



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Identificação por marcas naturais e estimativa de parâmetros
populacionais de *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) em uma área de
Cerrado**

Sabine Borges da Rocha

Campo Grande, MS
Dezembro, 2013



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Identificação por marcas naturais e estimativa de parâmetros
populacionais de *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) em uma área de
Cerrado**

Sabine Borges da Rocha

Dissertação apresentada à Fundação
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito à obtenção do título de Mestre
em Biologia Animal. Área de concentração:
Sistemática e Bionomia Animal.

Orientador: Dr. José Sabino

Campo Grande, MS
Dezembro, 2013

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo Geral.....	ii
Abstrat.....	iii
Introdução Geral.....	iv
Capítulo 1. Identificação de <i>Phyllomedusa azurea</i> (Anura, Hylidae) por meio de marcas naturais	
Introdução... ..	1
Material e Métodos.....	5
Resultados.. ..	12
Discussão.....	14
Referências Bibliográficas.	17
Normas do periódico <i>Herpetological Review</i>	24
Capítulo 2. Uso de marcas naturais para estimativa de parâmetros populacionais de <i>Phyllomedusa azurea</i> (Anura, Hylidae) em uma área de Cerrado	
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.. ..	8
Resultados.....	19
Discussão.. ..	28
Referências Bibliográficas.....	33
Normas do periódico <i>Journal of Herpetology</i>	45

*“Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas
mais que a dos mísseis.
Tenho em mim
esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos.
Tenho abundância
de ser feliz por isso.”*

Manoel de Barros

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio no subsídio financeiro. Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal pelo apoio logístico. Ao IBAMA por permitir a captura e acompanhamento dos animais em cativeiro. Ao meu orientador José Sabino por sempre demonstrar-se confiante e tranquilo com o meu trabalho. A toda a equipe de funcionários da Estância Mimosa Ecoturismo pela atenção que sempre foi dada.

Agradeço especialmente a minha família que sempre me apoiou e acreditou no meu trabalho, minha mãe Ana Brígida, meu pai Edson e meus irmãos, Rodrigo e Felipe. Sou eternamente grata a vocês, por me encorajar nos momentos mais difíceis. Agradeço ao Fernando, que me apoiou na materialização da ideia e que sempre me auxiliou em todas as etapas deste estudo (desde o delineamento amostral, coleta e análises dos dados, correções). A minha companheira canina e sempre fiel Dinga, pela companhia dormente enquanto redigia a dissertação. Enfim, a todos os meus familiares que me deram apoio nessa jornada.

Agradeço aos meus colegas que me ajudaram nas coletas de campo Guilli, Zé (José Lucas Romero), Patrícia, Heriberto, Fernando. E também a todos que de alguma forma me ajudaram durante o processo laboratorial do estudo, Taynara, Liliana, Thomas, Ronedir. Agradeço a C. Hiert pela conversa esclarecedora durante a análise dos dados e ao P. Sarmento, pelos valiosos auxílios durante as análises no Programa Mark. Sou muito grata a vocês.

Agradeço sinceramente à carismática *Phyllomedusa azurea*, que me deu inspiração para desenvolver este projeto: sem elas nada disso teria acontecido.

Resumo Geral

Estudos populacionais permitem a obtenção de diversas informações biológicas aplicáveis à conservação da vida silvestre. Há diversos tipos de marcações individuais que podem ser utilizadas nesses estudos. Contudo, a única não invasiva para individualização de anfíbios é a identificação por marcas naturais. Uma das formas de registrar as marcas naturais é por imagem fotográfica. Assim, este trabalho teve como objetivo: (1) verificar se as marcas naturais presentes nos flancos de *Phyllomedusa azurea* podem ser utilizadas para distinguir os indivíduos; (2) analisar a estabilidade temporal das marcas naturais dos flancos de *P. azurea*, de modo a validar o método de identificação fotográfica; (3) quantificar os parâmetros populacionais sobrevivência aparente e probabilidade de captura de *P. azurea* ao longo de um período reprodutivo da espécie, no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. Indivíduos adultos de *P. azurea* ($n = 15$) foram capturados entre outubro 2012 e janeiro 2013, em lagoas temporárias no Município de Bonito, e mantidos em cativeiro. Capturamos imagens dos flancos dos indivíduos semanalmente, durante nove semanas em busca de alterações temporais no padrão de manchas. Verificamos que as marcas naturais dos flancos de *P. azurea* são únicas para cada indivíduo da espécie e que o formato destas manchas permaneceu constante ao longo de nove semanas. Os dados de marcação e recaptura foram obtidos entre outubro 2012 e março 2013. O método de amostragem utilizado foi o de busca ativa visual no período noturno em duas lagoas temporárias. Individualizamos os animais por meio de fotografia de seus flancos, nos quais se encontram as marcas naturais. Nas duas lagoas, individualizamos 177 indivíduos de *P. azurea* (29 fêmeas e 148 machos). Recapturamos somente machos ($n = 20$). A sobrevivência aparente dos indivíduos machos variou entre as duas lagoas amostradas, sendo 23% na lagoa 1 e 41% na lagoa 2. A probabilidade de captura dos machos variou entre as lagoas, bem como ao longo dos meses, em média 39% para os indivíduos da lagoa 1 e 52% para os da lagoa 2. Verificamos que a identificação por meio das marcas naturais, com registro fotográfico, é uma forma de individualização eficiente para estudos com *P. azurea* na região estudada. Sugerimos que futuros estudos populacionais sejam desenvolvidos com a espécie, em um maior escala temporal (ao longo dos anos) e espacial (de paisagem).

Abstrat

Studies of populations allow the obtaining of many biological information that are applicable to the conservation of wildlife. There are many types of individual marks that can be used in these studies. Even though, the only non-invasive to the individualization of amphibian is the identification through natural marks. One of the ways of registering the natural marks is with photographic image. This work has the objectives of: (1) verifying if the natural marks that are in the flanks of the *Phyllomedusa azurea* can be used to distinguish the individuals; (2) analyzing the temporal stability of the natural marks in the flanks of the *P. azurea*, in a way to validate the method of photographic identification; (3) quantifying the population parameters (apparent survival and probability of capture) of *P. azurea* during the reproductive period of the species, in the Municipality of Bonito, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Adult individuals of *P. azurea* ($n = 15$) were captured between October 2012 and January 2013 in temporary ponds in Bonito/MS and kept in a terrarium. We weekly captured images of the flanks of the individuals, during nine weeks searching for temporal changes in the standard of the flecks. We verified that the natural marks of the flanks of the *P. azurea* are unique to each individual of the species and that the format of the flecks of the individuals remained constant during the nine weeks. The mark-recapture data were obtained between October 2012 and March 2013. The method of sampling used was the active visual search in the night period in two different temporary ponds. We individualized the animals through photography of their flanks, where the natural marks are. In both ponds, we individualized 177 individuals of the *P. azurea* (29 females and 148 males). We recaptured only the male ones ($n = 20$). The apparent survival of the male individuals varied between the two sampled ponds, being 23% in the pond 1 and 41% in the pond 2. The probability of capture of the male varied between the two ponds, as well as during the months, an average of 39% to the individuals of the pond 1 and 52% to the pond 2. We verified that the identification through natural marks, with photographic register is one way of efficient individualization for studies with the *P. azurea* in the studied region. We suggest that future population studies are developed with the species in a longer scale of time (through years) and space (of landscape).

INTRODUÇÃO GERAL

A falta de estudos para a maioria das espécies de anfíbios, no que diz respeito à história natural, ao ciclo de vida e à ecologia é o grande obstáculo para reverter à perda de diversidade e o declínio de populações do grupo (Young et al. 2001, Funk et al., 2003). Estudos ecológicos, principalmente em termos de dinâmica populacional, são importantes para prevenir e inferir a causa dos decréscimos de populações (Funk et al., 2003). Dentre os fatores responsáveis pelo declínio das populações de anfíbios, a perda ou alteração dos ambientes naturais é uma das mais alarmantes e realizadas frequentemente no Cerrado e Pantanal, principais domínios vegetais do Estado de Mato Grosso do Sul (Young et al., 2001; IBGE, 2004; Klink & Machado, 2005; Uetanabaro et al., 2008). Estudos populacionais permitem a obtenção de diversas informações biológicas importantes e aplicáveis à conservação da vida silvestre (Converse et al., 2005). Aqueles que utilizam modelos de marcação e recaptura têm se mostrado eficientes para estimar parâmetros demográficos, tal como tamanho populacional, taxa de sobrevivência, probabilidade de captura, parâmetros importantes para identificar tendências populacionais (Schmidt, 2003; Vasconcellos, 2007).

Há diversos tipos de marcações individuais que podem ser utilizadas em animais e estas marcações podem ser classificadas pela sua durabilidade como temporária, semipermanente e permanente. Métodos permanentes de marcação tendem a criar marcas que muitas vezes envolvem dano tecidual (permanente ou temporário) (Mellor et al., 2004). A amputação de artelho ou *toe-clipping* é o método de marcação permanente mais utilizado atualmente em anfíbios (McCarthy & Parris, 2004; Campbell et al., 2009; Schmidt & Schwarzkopf, 2010; Del Lama et al., 2011; Oliveira et al., 2012). Em recente discussão sobre a proibição do uso dessa técnica no Brasil, um dos argumentos mencionados por herpetólogos contra tal impedimento, foi a falta de métodos de marcações individuais confiáveis no país (Corrêa et al., 2013). Desse modo, técnicas alternativas à marcação por amputação de artelhos devem ser investigadas e validadas.

A identificação por marcas naturais também é considerada um tipo de marcação permanente de indivíduos (Mellor et al., 2004). Contudo, se diferencia das demais técnicas de marcação permanente por ser a única não invasiva para individualização de anfíbios, ou seja, não há dano tecidual (Bradfield, 2004; Kenyon et al., 2010). Uma das formas de registrar as marcas naturais é por imagem fotográfica, também conhecida como método de identificação fotográfica ou MIF (Mellor et al., 2004). Em diversos países, inclusive no Brasil, pesquisadores

testaram o MIF em anfíbios e o consideraram eficiente e econômico, além da técnica causar menos estresse ao animal por não fornecer risco a sua integridade física (Arntzen et al., 2003; Carafa & Biondi, 2004; Bradfield, 2004; Gamble et al., 2008; Clemas et al., 2009; Del Lama et al., 2011; Ribeiro & Rebelo, 2011; Courtois et al., 2012). A individualização por marcas naturais tem elevada importância em estudos com populações de espécies em decréscimo (Caorsi et al., 2012) e espécies ameaçadas de extinção (Reisser et al., 2008), visto que não causa ferimentos no animal e evita o risco de mortalidade dos indivíduos (Del Lama et al., 2011).

A única limitação na aplicação do MIF é a restrição a espécies com marcas naturais, em pelo menos uma região do corpo (e.g., dorso, ventre, flancos), passíveis de reconhecimento (Bradfield, 2004; Kenyon et al., 2009). Também é necessário verificar se as marcas selecionadas são permanentes ao longo do tempo (Kenyon et al., 2009). Tal cuidado é importante, visto que em algumas espécies as marcas naturais se modificam ao longo de seu estágio de desenvolvimento e essa alteração pode causar erro na identificação dos indivíduos (Carafa & Biondi, 2004; Reisser et al., 2008; Yoshizaki et al., 2009). De modo a evitar esses problemas, é recomendável que a técnica seja cuidadosamente validada antes de ser aplicada (Kenyon et al., 2009).

A avaliação da eficácia do MIF pode ser alcançada por meio de estudos que combinam essa técnica com outros tipos de marcação (e.g., cinturão de miçangas, etiqueta de implante visível alfanumérico - VIA *tag*, “transponder” passivo integrado – PIT *tag*) (Santos et al., 2010; Clemas et al., 2009; Vasconcelos & Colli, 2009). Uma alternativa é manter indivíduos da espécie em cativeiro, para verificar se o padrão de manchas determinado para identificação individual se altera ao longo do tempo (Kenyon et al., 2010).

Phyllomedusa azurea Cope, 1862 pertence à família Hylidae e possui hábito noturno e arborícola (Caramaschi & Cruz, 2002; Freitas et al., 2008; Uetanabaro et al., 2008). Tem ocorrência conhecida para o Pantanal e Cerrado, nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, bem como no Distrito Federal (Caramaschi 2006; Prado et al., 2008). Também foi registrada na transição do Cerrado com Floresta Amazônica, em Rondônia e em Santa Catarina, em área de Mata Atlântica (Calderon et al. 2009; Lucas et al., 2010) . Sua distribuição também inclui as regiões de Chaco no leste da Bolívia, Paraguai e Norte da Argentina (Caramaschi 2006; Uetanabaro et al., 2008). A espécie apresenta coloração verde no dorso e o seu ventre é branco/creme. As laterais de seu corpo e parte interna de seus membros apresentam barras verticais escuras que contrastam com um fundo vermelho-alaranjado (Caramaschi, 2006; Uetanabaro et al., 2008; Lucas et al., 2010).

Para o gênero *Phyllomedusa*, encontramos somente um artigo publicado em que utilizaram marcas naturais para individualização da espécie (*Phyllomedusa megacephala*, ver Oliveira et al., 2012). Adicionalmente, não há registros de estudos populacionais para *P. azurea*, inclusive ainda são deficientes os dados quanto ao seu status de conservação (IUCN, 2013).

O presente estudo está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo está intitulado como: “Identificação de *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) por meio de marcas naturais”, e se encontra nas normas do periódico *Herpetological Review*. O segundo capítulo está intitulado como: “Uso de marcas naturais para estimativa de parâmetros populacionais de *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) em uma área de Cerrado”, e se encontra nas normas do periódico *Journal of Herpetology*.

As normas dos periódicos estão ao final de cada capítulo. Para os dois periódicos escolhidos, é sugerido inserir as figuras e tabelas ao final do texto. Contudo, para melhor compreensão do leitor, inserimos as figuras e tabelas ao longo do corpo do texto.

De acordo com a Resolução N.52 de 28 de novembro de 2012 do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, as dissertações devem ser redigidas em língua portuguesa, independentemente da linguagem exigida pelo periódico escolhido. Deste modo, os dois capítulos desta dissertação foram redigidos em português.

Referências Bibliográficas

- Arntzen, JW, IBJ Goudie, J Halley, R Jehle. 2003. Cost comparison of marking techniques in long-term population studies: PIT-tags versus pattern maps. *Amphib. Reptil.* 25:305-315.
- Bradfield, KS 2004. Photographic identification of individual Archey's frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings. DOC Science Internal Series 191. Department of Conservation. Wellington, New Zealand. 36 pp.
- Campbell, TS, P Irvin, KR Campbell, K Hoffmann, ME Dykes, AJ Harding, SA Johnson. 2009. Evaluation of a new technique for marking anurans. *Appl. Herpetol.* 6:247–256.

- Caorsi, VZ, RR Santos, T Grant. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. South Am. J. Herpetol., 7(2):79-84.
- Carafa, M e M Biondi. 2004. Application of a method for individual photographic identification during a study on *Salamandra salamandra gigliolii* in central Italy. Ital. J. Zoolog. 2 (Supplement), pp 181-184.
- Caramaschi, U 2006. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro. 64 (2): 159-179.
- Caramaschi, U e CAG Cruz. 2002. Phyllomedusa: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). Phyllomedusa. 1(1): 5-10.
- Clemas, RJ, JM Germano, R Speare, PJ Bishop. 2009. Use of three individual marking methods in Australian frogs (Genus: *Litoria*) with notes on placement of Visible Implant Alphanumeric tags. N. Z. Nat. Sci.. 34:1-7.
- Converse, SJ, JB Iverson, JA Savidge. 2005. Demographics of an ornate box turtle population experiencing minimal human-induced disturbances. Ecol. Appl.. 15:2171-2179.
- Corrêa, DT, M Guimarães, TAL Oliveira, M Martins, RJ Sawaya. 2013. Toe-clipping vital to amphibian research. Nature. 493:305.
- Courtois, EA, K Pineau, B Villette, DS Schmeller, P Gaucher. 2012. Population estimates of *Dendrobates tinctorius* (Anura: Dendrobatidae) at three sites in French Guiana and first record of chytrid infection. Phyllomedusa. 11(1):63–70.
- Del Lama, F, MD Rocha, MA Andrade, LB Nascimento. 2011. The use of photography to identify individual tree frogs by their natural marks. South Am. J. Herpetol.. 6(3):198-204.
- Freitas, EB, CB De-Carvalho, RG Faria, BC Batista, CC Batista, WA Coelho, A Bocchiglieri. 2008. Nicho ecológico e aspectos da história natural de *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae, Phyllomedusinae) no Cerrado do Brasil Central. Biota Neotrop.. 8 (4):101-110.

- Funk, WC, D Almeida-Reinoso, F Nogales-Sornosa, MR Bustamante. 2003. Monitoring Population trends of *Eleutherodactylus* Frogs. J. Herpetol.. 37(2):245-256.
- Gamble, L, S Ravela, K McGarigal. 2008. Multi-scale features for identifying individuals in large biological databases: an application of pattern recognition technology to the marbled salamander *Ambystoma opacum*.. J Appl Ecol. 45:170-180.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas do Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em: 05 Nov 2013.
- IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 November 2013.
- Kenyon, N, AD Phillott, RA Alford. 2009. Evaluation of the photographic identification method (PIM) as a tool to identify adult *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). Herpetol. Conserv. Biol.. 4(3):403-410.
- Kenyon, N, AD Phillott, RA Alford. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria Genimaculata* (Anura: Hylidae). Herpetol. Conserv. Biol.. 5(1):126-131.
- Klink, CA, e RB Machado. 2005. A conservação do Cerrado Brasileiro. Megadiversidade, 1(1):147-155.
- Lucas, EM, VB Fortes, PCA Garci. 2010. Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862: Distribution extension to southern Brazil. Check List, 6:164-166.
- McCarthy, MA, e KM Parris. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. J. Appl. Ecol.. 41:780-786.
- Mellor, DJ, NJ Beausoleil, KJ Stafford. 2004. Marking amphibians, reptiles and marine mammals: animal welfare, practicalities and public perceptions in New Zealand. Wellington, Department of Conservation. 55 pp.

- Oliveira, FFR, PAG Nogueira, PC Eterovick. 2012. Natural history of *Phyllomedusa megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil, with descriptions of its breeding biology and male territorial behavior. *J. Nat. Hist.* 46(1-2):117-129.
- Reisser, J, M Proietti, P Kinas, I Sazima. 2008. Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. *Endang, Species Res.* 5:73–82.
- Ribeiro, J, e R Rebelo. 2011. Survival of *Alytes cisternasii* tadpoles in stream pools: a capture-recapture study using photo-identification. *Amph. Reptil.* 32:365-374.
- Santos, MA, ED Lutzer, RR Laps. 2010. Use of natural marks to identify individual *Bokermannohyla hylax* (Amphibia: Anura). *IRCF Reptil. & Amph.* 17(4):338-241.
- Schmidt, BR 2003. Count data, detection probabilities, and the demography, dynamics, distribution, and decline of amphibians. *C. R. Biologies*, 326:119-124.
- Schmidt, K, e L Schwarzkopf. 2010. Visible implant elastomer tagging and toe-clipping: effects of marking on locomotor performance of frogs and skinks. *Herpetolog. J.* 20:99–105.
- Uetanabaro, M, CPA Prado, DJ Rodrigues, M Gordo, Z Campos. 2008. Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno. Editora UFMS e UFMT, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 196 pp.
- Vasconcellos, MM 2007. Dinâmica populacional de dois bufonídeos (Amphibia: Anura) em uma lagoa no Cerrado do Brasil Central. Dissertação de mestrado em Ecologia. Universidade de Brasília, Distrito Federal.
- Vasconcellos, MM, e GR Colli. 2009. Factors Affecting the Population Dynamics of Two Toads (Anura: Bufonidae) in a Seasonal Neotropical Savanna. *Copeia*. (2):266-276.
- Young, BE, KR Lips, JK Reaser, R Ibáñez, AW Salas, JR Cedeño, LA Coloma, S Ron, E La Marca, JR Meyer, A Muñoz, F Bolaños, G Chaves, D Romos. 2001. Population declines and priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conserv. Biol.* 15(5):1213-1223.

Yoshizaki, J, KH Pollock, C Brownie, RA Webster. 2009. Modeling misidentification errors in capture–recapture studies using photographic identification of evolving marks. *Ecology*. 90(1):3–9.

Capítulo 1

Identificação de *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) por meio de marcas naturais

Sabine B. Rocha^{1,2}, José Sabino^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

²E-mail: sabineborges@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Laboratório de Biodiversidade e Conservação de Ecossistemas Aquáticos, Universidade Anhanguera – Uniderp, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Introdução

O reconhecimento dos indivíduos em uma população é fundamental para a maioria dos estudos comportamentais e ecológicos com animais silvestres (Reisser et al. 2008). Para a identificação desses organismos, habitualmente utiliza-se marcações que permitam individualiza-los em estudo (McCarthy e Parris 2004). Diversos tipos de marcações individuais podem ser utilizadas em animais e estas podem ser classificadas pela sua durabilidade como temporária, semipermanente e permanente (Mellor et al. 2004). Métodos permanentes de marcação tendem a criar marcas que muitas vezes envolvem dano tecidual (permanente ou temporário), como é o caso das marcas feitas em alta temperatura (*hot brands*), tatuagens, elastômero fluorescente, “transponder” passivo integrado (PIT *tag*) e remoção de tecidos (e.g. amputação de artelho) (Beausoleil et al. 2004; Donnelly e Guyer 1994; Mellor et al. 2004).

A amputação de artelho ou *toe-clipping* é o método de marcação mais utilizado atualmente em anfíbios (Campbell et al. 2009; Del Lama et al. 2011; McCarthy e Parris 2004;

Oliveira et al. 2012; Schmidt e Schwarzkopf 2010). Em recente discussão sobre a possibilidade de proibição do uso dessa técnica no Brasil, um dos argumentos mencionados por herpetólogos contra tal impedimento, foi a falta de métodos de marcações individuais confiáveis no país (Corrêa et al. 2013). Desse modo, técnicas alternativas à marcação por amputação de artelhos devem ser investigadas e validadas.

A identificação por marcas naturais também é considerada um tipo de marcação permanente de indivíduos, a única não invasiva para individualização de anfíbios, ou seja, não há dano tecidual (Bradfield 2004; Mellor et al. 2004; Kenyon et al. 2010). Apesar disso, a técnica ainda é pouco utilizada no Brasil (Caorsi et al. 2012; Del Lama et al. 2011; Miranda et al. 2005; Oliveira et al. 2012; Santos et al. 2010; Sousa 2012).

Uma das formas de registrar as marcas naturais é por imagem fotográfica, conhecida como método de identificação fotográfica (MIF) ou foto-identificação (Mellor et al. 2004; Caorsi et al. 2012; Gamble et al. 2008; Kenyon et al. 2009; Kenyon et al. 2010; Knox et al. 2012). Em diversos países, inclusive no Brasil, pesquisadores testaram o MIF em anfíbios e o consideraram eficiente e econômico, além da técnica minimizar o estresse e o risco a integridade física do animal (Arntzen et al. 2003; Bradfield 2004; Courtois et al. 2012; Del Lama et al. 2011; Gamble et al. 2008; Ribeiro e Rebelo, 2011). Dessa forma, a individualização por marcas naturais tem elevada importância em estudos com populações em declínio (Caorsi et al. 2012) e ameaçadas de extinção (Reisser et al. 2008).

A única limitação na aplicação do MIF é a restrição a espécies com características ou marcas naturais passíveis de reconhecimento, em pelo menos uma região do corpo (Bradfield 2004; Kenyon et al. 2009). Também deve ser testada a permanência das marcas selecionadas, visto que em algumas espécies as marcas naturais se modificam ao longo do estágio de desenvolvimento, o que prejudica o reconhecimento dos indivíduos (Carafa e Biondi 2004; Kenyon et al. 2009; Reisser et al. 2008; Yoshizaki et al. 2009). Outro problema comum em estudos que utilizam o MIF é relativo à qualidade da imagem capturada; imagens de má

qualidade dificultam a identificação do animal (Reisser et al. 2008; Ribeiro 2009; Yoshizaki et al. 2009). Desse modo, é recomendável que a técnica seja cuidadosamente validada para ser aplicada (Kenyon et al. 2009).

A avaliação da eficácia do MIF pode ser alcançada por meio de estudos que combinam essa técnica com outros tipos de marcação, como, por exemplo, o cinturão de miçangas (Santos et al. 2010), etiqueta de implante visível alfanumérico - VIA *tag* (Clemas et al. 2009), “transponder” passivo integrado – PIT *tag* (Arntzen et al. 2003). Uma alternativa é manter indivíduos da espécie em cativeiro, para verificar se o padrão de manchas determinado para identificação individual se altera ao longo do tempo (Kenyon et al. 2010).

Estudos com anfíbios anuros em que foi utilizado o MIF, verificaram a estabilidade das marcas naturais ao longo do período de amostragem (e.g., *Scinax longilineus* ver Del Lama et al. 2011; *Litoria genimaculata* ver Kenyon et al. 2010; *Pseudis cardosoi* ver Miranda et al. 2005). Porém, observamos um caso em que houve alteração nas marcas naturais de um anfíbio (*Salamandra salamandra giglioli*), no qual as manchas do dorso de 4% dos indivíduos amostrados se fundiram (Carafa e Biondi 2004). Contudo, ainda há pouca informação disponível sobre a variação no padrão de manchas e na coloração de indivíduos ao longo de seu desenvolvimento (Bradfield 2004; Kenyon et al. 2010).

Phyllomedusa azurea Cope, 1862 pertence a família Hylidae e subfamília Phyllomedusinae. Segundo Duellman (1968), os anuros desta subfamília são os mais distintos dentre os hílideos neotropicais, apresentando diferentes características morfológicas, comportamentais, reprodutivas e bioquímicas. *P. azurea* apresenta coloração verde no dorso e o seu ventre é branco/creme. As laterais de seu corpo e parte interna dos membros anteriores e posteriores apresentam barras verticais escuras contrastando com um fundo vermelho-alaranjado (Caramaschi 2006; Lucas et al. 2010; Uetanabaro et al. 2008;).

Diversas espécies pertencentes à Phyllomedusinae apresentam padrões de manchas em seus flancos, como *Agalychnis callidryas*, *Phasmahyla nordestina*, *Phyllomedusa iheringii*, *P.*

azurea. Contudo, para o gênero *Phyllomedusa*, somente um estudo utilizou essas marcas naturais para identificação dos indivíduos (*Phyllomedusa megacephala*, ver Oliveira et al. 2012).

Este trabalho teve como objetivos: (1) verificar se as marcas naturais presentes nos flancos de *Phyllomedusa azurea* podem ser utilizadas para distinguir os indivíduos; (2) analisar a estabilidade temporal das marcas naturais dos flancos de *P. azurea*, de modo a validar o método de identificação fotográfica (MIF).

Material e Métodos

De modo a verificar se as marcas naturais dos flancos de indivíduos adultos de *Phyllomedusa azurea* (Fig. 1) se alteram ao longo do tempo, capturamos os indivíduos e os mantivemos em cativeiro, conforme especificado a seguir.

Área de captura dos indivíduos

Entre outubro de 2012 e janeiro de 2013, indivíduos adultos de *P. azurea* (N = 15) foram manualmente capturados por meio de busca ativa em lagoas temporárias no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. A área de estudo está localizada em uma propriedade particular denominada Estância Mimosa Ecoturismo (20.9814°S, 56.5156°W), situada 26 km ao norte da cidade de Bonito (Fig. 2). A área está inserida no Planalto da Bodoquena, conhecida popularmente como Serra da Bodoquena, e está situado na região sudoeste do Estado, na borda do Pantanal sul. Este planalto é caracterizado pela presença de pedras carbonáticas no substrato rochoso (Boggiani et al. 1993). Está sob influência do Cerrado e suas variações

(cerradão, campo cerrado e campo limpo), bem como de florestas estacionais (Uetanabaro et al. 2008).

Nos meses de verão, o clima da região é quente e úmido e no inverno é frio e seco (Uetanabaro et al. 2008). A maior incidência de chuvas ocorre entre outubro e abril, e os meses de maio a setembro são marcados por período de seca (Rodrigues et al. 2003; Uetanabaro et al. 2007). A temperatura média anual varia de 20 a 22°C e a precipitação média anual oscila entre 1.300 mm e 1.700 mm (Rodrigues et al. 2003; Uetanabaro et al. 2007).

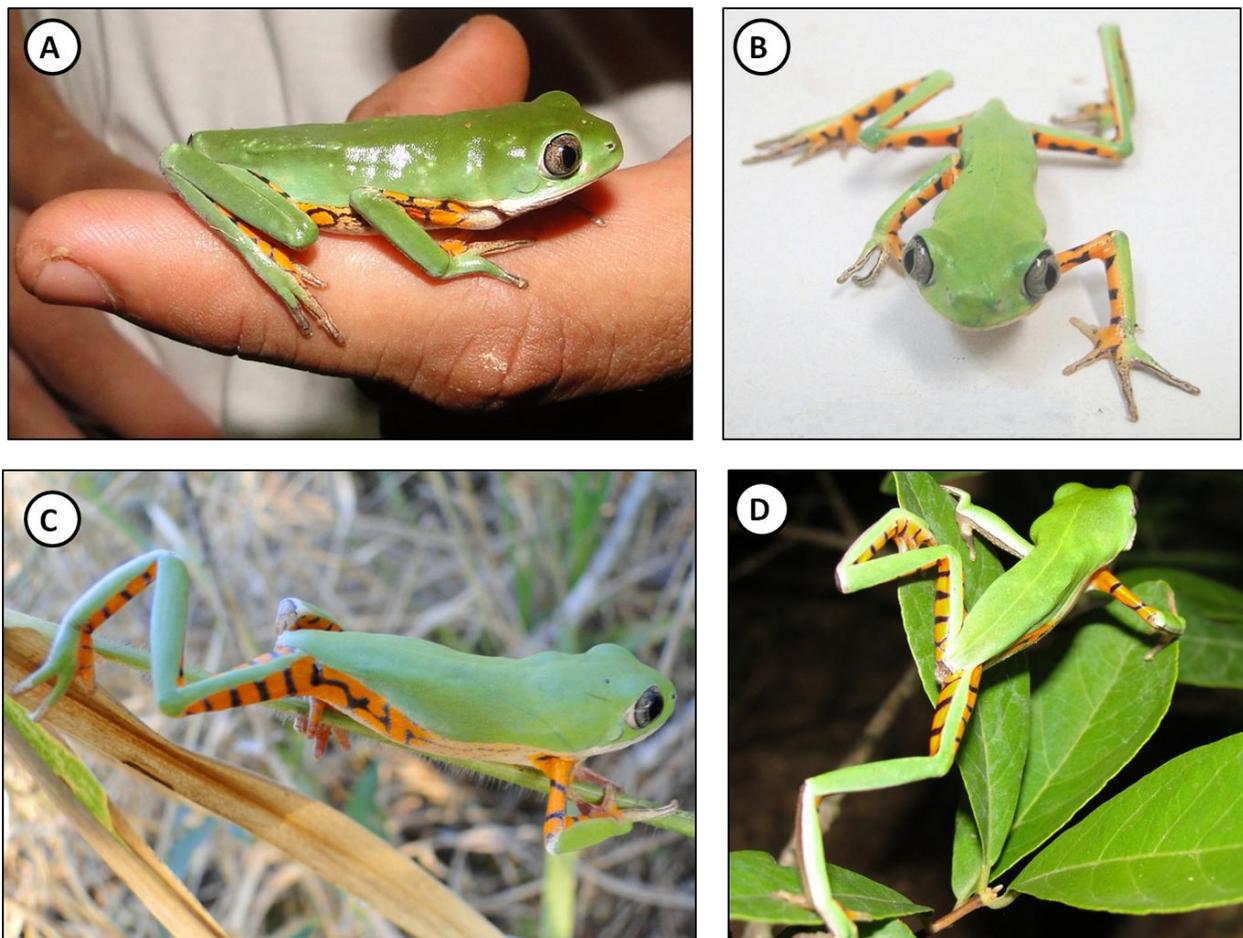


Fig. 1. Imagens de adultos de *Phyllomedusa azurea*. A) Imagem de um indivíduo macho da espécie. B) Imagem frontal, com as marcas naturais dos membros anteriores e posteriores a

mostra. C) Imagem lateral, em que o indivíduo está em movimento, com os flancos alaranjados e barras verticais escuras à mostra. D) Imagem do dorso de um indivíduo em movimento. Fotos: S. B. Rocha.

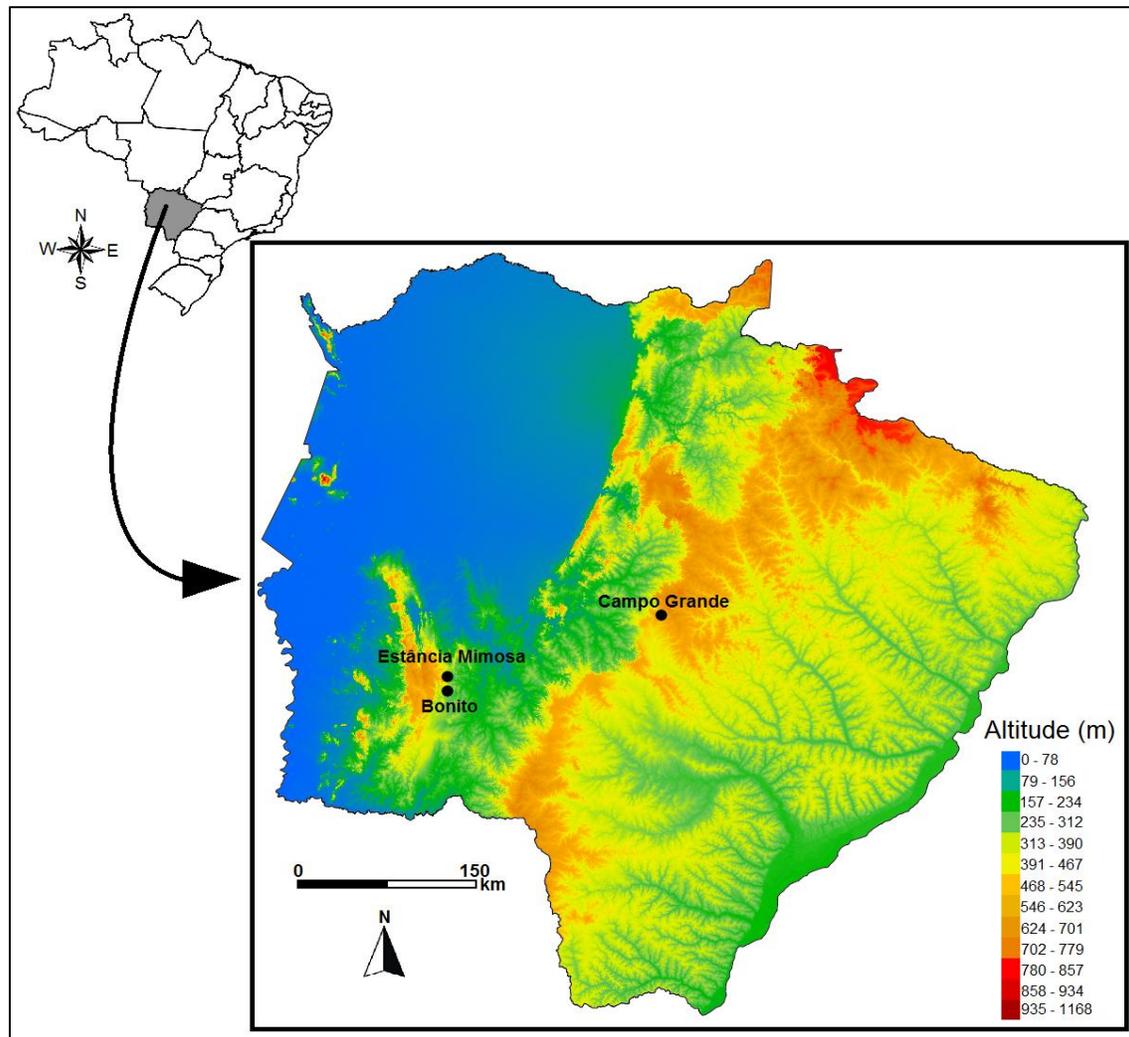


Fig. 2. Localização da área de captura dos indivíduos de *Phyllomedusa azurea* (Estância Mimosa Ecoturismo), Município de Bonito, Mato Grosso do Sul e a altitude (m). Fonte: Weber et al. 2004.

Processo laboratorial

Os indivíduos de *P. azurea* (N = 15) foram mantidos em um terrário (90 x 60 x 60 cm), no Laboratório de Zoologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Campo Grande (Fig. 3). O terrário foi construído com uma área com água, terra e vegetação apropriada (com até 50 cm de altura). Mantivemos o ambiente úmido com equipamento, sempre que possível, para manter a umidade relativa do terrário em no mínimo 50%. A umidade relativa e a temperatura do terrário foram registradas ao longo de todo o período do trabalho laboratorial, por um termo-higrômetro (precisão de 1%). Os indivíduos de *P. azurea* em cativeiro foram alimentados *ad libitum*, com espécimes vivos de artrópodes das ordens Diptera, Araneae e Hymenoptera, itens alimentares mais consumidos pela espécie em áreas de Cerrado (Freitas et al. 2008).

De modo a causar menos estresse aos animais, não mantivemos os 15 indivíduos de *P. azurea* juntos em cativeiro. Primeiramente, mantivemos um grupo com sete indivíduos em cativeiro. Após nove semanas, capturamos mais oito indivíduos e soltamos os indivíduos do primeiro lote nas mesmas lagoas onde foram capturados. Mantivemos os oito indivíduos do segundo lote em cativeiro por outras nove semanas. Após esse período, soltamos os indivíduos desse último lote nas lagoas de onde foram capturados.

Uma vez que *P. azurea* apresenta marcas naturais em diferentes partes de seu corpo (Fig. 1), optamos pelas marcas do flanco para individualização dos animais, pois consideramos mais perceptíveis e conspícuas. Capturamos imagens do flanco direito dos indivíduos semanalmente, durante nove semanas em busca de alterações temporais no padrão de manchas. Para captura das imagens das laterais desses indivíduos, imobilizamos seus membros anteriores e posteriores (para evitar a movimentação do animal). Capturamos as imagens com uso de uma câmera digital com resolução 9.1 megapixels. Depois de

fotografados, obtivemos a massa corpórea dos indivíduos de modo a monitorar o ganho ou perda de massa dos animais. Fizemos também a sexagem dos indivíduos, observando algumas características como calosidade nupcial, evidentes nos machos em época reprodutiva e massa corpórea, que apresenta maior valor nas fêmeas (Caramaschi 2006; Freitas et al. 2008; Luna et al. 2012). Derivado desse procedimento, obtivemos um banco de dados e imagens dos indivíduos. Utilizamos o programa *ImageJ* (Rasband 1997) para transformar as imagens em preto e branco, de modo a evidenciar as marcas naturais individuais.

Analizamos todas as marcas que se encontravam na região axilar, flanco e região proximal do membro posterior (Fig. 4). Não consideramos as marcas causadas por traumas físicos (cicatrizes), pois estas podem desaparecer com o tempo (Fig. 5). Comparamos visualmente as imagens dos indivíduos ao longo das semanas. Um indivíduo de *P. azurea* foi depositado na Coleção Zoológica de Referência da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ZUFMS AMP03120).



Fig. 3. Imagens do terrário em que foram mantidos os indivíduos de *Phyllomedusa azurea* para avaliar a permanência do padrão de manchas nos indivíduos ao longo de nove semanas. A) Terrário visto de perfil; B) Terrário visto de cima; C) Indivíduo de *P. azurea* camuflado em uma das plantas do cativeiro (seta branca). Fotos: S. B. Rocha.

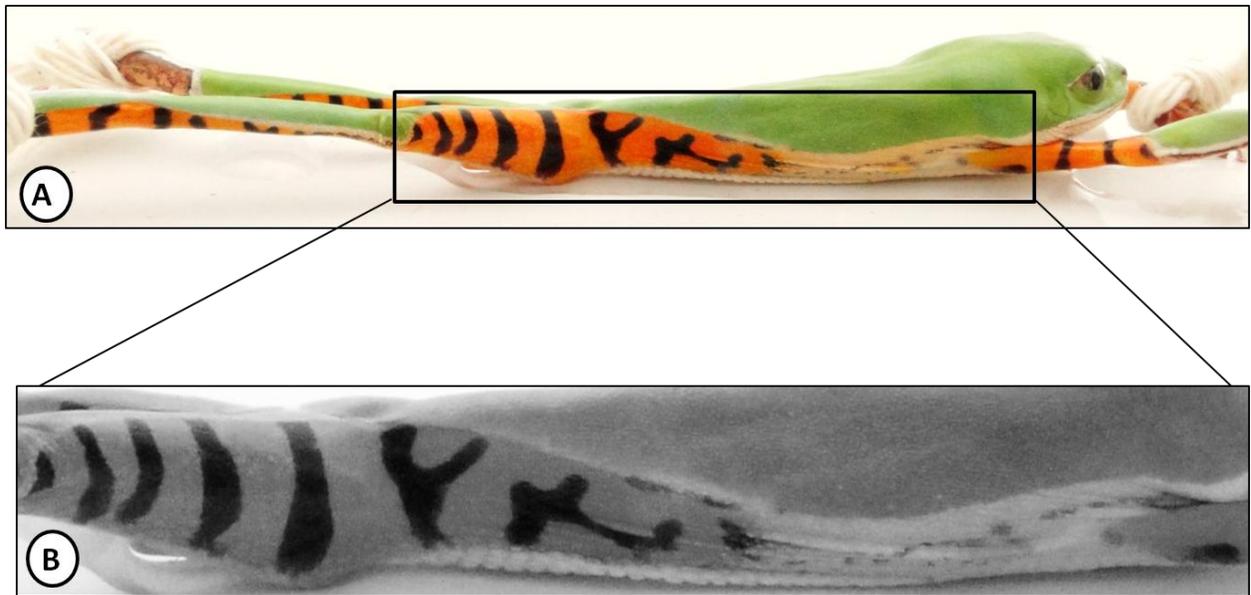


Fig. 4. Flanco direito de *Phyllomedusa azurea* utilizado para individualização dos animais. A) Indivíduo imobilizado durante a captura das imagens; o retângulo na imagem contorna a área do flanco utilizada para identificação dos indivíduos. B) Flanco do mesmo indivíduo modificado para coloração em preto e branco. Foto: S. B. Rocha.

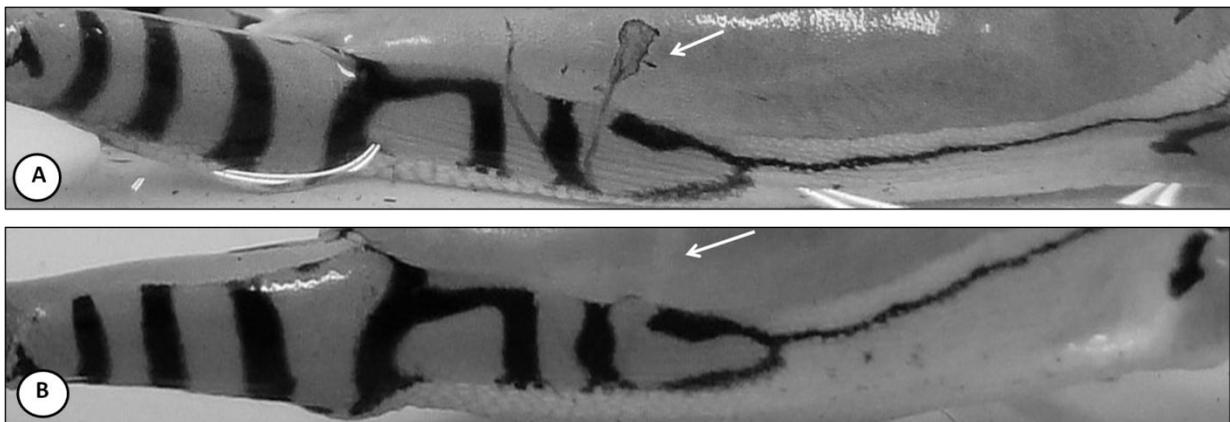


Fig. 5. Desaparecimento de trauma físico (seta branca) em um dos indivíduos de *Phyllomedusa azurea*, durante período em cativeiro. A) Cicatriz em indivíduo na primeira semana em cativeiro. B) Após quatro semanas, a cicatriz não está mais presente no indivíduo. Fotos: S. B. Rocha.

Resultados

Mantivemos em cativeiro 12 machos e três fêmeas de *P. azurea*. Em média, a massa corpórea dos machos foi de 1,95 g (dp \pm 0.39) e das fêmeas foi de 3,08 g (dp \pm 0,63). Apesar dos cuidados com a alimentação dos indivíduos em cativeiro, eles apresentaram perda de peso, em média a massa corpórea dos animais reduziu 35% (dp \pm 11).

Verificamos que o padrão de manchas do flanco de *P. azurea* é único para cada indivíduo da espécie e, desse modo, pode ser utilizado para distingui-los (Fig. 6). Constatamos também que o formato das manchas do flanco dos indivíduos permaneceu constante ao longo de nove semanas. Verificamos apenas que a cor das marcas variou de tons mais escuros para tons mais claros de preto, na maioria dos indivíduos ao longo do experimento (Fig. 7). Contudo, tal variação não atrapalhou o reconhecimento individual. A alteração na tonalidade das manchas pretas ocorreu a partir da primeira semana dos indivíduos em cativeiro.

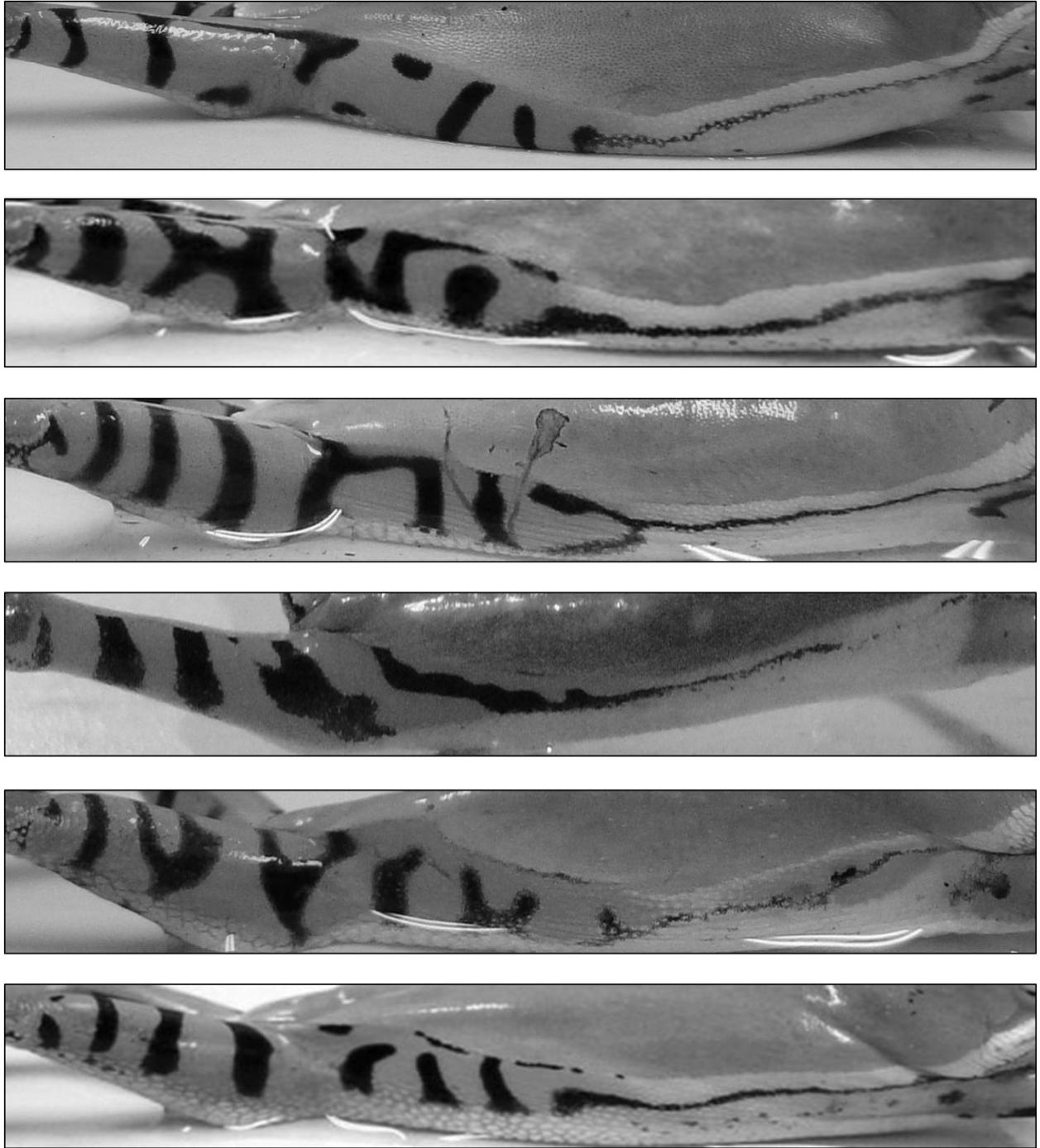


Fig. 6. Padrão de manchas do flanco direito de seis indivíduos diferentes de *Phyllomedusa azurea* mantidos em cativeiro.

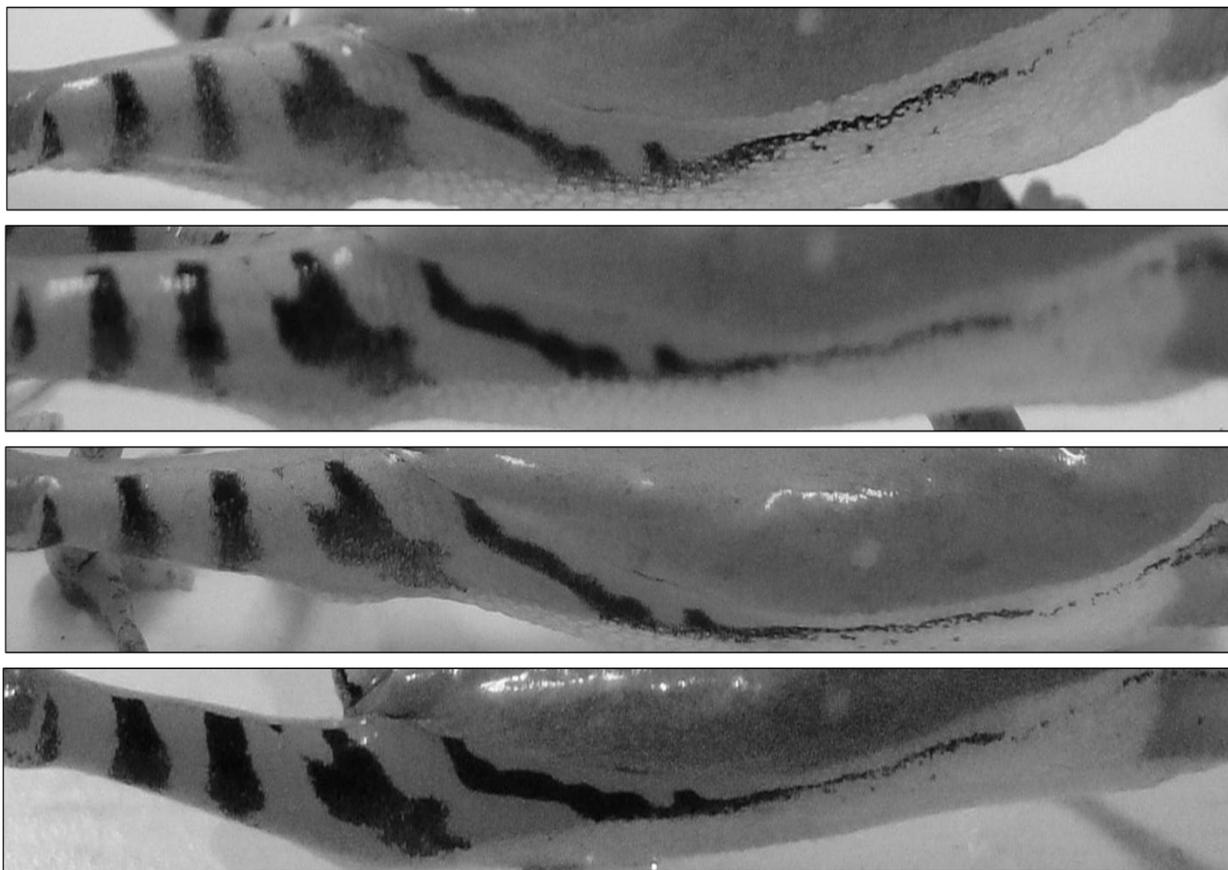


Fig. 7. Padrão de manchas do flanco direito do mesmo indivíduo de *Phyllomedusa azurea*, ao longo de quatro semanas em cativeiro. O formato das marcas naturais do indivíduo permanece igual, apenas a mancha preta varia de tons mais escuros para tons mais claros.

Discussão

Verificamos que os adultos de *P. azurea* podem ser identificados por meio do MIF, visto que os indivíduos são distinguíveis por suas marcas naturais, e o padrão de manchas avaliado não se altera ao longo do tempo. Esta técnica de identificação individual também tem se mostrado eficaz na identificação de outros hílideos (Miranda et al. 2005, Oliveira et al. 2012; Sousa 2012; Ramalho et al. 2013). No caso dos hílideos arborícolas, como *P. azurea*, essa

técnica se mostra mais adequada que a amputação de artelho, em virtude da limitação do corte da falange.

A eficácia do MIF também foi registrada para outras espécies de anuros, como para uma espécie do gênero *Phyllomedusa* (Oliveira et al. 2012). Durante estudo sobre história natural de *P. megacephala* (grupo *hypocondrialis*, o mesmo que *P. azurea*), os autores utilizaram duas formas de marcação individual na população: amputação de artelho e o MIF (Oliveira et al. 2012). Ao longo de três anos de estudo, o padrão de manchas dos flancos dos indivíduos não se alterou e o MIF permitiu um eficiente reconhecimento individual, sem causar qualquer dano físico aos indivíduos marcados (Oliveira et al. 2012). Em outro estudo, semelhante ao nosso, indivíduos de *Litoria genimaculata* (Hylidae) foram mantidos em cativeiro e os autores também constataram que cada indivíduo possui um padrão dorsal de manchas, o qual permite identifica-los (Kenyon et al. 2010). Os autores também confirmaram a permanência das manchas do dorso dos indivíduos por um período de nove semanas, o qual variou somente em sua coloração, de castanho para verde (Kenyon et al. 2010).

A permanência das marcas naturais também foi registrada para o anuro *Pseudis cardosoi* (Hylidae; Miranda et al. 2005). Neste estudo, para estimar o tamanho populacional da espécie, os autores utilizaram como forma de marcação individual somente o MIF e confirmaram a eficácia da técnica (Miranda et al. 2005). O padrão de manchas das coxas dos indivíduos não se alterou ao longo de 10 meses e, desse modo, os indivíduos foram identificados inequivocamente em todas as vezes que foram recapturados (Miranda et al. 2005).

A alteração na tonalidade das marcas naturais também foi registrada em *Scinax longilineus* (Hylidae; Del Lama et al. 2011). Buscando examinar a viabilidade da aplicação do MIF em pesquisas de campo, os autores capturaram indivíduos de *S. longilineus* durante três

meses e os marcaram por meio de amputação de artelho e do MIF (Del Lama et al. 2011). Neste estudo, os autores observaram que o padrão de manchas dos flancos do anuro *S. longilineus* não se alterou. Constataram apenas uma variação de tons mais claros para escuros nas manchas, mas esta alteração não atrapalhou no reconhecimento dos indivíduos (Del Lama et al. 2011). Verificaram, também, que o uso das marcas naturais para individualização dos animais é eficiente para ser aplicado em campo, permitindo a identificação imediata do indivíduo (Del Lama et al. 2011).

Mais estudos devem ser desenvolvidos utilizando a técnica de individualização através de marcas naturais, de modo a validar o método para outras espécies de anfíbios e evitar o uso de marcações invasivas. Sugerimos também que outros estudos sejam desenvolvidos com *P. azurea* em outras localidades (devido a sua ampla distribuição), de modo a corroborar a eficácia do MIF na individualização de *P. azurea* no Brasil.

Concluimos, portanto, que o MIF é adequado para ser utilizado em estudos que visam individualizar adultos de *P. azurea* na região estudada. Este é o primeiro estudo em que se testou a eficácia do método de identificação fotográfica com *Phyllomedusa azurea*.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal (UFMS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Aos técnicos de laboratório da UFMS T. Sinani, L. Piatti e R. Magalhães pelo auxílio. Ao proprietário e a toda a equipe de funcionários da Estância Mimosa Ecoturismo. Ao IBAMA pela autorização de captura e acompanhamento dos animais em cativeiro (n° 36897-1) e ao Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS (Processo n° 479/2012).

Referências Bibliográficas

- Arntzen, J. W., I. B. J. Goudie, J. Halley, R. Jehle. 2003. Cost comparison of marking techniques in long-term population studies: PIT-tags versus pattern maps. *Amphib. Reptil.* 25:305-315.
- Beausoleil, N. J., D. J. Mellor, K. J. Stafford. 2004: Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals. Department of Conservation, Wellington, New Zealand. 147 pp.
- Boggiani, P. C., T. R. Fairchild, A. M. Coimbra. 1993. O grupo Corumbá (Neoproterozoico-Cambriano) na região central da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul (Faixa Paraguai). *Rev. Bras. de Geo.* 23(3):301-305.
- Bradfield, K. S. 2004. Photographic identification of individual Archey's frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings. DOC Science Internal Series 191. Department of Conservation. Wellington, New Zealand. 36 pp.
- Calderon, L. A., R. M. Messias, R. P. Serrano, K. D. Zaqueo, E. S. Souza, S. S. Nienow, J. L. Cardoz-Filho, R. Diniz-Sousa, K. Delaix-Zaqueo, R. G. Stabeli. 2009. Amphibia, Anura, Hylidae, Phyllomedusinae, *Phyllomedusa azurea*: Distribution extension and geographic distribution map. *Check List*, 5(2):317–319.
- Campbell, T. S., P. Irvin, K. R. Campbell, K. Hoffmann, M. E. Dykes, A. J. Harding, S. A. Johnson. 2009. Evaluation of a new technique for marking anurans. *Appl. Herpetol.* 6:247–256.
- Caorsi, V. Z., R. R. Santos, T. Grant. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South Am. J. Herpetol.*, 7(2):79-84.

- Carafa, M., and M. Biondi. 2004. Application of a method for individual photographic identification during a study on *Salamandra salamandra gigliolii* in central Italy. *Ital. J. Zoolog.* 2 (Supplement), pp 181-184.
- Caramaschi, U. 2006. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescrção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64 (2):159-179.
- Clemas, R. J., J. M. Germano, R. Speare, P. J. Bishop. 2009. Use of three individual marking methods in Australian frogs (Genus: *Litoria*) with notes on placement of Visible Implant Alphanumeric tags. *N. Z. Nat. Sci.* 34:1-7.
- Corrêa, D. T., M. Guimarães, T. A. L. Oliveira, M. Martins, R. J. Sawaya. 2013. Toe-clipping vital to amphibian research. *Nature*. 493:305.
- Courtois, E. A., K. Pineau, B. Villette, D. S. Schmeller, P. Gaucher. 2012. Population estimates of *Dendrobates tinctorius* (Anura: Dendrobatidae) at three sites in French Guiana and first record of chytrid infection. *Phyllomedusa*. 11(1):63–70.
- Del Lama, F., M. D. Rocha, M. A. Andrade, L. B. Nascimento. 2011. The use of photography to identify individual tree frogs by their natural marks. *South Am. J. Herpetol.* 6(3):198-204.
- Donnelly, M. A., and C. Guyer. 1994. Estimating population size. In Heyer, W. R., M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek, M. S. Foster (eds.), *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians*, pp 183-205. Smithsonian Institution Press, London.
- Duellman, W. E. 1968. The genera of *Phyllomedusine* frogs (Anura: Hylidae). University of Kansas Publications. *Museum of Natural History*, 18:1-10.

- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell, W. C. Wheeler. 2005. Revisão sistemática da rã da família Hylidae, com especial referência a Hylinae: análise filogenética e revisão taxonômica. *Boletim do Museu Americano de História Natural*, 294:1-240.
- Freitas, E. B., C. B. De-Carvalho, R. G. Faria, B. C. Batista, C. C. Batista, W. A. Coelho, A. Bocchiglieri. 2008. Nicho ecológico e aspectos da história natural de *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae, Phyllomedusinae) no Cerrado do Brasil Central. *Biota Neotrop.* 8 (4):101-110.
- Frost, D. R. 2013. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gamble, L., S. Ravela, K. McGarigal. 2008. Multi-scale features for identifying individuals in large biological databases: an application of pattern recognition technology to the marbled salamander *Ambystoma opacum*. *J Appl Ecol.* 45:170-180.
- Kenyon, N., A. D. Phillott, R. A. Alford. 2009. Evaluation of the photographic identification method (PIM) as a tool to identify adult *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetol. Conserv. Biol.* 4(3):403-410.
- Kenyon, N., A. D. Phillott, R. A. Alford. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria Genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetol. Conserv. Biol.* 5(1):126-131.
- Knox, C. D., A. Cree, P. J. Seddon. 2012. Accurate identification of individual geckos (*Naultinus gemmeus*) through dorsal pattern differentiation. *N. Z. J. Ecol.* 37(1):0-0.

- Lucas, E. M., V. B. Fortes, P. C. A. Garcia. 2010. Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862: Distribution extension to southern Brazil. Check List. 6:164-166.
- McCarthy, M. A., and K. M. Parris. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. J. Appl. Ecol.. 41:780-786.
- Mellor, D. J., N. J. Beausoleil, K. J. Stafford. 2004. Marking amphibians, reptiles and marine mammals: animal welfare, practicalities and public perceptions in New Zealand. Department of Conservation. Wellington, 55 pp.
- Miranda, T., M. Ebner, M. Solé, A. Kwet. 2005. Estimativa populacional de *Pseudis cardosoi* (Anura, Hylidae), com emprego de método fotográfico para reconhecimento individual. Porto Alegre, Bioc.. 13(1):49-54.
- Oliveira, F. F. R., P. A. G. Nogueira, P. C. Eterovick. 2012. Natural history of *Phyllomedusa megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae) in southeastern Brazil, with descriptions of its breeding biology and male territorial behavior. J. Nat. Hist.. 46(1-2):117-129.
- Prado, V. H., R. E. Borges, F. R. Silva, T. T. Tognolo, D. C. Rossa-Feres. 2008. Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea*: Distribution extension. Check List. 4(1):55-56.
- Ramalho, W. P., R. F. Jorge, L. B. Baiocchi, A. P. Peña, R. A. P. Pires. 2013. Study on the population structure of the paradoxical frog, *Pseudis bolbodactyla* (Amphibia:Anura:Hylidae), using natural markings for individual identification. Zoologia. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702013005000001>.
- Rasband, W. S. 1997. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>.

- Reisser, J., M. Proietti, P. Kinas, I. Sazima. 2008. Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss. *Endang, Species Res.* 5:73–82.
- Ribeiro, J. C. C. T. 2009. Aplicação do método de captura-recaptura de larvas fotoidentificadas para avaliação de parâmetros demográficos: comparação entre anura e caudata. Dissertação de mestrado em Biologia da Conservação. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal, Lisboa, Portugal. 85 pp.
- Ribeiro, J., and R. Rebelo. 2011. Survival of *Alytes cisternasii* tadpoles in stream pools: a capture-recapture study using photo-identification. *Amph. Reptil.* 32:365-374.
- Rodrigues, D. J., F. S. Lopes, M. Uetanabaro. 2003. Padrão reprodutivo de *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre*, 93(4):365-371.
- Rodrigues, D. J., M. Uetanabaro, F. S. Lopes. 2007. Breeding biology of *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 and *P. sauvagii* Boulenger, 1882 (Anura) from the Cerrado, Central Brazil. *J. Nat. Hist.* 41(29–32):1841–1851.
- Santos, M. A., E. D. Lutzer, R. R. Laps. 2010. Use of natural marks to identify individual *Bokermannohyla hylax* (Amphibia: Anura). *IRCF Reptil. & Amph.* 17(4):338-241.
- Schmidt, K., e L. Schwarzkopf. 2010. Visible implant elastomer tagging and toe-clipping: effects of marking on locomotor performance of frogs and skinks. *Herpetolog. J.* 20:99–105.
- Sousa, V. T. T. 2012. Efeitos do canto de anúncio e do tamanho corporal no espaçamento entre machos em agregações de *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo. 42 pp.

- Uetanabaro, M., F. L. Souza, P. L. Filho, A. F. Beda, R. A. Brandão. 2007. Anfíbios e répteis do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Biota Neotrop.* 7(3):279-289.
- Uetanabaro, M., C. P. A. Prado, D. J. Rodrigues, M. Gordo, Z. Campos. 2008. Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno. Editora UFMS e UFMT, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 196 pp.
- Weber, E., H. Hasenack, C. J. S. Ferreira. 2004. Adaptação do modelo digital de elevação do SRTM para o sistema de referência oficial brasileiro e recorte por unidade da federação. Porto Alegre, UFRGS Centro de Ecologia. ISBN 978-85-63843-02-9. Disponível em: <HTTP://www.ecologia.ufrgs.br/labgeo>.
- Yoshizaki, J., K. H. Pollock, C. Brownie, R. A. Webster. 2009. Modeling misidentification errors in capture–recapture studies using photographic identification of evolving marks. *Ecology*. 90(1):3–9.

- Normas do periódico *Herpetological Review*

Standard Manuscripts (including Articles, Techniques, Herpetological Husbandry, Herpetological History, Points of View, Letters to the Editor)

Style and Formatting

1. Double-space the entire ms., including the lit cites.
2. Do NOT include an abstract, as HR does not publish these.
3. Do pay careful attention to proper lit cite format, as this is typically the biggest problem area and only results in publication delays and aggravated editors.
4. If English is not your primary language and you think your manuscript could benefit from a pre-review process, please check this link to SSAR's Presubmission Manuscript Review service (<http://www.ssarherps.org/pages/presub.html>).
5. Illustrations should be discussed in the text and numbered sequentially with Arabic numbers. References to illustrations should be placed in parentheses at the end of sentences. (Also, please read "Graphics Materials/Art Files" below for details concerning how to send figures).

Editorial Conventions

1. For legends, use Fig. 1, Table 3 (no bolding, small caps, and Fig. rather than Figure).
2. 0800 h and 24 h (note spacing).
3. Temperatures as 24°C (note spacing).
4. Sample size use upper case N (not italicized), and N = 7 (note spacing).
5. Literature citation for HR is Herpetol. Rev.
6. Spacing items: 78 ± 2.6; P = 0.56; 6-20%; mid-April; 0.5 m
7. Alphabetize references within a series, separated by a semi-colon: (Aaronsen 1955; Burger 1923; Parker 1972).
8. Spell out all state/province names (e.g., Arizona, not AZ).
9. Include country in all postal addresses (e.g., Berkeley, California 94720, USA).
10. Avoid use of personal/professional titles in Acknowledgments (e.g., We thank John W. Jones rather than Dr. John W. Jones).
11. A period should be followed by a single space.
12. Regarding proper use of dashes: Use a single dash (-) for hyphens. Use a n-dash (–) to indicate a range (such as page numbers, or specimen series; e.g., pp. 21–25) Use a m-dash (—) to show a break in a sentence, or to set off sections of a manuscript. Example: Methods.—
13. For GPS coordinates, preferred format is decimal degrees (e.g., XX.XXXX°N, XXX.XXXX°W). Note spacing and punctuation.
14. Examples of proper literature citation formats:

For an article in a journal or serial publication.

Smith, J. W. 1988. Distributional notes on amphibians of eastern Texas. *Texas J. Sci.* 42:12-14.

For a book or monograph.

Conant, R., and J. T. Collins. 1991. A Field Guide to Reptiles and Amphibians of Eastern and Central North America. 3rd ed. Houghton Mifflin Co., Boston, Massachusetts. 450 pp.

For an article or chapter within a book.

Auffenberg, W. L., and W. W. Milstead. 1965. Reptiles in the Quaternary of North America. In H. E. Wright, Jr., and D. G. Frey (eds.), *The Quaternary of the United States*, pp. 557-568. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.

For further guidelines, authors should consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (6th edition, 1994, Council of Biology Editors, Inc., 11 South LaSalle Street, Suite 1400, Chicago, Illinois 60603, USA).

Animal Care and Permits: The Society feels strongly that all animals used in research be treated humanely and ethically. The Society has [published a guide](#) (jointly issued by ASIH and HL) for appropriate treatment of amphibians and reptiles used in field research, and all contributors to HR are expected to comply with these guidelines. In addition, HR requires a statement indicating that authors have complied with all applicable institutional Animal Care guidelines, and that all required state and federal permits have been obtained. This statement should be included with your manuscript submission cover letter and should also be referenced in the ms. "Acknowledgments."

Graphics Materials/Art Files: Illustrative material (e.g., tables, photographs, diagrams, etc.) should be sent with initial manuscript submissions as low-resolution digital files (as PDFs or JPEGs) or imbedded as figures within the ms. text file. Please do not send original figures at time of ms. submission. If your manuscript is accepted for publication, you will be asked to send these materials electronically. Download "Guidelines for Submission of Digital Art Files" in ([pdf](#)) or ([html](#)) for specific digital file requirements. Because HR is now published in full color, with color page charges waived for authors lacking publication funds, authors are encouraged to prepare all figures in color.

1 **Capítulo 2**

2 JOURNAL OF HERPETOLOGY

3 Uso de marcas naturais para estimativa de parâmetros populacionais de *Phyllomedusa*
4 *azurea* (Anura, Hylidae) em uma área de Cerrado

5 SABINE B. ROCHA^{1,2}, JOSÉ SABINO^{1,3}

6 ¹*Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas e da*
7 *Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.*

8 ²*Autor para correspondência. E-mail: sabineborges@hotmail.com*

9 ³*Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.*
10 *Laboratório de Biodiversidade e Conservação de Ecossistemas Aquáticos.*
11 *Universidade Anhanguera – Uniderp, Mato Grosso do Sul, Brasil.*

12

13 Left Running Head: S.B. Rocha e J. Sabino

14 Right Running Head: Parâmetros populacionais de *Phyllomedusa azurea*.

15

16 Resumo - Estudos populacionais permitem a obtenção de informações biológicas
17 aplicáveis à conservação da vida silvestre. Para *Phyllomedusa azurea* não há registros
18 de estudos populacionais. Este trabalho teve como objetivo quantificar os parâmetros
19 populacionais sobrevivência aparente e probabilidade de captura de *P. azurea* em um
20 período reprodutivo da espécie no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul.
21 Amostramos duas lagoas temporárias, entre outubro 2012 e março 2013. Utilizamos
22 como método de amostragem a busca ativa visual no período noturno. Capturamos
23 manualmente 177 indivíduos adultos de *P. azurea* (29 fêmeas e 148 machos), nas
24 duas lagoas amostradas, e os individualizamos por meio de fotografia de seus flancos,
25 onde se encontram as marcas naturais. Utilizamos o modelo de Cormack-Jolly-Seber
26 (CJS). Recapturamos somente machos ($n = 20$). A sobrevivência aparente dos
27 indivíduos machos variou entre as lagoas (23% na lagoa 1 e 41% na lagoa 2). A
28 probabilidade de captura dos machos variou ao longo dos meses e entre as lagoas, em
29 média 39% para os indivíduos da lagoa 1 e 52% para os da lagoa 2. Verificamos que a
30 identificação por meio das marcas naturais, com registro fotográfico, se mostrou
31 eficiente para estudos com *P. azurea*. Sugerimos que futuros estudos populacionais
32 sejam desenvolvidos com a espécie, em maior escala temporal (ao longo dos anos) e
33 espacial (de paisagem).

34

35 *Palavras chave:* Individualização; Mato Grosso do Sul; Padrão de manchas;
36 Probabilidade de captura; Sobrevivência aparente.

37 O declínio de populações e perda de diversidade de anfíbios tem sido registrado
38 nos últimos anos e o grande obstáculo para reverter essa situação é a falta de estudos
39 para a maioria das espécies do grupo, no que diz respeito à história natural, ciclo de
40 vida, fisiologia e ecologia, principalmente em termos de dinâmica populacional (Young
41 et al., 2001; Funk et al., 2003; Uetanabaro et al., 2008). Devido à falta de estudos
42 populacionais com anfíbios, muitas vezes não há tempo para prevenir e inferir a causa
43 dos decréscimos de populações, e muitos declínios ou até extinções de espécies
44 podem ocorrer sem serem detectados (Funk et al., 2003).

45 Dentre os fatores responsáveis pelo declínio das populações de anfíbios, a
46 perda ou alteração dos ambientes naturais é uma das mais alarmantes e realizadas
47 frequentemente no Cerrado e Pantanal, principais domínios vegetais do Estado de
48 Mato Grosso do Sul (Young et al., 2001; IBGE, 2004; Klink e Machado, 2005;
49 Uetanabaro et al., 2008). Consequentemente, as espécies endêmicas dos locais que
50 vêm sofrendo impactos oriundos das ações humanas e que requerem condições
51 ambientais específicas para sua sobrevivência, encontram-se relativamente mais
52 ameaçadas que as demais (Primack, 2002).

53 Os anfíbios são elementos importantes nas cadeias ecológicas, principalmente
54 como controladores de insetos e outros invertebrados (Bastos et al., 2003).
55 Apresentam diversas substâncias em sua pele que tem atraído atenção de laboratórios
56 farmacêuticos, como é o caso de espécies do gênero *Phyllomedusa* (Bastos et al.,
57 2003; Kückelhaus et al., 2009). Desse modo, o desenvolvimento de pesquisas com os
58 anuros podem possibilitar a descoberta de novas substâncias que poderão atuar no

59 tratamento de doenças (Bastos et al., 2003), bem como, estudos com as populações
60 desses anuros também são necessárias para auxiliar na preservação destes animais.

61 Estudos populacionais permitem a obtenção de diversas informações biológicas
62 importantes e aplicáveis à conservação da vida silvestre (Converse et al., 2005).
63 Aqueles que utilizam modelos de marcação e recaptura têm se mostrado eficientes
64 para estimar parâmetros demográficos, tal como tamanho populacional, taxa de
65 sobrevivência, probabilidade de captura, parâmetros importantes para identificar
66 tendências populacionais (Schimidt, 2003; Vasconellos, 2007).

67 O método de marcação e recaptura (MR) consiste na captura e marcação (ou
68 sistema de individualização) dos indivíduos, soltura e subsequente recaptura, uma ou
69 mais vezes (Donnelly e Guyer, 1994). Há diversos tipos de marcações que podem ser
70 utilizadas em anfíbios. Contudo, a única técnica permanente e não invasiva para
71 individualização do grupo é a identificação por marcar naturais (Bradfield, 2004;
72 Kenyon et al, 2009). Esse método foi utilizado pela primeira vez por herpetólogos em
73 meados de 1970, com duas espécies de salamandra (Honegger, 1978). Desde então, o
74 uso da técnica tem sido frequente e se mostrado eficaz tanto em estudos com répteis
75 (e.g., Honegger, 1978; Sazima, 1988; Knox et al., 2012) como em anfíbios (e.g.,
76 Honegger, 1978; Miranda et al., 2005; Gamble et al., 2008; Courtois et al., 2012). Uma
77 das formas de registrar as marcas naturais é por imagem fotográfica, também
78 conhecida como método de identificação fotográfica (MIF), ou foto-identificação (Mellor
79 et al., 2004; Gamble et al., 2008; Kenyon et al., 2010; Caorsi et al., 2012).

80 Alguns estudos que utilizam o MIF, ainda identificam os indivíduos recapturados
81 por meio da comparação visual das imagens das marcas naturais (Sazima, 1988;

82 Miranda et al., 2005; Courtois et al., 2012). Contudo, a identificação visual das imagens
83 pode ser difícil, trabalhosa e lenta, além de tender a erros e, desse modo, requer
84 treinamento do observador (Ribeiro, 2009; Souza, 2010). Com o avanço da tecnologia,
85 programas que reconhecem padrões em imagens foram desenvolvidos e estes podem
86 ser utilizados em associação ao MIF (Kenyon et al., 2009), de modo a minimizar erros
87 na identificação dos animais. Esses programas são considerados confiáveis e possuem
88 alta precisão de reconhecimento, diminuindo o tempo que seria necessário para
89 comparar visualmente as imagens das marcas naturais (Kenyon et al., 2009).

90 O Brasil é o país com a maior diversidade de anfíbios, com mais de 940
91 espécies registradas, a maioria anuros (Segalla et al., 2012). Aproximadamente 38%
92 dos integrantes da ordem Anura registradas atualmente no Brasil pertencem à família
93 Hylidae, animais popularmente conhecidos como pererecas (Segalla et al., 2012).
94 *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 é uma perereca que possui hábito noturno e
95 arborícola (Caramaschi e Cruz, 2002; Freitas et al., 2008; Uetanabaro et al., 2008).
96 Poças e lagoas temporárias em áreas abertas, com predomínio de vegetação herbácea
97 e arbórea, são utilizadas como sítio reprodutivo pela espécie (Norman, 1994; Prado et
98 al., 2005; Freitas et al., 2008).

99 No Brasil, *P. azurea* tem ocorrência conhecida para o Pantanal e Cerrado, nos
100 Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Minas Gerais e São
101 Paulo, bem como no Distrito Federal (Caramaschi, 2006; Prado et al., 2008). Também
102 foi registrada na transição do Cerrado com Floresta Amazônica, em Rondônia e em
103 área de Mata Atlântica, em Santa Catarina (Calderon et a., 2009; Lucas et al., 2010).

104 Sua distribuição também inclui as regiões de Chaco no leste da Bolívia, Paraguai e
105 Norte da Argentina (Caramaschi, 2006).

106 *Phyllomedusa azurea* apresenta coloração verde no dorso (que varia de tons mais
107 escuros a mais claros, dependendo da cor do substrato que se encontra) e o seu
108 ventre é branco/creme. As laterais de seu corpo e parte interna de seus membros
109 apresentam barras verticais escuras que contrastam com um fundo vermelho-
110 alaranjado (Caramaschi, 2006; Uetanabaro et al., 2008; Lucas et al., 2010).

111 Ainda são escassos os estudos populacionais com anfíbios no Brasil (e.g., Biavatti,
112 2006; Hiert, 2008; Vaconsellos e Coli, 2009). Para *Phyllomedusa azurea* não há
113 registros desse tipo de estudo, inclusive ainda são deficientes os dados quanto ao seu
114 status de conservação (IUCN, 2013). Este trabalho teve como objetivo quantificar os
115 parâmetros populacionais (sobrevivência aparente e probabilidade de captura) de
116 *Phyllomedusa azurea* ao longo de um período reprodutivo da espécie no Município de
117 Bonito, Mato Grosso do Sul.

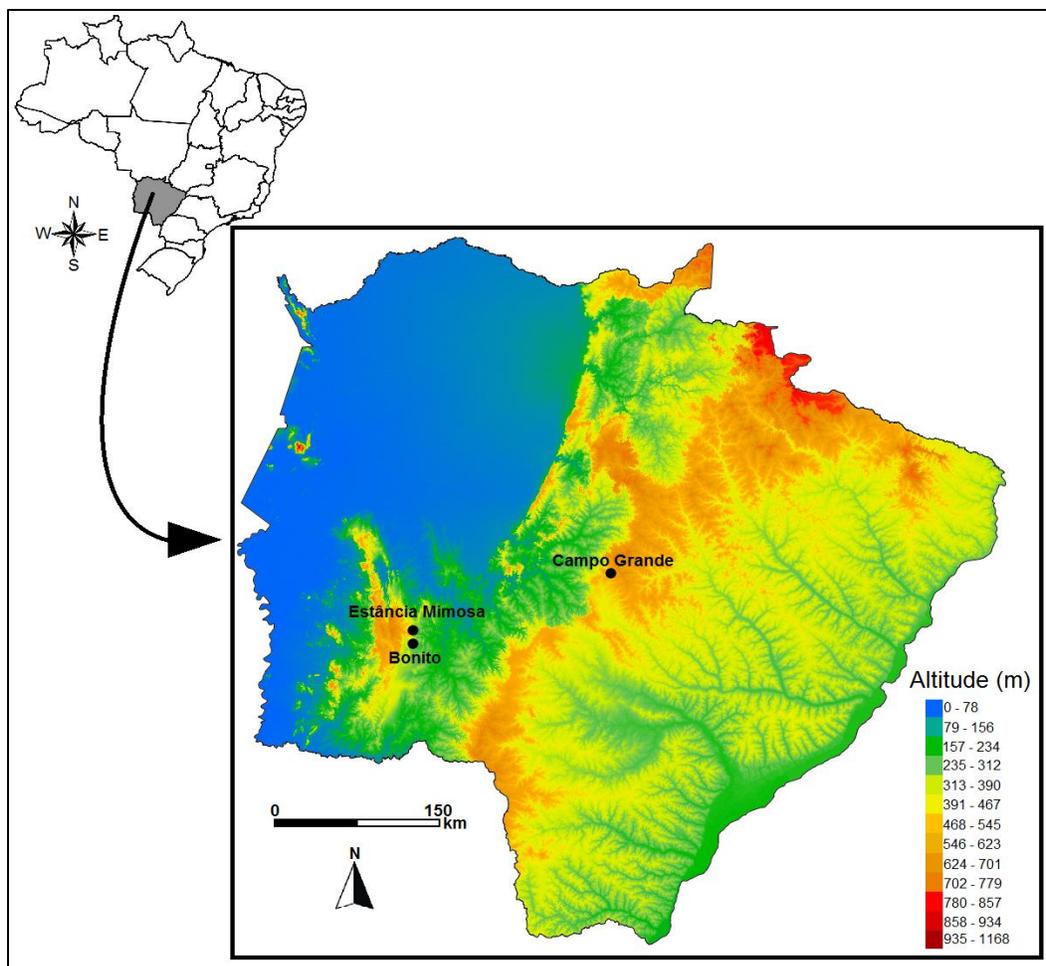
118

119 **Material e Métodos**

120 O presente estudo foi desenvolvido em uma propriedade particular, denominada
121 Estância Mimosa Ecoturismo, no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul
122 (20.981469°S, 56.515680°W, datum WGS 84). A área está localizada a 26 km ao norte
123 da cidade de Bonito e está inserida no Planalto da Bodoquena, na região sudoeste do
124 Estado, borda da porção sul do Pantanal (Fig. 1). A Serra da Bodoquena está sob
125 influência do Cerrado e suas variações (cerradão, campo cerrado e campo limpo), bem

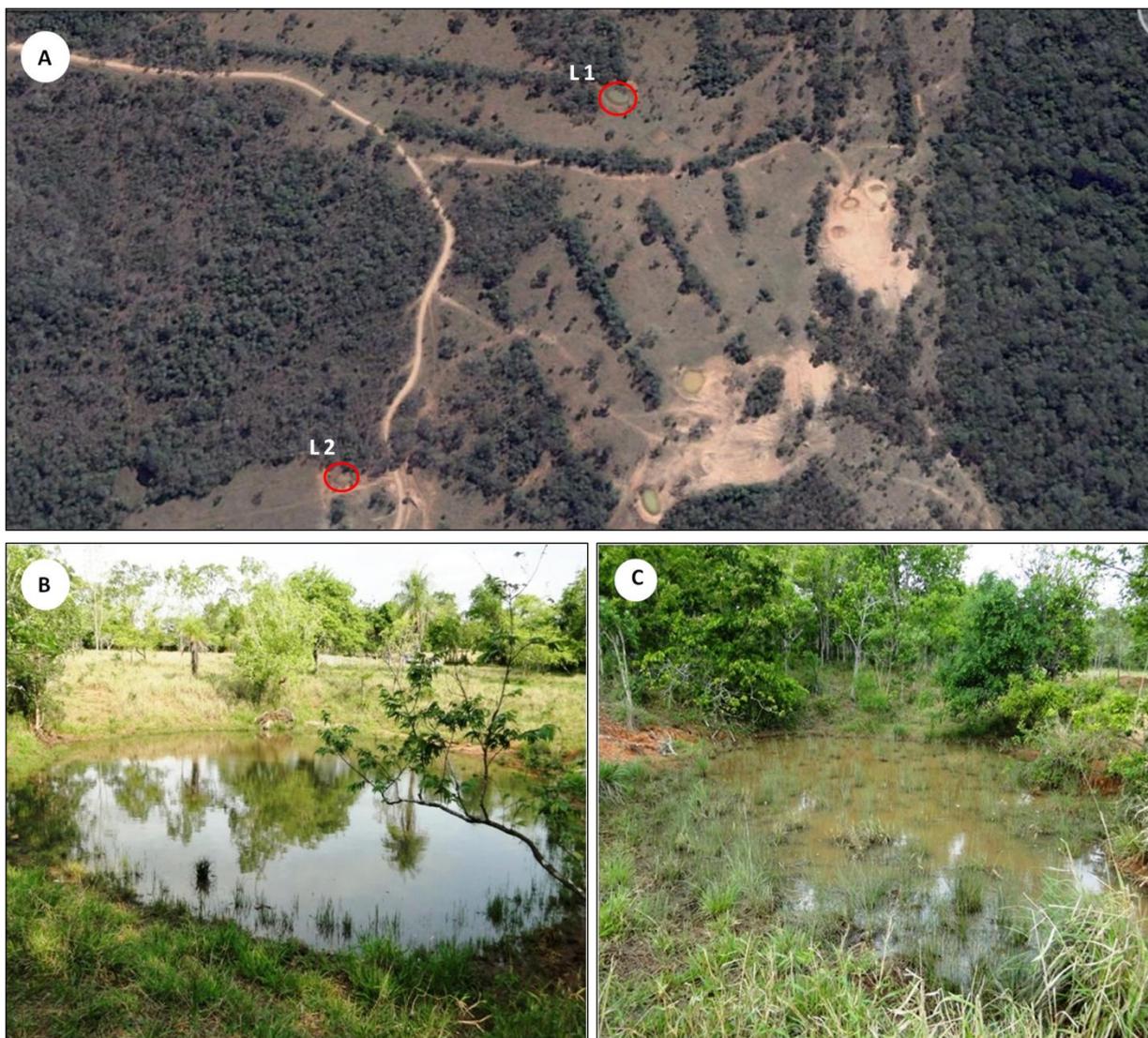
126 como de florestas estacionais (Uetanabaro et al., 2008). Nos meses de verão, o clima
127 da região é quente e úmido e no inverno é frio e seco (Uetanabaro et al., 2008). A
128 maior incidência de chuvas ocorre entre outubro e abril, e os meses de maio a
129 setembro são marcados por período de seca (Rodrigues et al., 2003; Uetanabaro et al.,
130 2007). A temperatura média anual varia de 20 a 22 °C e a precipitação média anual
131 oscila entre 1.300mm e 1.700 mm (Rodrigues et al., 2003).

132 A área da propriedade em que o estudo foi desenvolvido delimita-se ao sul pelo Rio
133 Mimoso e apresenta uma série de lagoas temporárias, a maioria delas artificiais,
134 formadas com a finalidade de conter as águas das chuvas e estocar água para o gado.
135 Essas lagoas temporárias são habitats comuns de *P. azurea* na região (Rodrigues et
136 al., 2007). Amostramos duas lagoas temporárias na área (Fig. 2). A lagoa 1
137 (20.969928°S, 56.514236°W, datum WGS 84) apresenta circunferência de
138 aproximadamente 50 m e está circundada por cerca de cinco lagoas temporárias. A
139 lagoa 2 (20.972944°S, 56.516081°W, datum WGS 84) apresenta circunferência de
140 aproximadamente 35 m e está isolada das demais lagoas; o corpo d'água mais próximo
141 é um córrego, localizado a uma distância de aproximadamente 220 m. A distância entre
142 a lagoa 1 e lagoa 2 é de 385 m. Os dois corpos d'água amostrados apresentam
143 conexão com mata estacional. Lagoas conectadas à mata são propícias para o
144 encontro de *P. azurea*, uma vez que muitos dos indivíduos da espécie permanecem na
145 mata durante o dia e se deslocam para as lagoas no período noturno (Uetanabaro et
146 al., 2008). Entre as duas lagoas amostradas encontra-se a principal via que dá acesso
147 à sede da fazenda (Fig. 2).



148

149 Fig. 1 - Localização da área de estudo (Estância Mimosa Ecoturismo), Município de
 150 Bonito, Mato Grosso do Sul e altitude (m). Fonte: Weber et al., 2004.



151
152 Fig. 2 - Lagoas temporárias amostradas no presente estudo, na região da Serra da
153 Bodoquena, Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. A) Imagem de satélite em que
154 as duas lagoas estão circuladas em vermelho (altura 1.20 km); L1 = lagoa 1, L2 = lagoa
155 2. Fonte: Google Earth; B) Imagem da lagoa 1; C) Imagem da lagoa 2. Fotos: S. B.
156 Rocha.

157

158 Antes de iniciar as coletas dos dados de marcação e recaptura, fizemos um
159 estudo piloto em setembro 2012, de modo a testar a eficácia dos programas que
160 auxiliam no reconhecimento dos indivíduos recapturados. Coletamos 36 indivíduos de
161 *P. azurea* em diferentes lagoas na área de estudo e avaliamos diversos programas que
162 reconhecem padrões em imagens, tal como o I₃S (sigla em inglês para Interactive
163 Individual Identification System) em suas três versões, I₃S Manta, I₃S Contour e I₃S
164 Classic (3.0, Hartog e Reijns, 2011) e Wild-ID (Java 1.5, Bolger et al., 2012). Elegemos
165 o programa que se mostrou mais adequado para o tipo de padrão de manchas da
166 espécie estudada e que apresentou menor taxa de erro no reconhecimento dos
167 animais.

168 Os dados de marcação e recaptura foram obtidos em intervalos de
169 aproximadamente 20 dias, entre outubro 2012 e março 2013, meses de atividade
170 reprodutiva de *P. azurea* (Rodrigues et al., 2007). As duas lagoas amostradas (Fig. 2)
171 são utilizadas como sítio reprodutivo pela espécie. Amostramos uma lagoa por noite e
172 ao final das coletas, obtivemos sete amostras de cada lagoa, ao longo de seis meses
173 de amostragem.

174 O método de amostragem utilizado foi o de busca ativa visual no período
175 noturno, por dois pesquisadores, entre 2000 h e 2200 h. Este intervalo foi selecionado
176 por compreender o horário de maior atividade da espécie (Feitas et al., 2008). Durante
177 a busca ativa, percorremos um transecto na extensão marginal da lagoa (não nos
178 guiávamos pela vocalização dos indivíduos, assegurando que machos e fêmeas do
179 local tivessem a mesma chance de serem detectados). Capturamos os indivíduos
180 adultos manualmente e os acondicionamos em sacos plásticos umedecidos e,

181 posteriormente, os levamos à estação de trabalho instalada na área de estudo, para
182 registro de suas informações e marcação individual. Registramos o número de juvenis
183 capturados nas lagoas, de modo a verificar a sua abundância ao longo dos meses. Não
184 individualizamos os juvenis, pelo fato de suas marcas naturais não estarem formadas.

185 A individualização dos adultos de *P. azurea* foi feita por meio de fotografia dos
186 flancos dos indivíduos, onde se encontram as suas marcas naturais (Fig. 3). As
187 imagens foram capturadas com uma câmera fotográfica digital HX1 Sony, resolução
188 9.1 megapixel. De modo a evitar um erro comum cometido em estudos que utilizam o
189 MIF, relativo à qualidade da imagem, luminosidade, a estabilidade do ângulo
190 (Bensemer e Beneti, 2008; Ribeiro, 2009; Yoshizaki et al., 2009), padronizamos a
191 forma de captura das imagens, para todos os indivíduos. Montamos um suporte para
192 os animais, no qual são mantidos os seus membros dianteiros e traseiros imobilizados
193 por um barbante, visando minimizar o movimento do indivíduo durante a captura das
194 imagens de seus flancos. Para garantir boa luminosidade nas imagens, utilizamos uma
195 tenda difusora de luz (40 x 40 x 40 cm) e duas luminárias com lâmpadas fluorescentes,
196 de modo que uma luminária ficasse posicionada acima e outra ao fundo da tenda. Para
197 obter imagens detalhadas das marcas naturais e minimizar distorções, fotografamos os
198 indivíduos a uma distância de 3 cm da câmera, com tripé sempre posicionado a uma
199 altura de 18,5 cm. Para evitar erros na identificação dos animais, capturamos diversas
200 imagens do mesmo indivíduo: flanco direito e esquerdo, e também imagens do dorso e
201 ventre.

202 De modo a evitar a desidratação do indivíduo ao ser fotografado, utilizamos um
203 conta-gotas (1 mL) para umedecer a superfície do corpo do animal. A captura de

204 imagem de cada indivíduo durou em torno de um minuto. Depois de fotografado,
205 mensuramos o comprimento rostro-cloacal (Paquímetro precisão de 0.05 mm, Profield)
206 e massa corpórea de cada indivíduo (Balança 10g precisão de 0.1g, Pesola). A
207 sexagem deu-se por meio da observação de algumas características como calosidade
208 nupcial, evidentes nos machos em época reprodutiva, tamanho e massa corpórea, que
209 apresenta maior valor nas fêmeas (Caramaschi, 2006; Freitas et al., 2008; Luna et al.,
210 2012). Após a individualização, fizemos a soltura dos animais nas mesmas lagoas em
211 que foram capturados. Derivado desse procedimento, obtivemos um banco de dados e
212 imagens de cada indivíduo. Utilizamos em nossas análises somente as imagens do
213 flanco direito dos indivíduos. O reconhecimento dos anuros recapturados foi feito com o
214 auxílio do programa Wild-ID (Java 1.5, Bolger et al., 2012). Esse programa compara as
215 imagens e apresenta ao usuário do programa 20 pares de imagens mais semelhantes,
216 para confirmação visual pelo usuário (Caorsi et al., 2012). De acordo com o capítulo 1
217 (presente estudo), as marcas naturais dos flancos de *P. azurea* não se alteram ao
218 longo do tempo e o MIF é eficaz para individualização da espécie na região estudada.

219 Ao final das coletas, realizamos 14 horas/homem de busca ativa por lagoa. Em
220 cada noite de amostragem registramos a temperatura do ar e a umidade relativa
221 (Termo-higrômetro digital precisão 0,1%, Incoterm). Obtivemos os valores de
222 precipitação na área de estudo ao longo de todo o período de amostragem (dados
223 fornecidos por Estância Mimosa Ecoturismo). Consideramos em nosso estudo a
224 precipitação acumulada de sete dias que antecederam as coletas de dados.



225

226 Fig. 3 - Adulto de *Phyllomedusa azurea* em movimento, com as marcas naturais do
227 flanco direito à mostra, as quais foram utilizadas para individualização da espécie. Foto:
228 S. B. Rocha.

229 Os dados de marcação e recaptura (histórico de captura dos indivíduos) foram
230 utilizados para estimar os parâmetros sobrevivência aparente (ϕ) e probabilidade de
231 captura (p). Utilizamos o modelo de Cormack-Jolly-Seber (CJS) para populações
232 animais abertas. A estimativa de sobrevivência do modelo CJS, implica em um valor
233 aparente quando a emigração difere de zero (Converse et al., 2005; Martins e Souza,
234 2009). Com a saída dos indivíduos da área estudada, a sobrevivência estimada
235 (aparente) pode ser interpretada como a permanência dos indivíduos na área durante o
236 período de estudo.

237 Consideramos as populações de *P. azurea* do presente estudo como abertas,
238 pois esse modelo admite que durante todo o período de amostragem ocorra
239 nascimentos, mortes, emigrações e imigrações (Heyer et al., 1994; Fernandez, 1995).
240 Optamos pelo uso desse modelo uma vez que não pudemos controlar a entrada/saída

241 dos indivíduos da lagoa e tivemos baixas taxas de recaptura dos indivíduos (o que
242 sugere a entrada constante de novos indivíduos nas áreas de amostragem).

243 O modelo CJS é baseado nos seguintes pressupostos: (1) todo animal marcado
244 tem a mesma probabilidade de recaptura durante a amostragem, (2) todo animal
245 marcado tem a mesma probabilidade de sobrevivência entre um período e outro de
246 amostragem; (3) marcações não são perdidas e (4) os períodos de amostragem são
247 rápidos comparados ao intervalo entre eles (Pollock, 1991; Vasconcellos e Colli, 2009).

248 Os parâmetros demográficos verificados a partir do modelo CJS foram
249 calculados com o auxílio do programa MARK 6.2 (White e Burnhan, 1999). Esse
250 programa permite a análise dos parâmetros demográficos e suas variâncias sob a
251 influência de diferentes covariáveis, tal como sexo (Converse et al. 2005, Martins e
252 Souza, 2009).

253 Consideramos somente os machos em nossas análises, uma vez que apenas os
254 indivíduos deste sexo foram recapturados e representaram 80% dos indivíduos
255 capturados nas lagoas. De modo a obter independência das amostras e um melhor
256 ajuste do modelo à variação dos dados, os índices foram estimados considerando-se
257 as sessões de capturas como mensais (Hiert, 2008), sendo sete amostras. O tamanho
258 populacional não foi estimado uma vez que o nosso delineamento amostral e os
259 nossos dados não foram apropriados para essa tarefa.

260 Da rotina CJS, foram construídos modelos iniciais, onde “(local*tempo)” indica
261 que os parâmetros populacionais estimados (ϕ ou p) variam com a interação do local e
262 do tempo, e “(.)” está relacionado com um modelo onde os parâmetros populacionais
263 não variam com a influência das covariáveis. Nos modelos gerados, o “local” indica a

264 diferença do parâmetro nas duas áreas amostradas (lagoa 1 e 2) e o “tempo” indica a
265 variação do parâmetro ao longo das amostragens.

266 Partindo do pressuposto que as premissas 3 e 4 do modelo CJS não foram
267 violadas neste estudo, testamos as premissas 1 e 2 por meio do teste de aderência
268 “goodness-of-fit”, GOF (Programa RELEASE, TEST 2 e TEST 3), de modo a ajustar
269 nossos dados. O TEST 2 avalia o ajuste dos dados ao primeiro pressuposto do modelo
270 CJS e o TEST 3 ao segundo pressuposto do modelo (Cooch e White, 2007). Contudo,
271 só é possível realizar o TEST 3 quando os dados apresentam ao menos 5 ocasiões de
272 recaptura (Cooch e White, 2007) e os nossos dados apresentaram apenas 2 ocasiões
273 de recaptura. Logo, não obtivemos um resultado para o TEST 3.

274 Para quantificar a sobredispersão dos dados (medida de variação extra-
275 binomial), estimamos o fator de inflação de variância (\hat{c}), a mediana \hat{c} , para o
276 modelo com mais parâmetros. Selecionamos o melhor modelo populacional de acordo
277 com o Critério de Informação de Akaike, AIC – “Akaike Information Criterion”
278 (Converse et al., 2005) corrigido para o tamanho de amostra pequena (AICc), um
279 critério para a escolha do modelo mais parcimonioso que melhor explica a variação dos
280 dados com o menor número de parâmetros (White e Burnham, 1999).

281 Fizemos um ajuste de \hat{c} nos valores AICc, convertendo-a em Quasi-AICc
282 (QAICc). Considerando a incerteza entre os melhores modelos gerados após ajuste de
283 \hat{c} , utilizamos a média dos modelos (“model averaging”), de modo a obter as
284 estimativas dos parâmetros.

285

286 **Resultados**

287 Ao todo, capturamos e individualizamos nas duas lagoas 177 indivíduos de
288 *Phyllomedusa azurea*, sendo 29 fêmeas e 148 machos. Recapturamos apenas 20
289 destes indivíduos, todos machos. Na lagoa 1, capturamos um maior número de
290 indivíduos ($n = 102$) e recapturamos 8 deles. Na lagoa 2 capturamos menos indivíduos
291 ($n = 75$), contudo 12 deles foram recapturados. Observamos um viés voltado aos
292 machos na razão sexual (5,1 machos : 1 fêmea). Não detectamos o deslocamento dos
293 indivíduos entre a lagoa 1 e a lagoa 2.

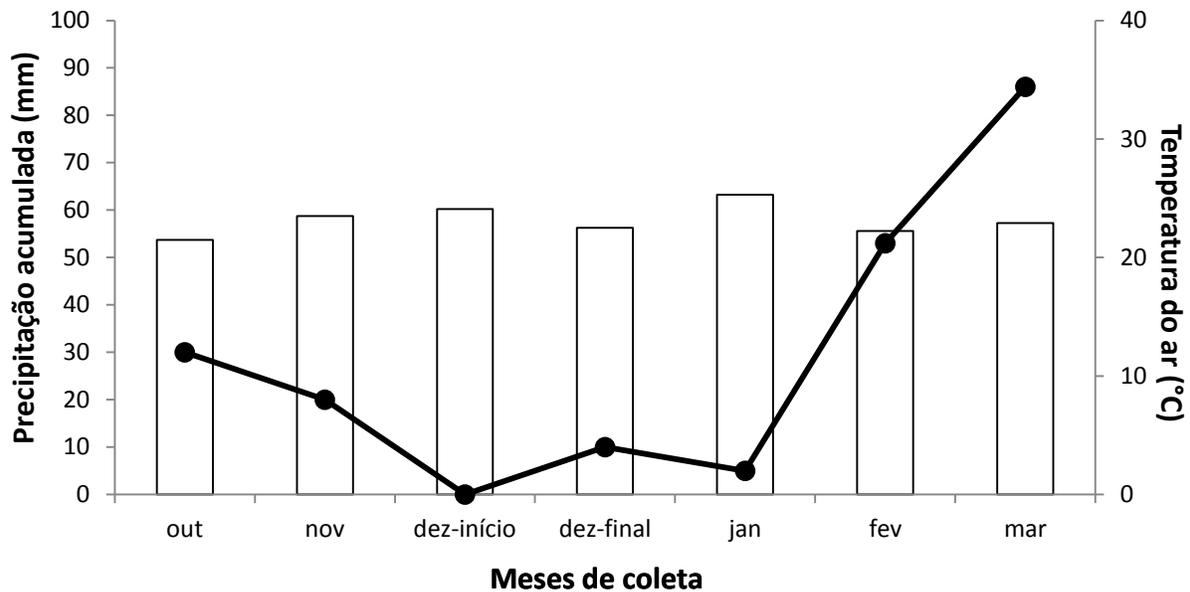
294 A precipitação acumulada na área de estudo entre os meses de outubro 2012 a
295 março 2013, foi em média 29 mm, variando de 0 mm (início de dezembro 2012) a 86
296 mm (março 2013). A umidade relativa e a temperatura do ar registrada nas lagoas
297 durante as coletas se mantiveram estáveis durante o período reprodutivo da espécie. A
298 umidade relativa foi em média 86% (± 6.9 dp). A temperatura do ar em média foi 23 °C
299 (variando de 21 a 25 °C). A figura 4 demonstra a precipitação acumulada e a
300 temperatura média no período noturno entre os meses de outubro 2012 e março 2013.

301 Verificamos uma maior abundância de indivíduos adultos de *P. azurea* em
302 dezembro 2012. No início de dezembro observamos maior abundância de machos ($n =$
303 63), mesmo não registrando chuva nesse período. No final de dezembro, registramos
304 maior abundância de fêmeas ($n = 14$). Observamos maior número de indivíduos juvenis
305 em março 2013 ($n = 28$). A Figura 5 apresenta o número de indivíduos capturados ao
306 longo das coletas, diferenciando machos, fêmeas e juvenis de *P. azurea*, durante um
307 período reprodutivo da espécie.

308 Os machos apresentaram atividade de vocalização de setembro 2012 a março
309 2013, enquanto as fêmeas não foram registradas no início (setembro 2012) e no fim
310 (março 2013) do período reprodutivo. Conforme mencionado, em setembro 2012
311 realizamos um estudo piloto na área e capturamos o máximo de indivíduos possíveis,
312 de modo a testar a eficácia de diferentes programas de reconhecimento de imagens;
313 contudo, nesse período só encontramos indivíduos machos nas lagoas da região. Uma
314 vez que em setembro ainda não havíamos iniciado a coleta dos dados de captura e
315 recaptura, este período não se encontra na figura 5.

316 Ao longo do período de acompanhamento populacional nas duas lagoas, a
317 maioria dos indivíduos foram recapturados apenas uma vez (16 indivíduos) e os
318 demais foram recapturados duas vezes (quatro indivíduos). Ao longo das sete
319 amostras, a taxa média de recaptura nas duas lagoas foi 25%, variando de 8 a 50%
320 (Fig. 5).

321 A massa corpórea dos machos variou de 1.5 a 3.9 g (2.55 ± 0.44 dp), enquanto
322 que a das fêmeas oscilou de 2.7 a 5.5 g (3.64 ± 0.64 dp). O comprimento corporal dos
323 machos apresentou menores valores que o das fêmeas, variando de 30 a 41 mm
324 (36.17 ± 2.21 dp), já o comprimento das fêmeas variou de 35 a 47 mm (41.03 ± 2.44
325 dp) (Tabela 1).



326

327 Fig. 4 - Distribuição das variáveis climáticas na área de estudo, no Município de Bonito,

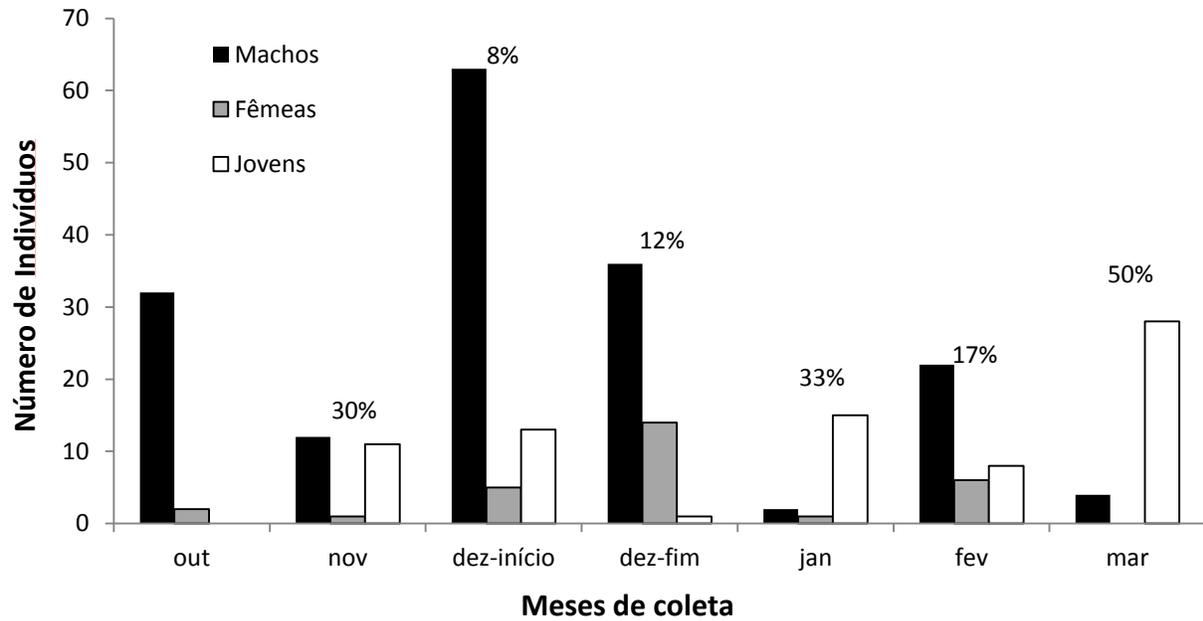
328 Mato Grosso do Sul, de outubro 2012 a março 2013. Barras brancas mostram a

329 temperatura média obtida durante as coletas; linha preta demonstra a precipitação

330 acumulada de sete dias que antecederam a data das coletas. Fonte: Estância Mimosa

331 Ecoturismo.

332



333

334 Fig. 5 - Distribuição do número de indivíduos de *Phyllomedusa azurea* pertencentes a
 335 cada categoria (machos, fêmeas e juvenis) encontrados nas duas lagoas estudadas no
 336 Município de Bonito/MS, durante o período de outubro 2012 a março 2013. Os valores
 337 acima das barras indicam a porcentagem de indivíduos recapturados em cada ocasião.

338

339 Tabela 1. Medidas morfométricas de indivíduos adultos (machos e fêmeas) de
 340 *Phyllomedusa azurea*, no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. *n* = número de
 341 indivíduos amostrados. dp = desvio padrão; MC = massa corporal, apresentada em
 342 gramas (g); CRC = comprimento rostro-cloacal, apresentada em milímetros (mm).

Medidas morfométricas	<i>Phyllomedusa azurea</i> (<i>n</i> = 177)			
	Machos (<i>n</i> = 148)		Fêmeas (<i>n</i> = 29)	
	media ± dp	min - max	media ± dp	min - max
MC	2.55 ± 0.44	1.5 - 3.9	3.64 ± 0.64	2.7 - 5.5
CRC	36.17 ± 2.21	30 - 41	41.03 ± 2.44	35 - 47

343

344 Não houve indícios de alteração nas marcas naturais dos indivíduos, como
 345 também não houve vestígios de qualquer tipo de ferimento nos animais após o
 346 processo de individualização. A variabilidade das marcas dos flancos dos indivíduos
 347 proporcionou a identificação inconfundível dos animais. Contudo, alguns indivíduos
 348 apresentaram padrões de manchas similares e, desse modo, foi necessário consultar
 349 as outras imagens das marcas naturais do indivíduo (como por exemplo as manchas
 350 presentes no flanco do lado esquerdo) para confirmar a identificação.

351 Por meio do histórico de captura dos indivíduos, 16 modelos iniciais foram
 352 gerados, os quais indicam o local (lagoas) e o tempo (variação mensal), e a interação
 353 entre local e tempo, como covariáveis que podem influenciar na sobrevivência aparente
 354 e na probabilidade de captura dos indivíduos. Após ajustes dos modelos, elegemos os

355 melhores utilizando os critérios de seleção: modelos com valores de $\Delta\text{QAICc} < 4$ (Hiert,
356 2008) e com somatórios de pesos AICc em 0.90 (Burhan e Andreson, 2002). Seguindo
357 esses critérios, três modelos foram melhores que os demais candidatos. A Tabela 2
358 apresenta os resultados da seleção de modelos para efeitos de covariáveis local e
359 tempo.

360 Dentre os três melhores modelos (modelos 1, 2, 3 da tabela 2), dois contém o
361 local como covariável importante na sobrevivência aparente dos indivíduos. Ao passo
362 que um modelo contém a covariável tempo influenciando na probabilidade de captura
363 dos indivíduos, e os outros dois modelos contêm a interação entre local e tempo como
364 covariáveis que influenciam na captura dos animais (Tabela 2).

365 Os dois primeiros modelos contribuíram em 76% do peso QAICc e ambos
366 contêm as covariáveis local e tempo influenciando na probabilidade de captura dos
367 indivíduos. A única diferença entre os dois melhores modelos foi o efeito do local na
368 sobrevivência aparente, com o melhor modelo sugerindo diferença na sobrevivência
369 dos indivíduos entre as duas lagoas amostradas.

370 Uma vez que dois dos três modelos de topo contêm o local influenciando na
371 sobrevivência aparente dos indivíduos (ϕ), apresentamos na tabela 3 os resultados
372 deste parâmetro para as duas lagoas. Ao passo que a probabilidade de captura (p) foi
373 influenciada pelo tempo e local, sendo assim, apresentamos os resultados deste
374 parâmetro para as duas lagoas, bem como entre os intervalos de amostragem.

375 As estimativas dos parâmetros (\pm erro padrão) apresentados na tabela 3
376 demonstram que a sobrevivência aparente mensal para machos de *P. azurea* foi maior
377 na lagoa 2, com 41% (0.41 ± 0.05), do que na lagoa 1, com 23% (0.23 ± 0.06).

378 A probabilidade de captura dos machos da lagoa 1 foi estimada, em média, em
379 39%, com oscilação de 14% (0.14 ± 0.12) a 79% (0.79 ± 0.04). Para a lagoa 2, a taxa
380 de captura dos indivíduos machos foi estimada, em média, em 52%, contudo houve
381 uma maior variação, de 1% (0.01 ± 0.01) a 99% (0.99 ± 0.01) (Tabela 3).

382

383 Tabela 2. Resultados da seleção de modelo para efeitos de co-variáveis (local e tempo) em probabilidades mensais de
 384 sobrevivência aparente (ϕ) e de captura (p) para a população de machos de *Phyllomedusa azurea* no Município de
 385 Bonito, Mato Grosso do Sul, ao longo de um período reprodutivo da espécie (outubro 2012 a março 2013). Estatística de
 386 seleção de modelo: Quasi- Critério de Informação de Akaike corrigido para pequenas amostras (QAICc), diferença entre
 387 o modelo em questão e o melhor modelo (Δ QAICc), peso do modelo Akaike (Peso QAICc), verossimilhança do modelo
 388 (Verossim. do modelo), número de parâmetros no modelo (N. Par) e Quasi-desvio (Qdesvio; estatística “goodness-of-fit”
 389 para o modelo). Local = lagoas. Valor c-hat para ajuste = 0.80.

	Modelo	QAICc	ΔQAICc	Peso QAICc	Verossim. do modelo	N. Par.	Qdesvio
1	$\phi(\text{local}) p(\text{local}*\text{tempo})$	196.62	0	0.55	1	9	11.12
2	$\phi(.) p(\text{local}*\text{tempo})$	198.45	1.86	0.21	0.39	9	12.95
3	$\phi(\text{local}) p(\text{tempo})$	199.31	2.69	0.14	0.25	6	20.44
4	$\phi(\text{local}*\text{tempo}) p(\text{local}*\text{tempo})$	200.86	4.24	0.06	0.11	12	8.49
5	$\phi(\text{tempo}) p(\text{local}*\text{tempo})$	204.16	7.54	0.01	0.02	12	11.79

390

391 Tabela 2. Continuação.

392

6	$\varphi(\text{local}*\text{tempo}) \rho(\text{tempo})$	206.49	9.87	0	0	13	77.76
7	$\varphi(.) \rho(\text{tempo})$	206.91	10.29	0	0	6	28.04
8	$\varphi(\text{tempo}) * \rho(\text{tempo})$	209.04	12.42	0	0	9	23.55
9	$\varphi(\text{local}) \rho(.)$	215.32	18.70	0	0	3	42.82
10	$\varphi(\text{local}) \rho(\text{local})$	217.29	20.67	0	0	4	42.69
11	$\varphi(\text{tempo}) \rho(\text{local})$	218.08	21.46	0	0	7	37.03
12	$\varphi(.) \rho(\text{local})$	218.34	21.72	0	0	3	45.84
13	$\varphi(\text{tempo}) \rho(.)$	218.37	21.75	0	0	6	39.49
14	$\varphi(\text{local}*\text{tempo}) \rho(\text{local})$	219.39	22.77	0	0	11	29.34
15	$\varphi(.) \rho(.)$	221.18	24.56	0	0	2	50.76
16	$\varphi(\text{local}*\text{tempo}) \rho(.)$	221.18	25.09	0	0	12	29.34

393

394 Tabela 3. Estimativas de sobrevivência aparente (ϕ) e probabilidade de captura (p)
 395 obtidas por meio da média dos modelos (“model averaging”) para os três melhores
 396 modelos da tabela 2. Estimativas dos parâmetros (\pm erro padrão). Duas estimativas de
 397 sobrevivência aparente são fornecidas para os indivíduos machos da lagoa 1 e lagoa 2.
 398 Seis estimativas de probabilidade de captura são apresentadas para os indivíduos
 399 machos das duas lagoas. $p_2...p_7$ = probabilidade de captura dos indivíduos nos
 400 intervalos de amostragem.

Sobrevivência aparente (ϕ)	Lagoa 1	Lagoa 2
	0.23 (0.06)	0.41 (0.05)
Probabilidade de captura (p)		
p_2	0.37 (0.31)	0.45 (0.20)
p_3	0.15 (0.01)	0.99 (0.01)
p_4	0.61 (0.33)	0.16 (0.08)
p_5	0.14 (0.12)	0.01 (0.01)
p_6	0.79 (0.04)	0.99 (0.01)
p_7	0.28 (0.25)	0.56 (0.43)

401

402 **Discussão**

403 Neste estudo, verificamos diferença na abundância de indivíduos capturados
 404 entre as duas lagoas temporárias. Na lagoa 1, capturamos um maior número de
 405 indivíduos do que na lagoa 2. Por se tratar de ambientes distintos e não conectados, é
 406 esperado encontrar diferença na abundância de indivíduos entre os ambientes.

407 Segundo Neckel-Oliveira e Gascon (2006), a diferença na abundância de indivíduos em
408 uma determinada área pode estar relacionada a preservação dos ambientes. Contudo,
409 no presente estudo não quantificamos as variáveis ambientais das lagoas para
410 determinar níveis de preservação ambiental, visto que não era este o objetivo do
411 estudo. Desse modo, sugerimos que futuras pesquisas sejam desenvolvidas em nível
412 de paisagem, de modo a verificar a influência das características do ambiente na
413 abundância de indivíduos de *P. azurea* nos sítios reprodutivos.

414 A razão sexual foi desviada para machos nas duas lagoas estudadas. A
415 predominância de machos nas populações já foi registrada em estudo com a mesma
416 espécie (Freitas et al., 2008; Rodrigues et al., 2007; Costa et al., 2010), bem como com
417 outras espécies do gênero (*P. tarsi* ver Neckel-Oliveira e Gascon, 2006; *P.*
418 *megacephala* ver Oliveira et al., 2012). Observamos também uma diferença quanto ao
419 comprimento e massa corporal dos machos e fêmeas, sendo as fêmeas maiores e
420 mais pesadas, o que corresponde ao padrão observado para a espécie (Caramaschi,
421 2006; Rodrigues et al., 2007; Freitas et al., 2008).

422 Segundo Shine (1979), em 90% das espécies de anuros, as fêmeas são maiores
423 que os machos. Diversos fatores podem ser responsáveis por esse fenômeno, tal como
424 a capacidade de fêmeas maiores produzirem um maior número de ovos e ovos
425 maiores, taxa de mortalidade causada pela alta pressão de predação em machos
426 maiores, restrição no crescimento dos machos devido à demanda de energia no
427 período reprodutivo com defesa de território, embates físicos e vocalização (Shine,
428 1979; Wollbright, 1989; Rodrigues et al., 2007; Freitas et al., 2008).

429 A temperatura e precipitação são fatores abióticos que interferem na atividade
430 reprodutiva de anuros neotropicais (Duellman e Trueb, 1994; Prado et al., 2005; Freitas
431 et al., 2008; Hiert e Moura, 2010). Apesar de verificarmos uma oscilação na
432 precipitação da área de estudo, observamos estabilidade na temperatura e umidade
433 relativa obtida durante as coletas. Dessa forma, mesmo registrando uma baixa
434 precipitação acumulada em dezembro 2012, observamos uma maior abundância de
435 indivíduos nesse período, de modo similar ao verificado por Rodrigues et al. (2007). O
436 fato de registrarmos somente os machos no início do período reprodutivo (setembro
437 2012) e posteriormente a chegada das fêmeas nas lagoas (outubro 2012) demonstra a
438 chegada assincrônica entre machos e fêmeas no sítio reprodutivo. Esse mesmo padrão
439 de atividade reprodutiva já foi observado por Rodrigues et al. (2007), em estudo com *P.*
440 *azurea* na Serra da Bodoquena. A reprodução da espécie por mais de três meses
441 consecutivos (setembro 2012 a março 2013), a chegada assincrônica de fêmeas nos
442 sítios reprodutivos e a defesa de território por machos, inclusive com embates físicos,
443 está de acordo com a definição de *P. azurea* como uma espécie de reprodução
444 prolongada (Prado et al., 2005).

445 A probabilidade de captura dos indivíduos machos variou ao longo do período
446 reprodutivo e diferiu entre as duas lagoas. A variação ao longo dos meses é esperada,
447 uma vez que verificamos uma oscilação na abundância dos indivíduos ao longo do
448 período reprodutivo (ver Fig. 5). A menor probabilidade de captura estimada na lagoa 1,
449 pode estar relacionada a menor recaptura neste local.

450 Apesar de poucos estudos descreverem a probabilidade de captura de
451 populações de anfíbios, os valores deste parâmetro para as populações de *P. azurea*

452 (39% e 52%) avaliadas no presente estudo, são próximos aos estimados em outros
453 estudos com anfíbios. Hiert (2008), em estudo com o anuro *Hypsiboas leptolineatus*,
454 estimou a sua probabilidade de captura em 56% ao longo de 11 meses de
455 acompanhamento populacional. Funk et al. (2003), ao estudarem quatro espécies de
456 *Eleuterodactylus* ao longo de cinco anos, estimaram a probabilidade de captura das
457 espécies entre 24 a 48%. Em estudo desenvolvido com salamandras, ao longo de três
458 anos, Bailey et al. (2004) estimaram sua capturabilidade em 30%. Diante desses
459 estudos, verificamos que a probabilidade de captura dos indivíduos da população de *P.*
460 *azurea* está de acordo com os demais resultados encontrados.

461 O parâmetro sobrevivência aparente estimado para os machos de *P. azurea*
462 variou entre as lagoas, sendo a lagoa 2 o local com maior valor deste parâmetro.
463 Possivelmente a maior permanência dos indivíduos na lagoa 2 está relacionada ao
464 isolamento desta lagoa. Diferentemente da lagoa 1 que está circundada por cerca de 5
465 lagoas temporárias, a lagoa 2 não apresenta lagoa temporária em seu entorno. Dessa
466 forma, possivelmente este fato pode estar relacionado ao deslocamento dos indivíduos
467 entre os corpos d'água no período reprodutivo, em busca de maior número/melhores
468 locais de reprodução (Marsh et al., 1999; Neckel-Oliveira e Gascon, 2006).

469 Os resultados de nosso estudo, onde a sobrevivência aparente dos machos
470 variou entre 23% e 41%, está incluso na variação de valores de sobrevivência já
471 estimados para outras espécies de anfíbios, que variam de 6% a 70% (Funk e Mills,
472 2003; Measey et al., 2003; Hiert, 2008). A sobrevivência do anuro *Hypsiboas*
473 *leptolineatus* foi estimada entre 6% a 53% (Hiert, 2008). Para *Anomaloglossus*
474 *stepheni*, Funk e Mills (2003) estimaram a sua sobrevivência média em 60%. Measey e

475 colaboradores (2003) apresentam a taxa de sobrevivência para a espécie de
476 *Gymnophiona Gegeneophis ramaswamii* em 30% e 70%.

477 O método de marcação e recaptura é um importante meio para o
478 desenvolvimento de estudos que buscam uma compreensão detalhada dos aspectos
479 de história natural, comportamento, ecologia dos anfíbios, bem como para conservação
480 das espécies (Phillott et al., 2007; Reisser et al., 2008). Verificamos que a identificação
481 por meio das marcas naturais, com registro fotográfico, é uma forma de
482 individualização eficiente para estudos com *Phyllomedusa azurea*. Contudo,
483 ressaltamos que para o uso do MIF é necessário a obtenção de imagens de boa
484 qualidade (iluminação, nitidez), bem como a captura de mais de uma imagem das
485 marcas naturais do animal (e.g. dos dois flancos). Tais cuidados são essenciais para
486 evitar possíveis erros de identificação.

487 Sugerimos que futuros estudos populacionais sejam desenvolvidos com a
488 espécie, em maior escala temporal (ao longo dos anos) e espacial (de paisagem), de
489 modo a gerar informações robustas sobre os parâmetros populacionais da espécie,
490 bem como verificar características do ambiente capazes de influenciar na variação
491 destes parâmetros.

492

493 **Agradecimentos**

494 Gostaríamos de agradecer ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal
495 (UFMS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
496 Ao P. Sarmiento, pelo auxílio durante as análises dos dados. Ao J.L.M. Sugai pelas

497 imagens da localização da área de estudo. A toda a equipe da Estância Mimosa
498 Ecoturismo. Ao IBAMA pela autorização de captura dos animais (n° 36191-1).

499

500 **Referências Bibliográficas**

501 Anholt, B.R., H. Hotz, G.D. Guex, e R.D. Semlitsch. 2003. Overwinter survival of *Rana*
502 *lessonae* and its hemiclinal associate *Rana esculenta*. *Ecology* 84:391-397.

503 Bailey, L.L., T.R. Simons, e K.H. Pollock. 2004. Spatial and temporal variation in
504 detection probability of *Plethodon* Salamanders using the robust capture–recapture
505 design. *Journal of Wildlife Management* 68(1):14-24.

506 Bastos, R.P., J.A.O. Motta, L.P. Lima, e L.D. Guimarães. 2003. Anfíbios da Floresta
507 Nacional de Silvânia, Estado de Goiás. Stylo Gráfica e Editora, Brasil.

508 Bensemer, C.S., e M.B. Beneti. 2008. Multi-year validation of photographic identification
509 of grey nurse sharks, *Carcharias taurus*, and applications for non-invasive
510 conservation research. *Marine and Freshwater Research* 59:322-331.

511 Biavatti, G.M. 2006. Aspectos da Biologia e da Dinâmica populacional em cinco
512 espécies de Dendrobatídeos (Amphibia: Anura) na Amazônia Central. Dissertação
513 de mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de
514 Pesquisa da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas (INPA/UFAM), Brasil.

515 Boggiani, P.C., e J. Clemente. 1999. A questão do Licenciamento Ambiental de
516 empreendimentos turísticos no Planalto da Bodoquena – Mato Grosso do Sul.
517 *Revista de Geografia* 9:24-32.

- 518 Boggiani, P.C. 1999. Por que Bonito é Bonito? Geologia da Bodoquena. In Scremin-
519 Dias, E., V.J.P. Pott, R.C. Hora, P.R. Souza (Eds). Nos jardins submersos da
520 Bodoquena: Guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região. Brasil.
- 521 Bolger, D.T., T.A. Morrison, B. Vance, D. Lee, e H. Farid. 2012. A computer-assisted
522 system for photographic mark–recapture analysis. *Methods in Ecology and Evolution*
523 3:813-822.
- 524 Bradfield, K.S. 2004. Photographic identification of individual Archey’s frogs, *Leiopelma*
525 *archeyi*, from natural markings. DOC Science Internal Series 191. Department of
526 Conservation, New Zealand.
- 527 Burnham, K.P., e D.R. Anderson. 2002. Model selection and multimodel inference: a
528 practical information-theoretic approach. Springer, USA.
- 529 Calderon, L.A., R.M. Messias, R.P. Serrano, K.D. Zaqueo, E.S. Souza, S.S. Nienow,
530 J.L. Cardoz-Filho, R. Diniz-Sousa, K. Delaix-Zaqueo, e R.G. Stabeli. 2009.
531 Amphibia, Anura, Hylidae, Phyllomedusinae, *Phyllomedusa azurea*: Distribution
532 extension and geographic distribution map. *Check List* 5(2):317–319.
- 533 Caorsi, V.Z., R.R. Santos, e T. Grant. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-
534 Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-
535 Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of*
536 *Herpetology* 7(2):79-84.
- 537 Caramaschi, U. 2006. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com
538 redescrição de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea*

539 Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). Arquivos
540 do Museu Nacional 64 (2):159-179.

541 Caramaschi, U., e C.A.G. Cruz. 2002. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e
542 biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). *Phyllomedusa* 1(1): 5-10.

543 Chen, T., M. Zhou, R. Gagliardo, B. Walker, e C. Shaw. 2006. Elements of the granular
544 gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American
545 orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. *Peptides* 27:2129-2136.

546 Converse, S.J., J.B. Iverson, e J.A. Savidge. 2005. Demographics of an ornate box
547 turtle population experiencing minimal human-induced disturbances. *Ecological*
548 *Applications* 15:2171-2179.

549 Cooch, E. e G. White. 2007. Program Mark - a gentle introduction. 5th Edition. USA.

550 Costa, T.B., L.D. Guimarães, e R.P. Bastos. 2010. Territorial and mating behavior in
551 *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) at a temporary pond in west-central Brazil.
552 *Phyllomedusa* 9(2):99-108.

553 Courtois, E.A., K. Pineau, B. Villette, D.S. Schmeller, e P. Gaucher. 2012. Population
554 estimates of *Dendrobates tinctorius* (Anura: Dendrobatidae) at three sites in French
555 Guiana and first record of chytrid infection. *Phyllomedusa* 11(1): 63–70.

556 Donnelly, M.A., e C. Guyer. 1994. Estimating population size. In Heyer, W.R., M.A.
557 Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek, M.S. Foster (Eds). *Measuring and*
558 *monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians*. Smithsonian
559 Institution Press, Reino Unido.

560 Duellman, W.E., e L. Trueb. 1994. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins Univ.
561 Press, USA.

562 Fernandez, F.A.S. 1995. Métodos para estimativa de parâmetros populacionais por
563 captura, marcação e recaptura. Oecologia Brasiliensis 2: 1-26.

564 Freitas, E.B., C.B. De-Carvalho, R.G. Faria, B.C. Batista, C.C. Batista, W.A. Coelho, e
565 A. Bocchiglieri. 2008. Nicho ecológico e aspectos da história natural de
566 *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae, Phyllomedusinae) no Cerrado do Brasil
567 Central. Biota Neotropica 8 (4):101-110.

568 Funk, W.C., D. Almeida-Reinoso, F. Nogales-Sornosa, e M.R. Bustamante. 2003.
569 Monitoring Population trends of *Eleutherodactylus* Frogs. Journal of Herpetology
570 37(2):245-256.

571 Funk, W.C., e L.S. Mills. 2003. Potential causes of population declines in forest
572 fragments in an Amazonian frog. Biological Conservation 111:205-214.

573 Gamble, L., S. Ravela, e K. McGarigal. 2008. Multi-scale features for identifying
574 individuals in large biological databases: an application of pattern recognition
575 technology to the marbled salamander *Ambystoma opacum*. Journal of Applied
576 Ecology 45: 170– 180.

577 Hartog, J., e R. Reijns. 2011. Interactive Individual Identification System. Disponível em:
578 <http://www.reijns.com/i3s/index.html>. Acessado em: 10 novembro 2013.

579 Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek, e M.S. Foster. 1994.
580 Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians.
581 Smithsonian Institution Press, USA.

582 Hiert, C. 2008. Dinâmica populacional e uso do espaço de *Hypsiboas leptolineatus*
583 (Braun & Braun, 1977) (Anura: Hylidae) no Município de Turvo, Estado do Paraná.
584 Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

585 Hiert, C., e M.O. Moura. 2010. Abiotic correlates of temporal variation of *Hypsiboas*
586 *leptolineatus* (Amphibia: Hylidae). *Zoologia* 27(5):703-708.

587 Honegger, R.E. 1978. Marking amphibians and reptiles for future identification. *Reptiles*
588 p14-22.

589 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Mapa de Biomas do Brasil. 2004.
590 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em: 05 Novembro 2013.

591 IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Disponível em:
592 www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 November 2013.

593 Kenyon, N., A.D. Phillott, e R.A. Alford. 2009. Evaluation of the photographic
594 identification method (PIM) as a tool to identify adult *Litoria genimaculata* (Anura:
595 Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology* 4(3):403-410.

596 Kenyon, N., A.D. Phillott, e R.A. Alford. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of
597 juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological*
598 *Conservation and Biology* 5(1):126-131.

599 Klink, C.A., e R.B. Machado. 2005. A conservação do Cerrado Brasileiro.
600 *Megadiversidade* 1(1):147-155.

601 Knox, C.D., A. Cree, e P.J. Seddon. 2012. Accurate identification of individual geckos
602 (*Naultinus gemmeus*) through dorsal pattern differentiation. *New Zealand Journal of*
603 *Ecology* 37(1): 0-0.

604 Kuckelhaus, S.A.S. 2007. Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1, um
605 peptídeo de *Phyllomedusa hipochondrialis* (Amphibia). Tese de Doutorado em
606 Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasil.

607 Kuckelhaus, S.A.S., J.R.S.A. Leite; M.P. Neves, K.S. Frota, L.F. Abdala, M.I. Muniz-
608 Junqueira, C. Bloch Jr., e C.E. Tosta. 2007. Toxicity evaluation to mice of
609 Phylloseptin-1, na Antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa*
610 *hypochondrialis* (Amphibia). *International journal of peptide research and*
611 *therapeutics* 13(3):423-429.

612 Kuckelhaus, S.A.S., J.R.S.A. Leite, M.I. Muniz-Junqueira, R.N. Sampaio, C. Bloch Jr., e
613 C.E. Tosta. 2009. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an
614 antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia).
615 *Experimental Parasitology* 123:11-16.

616 Leite, J.R.S.A, L.P. Silvia, M.I.S. Rodrigues, M.V. Prates, G.D. Brand, B.M. Lacava,
617 R.B. Azevedo, A.L. Bocca, S. Albuquerque, e C. Bloch Jr. 2005. Phylloseptins: a
618 novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa*
619 genus. *Peptides* 26:565-573.

620 Lucas, E.M., V.B. Fortes, e P.C.A. Garcia. 2010. Amphibia, Anura, Hylidae,
621 *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862: Distribution extension to southern Brazil. *Check*
622 *List* 6:164-166.

623 Luna, M.C., C. Taboada, D. Baêta, e J. Faivovich. 2012. Structural diversity of nuptial
624 pads in Phyllomedusinae (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Morphology* p.1-13.

625 Marsh, D.M., E.H. Fegraus, e S. Harrison. 1999. Effects of breeding pond isolation on
626 the spatial and temporal dynamics of pond use by the tungara frog, *Physalaemus*
627 *pustulosus*. *Journal of Animal Ecology* 68:804–814.

628 Martins, F.I., e Souza, F.L. 2009. Demographic Parameters of the Neotropical
629 Freshwater Turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae). *Herpetologica* 65(1):82-91.

630 Measey, G.J., D.J Gower, O.V. Oommen, e M. Wilkinson. 2003. A mark–recapture
631 study of the caecilian amphibian *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia:
632 Gymnophiona: Caeciliidae) in southern India. *Journal of Zoology* 261:129-133.

633 Mellor, D.J., N.J. Beausoleil, e K.J. Stafford. 2004. Marking amphibians, reptiles and
634 marine mammals: animal welfare, practicalities and public perceptions in New
635 Zealand. Department of Conservation. Nova Zelândia.

636 Miranda, T., M. Ebner, M. Solé, e A. Kwet. 2005. Estimativa populacional de *Pseudis*
637 *cardosoi* (Anura, Hylidae), com emprego de método fotográfico para
638 reconhecimento individual. *Biociências* 13(1):49-54.

639 Neckel-Oliveira, S, e C. Gascon. 2006. Abundance, body size and movement patterns
640 of a tropical treefrog in continuous and fragmented forests in the Brazilian Amazon.
641 *Biological Conservation* 28:308-315.

642 Norman, 1994. *Amphibians and reptiles of the Paraguayan chaco*. 1^a ed. Heredia,
643 Costa Rica.

644 Oliveira, F.F.R., P.A.G. Nogueira, e P.C. Eterovick. 2012. Natural history of
645 *Phyllomedusa megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae) in
646 southeastern Brazil, with descriptions of its breeding biology and male territorial
647 behavior. *Journal of Natural History* 46(1-2):117-129.

648 Phillott, A.D., L.F. Skerratt,, K.R. McDonald, F.L. Lemckert, H.B. Hines, J.M. Clarke,
649 R.A. Alford, e R. Speare. 2007. Toe-Clipping as an Acceptable Method of Identifying
650 Individual Anurans in Mark Recapture Studies. *Herpetological review* 38(3):305-308.

651 Pollock, K.H. 1991. Modeling capture, recapture, and removal statistics for estimation of
652 demographic parameters for fish and wildlife populations – past, present, and future.
653 *Journal of the American Statistical Association* 86:225-238.

654 Prado, C.P.A., M. Uetanabaro, e C.F.B Haddad. 2005. Breeding activity patterns,
655 reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal
656 environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia* 26:211-221.

657 Prado, V.H., R.E. Borges, F.R. Silva, T.T. Tognolo, e D.C. Rossa-Feres. 2008.
658 Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea*: Distribution extension. *Check List*
659 4(1):55-56.

660 Primack, R.B. 2002. *A Primer of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc.
661 Sunderland. Massachusetts, USA.

662 Reisser, J., M. Proietti, P. Kinas, e I. Sazima. 2008. Photographic identification of sea
663 turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss.
664 *Endangered Species Research* 5:73–82.

665 Ribeiro, J.C.C.T. 2009. Aplicação do método de captura-recaptura de larvas
666 fotoidentificadas para avaliação de parâmetros demográficos: comparação entre
667 anura e caudata. Dissertação de mestrado em Biologia da Conservação,
668 Universidade de Lisboa, Portugal.

669 Rodrigues, D.J., F.S. Lopes, e M. Uetanabaro. 2003. Padrão reprodutivo de
670 *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) na Serra da Bodoquena, Mato Grosso
671 do Sul, Brasil. Iheringia, Série Zoologia 93(4):365-371.

672 Rodrigues, D.J., M. Uetanabaro, e F.S. Lopes. 2007. Breeding biology of
673 *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 and *P. sauvagii* Boulenger, 1882 (Anura) from the
674 Cerrado, Central Brazil. Journal of Natural History 41(29–32):1841–1851.

675 Sazima, I. 1988. Um estudo de biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*,
676 com uso de marcas naturais. Memórias do Instituto Butantan 50(3): 83-99.

677 Schmidt, B.R. 2003. Count data, detection probabilities, and the demography,
678 dynamics, distribution, and decline of amphibians. Comptes Rendus Biologies
679 326:119-124.

680 Segalla, M.V., U. Caramaschi, C.A.G. Cruz, P.C.A. Garcia, T. Grant, C.F.B. Haddad, e
681 J. Langone. 2012. Brazilian Amphibians – List of species. Accessible at
682 <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured
683 on 04 out 2013.

684 Shine, R. 1979. Sexual Selection and Sexual Dimorphism in the Amphibia. Copeia 1979
685 (2):297-306.

686 Souza, D.S. 2010. Avaliação da eficiência e implantação de sistemas de marcação
687 individual no plantel do Parque Estadual Dois Irmãos – Recife/PE. Trabalho de
688 conclusão no curso de especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais
689 Selvagens e Exóticos, Universidade Castelo Branco e Instituto Qualittas,
690 Pernambuco, Brasil.

691 Thompson, A.H., A.J. Bjourson, D.F. Orr, C. Shaw, e S. McClean. 2007. A combined
692 mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and
693 characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of
694 *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides* 28:1331-1343.

695 Uetanabaro, M., F. L. Souza, P. L. Filho, A. F. Beda, e R. A. Brandão. 2007. Anfíbios e
696 répteis do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brasil.
697 *Biota Neotropica* 7(3):279-289.

698 Uetanabaro, M., C.P.A. Prado, D.J. Rodrigues, M. Gordo, e Z. Campos. 2008. Guia de
699 Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno. Editora UFMS e UFMT.
700 Mato Grosso do Sul, Brasil.

701 Vasconcellos, M.M. 2007. Dinâmica populacional de dois bufonídeos (Amphibia: Anura)
702 em uma lagoa no Cerrado do Brasil Central. Dissertação de mestrado em Ecologia,
703 Universidade de Brasília, Brasil.

704 Vasconcellos, M.M., e G.R. Colli. 2009. Factors Affecting the Population Dynamics of
705 Two Toads (Anura: Bufonidae) in a Seasonal Neotropical Savanna. *Copeia* (2):266-
706 276.

707 Weber, E., H. Hasenack, e C.J.S. Ferreira. 2004. Adaptação do modelo digital de
708 elevação do SRTM para o sistema de referência oficial brasileiro e recorte por

709 unidade da federação. Porto Alegre, UFRGS Centro de Ecologia. ISBN 978-85-
710 63843-02-9. Disponível em: [HTTP://www.ecologia.ufrgs.br/labgeo](http://www.ecologia.ufrgs.br/labgeo).

711 White, G.C., e K.P. Burnham. 1999. Program MARK: Survival estimation from
712 populations of marked animals. *Bird Study* 46 Supplement:120-138.

713 Woolbright, L.L. 1989. Sexual dimorphism in *Eleutherodactylus coqui*: selection
714 pressures and growth rates. *Herpetologica* 45(1):68-74.

715 Yoshizaki, J., K.H. Pollock, C. Brownie, e R.A. Webster. 2009. Modeling
716 misidentification errors in capture–recapture studies using photographic identification
717 of evolving marks. *Ecology* 90(1):3-9.

718 Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibáñez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma,
719 S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves, e D. Romos.
720 2001. Population declines and priorities for Amphibian Conservation in Latin
721 America. *Conservation Biology* 15(5):1213-1223.

- Normas do periódico *Journal of Herpetology*

Overall Document Format

The Journal of Herpetology publishes manuscripts that are no longer than 6000 words, including title, abstract, and text. We welcome shorter communications, intended to provide an outlet for scientific work that is data-driven but of more limited scope or depth than regular manuscripts. If you are submitting a shorter communication (under 4000 words), please indicate that in your cover letter. However, we no longer use a different format for printed articles of different lengths. Consult the editors before submitting a manuscript longer than 6000 words.

In preparing your manuscript:

- Use the active voice. Example “We studied...” not “... was studied”
- Double-space the entire manuscript, including literature cited, figure legends, table legends, and table contents
- Provide 2.5 cm (1 inch) margins on all sides
- Use 12 point font size
- Number all manuscripts pages consecutively
- Provide line numbering starting at the title page and continuing to the end of the document
- Left-justify the entire document
- Do not break words and hyphenate at the end of lines
- If you use bibliographic software to format the citations, remove the fields from the submission copy (be sure to keep a copy of the original document containing the fields for revision purposes)
- Use italics only for names of genera and species, and for appropriate headings as indicated below. Do not use italics or bold-face for emphasis; instead, reword sentences to provide appropriate emphasis

Manuscript Sections and Formatting

Manuscripts are usually arranged in the following order: 1. Title page (title, author's name, author's address); 2. Abstract (a second-language abstract may be added); 3. Key words (no more than eight, not including words that appear in the title); 4. Text (with sections described below); Literature cited; Appendices (not normally used); 5. Tables; 6. Figure legends; and 7. Figures. Alternatively, Figures and Tables (complete with legends) may be placed in the manuscript text, in the approximate place where they should appear in print.

Title Page.- The title page should include, in this order:

- † “JOURNAL OF HERPETOLOGY”, centered
- † The title, centered, which should be informative and concise
- † The names of all authors, centered, in small caps. Use numbered superscripts to distinguish author addresses. Do not leave a space between author name and superscript. Use commas to separate author information, placing them outside any superscripts. Example: REGINA SMITH^{1,2}, DON Q. DE LA MANCHA, III³, AND R. JAMES JONES^{1,4}

† The addresses of all authors, left-justified, matching superscript numbers above. Do not abbreviate states or provide postal codes. Do name the country of residence (example: Alaska, USA). If different, authors may indicate present addresses. An e-mail address for the corresponding author is required, and e-mail addresses for other authors are recommended. Example:

¹ *Department of Herpetology, Japanese Museum of Natural History, Kyoto, Japan*

² *Corresponding author. E-mail: Regina_S@JMNH.Sci*

³ *Department of Zoology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA*

⁴ *Present address: Departamento de Zoología, Universidad de México, Puerto Vallarta, Mexico*

LRH (left running head). Spell out the name of a single author (example: Regina Smith); Use initials and last name for two authors (example: R. Smith and R. Weasley); Use “et al.” for more than two authors (example: R. Smith et al.)

† RRH (right running head). Provide an abbreviated title of no more than 50 characters, including the spaces between words. Example: if the full title is “Ecology and Reproduction of the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*) in Kansas”, the abbreviated title might be “Ecology of timber rattlesnakes”

English-Language Abstract.- The abstract should begin on a new page and summarize the major points of the paper clearly and concisely without requiring the reader to refer to the text. It is limited to 250 words.

† The abstract heading should be indented and in small caps, followed by a period and an em-dash (example: Abstract.— The Boreal Toad...)

Second-Language Abstract.- An additional abstract may be given just below the mandatory English-language abstract. It should be an exact translation of the English version and follow the same rules.

† The abstract heading should be indented and in small caps, followed by a period and an em-dash. Use the equivalent word to “abstract” in the language chosen (example: Resumen.— El sapo...)

Key Words.- Used for indexing the article in online databases, key words should be placed on the same page as the abstract(s). Careful selection will improve the visibility of your article.

† Up to eight key words may be used to identify major aspects of the manuscript, such as the key methods, key variables, study locations, study organisms, or theory addressed.

† Do not repeat words that appear in the title

† Key words should be listed in alphabetical order and separated by semicolons

† Only the initial word in each term should be capitalized, unless it is a formal name. The phrase “*Key words:*” should be italicized, including the colon

Example: “*Key words:* Boreal Toad; Colorado; Disease; Survival; Temporary emigration”

Introduction.- The text should begin after the key words. Avoid unnecessary duplication with material covered in the Discussion.

† Do not include a heading for this section

Other sections.- Be concise but clear.

† The title should be centered, in small caps, and each major word should begin with a large capital letter. Example: Materials and Methods

- † Secondary titles should be indented. Each major word should be capitalized and italicized. Follow the title with a period and an em-dash. Example: “*Study Sites.—*”
- † In any italicized heading, scientific names of species should not be italicized so that they stand out from other text. Example: “*Analysis of paternity in Crotalus atrox*”
- † Do not use footnotes in the text
- † When two Figures or Tables are cited, use a comma to separate numbers. Example: “Figs. 6, 7; Tables 2, 3”

In-Text Citations.- Please read this section carefully, as errors in citation formats are relatively common.

- † Do not bold, underline, or italicize text
- † Cite references in chronological order, using a semicolon to separate citations and a comma to separate author names from dates. Example: “(Smith, 1975; Black, 1987)”
- † If there are multiple same-year references by the same author, list them as “(Smith, 2001a,b)”
- † Provide names for up to two authors “(Jones and Smith, 1987)”. For three or more authors, spell out the name of the first author, followed by “et al.” Example: “(Jones et al., 1990)”
- † If there are multiple same-year references by an author with various coauthors, list single-author references before those with a coauthor. List two-author references first and multiple coauthors last. Example: “(Smith, 1998; Smith and Jones, 1998; Smith et al., 1998)”
- † If there are multiple references by the same author and coauthor, or multiple references with the same first author and two or more coauthors, list them in chronological order regardless of the number of authors or their identity. Example: “(Smith and Jones, 1848; Smith et al., 1856a,b; Smith and Brown, 1858)”
- † Limit citation strings to 3 or 4 of the most pertinent references
- † Papers accepted for publication should be cited as “(Smith, in press)” and placed in the Literature Cited. Manuscripts which have not been accepted should be cited as “(Smith, unpubl. data)” and should not be placed in the Literature Cited. Unpublished observations should be cited as “(Potter, pers. obs.)” and should not be placed in the Literature Cited
- † Non peer-reviewed sources such as meeting abstracts and most web sites should be avoided if possible. However, dissertations and theses should be cited if the information has not also appeared in refereed form
- † For all commercial software mentioned in the text, specify the version and source Example: “(SPSS 13.0, IBM)”. For all commercial equipment provide the model and manufacturer. Example: “HOBO U23 Pro v2 External Temperature Data Logger (Onset Computer Corporation)”. Do not include either in the Literature Cited. For non-commercial software such as Program MARK, provide a citation in the text (in this case, White and Burnham, 1999) and in the Literature Cited
- † Peer-reviewed electronic resources should be cited in the same manner as paper-based ones
- † Use WebCite® (a free service) to archive non-peer-reviewed web sites first. Enter the URL you want to cite at www.webcitation.org. The system will create a “snapshot” of the webpage for future access. Cite as you would other sources. Example: “(Smith and Brown, 2011)”
- † Whenever possible, place all citations at the end of the sentence rather than interspersed with the text. Example: “Rattlesnakes are excellent subjects for research in many areas of biology (Klauber, 1972; Schaeffer, 1996; Schaeffer et al.,

1996; Beaupre and Duvall, 1998)”

Common and Scientific Names

Both common and scientific names vary in time and space. To maximize the ability of readers to identify study organisms across the world and over time but allow authors maximum flexibility in choosing their preferred authorities: †

For each species, provide a full citation of the taxonomic authority in the Literature Cited † If taxonomy has changed within the past decade, the former name of the organism must be presented at the first use of the name (example: “*Aspidocelis (Cnemidophorus) sexlineatus*”). Similarly, if your preferred taxonomic hypothesis differs from that of other authors, make sure to include the more commonly used name.

For standard names of North American species, follow Crother (<http://www.ssarherps.org/pdf/Crother.pdf>) or Liner and Casas-Andreu (2008; Herp. Circular 38, SSAR). Standard names for other species should follow an appropriate regional reference if available. Standard names of all reptiles and amphibians should be capitalized (example: Barking Treefrog)

Numbers

Always spell out a number used at the beginning of a sentence. Example: “Twenty species...”

† Spell out all whole numbers less than 10, except as noted below

† Use Arabic numerals:

- For numbers of 10 or greater
- When the number is followed by a unit of measurement. Example: “9 mm”
- When the number is a designator. Example: “Experiment 2”
- When a range of values is given. Example: “2–3 scutes”
- When numbers of 10 or more are compared to numbers less than 10 within a sentence. Example: “The 7 frogs, 9 salamanders, and 20 lizards that we collected...”
- For decimal values; if decimal value is less than one, use zero before decimal. Example: “0.5”

† Use commas in numbers with four or more digits (example: 280, but 5,280)

† Avoid excessive significant digits. Example: when measuring length with a ruler where the smallest measurement unit is 1 mm, report mean values as “15.7 mm” and standard deviation as “1.39 mm”

† Numbers or letters in a list should be fully enclosed in parentheses.

Example: “experiments (2), (3) and (4) failed; (1) did not”

† Geographic coordinates can be in any standard format, such as decimal degrees or UTM

† Specify the datum for the geographic coordinates. Example: “datum WGS 84”

Measurement Unites and Abbreviations

Follow the International System of Units (SI) throughout. Abbreviations include:

Linear measurement: Millimeters = mm, Centimeters = cm, Meters = m, Kilometers = km

Volume: Milliliters = mL, Liters = L

Mass: Grams = g, Kilograms = kg

Time: Seconds = s, Minutes = min, Hours = h, Days = d, Week = wk, Month = mo, Years = yr.

For time of day, use 24-hour clock (example: 1300 h)

Date: use Day Month Year with no commas, spelling out the name of the month

Example: “7 May 2006”

Temperature: Celsius, with space after number and with a degree symbol before the abbreviation for temperature scale. Example: “30 °C”

Statistical Abbreviations

Do not italicize Greek letters. Examples: α , χ^2

† Italicize all other statistical symbols. Examples: r , r^2 , F , t (as in t -test)

† Sample size: lower case and italicized. Example: “ $n = 5$ ”

† Mean or average: use “ X ” (capitalized and italicized) or spell out the word “mean”

† SD = standard deviation, SE = standard error, CI = confidence interval; often indicated as “ ± 1 SD”, “ ± 3 SE”, CI = 2.32 – 4.68, etc.

† Degrees of freedom: not italicized. Example: “df = 798”

† Probability: capitalize and italicize. Example: “ $P = 0.003$.” Provide the value, rather than using “NS” or “ $P > 0.05$.” Example: “ $P = 0.43$ ”

Mathematical Signs and Sybols

Separate mathematical operators by spaces on both sides. Examples: “ $\alpha = 0.05$ ”; “ $P < 0.025$ ”; “ 12 ± 0.02 ”

† Separate a number from a symbol to indicate a mathematical operation. Example: “ $1 + 1 = 2$ ”

Do not use a space between the “-” and the “+” when indicating positive or negative values. Examples: “ -2 °C”, “ ± 2 mm”

The symbols for “similar to” and “nearly equal to” are not followed by space. Examples: “ ~ 12 ”, “ ≈ 24 ”

† Use “log” for log base x (e.g. log base 10 would be \log_{10}) and “ln” for natural log

Other Common Abbreviations

Standard abbreviations are listed below. Do not use other abbreviations without first defining them in the text and be consistent in your use throughout the manuscript.

- † ca. = "circa" or "around"; lower case, not italicized, followed by period
- † cf. = "compare with"; lower case, not italicized, followed by period
- † e.g., = "for example"; lower case, not italicized, period after each letter, followed comma
- † i.e., = "that is"; lower case, not italicized, period after each letter, followed by comma
- † N = chromosome number; capitalized, not italicized (different from sample size)
- † SVL = snout–vent length; define this at first usage
- † vs. = "versus"; can be abbreviated in lower case without italics, or can be spelled out
- † sp. nov. and gen. nov. = "new species" and "new genus"; lower case, no comma before these terms
- † "pers. com." = "personal communication"
- † Spell out full the names of North American states. Example: "Colorado"
- † Capitalize and abbreviate the word "figure" (example: "Fig. 1") except at the beginning of a sentence

Dashes and Hyphenation

Use hyphen (dash) for modifiers and two-word phrases used as an adjective. Examples: "20-ml syringe", "24-hour clock", "*t*-test results", "life-history strategy", but "20 ml of water" or "the life history of bullfrogs"

- Do not hyphenate "Non" words. Example: "Nonparametric"
- Other common prefixes such as neo-, co-, re-, are not hyphenated except where necessary to prevent misreading or ambiguity. Example: "relocated" means "moved away", but "re-located" is used to indicate that a radiotracked individual has been found again
- Avoid using long hyphenated phrases as adjectives For example, avoid "We used black, sticky-sloping-plastic-matting as substrate in the aquaria"
- Use commas to separate clauses, instead of hyphens. Example: "The town, which is more of a village, is the nearest place to buy supplies."

Other Common Word Usage

Modern word processors include both spellcheckers and grammar correction options, but these are far from perfect. The list below contains some common problems and is far from comprehensive.

- *Affect* vs. *effect*: "Affect" is usually used as a verb and means "to influence, or have an effect on" whereas "effect" should be used as a noun that means an outcome or result
- *Because* vs. *since*: "Because" usually means "for the reason that" whereas "since" usually means "from a time in the past until now"
- *Because of* vs. *due to*: Do not use "due to" instead of "because of"
- *Farther* vs. *further*: "Farther" indicates a physical or measurable distance, whereas "further" indicates a figurative distance, such as in advancing, elaborating, or

- developing an explanation or argument
- *Infer* vs. *imply*: “Infer” means to deduce or conclude; “imply” means to hint or suggest.
- *That* vs. *which*: Usually, “that” is used with restrictive clauses. Example: “The snakes that we had captured” (the word “that” restricts the snakes being discussed to those that we captured). “Which” is used with nonrestrictive clauses. Example: “The snakes had all eaten frogs, which are common in the area” (the word “which” simply gives additional information about the frogs being discussed)
- *While* vs. *although* and *whereas*: “While” means “at the same time”; “whereas” or “although” should be used to indicate “in spite of” or “even though”
- *Therefore* vs. *thus*: “Therefore” usually means “as a consequence” or “for these reasons” whereas “thus” usually means “in this way” or “in that way”
- *Data*: The word “data” should always be used to indicate the plural (the singular is “datum”). Example: “The data are presented...”
- *Comprised of*: “comprised of” means “to contain”. For example, “the whole comprises its parts”. “Comprised of” should be avoided
- *Different from* is preferable to *different than* because it is consistent with how the word “differ” is typically used. Example: “Method A differs from method B in that...”

Specimens

If the study involved collection of specimens, provide accession numbers in the text

- † Use the Standard Symbolic Codes for Institutional Resource Collections in Herpetology and Ichthyology (<http://herpetologistsleague.org/dox/CollectAcronym-Sabaj10.pdf>) for museum abbreviations
- † For taxonomic papers, see additional specific comments below

Acknowledgments

The text ends with the acknowledgments section. Be as concise as possible.

- † Use a secondary heading. Spell “acknowledgments” with no “e” after “g”. Example: “*Acknowledgments.*—”
- † Use initials instead of first names for individuals. Example: “We thank H. Granger...”
- † Provide the numbers of all collection, research, export, and import permits, as well as Institutional Animal Care and Use Committee approval

Literature Cited Section

The Literature Cited is one the largest sources of errors. Carefully follow all format instructions and examples below. Check a recent issue if anything remains unclear.

General instructions

- † All references cited in the manuscript must appear in full in the Literature Cited section, and all references in the Literature Cited section must be cited in the text of the manuscript
- † Do not include personal observations and unpublished manuscripts in this section

- † Double space the entire section
- † Do not bold, underline, or italicize text other than scientific names
- † Do not use manual line breaks or tabs. Use indents instead
- † Cite references in alphabetical order. Example: Jones comes before Smith
- † References cited in the text as “Smith 2001a,b” should be cited in the same order here.
- † † Example: Smith 2001a precedes Smith 2001b
- † If there are multiple same-year references by an author with various coauthors, list single-author references before those with a coauthor. List two-author references first and multiple coauthors last. Example: Smith 1998 is first, followed by Smith and Jones 1998, followed by Smith et al. 1998
- † If the same author collaborated with different coauthors during the same year, order by the name of the junior authors. Example: Smith and Bell 1998 comes before Smith and Jones 1998. Example: Smith, Bell, and Brown 2000 precedes Smith, Bell, and Jones, 2000
- † If there are multiple “et al.” references by the same author, list them in chronological order regardless of the number of authors or their identity. Example: Smith, Bell, Zundermeier, and Jones 1848 comes before Smith, Abrams, and Bell 1856
- † Author names should be presented as “Smith, A.B.” or “Smith, A.B., III.” Spell out all author surnames, even if they are repeated from a previous reference
- † Always insert a comma before the “and” that precedes the last author. Example: “Smith, A.B., and J.F. Bell” or “Smith, A.B., R.Q. Zundermeier, and J.F. Bell”
- † Follow author names with the year of publication. Example: “Smith, A.B. 1769.” If you are using a reprinted version, indicate this by listing both years. Example: “Smith, A.B. 1769 [1996].” For articles that are accepted, state “In press” in place of the year. Example: “Smith, A.B. In press”

Article in a print journal

- † Provide the names of journals in full. Do not present issue number. List complete page numbers. Example: “Journal of Herpetology 32:246–257”
- † Example: Baird, T.A. 2004. Reproductive coloration in female collared lizards, *Crotaphytus collaris*, stimulates courtship by males. *Herpetologica* 60:337–348

Article in an on-line only journal

- † Follow the format above but also provide the URL for the article
- † Example: O'Donnell, R.P., and A.P. Rayburn. 2011. Biases in the protection of peripheral anuran populations in the United States. *Herpetological Conservation and Biology* 6:91-98.http://www.herpconbio.org/Volume_6/Issue_1/ODonnell_Rayburn_2011.pdf

Chapter in a book

- † Do not name the publication city. Provide the publication country.
- † Example: Smith, A.T. 1994. Systematics of frogs and toads. Pp. 52–65 in J. Black and M. Lee (Eds.), *Systematics of Amphibians and Reptiles*. University of Kansas Press, USA

Book

- † Do not provide the publication city. Do name the publication country

- † Example: Smith, A.T., and J. Jones. 1995. *Physiology of Amphibians and Reptiles*. Kluwer, Netherlands

Thesis or dissertation

- † Indicate the degree and university
- † Example: Smith, A.T. 1991. *Behavioral Ecology of Turtles*. Ph.D. Dissertation, Federal University of Sao Paulo, Brazil

Non-commercial software

- † Provide a named citation to the definitive description of the software
- † Example: for Program MARK: White, G.C., and K.P. Burnham. 1999. Program MARK Survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46 Supplement: 138

Non peer-reviewed technical report

- † Use only where unavoidable
- † Example: USGS (United States Geological Survey). 1998. National water quality assessment (NAWQA) program, water quality in the Ozark plateaus. Circular 1158

Non peer-reviewed print media

- † Use only where unavoidable
- † Example: Guam Economic Review. 1998. Statistical highlights. *Guam Economic Review* 20:11–32

Online reference

- † Use WebCite® (www.webcitation.org) to archive the web site. Provide the regular citation, followed by the archival site provided by the service

†

Example: Frost, D.R. 2004. Amphibian species of the world: an online reference Available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Archived by

WebCite at <http://www.webcitation.org/T8g8UVs14> on 4 July 2011

Appendices

Appendices follow the Literature Cited section. They are optional and should be used sparingly. Appendices include detailed information not essential to the text but useful to readers interested in specific methods, formulae, computer code, large data sets, or the species examined in taxonomic papers. When used, the primary heading would be: APPENDIX (numbered I, II, III as needed), followed by secondary headings as needed.

Tables

Tables are used to provide numerical information in a condensed form that does not duplicate material listed in the text or displayed in Figures.

- † Table files MUST be .xls or .doc, NOT a graphic format such as .pdf or .jpg. They

- † may be uploaded as individual files or included in the main document file.
- † Use the same font size, double spacing, and abbreviations as elsewhere in the text
- † Each table should appear on a separate page. Tables should be numbered consecutively using Arabic numeral that match references to them in the text. Example: “TABLE 1.—” (note that this text is not indented)
- † The legend should be concise but sufficiently detailed so the table can be understood without reference to the text. The legend should appear on the same page and above the table
- † Do not use vertical lines
- † Only capitalize the initial letter of the first word is capitalized (e.g., “Average length”)
- † Do not use footnotes

If a Table is too long to fit on a single page, continue it on additional pages as needed. At the top of each such page, insert the text “Table xx, continued,” followed by an empty line.

Figures

Figures are used to provide numerical information in visual form without duplicating material listed in the text or displayed in Tables.

- † Figure legends should be placed together, with three lines of space between each legend, and before the actual figures. They should be numbered in Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Each legend should be concise but sufficiently detailed to be understood without reference to the text
- † Each heading should begin with the word “FIG” in small caps, followed by a period and an em-dash. Example: “Fig. 1.—” (note that this text is not indented)
- † Use the same font size, double spacing, and abbreviations as elsewhere in the text
- † In preparing graphics, follow the guidelines below and those provided by Allen Press (http://allenpress.com/system/files/pdfs/library/apmk_digital_art.pdf)
- † Figures with multiple parts should have each part labeled with a capital letters (A, B, C, etc.) and all parts of the figure should be submitted on a single page and in a single file
- † Figures may be black-and-white or color. Unless specifically waived, the cost of printing color figures will be charged to the authors
- † Prepare Figures at high resolution (minimum requirements: grayscale or color images at 300 dpi, line art at 1200 dpi)
- † Submit graphics and artwork at full page size (do not exceed 21.5 × 28 cm). Make sure that it is sharp at the submission size. After reduction (usually to one or two columns), lettering in printed figures should be 1.5–2.0 mm high and decimals should be clearly visible. Authors will be charged for the extra work if the press has to request better version in the typesetting stage
- † All axes of graphs should be labeled, with a larger font size used for major labels than for minor or quantitative labels
- † Include a scale to indicate distance or size whenever appropriate
- † Do not use pictures taken from other sources without express permission. It is the responsibility of the authors to ensure that all copyright issues have been addressed. Please check a recent issue for additional examples.