nota agressiva, sugerindo um aumento na agressividade vocal. Alternativamente, esse padrão de diminuição de pulsos pode estar relacionado a estratégias de economia de energia durante a estação reprodutiva, quando os recursos podem ser limitados (Gerhardt & Huber, 2002). Ou seja, a vocalização de anúncio com um menor número de pulsos seria um meio-termo entre a vocalização plena de anúncio e a vocalização agressiva, que naturalmente apresenta menos

pulsos (Capítulo 2). Essa resposta vocal pode preceder a ocorrência de interações agonísticas diretas, as quais foram registradas para *B. feioi*, em uma briga com um macho de *B. ibitipoca*. Esses eventos indicam que os machos estão sujeitos a um ambiente de competição dinâmico, sugerindo que a modulação dos sinais acústicos pode desempenhar um papel na mediação dessas interações competitivas antes de evoluir para combates físicos (Magalhães *et al.* 2018; Aguiar *et al.*, 2022). A manutenção de um equilíbrio entre vocalizações de anúncio e agressivas é fundamental para evitar um gasto energético excessivo em apenas um tipo de comportamento, como já observado para outros anuros (Andreani *et al.*, 2023). Assim, a resposta de machos de *B. feioi* ao adotar vocalizações com a duração do canto menor no último minuto e com menor número de pulsos no segundo minuto, pode representar uma estratégia otimizada para minimizar custos energéticos para repelir competidores e adquirir parceiras, em um possível escalonamento (McCauley *et al.*, Toledo *et al.*, 2015; 2000; Aguiar *et al.*, 2020).

Além disso, o fato de machos de *B. feioi* reduzirem o número de pulsos tanto na resposta para coespecíficos quanto heteroespecíficos indica uma estratégia conservadora de resposta, reagindo de forma semelhante a sinais acústicos de ambas as espécies e competições que estejam habituadas no ambiente acústico (Rankin *et al.*, 2009). Essa postura defensiva generalizada reflete a priorização da permanência prolongada na agregação reprodutiva, combinando a possível defesa territorial com a atração de fêmeas. Estratégias intraespecíficas similares foram observadas em outros anuros, cujos ajustes acústicos, como alterações na duração e frequência dominante dos cantos, sugerem que a modulação do comportamento vocal pode ser crucial para o sucesso reprodutivo (Tarano & Fuenmayor, 2014; Andreani *et al.*, 2023), ainda que estejam em um ambiente acústico ruidoso (Turin & Nali, 2024). Assim, as vocalizações agressivas de *B. feioi* podem representar uma estratégia essencial para equilibrar a possível defesa do território com a economia de energia, garantindo seu sucesso competitivo em contextos de elevada pressão acústica, como em casos de interferência reprodutiva (Chaloupka *et al.*, 2022). Essas respostas demonstram uma maior agressividade em *B. feioi*, refletindo a pressão por garantir espaço acústico e evitar a perda de oportunidades reprodutivas. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar a fidelidade de sítio e/ou a defesa ativa de território em *B. feioi*.

Em contraste, o fato de machos de *B. ibitipoca* manterem seu comportamento vocal praticamente inalterado diante dos estímulos heteroespecíficos sugere uma menor necessidade de ajuste defensivo por meio de vocalizações. No entanto, essa ausência de resposta parece ser compensada por comportamentos físicos, como sair de sua toca para avaliar a situação, o

que indica que a proteção do local de reprodução pode ser mais prioritária do que a competição acústica para essa espécie. Essa estratégia parece viável, considerando que *B. ibitipoca* vocaliza e desova em tocas (Cruz *et al.*, 2009) e nosso resultado de que a vocalização escondida ocorre de maneira significativamente mais frequente em comparação com *B. feioi*. Também observamos, em duas ocasiões, os machos permanecendo na toca junto com a desova (E. B. Oliveira, obs. pessoal). Embora nossas observações sejam limitadas, esse comportamento pode indicar uma maior necessidade de defesa do sítio reprodutivo, até mesmo com a possibilidade de presença de cuidado parental ou o macho utilizando o mesmo local mais de uma vez (Lima *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2021).

Os resultados encontrados neste estudo reforçam que modificações no comportamento vocal podem ser mecanismos cruciais para minimizar a interferência acústica e facilitar o isolamento reprodutivo em anuros simpátricos (Vieira *et al.*, 2016; Andreani *et al.*, 2023). Tais ajustes estão alinhados à hipótese de que machos vocalizando em agregados são capazes de modificar parâmetros acústicos para evitar interações agressivas, reduzir custos de combates físicos e aumentar as chances de atrair fêmeas (Sullivan & Wagner, 1988; Brenowitz, 1989; Nali & Prado, 2014). Esses comportamentos evidenciam a importância da comunicação acústica na partição de nicho e na coexistência de espécies simpátricas de anuros, funcionando como um mecanismo de isolamento reprodutivo (Gerhardt, 1991). Além disso, os resultados deste estudo indicam uma resposta assimétrica entre as espécies. Enquanto *B. feioi* ajusta sua emissão vocal tanto em interações coespecíficas quanto heteroespecíficas, *B. ibitipoca* parece manter as alterações vocais para interações coespecíficas, apresentando um comportamento de sair de sua toca para avaliar contextos heteroespecíficos. Essa diferença sugere estratégias distintas de comunicação e isolamento reprodutivo, destacando como a plasticidade vocal, aliada a escolhas como sítio de vocalização, podem influenciar a coexistência em ambientes simpátricos. Essas diferenças comportamentais podem ter implicações ecológicas importantes, influenciando a dinâmica de competição acústica, a estruturação das comunidades e até mesmo o potencial de hibridação e especiação em contextos de simpatria.

2.5 CONCLUSÃO

Concluimos que há interferência reprodutiva entre machos de *Bokermannohyla feioi* e *B. ibitipoca*, porém em diferentes escalas. *Bokermannohyla feioi* interagiu mais ativamente com *B. ibitipoca*, ajustando sua vocalização tanto em interações coespecíficas quanto heteroespecíficas. Por outro lado, machos de *B. ibitipoca* não reagiram da mesma forma à presença do competidor heteroespecífico, exibindo uma maior tolerância ou indiferença às vocalizações de machos de *B. feioi*. Machos de *B. ibitipoca* ajustaram sua vocalização apenas em contextos coespecíficos e, ao interagirem com o estímulo de *B. feioi*, não saíram da toca para avaliar o cenário, diferentemente de quando interagiram com o estímulo da própria espécie. Esses resultados sugerem que, enquanto machos de *B. feioi* respondem ativamente a estímulos acústicos de diferentes origens, machos de *B. ibitipoca* podem estar menos sujeitos à competição vocal com espécies simpátricas, talvez pelo fato de vocalizarem, preferencialmente, escondidos em tocas.

Nossos resultados geraram interessantes possibilidades de investigação futura. Uma delas é investigar a possibilidade de hibridização entre essas espécies em áreas de sympatria, por meio de estudos moleculares, trazendo novos *insights* sobre os limites do isolamento reprodutivo. O monitoramento de longo prazo dessas interações pode revelar a estabilidade dos padrões comportamentais observados e potenciais variações sazonais. Além disso, testar como a composição das espécies no ambiente influencia a comunicação e a competição acústica ajudaria a compreender melhor os fatores que modulam essas interações. Por fim, experimentos com *playbacks* mais elaborados, variando notas e suas características, podem esclarecer se diferentes estímulos induzem respostas escalonadas, contribuindo para um entendimento mais profundo da complexidade do comportamento vocal e entendendo melhor sobre a diversidade vocal dessas espécies.

2.6 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Pedro Lopes *et al.* Male aggressiveness in the tree frog *Dendropsophus branneri* (Anura, Hylidae): Physical combat, fighting call, and escalated behavior. **Caldasia**, v. 44, n. 1, p. 203-207, 2022.
- ALTMANN, Jeanne. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3-4, p. 227-266, 1974.
- ALVES, Juliana *et al.* Novel breeding habitat, oviposition microhabitat, and parental care in *Bokermannohyla caramaschii* (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 20, n. 2, p. 219-223, 2021.
- ANDREANI, Tainã Lucas *et al.* Acoustic plasticity in *Boana goiana* (Lutz, 1968)(Anura, Hylidae): how males respond to successive interactions with conspecific competitors. **Bioacoustics**, v. 32, n. 4, p. 422-433, 2023.
- BANG, Davi Lee *et al.* Vocal Repertoire of Two *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae) Species, with an Overview of Advertisement Call Diversity in the Genus. **Journal of Herpetology**, v. 57, n. 2, p. 211-219, 2023.
- BOKERMANN, WERNER CA; SAZIMA, I. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 1—Espécies novas de *Hyla* (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 33, n. 3, p. 329-336, 1973.
- BRENEWITZ, Eliot A. Neighbor call amplitude influences aggressive behavior and intermale spacing in choruses of the Pacific treefrog (*Hyla regilla*). **Ethology**, v. 83, n. 1, p. 69-79, 1989.
- BRUNES, Tuliana O. *et al.* Traditional taxonomy underestimates the number of species of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae) diverging in the mountains of southeastern Brazil since the Miocene. **Systematics and Biodiversity**, v. 21, n. 1, p. 2156001, 2023.
- CHALOUPKA, Sarah *et al.* Repeatable territorial aggression in a Neotropical poison frog. **Frontiers in ecology and evolution**, v. 10, p. 881387, 2022.
- CRUZ, C. A. G., Feio, R. N., Caramaschi, U., & Murta, R. (2009). Anfíbios do Ibitipoca. **Bicho do Mato Editora**.

- D'AMORE, A. N. T. O. N. I. A., Kirby, E., & Hemingway, V. (2009). Reproductive interference by an invasive species: an evolutionary trap. **Herpetological Conservation and Biology**, 4(3), 325-330.
- DA SILVA, FR, Gonçalves-Souza T, Paterno GB, Provete DB, Vancine MH. Análises ecológicas no R. Nupeea : Recife, PE, Canal 6 : São Paulo. 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0, 2022
- DAVIES, Nick B.; HALLIDAY, Tim R. Deep croaks and fighting assessment in toads *Bufo bufo*. **Nature**, v. 274, n. 5672, p. 683-685, 1978.
- DE MAGALHÃES, Rafael Félix *et al.* Sexual dimorphism in *Bokermannohyla martinsi* (Bokermann, 1964)(Anura, Hylidae) with a report of male–male combat. **South American Journal of Herpetology**, v. 13, n. 2, p. 202-209, 2018.
- DEL LAMA, Fernanda *et al.* The use of photography to identify individual tree frogs by their natural marks. **South American Journal of Herpetology**, v. 6, n. 3, p. 198-204, 2011.
- FAIVOVICH, Julián *et al.* Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of natural History**, v. 2005, n. 294, p. 1-240, 2005.
- GERHARDT, H. Carl. Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. **Animal Behaviour**, v. 42, n. 4, p. 615-635, 1991.
- GERHARDT, H. Carl; HUBER, Franz. **Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions**. University of Chicago Press, 2002.
- GERHARDT, H. Carl; HUBER, Franz. Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. **University of Chicago Press**, 2002.
- HUBERT, Mia; VAN DER VEEKEN, Stephan. Outlier detection for skewed data. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 22, n. 3-4, p. 235-246, 2008.
- KOEHLER, Joern *et al.* The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, n. 1, p. 1–124-1–124, 2017.
- KYOGOKU, Daisuke. When does reproductive interference occur? Predictions and data. **Population Ecology**, v. 62, n. 2, p. 196-206, 2020.
- LIMA, Nathália Gonçalves da Silva; GONTIJO, Ana Sofia Buza; ETEROVICK, Paula Cabral. Breeding behaviour of *Bokermannohyla nanuzae* (Anura: Hylidae) at an Atlantic Forest site in southeastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 48, n. 23-24, p. 1439-1452, 2014.

- LINGNAU, R.; GUIMARÃES, L. D.; BASTOS, R. P. Vocalizações de *Hyla wernerii* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. **Phyllomedusa**, 3, 115–120, 2004.
- MÁRQUEZ, Rafael; PARGANA, João M.; CRESPO, Eduardo G. Acoustic competition in male *Pelodytes ibericus* (Anura: Pelodytidae): interactive playback tests. **Copeia**, v. 2001, n. 4, p. 1142-1150, 2001.
- MARTINS, Marcio; POMBAL, José P.; HADDAD, Célio FB. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*. **Amphibia-Reptilia**, v. 19, n. 1, p. 65-73, 1998.
- MCCAULEY, Shannon J. *et al.* Energetic dynamics and anuran breeding phenology: insights from a dynamic game. **Behavioral Ecology**, v. 11, n. 4, p. 429-436, 2000.
- MITCHELL, Christina *et al.* Reproductive interference and Satyrism: mechanisms, outcomes and potential use for insect control. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 3, p. 1023-1036, 2022.
- NALI, Renato C.; PRADO, Cynthia PA. Complex call with different messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a gladiator frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 48, n. 3, p. 407-414, 2014.
- NALI, Renato C.; PRADO, Cynthia PA. Habitat use, reproductive traits and social interactions in a stream-dweller treefrog endemic to the Brazilian Cerrado. **Amphibia-Reptilia**, v. 33, n. 3-4, p. 337-347, 2012.
- NALI, Renato C.; ZAMUDIO, Kelly R.; PRADO, Cynthia PA. Hybridization despite elaborate courtship behavior and female choice in Neotropical tree frogs. **Integrative Zoology**, v. 18, n. 2, p. 208-224, 2023.
- NAPOLI, Marcelo Felgueiras; CARAMASCHI, Ulisses. Two new species of the *Hyla circumdata* group from Serra do Mar and Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil, with description of the advertisement call of *Hyla ibitipoca* (Anura, Hylidae). **Copeia**, v. 2004, n. 3, p. 534-545, 2004.
- OLIVEIRA, Eduardo Borges de. Foto identificação. 2024. Disponível em: https://www.canva.com/design/DAF8Had8QeU/r0U8OWvKOIcL92QLdfCsEw/edit?utm_content=DAF8Had8QeU&utm_campaign=designshare&utm_medium=link2&utm_source=sharebutton. Acesso em: 12 dez. 2024.
- PEREIRA, Elvis Almeida *et al.* Release call of *Bokermannohyla ibitipoca* Caramaschi amp; Feio, 1990 (Anura, Hylidae). **Zootaxa**, v. 4656, n. 1, p. zootaxa. 4656.1. 13-zootaxa. 4656.1. 13, 2019.

- PEZZUTI, Tiago Leite *et al.* The tadpoles of the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil: a baseline for larval knowledge and anuran conservation in a diverse and threatened region. **South American Journal of Herpetology**, v. 22, n. sp1, p. 1-107, 2021.
- R CORE TEAM (2023). R: A language and environment for statistical computing. Da Silva FR, Gonçalves-Souza T, Paterno GB, Provete DB, Vancine MH. 2022. Análises ecológicas no R. Nupeea : Recife, PE, Canal 6 : São Paulo. 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0.
- RANKIN, Catharine H. *et al.* Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 2, p. 135-138, 2009.
- RYAN, Michael J.; TUTTLE, Merlin D.; TAFT, Lucinda K. The costs and benefits of frog chorusing behavior. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, p. 273-278, 1981.
- SULLIVAN, Brian K.; WAGNER JR, William E. Variation in advertisement and release calls, and social influences on calling behavior in the Gulf Coast toad (*Bufo valliceps*). **Copeia**, p. 1014-1020, 1988.
- TOLEDO, Luís F. *et al.* The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethologica**, v. 18, p. 87-99, 2015.
- VIEIRA, Raísa Romênia Silva; BATISTA, Vinícius Guerra; BASTOS, Rogério Pereira. Acoustic communication in two species of the *Hypsiboas albopunctatus* group (Anura: Hylidae) in sympatry and allopatry. **Zoologia (Curitiba)**, v. 33, n. 02, p. e20150037, 2016.
- WALKER, M., Lourenço, A.C.C., Pimenta, B. & Nascimento, L.B. Morphological variation, advertisement call, and tadpoles of *Bokermannohyla nanuzae* (Bokermann, 1973), and taxonomic status *B. feioi* (Napoli & Caramaschi, 2004) (Anura, Hylidae, Cophomantini). **Zootaxa** 3937:161–178, 2015.
- WELLS, Kentwood D. **The ecology and behavior of amphibians**. University of Chicago press, 2007.
- ZAR, Jerrold H. Biostatistical analysis pearson prentice-hall. **Upper Saddle River**, NJ, 2010.

3. CAPÍTULO 2 : DESCRIÇÃO DA NOTA AGRESSIVA DE *BOKERMANNOHYLA FEIOI* (NAPOLI & CARAMASCHI, 2004) E ANÁLISE DE SUA EMISSÃO EM CONTEXTOS COESPECÍFICO E HETEROESPECÍFICO

Eduardo B. de Oliveira; Felipe Messias; Renato C. Nali; Renato N. Feio

Bokermannohyla feioi (Anura: Hylidae) é uma espécie de médio porte que integra o grupo *B. nanuzae* (Faivovich *et al.*, 2025), sendo endêmica de regiões montanhosas na Floresta Atlântica do interior de Minas Gerais (Brunes *et al.*, 2023). Essa espécie foi descrita a partir de exemplares coletados na região da Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais, sendo conhecida por habitar florestas de altitude e zonas ripárias (Cruz *et al.* 2009). O canto de anúncio de *B. feioi*, principalmente utilizado na atração de fêmeas, foi descrito por Napoli & Caramaschi (2004), consistindo de múltiplas notas pulsadas, com duração entre 0,32 e 0,35 segundos. Entretanto, comportamentos agressivos também podem ser sinalizados por meio de vocalizações, como as notas agressivas, utilizadas em interações competitivas entre machos (Toledo *et al.* 2015).

Embora os cantos agressivos sejam menos frequentemente documentados do que os cantos de anúncio, elas são essenciais para compreender as estratégias de comunicação e o comportamento social dos anuros (Nali *et al.* 2014; Nali *et al.* 2015; Tumulty *et al.*, 2022). Por exemplo, espera-se que a atitude de repelir outros machos seja mais intensa quando direcionada a indivíduos da mesma espécie, devido tanto à ameaça de perda do sítio de vocalização ou oviposição quanto à disputa por fêmeas para a reprodução. Em contraste, essa atitude tende a ser menos acentuada contra machos de outra espécie, para os quais a principal ameaça inicial seria apenas a perda do sítio de vocalização ou oviposição, exceto em casos de possível hibridação (Nali *et al.*, 2023).

A localidade-tipo de *Bokermannohyla feioi* é o Parque Estadual do Ibitipoca, município de Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil (21°42'48"S, 43°53'55"W). Neste local, ocorre simpatria com a espécie aparentada *Bokermannohyla ibitipoca* (Caramaschi & Feio, 1990), criando uma oportunidade para estudo de relações agressivas coespecíficas e heteroespecíficas. Sendo assim, este estudo teve dois objetivos. Primeiro, apresentamos a primeira descrição do canto agressivo de *Bokermannohyla feioi*, fornecendo uma análise acústica detalhada e comparando-se com o canto de anúncio da espécie. Segundo, testamos a hipótese de que a nota agressiva de *B. feioi* apresenta uma maior carga de agressividade em

resposta a um canto coespecífico, em comparação ao canto da espécie sincronotópica *B. ibitipoca*.

As amostragens de machos focais foram realizadas no período noturno, entre outubro de 2023 e fevereiro de 2024, no Parque Estadual do Ibitipoca, Lima Duarte, Minas Gerais, sudeste do Brasil. Foram conduzidos experimentos de *playback* em campo, onde analisamos a resposta coespecífica (resposta a *B. feioi*) e heteroespecífica (resposta a *B. ibitipoca*). Os experimentos consistiram na reprodução de *playbacks* de um canto de anúncio médio da própria espécie (tratamento coespecífico), anteriormente gravados na mesma população, e um canto de anúncio médio de *B. ibitipoca* (tratamento heteroespecífico) também da mesma população, estimulando respostas dos machos focais. Cada macho focal foi gravado durante aproximadamente 3 minutos, sendo um primeiro minuto de silêncio, o segundo minuto de emissão do estímulo em caixa de som e o terceiro minuto novamente de silêncio. Mais detalhes do procedimento experimental de *playback* encontram-se no capítulo 1 e em Nali & Prado (2014b).

Os estímulos foram realizados utilizando uma caixa JBL Go 2 (Resposta de Frequência Dinâmica: 180Hz – 20kHz; Potência de Som: 3 watts), e as vocalizações foram gravadas com um microfone Sennheiser ME66 (unidirecional), conectado a um gravador Marantz Professional PMD660, a uma distância padronizada de 0,8 m do macho focal. Após cada gravação, temperatura do ar foi medida utilizando um termo-higrômetro digital com precisão de ± 1 °C (Incoterm 7666.02.0.00). Cada macho foi capturado e medido no comprimento rostro-cloacal (CRC) com um paquímetro analógico com precisão de 0,05 mm, e pesado com dinamômetro com precisão de 0,1 g. As gravações foram posteriormente analisadas utilizando o software Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY), com os seguintes parâmetros: Transformada Rápida de Fourier (FFT) de 512 pontos, Janela = Hanning, Sobreposição = 50%. Os parâmetros acústicos analisados foram: frequência dominante (Hz); frequência máxima (Hz), frequência mínima (Hz), pico de amplitude (U), duração da nota (s), número de pulsos por nota e número de notas emitidas no intervalo de 1 minuto (taxa de repetição). A frequência mínima foi aferida pela medida Frequência 5% do software Raven, enquanto a frequência máxima foi aferida pela medida Frequência 95% deste programa. Além disso, medimos o tempo de latência, i.e., o intervalo de tempo entre o início do estímulo no *playback* e a emissão da nota agressiva pelo macho. Um tempo de latência mais curto significa uma maior prontidão na agressividade. Espectrogramas e oscilogramas das notas agressivas foram gerados para ilustrar as características temporais e espectrais. A terminologia utilizada para descrever os

parâmetros do canto segue Köhler *et al.* (2017), sendo que, no caso de *B. feioi*, os termos nota e canto são intercambiáveis. As gravações foram armazenadas na Coleção Bioacústica de Juiz de Fora (CBJF), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil. Alguns espécimes gravados foram coletados e depositados na Coleção de Anfíbios da UFJF, desta mesma Universidade, como material-testemunho (CAUFJF; APÊNDICE A – Tabela).

Considerando-se as relações competitivas mais evidentes em anuros, ou seja, machos competindo com outros da mesma espécie pela posse de fêmeas (Wells, 2007), a descrição da nota agressiva de *B. feioi* foi realizada baseando-se na resposta ao tratamento coespecífico, ou seja, a simulação de um macho intruso da mesma espécie. Adicionalmente, para testar a hipótese da diferença em agressividade entre os dois tratamentos (coespecífico vs. heteroespecífico), utilizamos o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para cada parâmetro acústico das notas agressivas (Da Silva *et al.*, 2022).

Foram obtidas 14 gravações de diferentes machos (14 indivíduos) em resposta ao tratamento coespecífico. Em 11 destas gravações (78,6%), com temperaturas do ar variando entre 14°C e 23°C, a nota agressiva foi emitida, podendo ser utilizada para a descrição das notas. Os 11 machos usados na descrição tiveram CRC entre 38,95 mm e 40,2 mm e massa de 3,2 g a 3,7 g. As notas agressivas emitidas por *Bokermannohyla feioi* apresentaram um padrão acústico simples e pulsado, com um envelope relativamente similar à nota de anúncio descrita por Napoli & Caramaschi (2004) e citada por Walker *et al.* (2015) como “nota A” (Figura 9-B). No entanto, a nota agressiva apresenta, em comparação com a nota de anúncio (ou “nota A” *sensu* Walker *et al.* 2017), uma sequência de pulsos em menor número e maior separação entre pulsos. Além disso, a nota agressiva apresenta intensidade que diminui gradativamente do meio ao final da nota, evidenciando um padrão decrescente tanto na amplitude quanto na energia espectral (Figura 9-C). Em média, a frequência dominante foi de 2340 Hz, a frequência máxima 2740,85 Hz e a frequência mínima foi de 1471,83 Hz (Tabela 4). A duração média das notas foi de 0,4 segundos, o número médio de pulsos foi de 26, e foram emitidas aproximadamente 3 notas agressivas por minuto (Tabela 4).

Tabela 4- Caracterização das notas agressivas em *Bokermannohyla feioi*, Lima Duarte, MG, Brasil, descritas a partir de estímulos de *playback* coespecíficos (N = 11 machos e 38 notas).

Parâmetro	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Frequência dominante (Hz)	2340,20	264,61	1894,92	2756,25
Frequência mínima (Hz)	1471,83	147,79	1291,99	1837,50
Frequência máxima (Hz)	2740,85	318,36	2217,92	3273,05
Duração da nota (s)	0,41	0,10	0,28	0,57
Pico de amplitude (medida relativa, U)	6584,75	6081,66	1445,00	23089,00
Número de pulsos	26	11	10	52
Taxa de repetição (N notas/minuto)	3	1	1	6

Foram obtidas 18 gravações de diferentes machos (18 indivíduos) durante o tratamento heteroespecífico, sendo que 12 delas (66,7%) apresentaram nota agressiva em resposta ao estímulo. Os 18 machos usados na descrição tiveram CRC entre 31,3 mm e 40,2 mm e massa de 3,1 g a 5,1 g. A comparação de parâmetros da nota agressiva emitida nos diferentes tratamentos revelou algumas diferenças significativas. Os machos emitiram notas mais longas e com maior pico de amplitude no tratamento coespecífico ($p = 0,0106$ e $0,03928$, respectivamente; **Figura 10**). Quanto ao tempo de latência, este foi também menor no tratamento coespecífico, em comparação ao heteroespecífico ($p < 0,05$). Os demais parâmetros acústicos analisados (frequência dominante, frequência máxima, frequência mínima, número de pulsos, número de notas agressivas por minuto e esforço de canto) não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos.

As notas classificadas como agressivas foram assim denominadas porque só foram emitidas a partir do início do *playback*, simulando a vocalização de um macho competidor próximo ao local de vocalização de um macho residente. Após a emissão de algumas dessas notas agressivas, o macho residente frequentemente retornava ao canto de anúncio. Esse comportamento sugere que as notas agressivas em *B. feioi* são um canto de encontro (Toledo *et al.* 2015), sinalizando agressividade para afastar competidores próximos no momento da interação. Assim, a função dessas notas pode estar ligada à competição direta por sítios de vocalização ou fêmeas em potencial, com o macho residente tentando restabelecer a dominância após o confronto vocal inicial (Freitas & Toledo, 2015; Toledo *et al.* 2015).

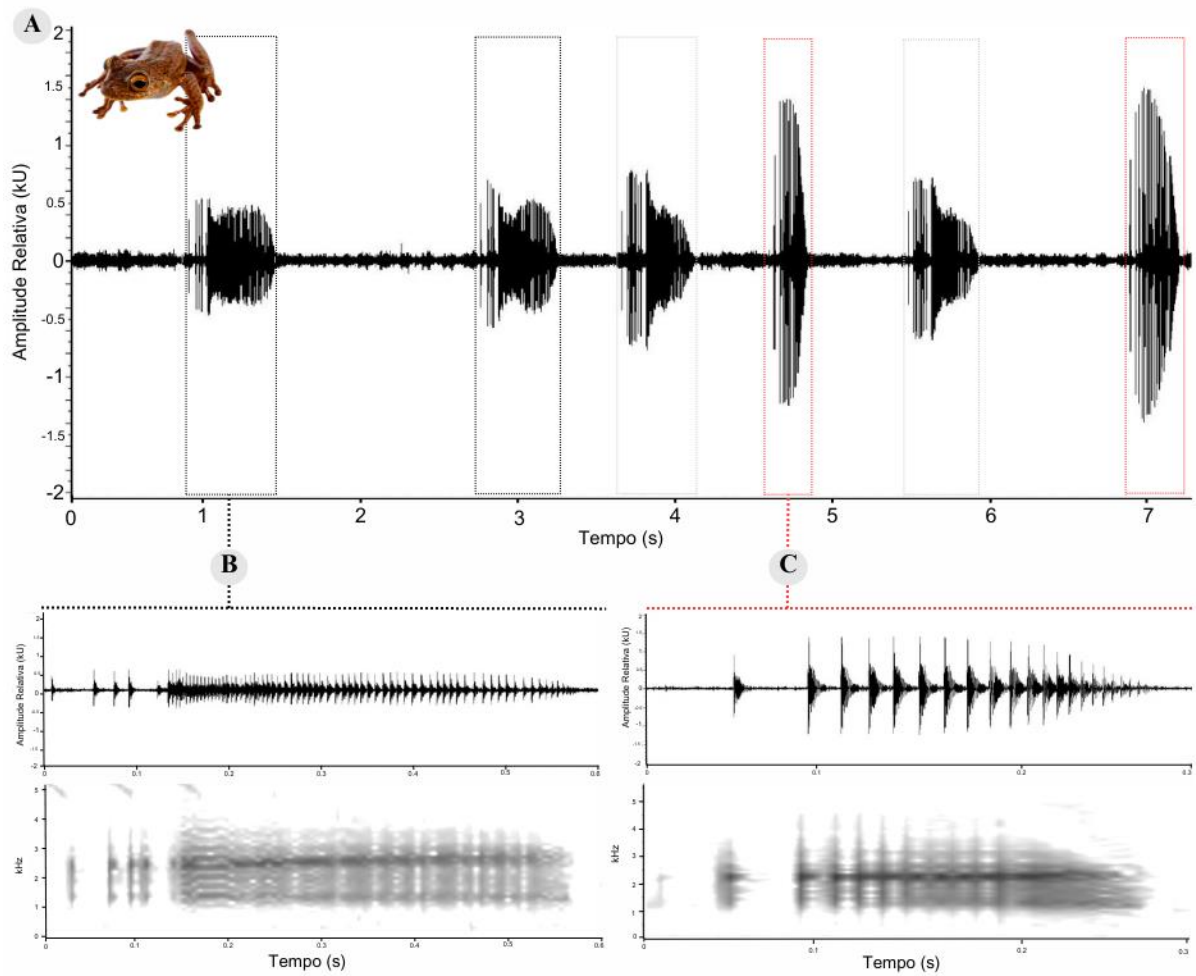


Figura 9 – Vocalizações de *Bokermannohyla feioi* em Lima Duarte, MG, Brasil. A: Oscilograma destacando notas de anúncio emitidas naturalmente pelo macho (pontilhado cinza), notas de anúncio médias da população provenientes do *playback* construído (pontilhado cinza claro) e notas agressivas emitidas naturalmente pelo macho (pontilhado vermelho). B: oscilograma e espectrograma de uma nota de anúncio, com múltiplos pulsos; C: Oscilograma e espectrograma da nota agressiva, descrita neste trabalho. Vocalização registrada a 19 °C de temperatura do ar, massa do indivíduo de 3,8 g e CRC = 40,4mm. Voucher não coletado.

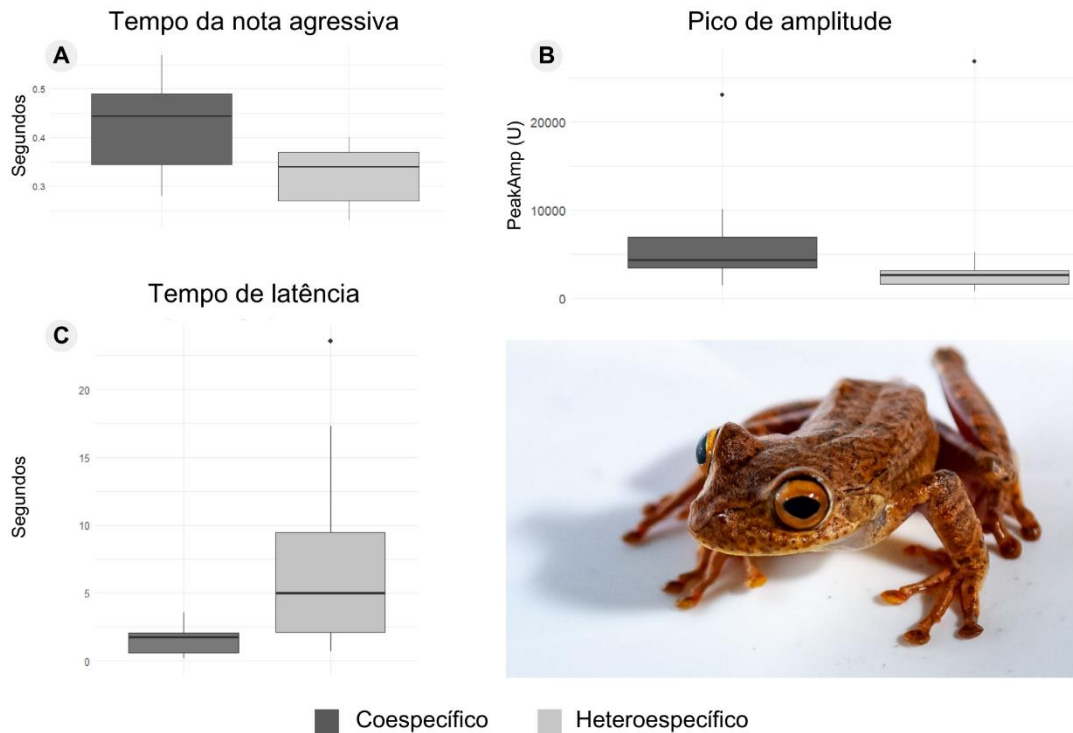


Figura 10- Boxplot com variáveis com resultados estatisticamente significativos em comparação entre os tratamentos (coespecífico e heteroespecífico)

A comparação entre notas agressivas no contexto coespecífico e heteroespecífico tende a corroborar nossa hipótese inicial. A emissão de notas agressivas ocorre em uma porcentagem levemente maior em tratamentos coespecíficos (78,6%) em comparação aos heteroespecíficos (66,7%), sugerindo que o estímulo coespecífico provoca uma reação competitiva mais acentuada (Freitas & Toledo, 2015). Esta tendência é corroborada por nossas análises quantitativas, em que as notas agressivas em resposta à mesma espécie foram emitidas com tempo de latência menor, demonstrando maior prontidão à agressividade em resposta a coespecíficos. Além disso, as notas agressivas foram mais longas e mais intensas em resposta a *playbacks* coespecíficos em comparação às emitidas em resposta à cantos heteroespecíficos. Estudos com outros hílideos demonstraram um aumento de agressividade quanto ao aumento da duração (Nali & Prado, 2014a em *Bokermannohyla ibitiguara*) e da intensidade do canto em resposta a coespecíficos (Lingnau *et al.*, 2004 em *Dendropsophus werneri*). No entanto, outros parâmetros do canto agressivo de *B. feioi* foram semelhantes entre os tratamentos, indicando que a presença de notas agressivas é importante em ambos os casos, talvez pela competição por sítios reprodutivos ou até mesmo para evitar acasalamentos errôneos, como já encontrado para espécies do mesmo gênero com morfologia semelhante (Nali *et al.*, 2023). Notas agressivas tendem a ser mais parecidas entre espécies pois são

também utilizadas em contextos heteroespecíficos (Freitas & Toledo, 2015), podendo ser indicativos de uma pressão seletiva convergente para o canto agressivo em espécies filogeneticamente próximas (Freitas & Toledo, 2015), otimizando assim a função dessas notas.

Cantos agressivos foram descritos apenas para uma pequena fração das espécies de *Bokermannohyla*, sendo que o detalhamento acústico e estudo do contexto social são ainda menos estudados para o gênero (veja Carvalho *et al.*, 2012; Nali & Prado, 2014a,b; Furtado *et al.*, 2016). Nosso estudo não apenas traz o primeiro registro de canto agressivo para *B. feioi*, mas também aborda, pela primeira vez no gênero, seu contexto em resposta a sinais de uma espécie congênica e que ocorre em sincronotopia. Assim, este estudo contribui na compreensão das relações sociais não apenas dentro de uma espécie, como também em relações interespecíficas em anfíbios anuros.

3.1 AGRADECIMENTOS

Agradeço à administração e aos funcionários do Parque Estadual do Ibitipoca – MG pelo suporte e estadia durante o trabalho de campo. Também expressei minha gratidão aos projetos FAPEMIG (APQ-04419-22 e APQ-00063-22) e à CAPES pelo financiamento, bem como a todas as pessoas que me auxiliaram em campo, seja no suporte logístico, nas coletas ou nas análises. As licenças de manejo e coleta de espécimes foram emitidas pelo IBAMA (SISBIO nº 85311-1), pelo IEF (Processo nº 2100.01.0046983/2022-34), e pela CEUA/UFJF (protocolo 12/2022).

3.2 REFERÊNCIAS

- BRUNES, Tuliana O. *et al.* Traditional taxonomy underestimates the number of species of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae) diverging in the mountains of southeastern Brazil since the Miocene. **Systematics and Biodiversity**, v. 21, n. 1, p. 2156001, 2023.
- CARVALHO, T. R., A. A. Giaretta & L. Magrini (2012): A new species of the *Bokermannohyla circumdata* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with bioacoustic data on seven species of the genus. – **Zootaxa**, 3321: 37–55
- CRUZ, Carlos. A. G., Feio, R. N., Caramaschi, U., & Murta, R. *Anfíbios do Ibitipoca*. **Bicho do Mato Editora**. 2009.
- DA SILVA, F. R.; GONÇALVES-SOUZA, T.; PATERNO, G. B.; PROVETE, D. B.; VANCINE, M. H. **Análises ecológicas no R**. Recife, PE: Nupeea; São Paulo: Canal 6, 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0, 2022.
- FAIVOVICH, Julián *et al.* Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of natural History**, v. 2005, n. 294, p. 1-240, 2005.
- FAIVOVICH, Julian *et al.* The phylogenetic relationships of Bokermann's treefrogs: species groups, reproductive biology, and biogeography (Anura: Hylidae: *Bokermannohyla*). **Cladistics**, 2025.
- FREITAS, Mariane de Oliveira; TOLEDO, Luis Felipe. Treefrogs with distinct advertisement calls produce similar territorial signals. **Bioacoustics**, v. 30, n. 4, p. 389-401, 2021.
- FURTADO, Raíssa *et al.* Vocal repertoire during reproductive and aggressive contexts of three Brazilian tree frogs: *Bokermannohyla sapiranga*, *Hypsiboas albopunctatus* and *H. goianus* (Anura: Hylidae). **South American Journal of Herpetology**, v. 11, n. 2, p. 136-147, 2016.
- KOEHLER, Joern *et al.* The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, n. 1, p. 1–124–1–124, 2017.
- LINGNAU, R.; GUIMARÃES, L. D.; BASTOS, R. P. Vocalizações de *Hyla werner*i (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. **Phyllomedusa**, 3, 115–120, 2004.

- NALI, Renato C.; Prado, C.P.A. The fight call of *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura: Hylidae): first record for the genus. **Salamandra**, v. 50, n. 3, p. 181-184, 2014a.
- NALI, Renato C.; PRADO, Cynthia PA. Complex call with different messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a gladiator frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 48, n. 3, p. 407-414, 2014b.
- NALI, Renato C.; BORGES, Marília M.; PRADO, Cynthia PA. Advertisement and release calls of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae) with comments on the social context of emission. **Zoologia (Curitiba)**, v. 32, n. 4, p. 263-269, 2015.
- TOLEDO, Luís F. *et al.* The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethologica**, v. 18, p. 87-99, 2015.
- TUMULTY, James P.; LANGE, Zachary K.; BEE, Mark A. Identity signaling, identity reception, and the evolution of social recognition in a Neotropical frog. **Evolution**, v. 76, n. 1, p. 158-170, 2022.
- WELLS, Kentwood D. The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago press, 2007.
- WICKHAM H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

APÊNDICE A – Tabela Espécimes coletados e tombados na Coleção de anfíbios da UFJF

Relação de espécimes coletados durante o desenvolvimento do estudo, tombados na Coleção de Anfíbios da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, incluindo informações sobre o número de registro, espécie e local de coleta.

Tabela 5 Espécimes coletados e tombados na Coleção de anfíbios da UFJF

CAUFJF	Espécie	Data de coleta	Nº de campo	Nº tecido (CAUFJF-T)
2950	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-22	EBO01	CAUFJF-T 350
2951	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-22	EBO02	CAUFJF-T 351
2952	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-22	EBO03	CAUFJF-T 352
2953	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-23	EBO07	CAUFJF-T 356
2954	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-23	EBO09	CAUFJF-T 358
2955	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO10	CAUFJF-T 359
2956	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO11	CAUFJF-T 360
2957	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO12	CAUFJF-T 361
2958	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO13	CAUFJF-T 362
2959	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO14	CAUFJF-T 363
2960	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-24	EBO15	CAUFJF-T 364
2961	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-25	EBO16	CAUFJF-T 365
2962	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-25	EBO18	CAUFJF-T 367
2963	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-25	EBO19	CAUFJF-T 368
2964	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-25	EBO21	CAUFJF-T 370
2965	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-26	EBO22	CAUFJF-T 371
2966	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-26	EBO23	CAUFJF-T 372
2967	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-26	EBO24	CAUFJF-T 373
2968	<i>Bokermannohyla feioi</i>	2023-XI-26	EBO25	CAUFJF-T 374
2969	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XI-23	EBO04	CAUFJF-T 353
2970	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XI-23	EBO05	CAUFJF-T 354
2971	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XI-23	EBO06	CAUFJF-T 355
2972	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XI-25	EBO17	CAUFJF-T 366
2973	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XI-25	EBO20	CAUFJF-T 369
2976	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XII-20	EBO27	CAUFJF-T 376
2977	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2023-XII-20	EBO28	CAUFJF-T 377

APÊNDICE B – Produções Técnicas e Científicas

Produções técnicas e científicas resultantes do desenvolvimento deste trabalho até o momento, apresentadas em eventos acadêmicos apenas relacionados ao tema do estudo.

Trabalhos Apresentados em Eventos:

DELPENHO, V. P.; MAIA, L. R.; OLIVEIRA, E. B.; REBOUÇAS, R.; NALI, R. C. **Menos é mais: Evidências preliminares indicam que machos maiores de *Bokermannohyla ibitipoca* (Anura: Hylidae) apresentam menor atividade vocal.** [Tipo de apresentação: Pôster]. X Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2023, Porto Seguro - BA. X congresso brasileiro de herpetologia, 2023.

LEANDRO, F. M.; OLIVEIRA, E. B.; NALI, R. C.; PRADO, C. P. A. **Investimento em estratégias pré- e pós-acasalamento em espécies de *Bokermannohyla* (Anura: Hylidae) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais.** [Tipo de apresentação: Pôster]. I Congresso Brasileiro de Biologia Evolutiva, Campinas, SP, 2024.

ANEXO A - Normas

As atividades de campo realizadas para o desenvolvimento deste estudo foram conduzidas em conformidade com a legislação vigente, mediante autorizações emitidas pelos órgãos competentes.

Autorização SISBio: Licença de coleta emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para atividades científicas com animais silvestres. Nº 85311-1. Código de autenticação: 0853110120221226

Autorização IEF (SEI-MG): Licença de coleta emitida pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) para realização de atividades científicas no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais. Nº: 071/2022 - Processo nº 2100.01.0046983/2022-34