UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

UMA **NOVA ESPÉCIE DE *ALLOBATES* DO CLADO *ALLOBATES CAERULEODACTYLUS* COM UM RARO CANTO DE DUAS NOTAS EMITIDO EM UMA EXPIRAÇÃO E EMBRIÕES ESVERDEADOS DA MARGEM ESQUERDA DO ALTO RIO MADEIRA, SUDOESTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Silionamã Pereira Dantas

Manaus, Amazonas
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Uma nova espécie de *Allobates* do clado *Allobates caeruleodactylus* com um raro canto de duas notas emitido em uma expiração e embriões esverdeados da margem esquerda do alto rio Madeira, sudoeste da Amazônia brasileira

Discente: Silionamã Pereira Dantas
Orientador: Prof. Dra. Albertina Pimentel Lima
Coorientador: Prof. Dr. Miquéias Ferrão da Silva Júnior

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia

Manaus, Amazonas
2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D192n

Dantas , Silionamã Pereira
Uma nova espécie de Allobates do clado Allobates caeruleodactylus com um raro canto de duas notas emitido em uma expiração e embriões esverdeados da margem esquerda do alto rio Madeira, sudoeste da Amazônia brasileira / Silionamã Pereira Dantas . 2023
63 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Albertina Pimentel Lima
Coorientador: Miquéias Ferrão da Silva Junior
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Taxonomia integrativa . 2. Diversidade críptica . 3. Allobates gasconi. 4. Canto de anúncio . 5. Girino . I. Lima, Albertina Pimentel. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Eu falei de paixão e de ambição honesta como forças que nos levam ao trabalho criativo. O amor por um tema, e repito para dar ênfase, tem mérito por si só. Pelo prazer extraído das descobertas de novas verdades, o cientista é em parte poeta, e pelo prazer extraído dos novos meios de expressar velhas verdades, o poeta é em parte cientista. Nesse sentido, ciência e arte criativas são fundamentalmente a mesma coisa.”

Edward O. Wilson, em “Cartas a um Jovem Cientista”

AGRADECIMENTOS

Certamente não seria justo começar estes agradecimentos sem direciona-los aos meus pais, Maria Gilsa (Gilsa) e Pedro Alves Dantas (Doca) in memória. Vocês deram-me a oportunidade de estar vivenciando este momento, foi através de vocês que tive e tenho a oportunidade de conhecer pessoas e lugares incríveis. Porém, o mais importe foi me permitir estudar, mostrarem de melhor maneira possível o caminho justo, honesto e simples a ser seguido. Não tenho palavras para descrever tamanha falta que me fazem, e o quanto gostaria que estivessem comigo neste momento, mas também sei que a vida não é justa, não será justa e nunca foi justa. Pai e mãe, amo vocês com todas as forças do universo. Agradeço aos meus irmãos (Katia, Cezar, Nilton, Leandro, Kássia, Zé, Mocinha, Leoni e Gilzirene) por estarem comigo nessa jornada, sei que sentem minha falta, que queriam que estivesse um pouco mais ao lado de vocês, mas meu lugar é no mundo, talvez um dia fique um pouco mais. Porém, saibam que amo todos vocês infinitamente, mas a falta que sinto do nosso velho é grande demais pra eu ficar em casa. Me desculpem.

Ao meus orientadores Albertina e Miquéias, agradecimentos infinitos pela paciência, dedicação e por me apresentarem mais profundamente o conhecimento sobre nossos sapos. Obrigado por terem dividido o seu conhecimento comigo, pela oportunidade de conhecer o coração da Amazônia com dois dos mais renomados cientistas desse país. Levarei eternamente cada vivência compartilhada nesse maravilhoso período de tempo. Vocês são o alicerce e o boa parte do motivo de estar vivendo esse momento. Obrigado, obrigado e obrigado.

Obrigado querida Rosa, você me motivou tanto, talvez você seja a pessoa que mais acredita em mim, que mais teve certeza que eu chegaria ao final deste momento, obrigado por cada palavra de incentivo e carinho que me proferiu. Obrigado também pela oportunidade de conhecer lugares incríveis ao seu lado. Você está profundamente guardada no meu coração.

Meus amigos Lucas e Bryan, obrigado por todo nosso convívio, por nossa amizade verdadeira que foi construída nesses dois anos, vocês tornaram meus dias mais felizes e tranquilos, vocês são dois irmãos dados a mim como presente pela Amazônia. Meus amigos Cianir, Claudia, Milena, Aline e demais colegas obrigado pela vivência e momentos maravilhosos que pudemos compartilhar. Vocês estão guardados em lugar especial do meu coração. Aos amigos Alexander, Igor e Estebam obrigado pelo carinho,

algumas conversas e vários momentos ótimos compartilhado com vocês. Anthony e Jussara obrigado pelos dias no “Albertina Lab” e todos os dias do Juruá. Obrigado aos meus amigos da equipe Ecobiose (Wlainer, Divinin, Hugo, Wanieulli, Leandro, Thiago), vocês são especiais. Obrigado a dona Ângela pelo carinho e acolhimento que me foi dado quando mais precisei de um cantinho. Meu muito abrigado a todos do laboratório Albertina Lima, vocês permitiram que meus dias fossem mais tranquilos e repletos de aprendizagem.

E por último e não menos importante, um agradecimento especial a todos os professores que já passaram por minha vida, em especial a professora Jeane Almeida, a senhora é mais que uma professora, você foi a responsável por eu ter iniciado toda essa história e acreditado em mim. Obrigado por todo carinho desses longos anos, amo a senhora como uma mãe.

Agradeço ao PPGZool e a todos que trabalham para o funcionamento do programa. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas por financiar minha pós-graduação. Meus agradecimentos especiais a Universidade Federal do Amazonas-UFAM e ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, sem os quais não teria como realizar minha pesquisa.

Agradeço a FAPEAM (Programa BIODIVERSA/FAPEAM: C, T&I – Edital nº 007/2021, concedido a A.P. Lima) por financiar o material para as sequencias genéticas utilizadas neste estudo e ao INPA, Núcleo de Roraima pelo suporte com o transporte e combustível.

Agradeço a Coleção de Invertebrado do Inpa pela utilização da lupa com o equipamento fotográfico para as fotografias de alta resolução.

Agradeço ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex) na Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, edital 016/2006, Proc 1437/2007) coordenado por José Albertino Rafael, INPA, Manaus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição de *Allobates gasconi* senso lato SL3, SL4 e SL5.....14

Figura 2: Micro-habitat de *Allobates* SL3 sp.....14

Figura 3: Distribuição geográfica das espécies do clado *Allobates caeruleodactylus*.....23

Figura 1: Análise de Componentes Principais baseadas em 12 razões morfométricas de machos de *Allobates gasconi* SP3 sp. nov. e *A. gasconi* SP4.....26

Figura 2: Análise de componentes Principais baseadas em 9 parâmetros acústicos de machos de Allobates SP3 sp. nov. (círculos vermelhos) e Allobates SP4 sp. nov. (quadrados azuis) 27

Figura 3: Vistas dorsais, ventrais e laterais do macho holótipo AP23783 (A–C) e fêmea parátipo APL23790 (D–F) de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov.....34

Figura 4: Vistas ventrais da mão e pé do macho holótipo APL23783 (A, C) e fêmea parátipo APL23790 (B, D) de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. 36

Figura 5: Variação da coloração em preservativo de Allobates gasconi SL3 sp. nov. (A–C) Macho, APL23774, SVL 15.8 mm. (D–F) Macho, APL23772, SVL 17.0 mm. (G–I) Macho, APL23777, SVL 17.0 mm. (J–L) Fêmea, APL23781, SVL 17.4 mm.....37

Figura 6: Variação da coloração em vida de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A–C) Fêmea, APL23781, SVL 17.4 mm. (D–F) Fêmea, APL23790, SVL 17.5 mm. (G–H) Macho, APL23772, SVL 17.0 mm. (H) Fêmea, APL23787, SVL 16.9 mm. (J–L) Macho, APL23774, SVL 15.8 mm.....39

Figura 7: Girino de *Allobates* SL3 sp. nov. coletados em Vista Alegre do Abunã (lote APL–23784), estágio 36 de Gosner. Vistas lateral (A), dorsal (B), vista da região ventral (C), vista ventral do disco oral (D). Barras de escala: (A) 5 mm; (B, C) 1 mm; e (D) 2 mm.....45

Figura 11: Canto de anúncio de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A–B) e *A. gasconi* SL4 (C–D). Oscilogramas na porção superior da figura mostram a emissão contínua de séries de cantos com arranjos distintos em *A. gasconi* SL3 sp. nov. (A) e *A. gasconi* SL4 (C).....49

Figura 8: Machos de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. vocalizando. (A) Holótipo, SVL 15.94 mm. (B) Macho não coletado. Em alguns casos, os melanóforos presente na região gular podem ser melhor visualizados quando o saco vocal se encontra expandido (B).....52

Figura 9: História natural de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A) setas verdes indicam poças de provável deposição de girinos; (B) macho não coletado cantando; (C) fêmea não coletada; (D) desova recém-posta com 24 ovos; (E) desova com 20 embriões, note o ventre esverdeado dos embriões; (F) ninho com três desovas em diferentes estágios de desenvolvimento larval.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de canto de anúncio de *Allobates* SL3 sp. nov. e A. SL4. Os valores representam a média do canto de 10 machos.....21

Tabela 2: Distâncias genéticas pareadas não corrigidas (P; diagonal inferior) e Kimura de dois parâmetros (K2P; diagonal superior) entre espécies do complexo de espécies *Allobates gasconi* incluídas em nossas análises filogenéticas.....25

Tabela 3 - Medidas morfométricas de Allobates SL3 sp. nov. e A. SL4. Os valores representam média ± desvio padrão (intervalo).....42

Tabela 4- Medidas morfométricas de 28 girinos de Allobates SL3 sp. nov., estágio Gosner 34–37, de Vista alegre do Abunã-Porto Velho-RO. Os valores representam média ± desvio padrão (intervalos).....48

Uma nova espécie de *Allobates* do clado *Allobates caeruleodactylus* com um raro canto de duas notas emitido em uma expiração e embriões esverdeados da margem esquerda do alto rio Madeira, sudoeste da Amazônia brasileira

Silionamã Pereira Dantas[1]*, Miquéias Ferrão[2], Antônio Saulo Cunha-Machado[3] Albertina Pimentel Lima[3],

1 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: dantasbio12@gmail.com.

2 Museum of Comparative Zoology, Harvard University, 26 Oxford Street, Cambridge, Massachusetts 02138, U.S.A.; e-mail: uranoscodon@gmail.com

3 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo 2936, 69011-970, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mails: A.P. Lima <albertina.lima59@gmail.com>; A. C. Cunha-Machado <ascmbio@gmail.com>.

RESUMO

O gênero *Allobates* é dividido atualmente em nove clados de espécies. Estudos recentes apontam ampla existência de diversidade escondida ou críptica em alguns grupos com complexo histórico taxonômico. Dentre eles as linhagens do clado "*Allobates gasconi*" encontradas no sudoeste da Amazônia. Alguns estudos reconheceram estas linhagens como coespecíficas, enquanto outros estudos apontaram a existência de diversidade críptica associada ao mesmo. Um estudo recente baseado em dados da localidade tipo de *A. gasconi* e através de taxonomia integrativa mostrou que *A. gasconi* sensu stricto pertence ao clado *A. trilineatus*, enquanto o complexo de espécies *A. gasconi* sensu lato pertence ao clado *A. caeruleodactylus*. Recentemente, uma das espécies candidatas do complexo "*A. gasconi*" com distribuição no estado do Acre está em processo de descrição. No presente estudo, revisamos uma das linhagens do complexo "*A. gasconi*" do alto rio Madeira apontada anteriormente como espécie candidata. Nossos resultados corroboram delimitações moleculares anteriores que atribuíram o status heterospecífico a referida linhagem, sendo esta descrita no presente estudo por meio de taxonomia integrativa. A espécie nova difere da maioria dos congenéricos por apresentar canto consistindo de um

par de notas emitidas em uma única exalação, estrutura esta não reportada anteriormente para espécies do clado *A. caeruleodactylus*. O canto de anúncio tem duração média de 59 ± 4 ms com uma taxa de emissão de canto de 68.4 ± 0.5 cantos por minuto, a primeira nota mais curta que a segunda e frequência dominante de 5.135 ± 293 Hz. A espécie apresenta dorso tuberculado, discos e falanges dos dedos da mão expandidas, saco vocal branco e recoberto com melanóforos, ovócitos marrom-escuro, ovos com polo animal e vegetal cinza e embriões esverdeados. Os girinos têm duas ou três papilas curtas e piramidais distribuídas em uma única fileira em cada margem lateral do lábio anterior, comprimento relativo das fileiras de dente P3< P1 ≈ P2, P1 e P2 de igual comprimento, P3 ≈ 50% P1. Até o momento, a espécie foi registrada desde a montante da Cachoeira do Jirau até o distrito de Abunã, exclusivamente em áreas riparias não sujeitas a inundações sazonais na margem esquerda do Rio Madeira.
Palavra-chave: Taxonomia Integrativa, Diversidade críptica, *A. gasconi*, Canto de anúncio, Girino.

ABSTRACT

The genus *Allobates* is currently divided into nine clades of species. Recent studies point to a wide existence of hidden or cryptic diversity in some historical taxonomic complexes. Among them, the lineages of the "*Allobates gasconi*" clade were applied in the southwest of the Amazon. Some studies recognized these lineages as conspecific, while other studies pointed to the existence of cryptic diversity associated with it. A recent study based on data from the type locality of *A. gasconi* and through integrative taxonomy showed that *A. gasconi* sensu stricto belongs to the clade *A. trilineatus*, while the species *A. gasconi* sensu lato complex belongs to the clade *A. caeruleodactylus*. Recently, one of the candidate species of the "*A. gasconi*" with distribution in the Acre state is in press.

In the present study, we reviewed one of the strains of the "*A. gasconi*" from the upper Madeira River, previously identified as a candidate. Our results corroborate previous molecular delimitations that attributed the heterospecific status to that lineage, which is described in the present study through integrative taxonomy. The new species differs from most congeners by having a song consisting of a pair of exclusive notes in a single exaltation, a structure not previously reported for species of the clade *A. caeruleodactylus*. The advertisement call has an average duration of 59 ± 4 ms with a call emission rate of 68.4 ± 0.5 calls per minute, the first note shorter than the second and a dominant frequency of 5.135 ± 293 Hz. The species has a tuberculated dorsum, finger phalanges and digital disks expanded, white vocal sac covered with dark spots, dark brown eggs, with gray animal and vegetable poles, and greenish embryos. Tadpoles have two or three short, pyramidal papillae distributed in a single duct on each lateral margin of the anterior lip, relative length of tooth waves P3< P1 ≈ P2, P1 and P2 of equal length, P3 ≈ 50% P1. So far, this species has been recorded from the headwaters of Cachoeira do Jirau to the Abunã district, exclusively in riparian areas not subject to seasonal flooding on the left bank of the Madeira River.

Keywords: Cryptic diversity, Integrative taxonomy, *A. gasconi*, Advertisement call, Tadpoles.

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 11
2. **MATERIAIS E MÉTODOS** 13
2.1 Área de Estudo 13
2.2 Amostragem 15
2.4 Morfologia 18
2.5 Bioacústica 19
2.6 Análises morfométricas 20
3. **RESULTADOS** 22
3.1 Relações filogenéticas e distância genética 22
3.2 Evidências morfológicas e bioacústicas de separação das espécies *Allobates* SL3 sp. nov. e *Allobates* SL4 25
3.3 Taxonomia 27
3.3.1 Holótipo 28
3.3.2 Parátipos 28
3.3.3 Alocação genérica 28
3.3.4 Diagnose 28
3.3.5 Comparações interespecífica 30
3.3.6 Descrição do holótipo 32
3.3.7 Coloração em preservativo do holótipo 35
3.3.8 Variação da coloração em preservativo da série tipo 36
3.3.9 Coloração do holótipo e série tipo em vida 38
3.3.10 Variação morfológica dos parátipos 39
3.3.11 Descrição do Girino 44
3.3.12 Comparações entre Girinos 45
3.3.13 Vocalização 49
3.3.14 Comparação bioacústica 50
3.3.15 Distribuição e história natural 51
4. **DISCUSSÃO** 53
5. **FINANCIAMENTO** 57
6. **REFERÊNCIA** 57

1. INTRODUÇÃO

A taxonomia integrativa utiliza linhas de evidências independentes, por exemplo genética, bioacústica, ecologia, morfologia e história natural (Vieites et al. 2009; Padial et al. 2010; Brown et al. 2011) para delimitação e descrição de novos táxons (gênero, grupo de espécies, espécies, subespécies). Um dos pontos chave da taxonomia integrativa tem sido a sustentação do diagnóstico de novos táxons por no mínimo duas linhas de evidências com valores de divergência notadamente relevantes (Vences et al. 2005, Fouquet et al. 2007, Vieites et al. 2009, Oswald et al. 2023). O conhecimento sobre a riqueza de espécies de diversos gêneros de anuros neotropicais tem se beneficiado com o amplo uso da taxonomia integrativa, como *Amazophrynella* (Rojas et al. 2018), *Ischnocnema* (Oswald et al. 2023), *Leptodactylus* (Magalhães et al. 2020, Carvalho et al. 2022), *Pristimantis* (Oliveira et al. 2020, Fouquet et al. 2022a, Mônico et al. 2022), *Rhinella* (Ferrão et al. 2022), *Scinax* (Ferrão et al. 2016, Ferrão et al. 2022) e *Synapturanus* (Fouquet et al. 2021).

Este é também o caso das pequenas e elusivas rãs-cuidadoras do gênero *Allobates* Zimmermann & Zimmermann, 1988, que é constituído por 62 espécies nominais (Frost et al. 2022) alocadas em nove clados (sensu Réjaud et al. 2020). Estudos nas últimas duas décadas apontam ampla divergência entre linhagens de *Allobates*, "normalmente genética e bioacústica" (Melo-Sampaio et al. 2018, Lima et al. 2020, Réjaud et al. 2020, Vacher et al. 2020, Jamarillo et al. 2021, Ferrão et al. 2022, Fouquet et al. 2023). Como exemplos dessa diversidade críptica, 22 espécies morfologicamente similares foram descritas na última década, 95% delas para a Amazônia (e.g. Simões et al. 2010; Lima et al. 2010; Simões et al. 2013; Lima et al. 2014; Lima et al. 2015; Simões, 2016; Melo-Sampaio et al. 2018; Simões et al. 2019; Lima et al. 2020; Moraes & Lima, 2021; Melo-Sampaio et al. 2013; Simões et al. 2018; Moraes et al. 2019; Souza et al. 2020; Melo-Sampaio et al. 2020; Silva et al. 2022; Ferrão et al. 2022; Fouquet et al. 2023). É bem conhecido também que diversas espécies descritas anteriormente antes da era da taxonomia integrativa apresentam problemas taxonômicos, e que algumas destas representam complexos de espécies (Vacher et al. 2020; Ferrão et al. 2022; Fouquet et al. 2023).

Dentre estas espécies com histórico taxonômico problemático está *Allobates gasconi* (Morales, 2002). A espécie foi descrita com base exclusivamente em caracteres morfológicos e coloração em preservativo de indivíduos das margens do rio Juruá,

sudoeste da Amazônia Brasileira (Morales, 2002). Grant et al. (2006) recuperam pela primeira vez as relações filogenéticas da espécie com base em um indivíduo identificado por Victor Morales como sendo de *A. gasconi*. Posteriormente, Lima et al. (2014) sequenciaram indivíduos coletados próximo a cidade de Eirunepé no rio Juruá e atribuíram estes à *A. gasconi*. Em seguida Melo-Sampaio et al. (2018) sequenciaram novos indivíduos de várias localidades do sudoeste da Amazônia brasileira e recuperaram três clados fortemente suportados dentro do que vinha sendo chamado de *A. gasconi*. Vacher et al. (2020) sequenciaram indivíduos nominados como *A. gasconi* do alto rio Madeira (Abunã, Porto Velho, Rondônia) e mostraram por meio de delimitação molecular de espécies que *A. gasconi* compreendia potencialmente três espécies distintas.

Recentemente, A.P. Lima e colaboradores amostraram a localidade-tipo, coletaram material para redescrição de *Allobates gasconi* (*SS*) (Ferreira et al. *in press*) e demostram que o complexo de espécies que vem sendo chamado de *A. gasconi* não representava um único táxon. A filogenia inferida no estudo mostra que *A. gasconi* sensu stricto e sensu lato não pertenciam nem mesmo ao mesmo clado de espécies, sendo o primeiro um membro do clado *A. trilineatus* e o último um membro do clado *A. caeruleodactylus* (Ferreira et al. *in press*). Além disso, os autores corroboraram a existência de espécies candidatas dentro de *A. gasconi* sensu lato e indicaram que nenhuma delas havia sido descrita formalmente. No mesmo ano, Souza *et al.* (2023) sugerem que as cinco linhagens associadas a *A. gasconi* sensu lato (SL1–SL5) representam espécies candidatas distintas e descrevem por meio de taxonomia integrativa uma destas linhagens (SL4). Enquanto o estudo de Souza *et al*. (*in press*) não for publicado, no presente trabalho iremos nos referir a este complexo de espécies como complexo *A. gasconi* sensu lato (SL4).

Embora a problemática entorno de *Allobates gasconi* sensu stricto tenha sido resolvida e uma nova espécie do complexo *A. gasconi* sensu lato tenha disso descrita, quatro linhagens pertencentes ao complexo precisam ser revisadas. Dentre estas linhagens, SL3 e SL5 (sensu Ferreira *et al*. in press, Souza *et al.* (2023) ocorrem em paisagens ameaçadas da margem esquerda do alto rio Madeira, sendo a primeira linhagem com distribuição mais restrita até o momento e com demanda mais urgente de revisão taxonômica.

Durante expedição de campo no distrito de Vista Alegre do Abunã (Porto Velho, Rondônia, Brasil), coletamos novos indivíduos adultos, girinos, cantos de anúncio e dados de história natural de uma população identificado na literatura como *Allobates gasconi* SL3. O objetivo deste trabalho foi revisar este material, testar o status

heterospecífico desta linhagem, e através de taxonomia integrativa, descrever formalmente esta espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Estudo

A coleta de dados foi realizada em ambas as margens do alto rio Madeira em Rondônia, Brasil. Na margem esquerda, a paisagem apresenta formações tabulares e fragmentos de um planalto associado a sedimentos pré-cambrianos. Na margem direita, a paisagem é constituída por um planície plana contínua, originado a partir de sedimentos pliopleistocênicos (DNPM 1978, Souza Filho et al. 1999). O clima da região apresenta estações seca (junho a setembro) e chuvosa (outubro a maio) bem definidas (SEDAM 2019). Em ambas as margens, a vegetação é composta predominantemente por floresta ombrófila aberta (IBGE 2012). O micro-habitat é formado por poças de tamanhos variados em meio a serapilheira de florestas de terra firme não inundadas. (Fig. 2).

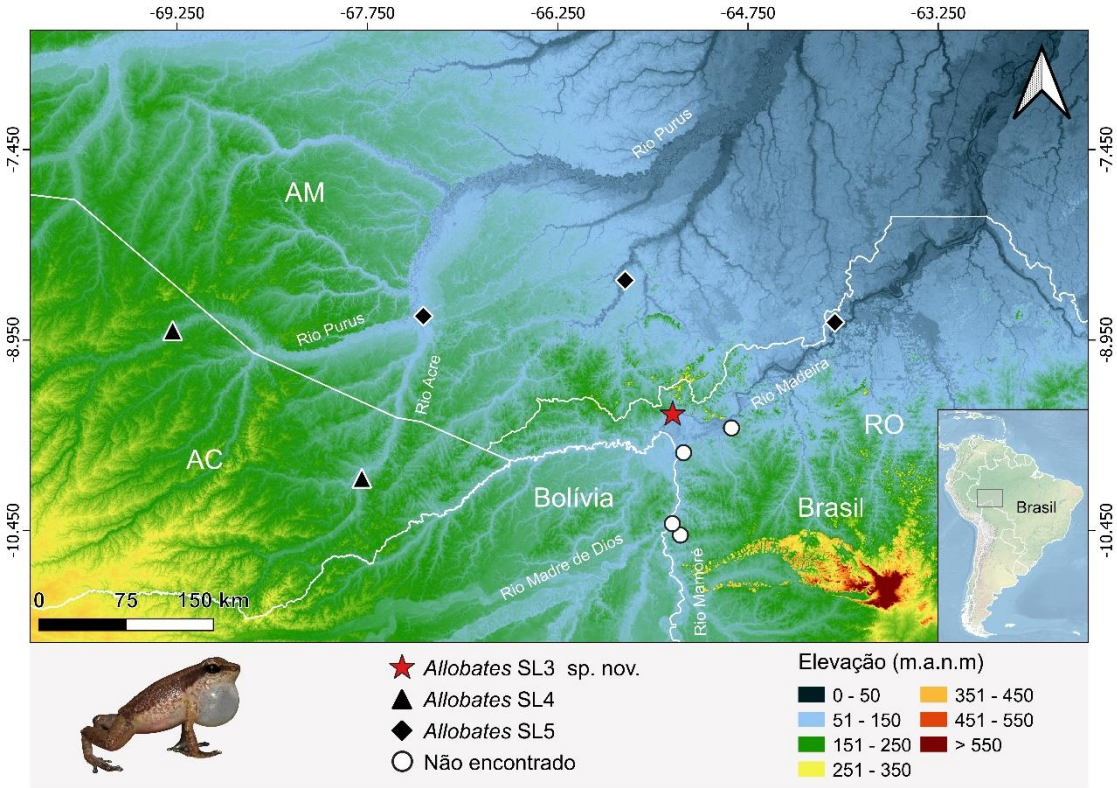

Figura 1. Mapa de distribuição de *Allobates gasconi* senso lato SL3, SL4 e SL5. Estrela vermelha indica a localidade onde indivíduos de *A. gasconi* SL3 foram coletados; círculos brancos indicam áreas na margem direita do rio Madeira onde linhagens deste *complexo* de espécies são ausentes (de norte a sul: Faz. Rio Madeira, Terra Indígena Igarapé Lage e Nova Mamoré) "triangulo preto central, estrela vermelha e círculos brancos são áreas amostradas neste estudo". Triângulos pretos indicam área de ocorrência de *A. gasconi* SL4*;* rombos pretos áreas de ocorrência de *A. gasconi* SL5.

Figura 2. Micro-habitat onde espécimes de *Allobates* SL3 sp. nov. foram encontrados. Os espécimes foram coletados no distrito de Vista Alegre do Abunã, município de Porto Velho-RO.

2.2 Amostragem

Nossas buscas foram realizadas durante o dia, entre 10 e 28 de fevereiro de 2022, as buscas por espécimes de *Allobates* foram realizadas em 6 localidades, 2 na margem esquerda e 4 na margem direita do rio Madeira, nos municípios de Porto Velho, Nova Mamoré em Rondônia (Fig. 1). Em Vista Alegre do Abunã (-9.5345832, -65.343587; 150 m a.s.l.) coletamos 27 adultos (17 machos e 10 fêmeas da espécie candidata) de *Allobates gasconi* SL3. Os espécimes foram eutanasiados com solução tópica de benzocaína aquosa a 2%, preservados em formol a 10% em seguida armazenados em álcool 70%. Antes da fixação, uma amostra de tecido muscular da coxa dos espécimes foi retirada e preservada em álcool etílico 98.5%.

Quatro desovas encontradas na mesma localidade dos adultos foram coletadas para acompanhar o desenvolvimento embrionário. Girinos foram criados em recipiente plástico (35 cm x 45 cm) com substrato constituído por folhagem, argila e água da chuva. Este recipiente foi mantido dentro de um fragmento florestal no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA; Manaus, Brasil), simulando o ambiente natural onde as

desovas foram encontradas. Girinos foram eutanasiados nos estágios 34–37 de Gosner, com solução aquosa de benzocaína e preservados em formol 5%.

Adultos e girinos foram depositados nas coleções herpetológicas do INPA (INPAH) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG; Belém, Brasil). Os protocolos de coleta e cuidados com os animais seguem a resolução do Conselho Federal de Biologia nº 148/2012 (Conselho Federal de Biologia CFBio, 2012). Os espécimes foram coletados sob licença de coleta nº 1337-1 e 02001.000508/2008-99 emitidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA (Ministério do Meio Ambiente, Governo do Brasil).

Gravamos o canto de anúncio de 10 dos 17 machos coletados da nova espécie em 20–23 de fevereiro de 2022. Gravações foram feitas nos picos de atividade vocal da nova espécie (06:00–11:30 e 15:00–18:30) com gravadores digitais com microfone embutido Tascam DR-40 e DR-05X, e Sony WM-D6C a uma taxa de amostragem de 44,1 kHz e amostra tamanho de 16 bits. Gravadores foram posicionados aproximadamente a um metro de distância dos machos gravados. A temperatura do ar no momento das gravações variou entre 23.8° e 26°C. Gravações serão depositadas na SAPOTECA: biblioteca de sons e vídeos de anuros amazônicos. CENBAM, Manaus, (Amazonas, Brasil) e na Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard (FNJV) da Universidade de Campinas (Campinas, Brasil).

2.3 Análise Molecular

Extraímos o DNA genômico do tecido de seis espécimes de Vista Alegre do Abunã. Além disso, incluímos amostras de espécimes coletados por A. P. Lima de outras localidades localizadas na margem esquerda do Rio Madeira, cuja vocalização e aspecto morfológico dos indivíduos se assemelhavam a SL3, com o objetivo de avaliar a relação com a espécie de nosso interesse. Extraímos DNA de tecido de quatro indivíduos de Teotônio, dois da Boca do Acre, dois do oeste de Jirau e um de Pedras, usando o kit comercial Wizard (Promega Corp., Madison, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Fragmentos de dois genes mitocondriais (rRNA 16S; citocromo oxidase I - COI) e dois nucleares (tirosinase - TYR; gene ativador de recombinação 1 - RAG1) foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os seguintes primers universais: 16sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16sbr (5'-

CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') para 16S (Palumbi, 1996), AnF1 (5'-ACHAAYCAYAAAGAYATYGG-3') eAnR1(5'-CCRAARAATCARAADARRTGTG-3') para COI (Lyra et al. 2017) Amp_F2 (5'-ACNGGNMGICARATCTTYCARCC-3') e Amp_R1 (5'-AACTACGCTGCATTKCCAATRTCACA-3') para RAG1 (Chiari et al. 2004) e TyrC (5'-GGCAGAGGAWCRTGCCAAGATGT-3')e TyrG (5'-TGCTGGCRTCTCTCCARTCCCA-3') para TYR (Bossuyt e Milinkovitch 2000). Seguimos os volumes de PCR e as condições do ciclo de Mônico et al. (2022). Os produtos de PCR foram purificados usando PEG 8000, submetidos a sequenciamento usando protocolos padrão do Big DyeTM Terminator Kit (Applied Biosystems Inc., Grand Island, NY, EUA) e sequenciados através de um ABI PRISMI 3130XL (Thermo Fisher) usando primers direto e reverso de cada gene. Os amplicons foram verificados visualmente e editados manualmente no Geneious 5.3.4 (Kearse et al. 2012). Trinta e nove novas sequências (16S = 15, COI = 12, TYR = 6, RAG1 = 6) foram geradas e depositadas no GenBank sob os números de acesso xxxxxxx–xxxxxx. Sequências publicadas anteriormente foram baixadas do GenBank para inferir as relações filogenéticas de espécimes recém-sequenciados. Além dos genes aqui sequenciados, sequências do gene mitocondrial citocromo b (CYTB) foram baixadas do GenBank. A amostragem de táxons foi focada no clado *Allobates caeruleodactylus* (sensu Réjaud et al. 2020), especialmente no complexo "*A. gasconi*". Sequências de *Allobates* sp. Neblina, *A. femoralis* e *A. olfersioides* foram usadas para enraizar a árvore filogenética. Sequencias de cada gene foram alinhadas separadamente através de MAFF no servidor web https://mafft.cbrc.jp/alignment/ usando as estratégias E-INS-I e G-INS-i para os genes 16S e codificadores de proteínas (COI, CYTB, RAG1 e TYR), respectivamente.

A matriz final foi concatenada no Geneious e composta por 55 terminais e 3.706 pares de bases (16S = 607, COI = 643, CYTB = 1.139, TYR = 501, RAG1 = 816).
A matriz final foi inicialmente dividida em 13 partições, uma para o 16S e uma para cada códon dos genes codificadores de proteínas. Model Finder (Kalyaanamoorthy et al. 2017) foi usado para calcular o modelo evolutivo e esquema de partição de melhor ajuste, que determinou como melhor o seguinte: TIM2 + F + I + G4 para 16S + CYTB 1st + RAG 3rd códons, TN + F + G4 para COI 1st + TYR 1st códons, HKY + F + I para COI 2nd + CYTB 2nd códons, TN + F + G4 para o COI 3rd + CYTB 3rd códons e HKY+ F+ I para RAG1 1st + RAG1 2nd +TYR 2rd + TYR 3rd códons. As relações filogenéticas foram inferidas por meio da inferência de Máxima Verossimilhança usando IQTREE (Nguyen

et al. 2015). Os suportes de nó foram calculados por meio de bootstrap ultrarrápido (10.000 réplicas, iterações malsucedidas para 100 e 1.000 iterações máximas e um coeficiente de correlação mínimo de 0,99; Hoang et al. 2018) e 10.000 réplicas do teste de razão de verossimilhança aproximada de Shimodaira-Hasegawa. As distâncias genéticas par-a-par não corrigidas (p) e Kimura-2-Parametros (K2P; Kimura, 1980) foram calculadas entre todos os membros do complexo *Allobates gasconi* sensu lato usando emparelhamento por eliminação no MEGA 11 (Tamura et al. 2021).

2.4 Morfologia

Coletamos todos os indivíduos de *Allobates gasconi* SL3 no período reprodutivo. Todos os machos coletados estavam vocalizando, uma fêmea foi coletada logo após a desova e as outras em corte próximo aos machos. Determinamos o sexo dos adultos coletados por meio de caracteres morfológicos secundários (presença de saco vocal em machos, pela transparência no ventre das fêmeas, além disso, fêmeas apresentam um desenho branco triangular na região gular, inexistente em machos). Analisamos a variação morfológica de 17 machos e 10 fêmeas. Terminologia, caracteres morfológicos e medidas morfométricas seguem Grant et al. (2017) e Jaramillo et al. (2021). Trinta e quatro medidas foram tomadas com microscópio estereoscópico: comprimento rostro-cloacal, medido da ponta do focinho até a cloaca (**SVL**); comprimento da cabeça (**HL**); largura da cabeça (**HW**); comprimento do focinho (**SL**); distância interorbital (**IO**); distância olho-narina (**EN**); distância internasal (**IN**); diâmetro do olho (**ED**); diâmetro do tímpano (**TYM**); comprimento do antebraço (**FAL**); comprimento do braço (**UAL**); comprimento da coxa (**THL**); comprimento da tíbia (**TL**); comprimento do pé (**FL**); comprimento da mão, da borda proximal do tubérculo palmar até a ponta dos dedos I–IV (**HANDI–HANDIV**); largura do disco no dedo I–IV (**WFDI–WFDIV**); diâmetro do tubérculo palmar (**DPT**); largura do tubérculo tênar (**WTT**); largura da terceira falange do dedo I–IV da mão em seu nível médio (**WPFI–WPFIV**); e largura do disco dos dedos da mão I–IV (**WTDI–IV**); largura da falange do segundo dedo da mão, abaixo do calo basal (**WBFII**); largura da falange do terceiro dedo da mão, acima do calo basal (**WBFIII**). A descrição morfológica dos adultos segue Lima *et al*. (2014) e Jaramillo *et al*. (2021). Descrição da coloração dos adultos foi feita a partir de fotografias e vídeos de Albertina P. Lima e Silionamã P. Dantas, além de observações em campo.

Para descrição dos girinos seguimos os estágios de desenvolvimento de Gosner (1960). Terminologia, medidas morfométricas e caracteres diagnósticos seguiram Altig & McDiarmid (1999) and Schulze et al. (2015). Vinte e oito medidas morfométricas foram realizadas em girinos: comprimento total, medido da ponta da cauda à ponta do focinho (**TL**); comprimento do corpo, medido da ponta do focinho à inserção da cauda (**BL**); comprimento da cauda, medido da ponta da cauda até sua inserção no corpo (**TAL**); largura do corpo (**BW**); altura corporal ao nível do espiráculo (**BH**); largura da cabeça (**HWLE**); largura do músculo da cauda (**TMW**); altura máxima da cauda (**MTH**); altura do músculo da cauda (**TMH**); altura da membrana dorsal (**DMH**); altura da membrana ventral (**VMH**); distância interorbital (**IOD**); distância internasal (**IND**); distância olho-narina (**END**); distância narina-focinho (**NSD**); distância olho-focinho (**ED**); diâmetro da narina (**ND**); diâmetro do olho (**ED**); comprimento do tubo de ventilação (**VTL**); comprimento do espiráculo (**STL**); largura do espiráculo (**SW**); largura da abertura do espiráculo (**WOS**); largura do disco oral (**OD**). Medidas dos girinos são apresentadas na (Tabela 2).

2.5 Bioacústica

Analisamos o canto de anúncio no programa Raven Pro. 1.6.3 (Centro de Conservação Bioacústica, 2022). Parâmetros temporais foram medidos a partir de oscilogramas, e parâmetros espectrais foram medidos a partir de espectrogramas. Foram medidas 6 a 9 series de cantos de cada um dos 10 machos gravados. Uma vez que *Allobates gasconi* SL3 emite series de cantos constituídos por duas notas, os seguintes parâmetros foram medidos: (**DSC)** duração da série de cantos, medido do início do primeiro canto até o final do último canto da série de cantos; (**ICI**) intervalo entre cantos, medido no início, centro e fim de séries com 4 ou mais cantos (séries com 2 e 3 cantos foram medidos todos os intervalos); (**ISC**) intervalo entre séries de cantos; (**NS**) número de cantos por serie; (**CD)** duração do canto, medido no primeiro e último canto da série (cantos não emitidos em séries foram medido apenas uma vez); (**ND1, ND2**) duração da nota, medida nas duas notas do canto inicial e final de cada série; (**IN)** intervalo entre notas, medidos no canto inicial, central e final de cada série; frequências baixa (**FB**), alta (**FA**) e dominante (**FD**) do canto inicial e final de cada série. Para obtenção da frequência dominante nós utilizamos a função “Frequência de Pico” no Raven. Os parâmetros

acústicos foram medidos no Raven pro 1.6.3. com a seguinte configuração: Janela Blackman = 2.048 amostras e largura de banda do filtro de 3 dB = 82 Hz. A descrição e terminologia para descrição canto segue a abordagem centrada na nota, proposta por Köhler et al. 2017. O gráfico do canto de anúncio foi produzido no R (R Core Team, 2022) usando o pacote Seewave v.2.1 (Sueur, Aubin & Simonis, 2008). Seewave foi configurado da seguinte forma: janela = Hanning, tamanho FFT = 256 amostras e sobreposição FFT = 85%, (Fig 11).

2.6 Análises morfométricas

Allobates gasconi SL4 é a única espécie em processo de formalização nominal Souza et al. (2023) do complexo *A. gasconi* sensu lato. Devido à proximidade filogenética e similaridade morfológica, usamos 12 razões morfométricas de machos (HW/HL, HL/SVL, EL/HL, TYM/EL, UAL/FAL, HAND3/UAL, HAND4/HAND3, HAND2/HAND4, THL/TL, FL/TLM, WPF3/WFD3, WPF4/WFD4) sumarizadas em dois eixos por uma Análise de Componentes Principais para testar se *Allobates gasconi* SL3 e SL4 diferem morfologicamente. As razões que usamos para representar as medidas morfométricas são as mesmas usadas nas descrições dos holótipos em boa parte dos estudos de descrição de espécies. Razões entre medidas, por serem características evolutivas não estão associadas ao aumento no tamanho do corpo de forma linear, por esta razão acreditamos serem mais adequadas que medidas lineares. Usamos os dois primeiros eixos da PCA (PC1 e PC2) para representar as medidas morfométricas. Como os eixos foram calculados pelas razões, os valores foram padronizados (0-1.0 mm), evitando assim as altas variações existentes em medidas morfométricas. Os dois eixos (PC1= 39.91% e PC2= 24.96%) explicaram 64.87% da variância. Razões com maior contribuição no eixo PC1 foram (HAND3/UAL= 0.739, UAL/FAL= 0.689, TYM/EL= 0.629, HL/SVL= 0.559, HW/HL= 0.553, EL/FL= 0.512) e o PC2, (EL/HL= 0.713, TYM/EL= -0.574. Nós usamos MANOVA para testar se as características morfológicas sumarizadas pelos dois primeiros eixos da PCA (PC1 e PC2) diferem expressivamente entre as duas espécies (*A. gasconi* SL3 e SL4).

2.7 Análise bioacústica

Usamos uma PCA para sumarizar em duas dimensões as variáveis temporais (ISC, IN, ICI, CD e ND1 e ND2) e espectrais (FD, FB e FA) da primeira nota e incluímos todas as variáveis espectrais e temporais em uma só analise. Usamos o Desvio Padrão para padronizar os dados, uma vez que variáveis temporais e espectrais são tomadas em medidas e escalas distintas (função "prcomp pacote Vegan"). Usamos os dois primeiros eixos da PCA (PC1 e PC2) para representar as medidas acústicas (Fig.5). Os dois eixos (PC1 = 67.25% e PC2 = 23.90%) explicaram 91.15% da variância. O PCA1 captou a maior variância dos dados e representou tanto as variáveis espectrais quanto temporais, tendo os mais altos loandings (Duração do canto= -0.985, Dur-N2= -0.925, frequência de pico N2= 0.832 Dur-N1= -0.825, intervalo entre cantos= -0.819, frequência baixa N1= -0.686, e frequência alta N1= 0.581). Nós usamos Generalized Least Squares (GLS) para testar se as características acústicas diferem entre as duas espécies (SL3 e SL4) tendo como covariáveis o SVL e a temperatura. Incluímos as covariadas SVL porque a espécie SL3 é maior que SL4, e a temperatura porque as gravações foram realizadas em anos e momentos diferentes. Diferença estatísticas entre espécies sem incluir no modelo as covariáveis podem ser um artefato do tamanho ou temperatura.

Tabela 1. Parâmetros de canto de anúncio de *Allobates* SL3 sp. nov. e *A.* SL4. Os valores representam a média do canto de 10 machos. Os parâmetros de chamada são descritos no texto.

		DSC	ICI	ISC	IN	CD	ND1	ND2	FB	FA	FP
A. SL3 sp. nov.	Méd	1.155	199	852	17	59	17	26	4.800	5.354	5.135
	Mín	937	152	645	14	53	14	22	4.351	4.837	4.550
	Máx	1.422	241	1.118	21	64	20	29	5.142	5.854	5.588
A. SL4	Méd	700	210	1.010	16	50	13	20	5.120	5.687	5.849
	Míni	400	130	410	8	42	8	14	4.640	5.135	5.189
	Máx	4.470	390	4.400	23	60	20	26	5.576	6.127	6.331

3. RESULTADOS

3.1 Relações filogenéticas e distância genética

Dois grandes clados foram recuperados dentro do clado *Allobates caeruleodactylus*, um deles agrupando seis espécies do complexo *A. tapajos* e o outro agrupando cinco espécies do complexo *A. gasconi* sensu lato (Fig.3). Os indivíduos coletados por nós na margem oeste do alto rio Madeira agrupam-se em duas linhagens distintas. Indivíduos coletados na Fortaleza do Abunã (Fig.3, estrela) agrupam em um clado com dois indivíduos (HJ480 e HJ299) previamente coletados próximo à nossa localidade amostrada e apresentados por Réjaud et al. (2020) e Vacher et al. (2020). A distância p pareada dentro deste clado é muito baixa e varia de 0,0 a 0,4% (Tabela 1), o que indica que HJ480 e HJ299 são coespecíficos (referidos daqui em diante como *Allobates gasconi* SL3 sp. nov.). Indivíduos recém-sequenciados dos grupos Teotonio, oeste de Jirau, Pedras juntos com os do rio Ituxi e Boca do Acre forma outra linhagem (*A. gasconi* SL5 daqui adiante, Fig.3).

Allobates gasconi SL3 sp. nov. foi recuperada como irmã de um clado que agrupa duas outras espécies candidatas do sudoeste da Amazônia, uma delas distribuída nas terras baixas do Acre (*A. gasconi* SL4) e outra (*A. gasconi* SL5) no interflúvio Purus-Madeira (Fig.1 e Fig.3). As distâncias p entre *A. gasconi* SL3 sp. nov. e as duas candidatas deste clado variam 1.5–2.1% (*A. gasconi* SL4) e 1.7–2.6% (*A. gasconi* SL5). As espécies candidatas do médio (*A. gasconi* SL1) e baixo (*A. gasconi* SL2) rio Juruá são as mais divergentes e agrupam-se basalmente dentro do complexo *A. gasconi* sensu lato, sendo *A.* gasconi SL1 a mais longe (Fig.3). A distância p entre *A. gasconi* SL3 sp. nov. e estas candidatas variam entre 3,0–4,4% (*A. gasconi* SL1) e 3,0–3,9% (*A. gasconi* SL2). Consulte a Tabela 2 para distâncias K2P.

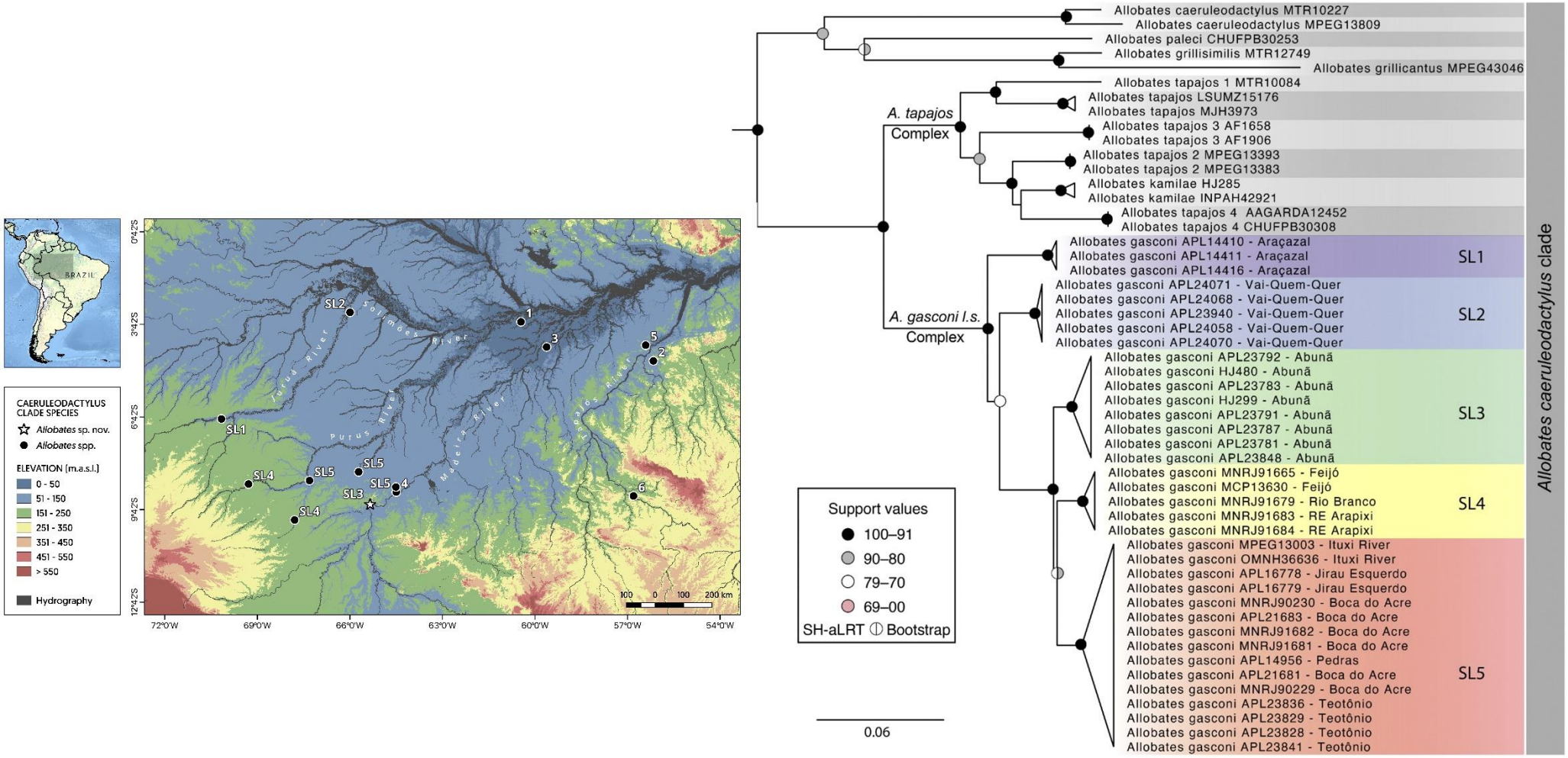
BRAZIL
CAERULEODACTYLUS CLADE SPECIES
Allobates sp. nov.
Allobates spp.
ELEVATION (m.a.s.l.)
0 - 50
51 - 150
151 - 250
251 - 350
351 - 450
451 - 550
> 550
Hydrography
0°42'S
3°42'S
6°42'S
9°42'S
12°42'S
72°0'W
69°0'W
66°0'W
63°0'W
60°0'W
57°0'W
54°0'W
Jurua River
Solimões River
Purus River
Madeira River
Tapajós River
SL1
SL2
SL3
SL4
SL5
100 0 100 200 km
Support values
100–91
90–80
79–70
69–00
SH-aLRT ⓘ Bootstrap
0.06
A. tapajos Complex
A. gasconi l.s. Complex
Allobates caeruleodactylus MTR10227
Allobates caeruleodactylus MPEG13809
Allobates paleci CHUFPB30253
Allobates grillisimilis MTR12749
Allobates grillicantus MPEG43046
Allobates tapajos 1 MTR10084
Allobates tapajos LSUMZ15176
Allobates tapajos MJH3973
Allobates tapajos 3 AF1658
Allobates tapajos 3 AF1906
Allobates tapajos 2 MPEG13393
Allobates tapajos 2 MPEG13383
Allobates kamilae HJ285
Allobates kamilae INPAH42921
Allobates tapajos 4 AAGARDA12452
Allobates tapajos 4 CHUFPB30308
Allobates gasconi APL14410 - Araçazal
Allobates gasconi APL14411 - Araçazal
Allobates gasconi APL14416 - Araçazal
Allobates gasconi APL24071 - Vai-Quem-Quer
Allobates gasconi APL24068 - Vai-Quem-Quer
Allobates gasconi APL23940 - Vai-Quem-Quer
Allobates gasconi APL24058 - Vai-Quem-Quer
Allobates gasconi APL24070 - Vai-Quem-Quer
Allobates gasconi APL23792 - Abunã
Allobates gasconi HJ480 - Abunã
Allobates gasconi APL23783 - Abunã
Allobates gasconi HJ299 - Abunã
Allobates gasconi APL23791 - Abunã
Allobates gasconi APL23787 - Abunã
Allobates gasconi APL23781 - Abunã
Allobates gasconi APL23848 - Abunã
Allobates gasconi MNRJ91665 - Feijó
Allobates gasconi MCP13630 - Feijó
Allobates gasconi MNRJ91679 - Rio Branco
Allobates gasconi MNRJ91683 - RE Arapixi
Allobates gasconi MNRJ91684 - RE Arapixi
Allobates gasconi MPEG13003 - Ituxi River
Allobates gasconi OMNH36636 - Ituxi River
Allobates gasconi APL16778 - Jirau Esquerdo
Allobates gasconi APL16779 - Jirau Esquerdo
Allobates gasconi MNRJ90230 - Boca do Acre
Allobates gasconi APL21683 - Boca do Acre
Allobates gasconi MNRJ91682 - Boca do Acre
Allobates gasconi MNRJ91681 - Boca do Acre
Allobates gasconi APL14956 - Pedras
Allobates gasconi APL21681 - Boca do Acre
Allobates gasconi MNRJ90229 - Boca do Acre
Allobates gasconi APL23836 - Teotônio
Allobates gasconi APL23829 - Teotônio
Allobates gasconi APL23828 - Teotônio
Allobates gasconi APL23841 - Teotônio
SL1
SL2
SL3
SL4
SL5
Allobates caeruleodactylus clade

Figura 3. A. Distribuição geográfica das espécies do clado *Allobates caeruleodactylus*. Estrela branca representa a localidade tipo da nova espécie descrita neste estudo e círculos pretos representam espécies previamente descritas e espécies candidatas. *A. caeruleodactylus* (1); *A. grillicantus* (2); *A. grillisimilis* (3); *A. kamilae* (4); *A. tapajos* (5); *A. paleci* (6); *A.* (SL1); *A.* (SL2); *A.* sp. nov. (SL3); *A.* (SL4); *A.* (SL5). B. Hipótese filogenética de máxima verossimilhança do clado *Allobates caeruleodactylus* baseada em três genes mitocondriais (16S, COI e CYTB) e dois nucleares (RAG1 e TYR). O suporte de nó foi calculado por meio de 10.000 bootstrap ultrarrápido e 10.000 réplicas do teste de razão de verossimilhança aproximada de Shimodaira-Hasegawa.

Tabela 2- Distâncias genéticas pareadas não corrigidas (P; diagonal inferior) e Kimura de dois parâmetros (K2P; diagonal superior) entre espécies do complexo de espécies *Allobates gasconi* incluídas em nossas análises filogenéticas. A diagonal em negrito representa a distância P intraespecífica. As distâncias foram calculadas com 607 pb para o gene 16S rRNA.

Species	SL1	SL2	SL3	SL4	SL5
"Allobates gasconi" SL1	**0.1 (0.0–0.2)**	3.1 (2.8–3.3)	4.6 (4.4–5.0)	4.1 (3.8–4.4)	4.6 (4.0–5.1)
"Allobates gasconi" SL2	3.0 (2.8–3.2)	**0.2 (0.0–0.6)**	3.5 (3.4–4.1)	3.2 (2.9–3.7)	4.0 (3.5–4.8)
"Allobates gasconi" SL3	4.4 (4.3–4.8)	3.4 (3.3–3.9)	**0.1 (0.0–0.4)**	1.7 (1.5–2.1)	2.0 (1.7–2.7)
"Allobates gasconi" SL4	3.9 (3.7–4.3)	3.1 (2.9–3.6)	1.7 (1.5–2.1)	**0.2 (0.0–0.3)**	2.0 (1.2–2.5)
"Allobates gasconi" SL5	4.4 (3.9–4.9)	3.9 (3.4–3.6)	2.0 (1.7–2.6)	2.0 (1.2–2.4)	**0.4 (0.0–1.6)**

3.2 Evidências morfológicas e bioacústicas de separação das espécies *Allobates* SL3 sp. nov. e *Allobates* SL4

Um modelo MANOVA considerando as 12 razões resumidas no PCA1 e PCA2 suportam a existência de divergência morfológica entre *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. e *A. gasconi* SL4 (Pillai Trace: F = 13.998, DF=34, P < 0.001). Para visualizar tal divergência plotamos o PC1 contra o PC2, que representam a sumarização das 12 razões, usando o erro padrão como centroide (Fig. 4).

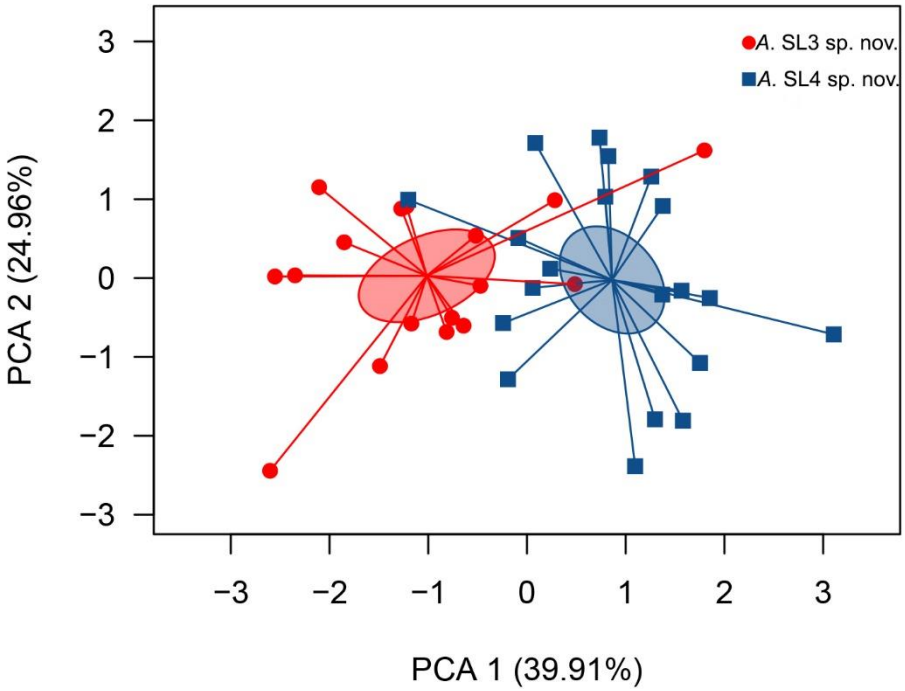

Figura 4. Relação entre PCA1 E PCA2 geradas por uma Análises de Componentes Principais baseadas em 12 razões morfométricas de machos de *Allobates gasconi* SP3 sp. nov. e *A. gasconi* SP4. Elipses significam erro padrão com intervalo de confiança = 95%. Os pontos com as linhas representam as distâncias de cada indivíduo em relação ao centroide.

O modelo de Mínimos Quadrados Generalizados (GLS) levando em consideração as características bioacústicas resumidas em PCA1 como variáveis dependentes e espécie como fator, e SVL e Temperatura como covariáveis indicou uma diferença significativa entre as espécies (GLS: F = 58,027, DF=18, P <0,001), sem efeito de SVL (GLS: F = 0,560, DF=18, P = 0,464) ou temperatura (GLS: F = 0053, DF=18, P = 0,821). Para visualização das diferenças apresentamos o resultado da sumarização das variáveis bioacústicas representadas pelo PCA1 e PCA2, tendo a média do erro padrão

como centroide (Fig. 5).

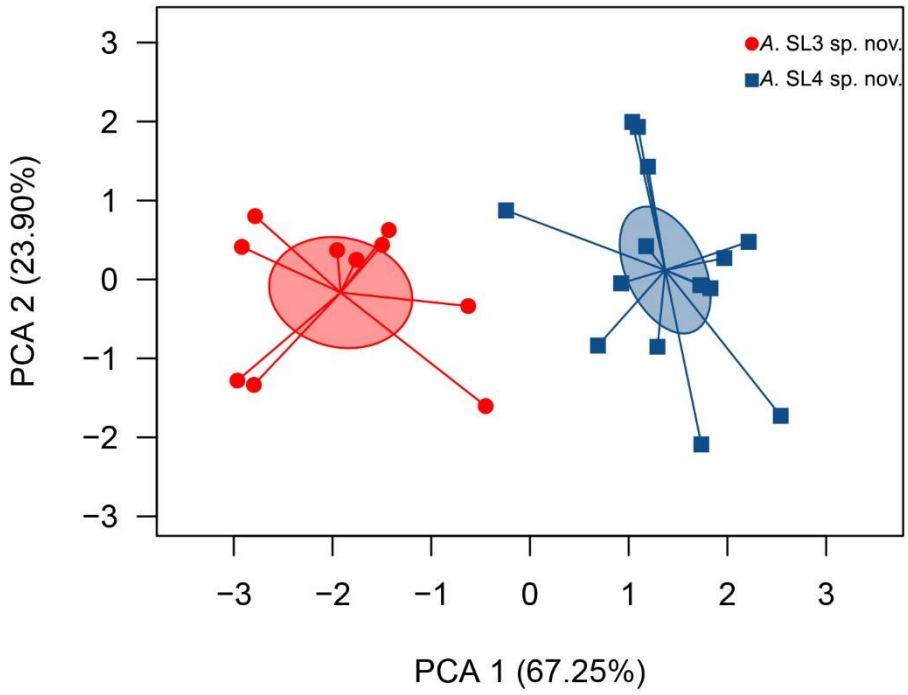

Figura 5. Relação entre PCA1 E PCA2 geradas por uma Análises de componentes Principais baseadas em 9 parâmetros acústicos de machos de *Allobates* SP3 sp. nov. (círculos vermelhos) e *Allobates* SP4 sp. nov. (quadrados azuis). Elipses significa erro padrão com intervalo de confiança = 95%. Os pontos com as linhas presentam as distancias de cada indivíduo em relação ao centroide.

Allobates gasconi SL3 é descrito abaixo através de taxonomia integrativa. Devido à insuficiência de fêmeas coletadas abstemo-nos de descrever "*Allobates gasconi*" SL5 até aquisição de material adicional. "*Allobates gasconi*" SL1 e SL4 está sendo descrito por terceiros.

3.3 Taxonomia

Allobates SL3 sp. nov.

Allobates gasconi Réjaud *et al*. 2020, Vacher *et al*. 2020.

Allobates gasconi SL4 Ferrão *et al*. 2022.

Allobates gasconi SL3 Ferreira *et al*. (*in press*), Souza *et al* (*in press*).

3.3.1 Holótipo

Macho adulto (número de campo APL23783), coletado por Silionamã P. Dantas, Albertina P. Lima e Miquéias Ferrão em 21 de março de 2022, na margem oeste do alto rio Madeira (-9.666.087 -65.451.914; 120m), distrito de Fortaleza do Abunã, município de Porto Velho, estado de Rondônia, Brasil, (Fig. 6; A, B e C; Fig. 7; A e B; Fig. 12; A).

3.3.2 Parátipos

Vinte e seis indivíduos coletados junto do holótipo entre os dias 20 e 23 de fevereiro de 2022. Dez fêmeas adultas (números de campo APL 23775, 23779, 23781, 23787–88, 23790–91, 23796–98) e dezesseis machos (números de campo APL 23771–74, 23776–78, 23780, 23782, 23784–86, 23792–95).

3.3.3 Alocação genérica

A nova espécie é alocada no gênero *Allobates* por apresentar os seguintes caracteres morfológicos (Grant et al., 2006; Grant et al., 2017): presença de escamas digitais dorsais pareadas; dedo III inchado em machos adultos; ausência de dentes vomerianos e processo lingual; ausência de glândula negra no braço; membrana basal presente entre os dedos III e IV, presença de marcas paracloacais. Esta alocação genérica é suportada pelo posicionamento filogenético da espécie em relação a outros *Allobates* (Melo-Sampaio et al. 2018; Réjaud et al. 2020; Ferrão et al. 2022; presente estudo).

3.3.4 Diagnose

Para diagnose da nova espécie observamos quarenta e quatro características relevantes para diagnose no gênero *Allobates* sugeridas por (Grant et al. 2006) e (Jaramillo et al. 2021).

Allobates SL3 sp. nov. é caracterizada pela seguinte combinação: (1) Machos e fêmeas adultos diferem em SVL (SVL em machos 16,1 ±0,7 (14,1–17,0 mm); SVL em fêmeas 17,4 ± 0,3 (16,9–18,2 mm), são sexualmente dimórficos nas razões entre largura e comprimento da cabeça (HW/HL); comprimento do cabeça e comprimento do corpo (HL/SVL) e entre largura das falanges e discos do dedo III (WPFIII/WFD3); (2) superfície dorsal do corpo tuberculada em machos e fêmeas; pele ventral lisa; (3) focinho truncado levemente arredondado em vista dorsal e ventral, e ovalado em vista lateral; (4)

narinas visíveis nas vistas lateral e dorsal (59%) e visível ventralmente em (41%) dos espécimes; (5) tímpano 38% do diâmetro do olho; (6) presença de dentes curtos na região maxilar, visto sob ampliação; (7) dentes vomerianos ausentes; (8) processo lingual ausente; (9) saco vocal subgular único em machos; (10) escudos digitais dorsais pareados presentes; (11) crista metacarpal ausente; (12) tubérculo tênar presente; (13) ausência de excrescências nupciais no polegar; (14) ausência de membrana entre os dedos; (15) Em machos dedo III levemente inchado na falange distal e fortemente inchado na base; (16) Dedo II levemente expandido; (17) ponta do dedo IV alcança o tubérculo subarticular distal do dedo III; (18) dedo II mais curto que o dedo I; (19) quilhas laterais presentes nos dedos I-IV; (20) em machos e fêmeas os discos dos dedos I-IV são mais largos que as falanges distais; (21) faixa negra ausente no braço; (22) quilha tarsal presente, tubercular dobrada; (23) franja tarsal ausente; (24) quilha metatarsal presente bem definida; (25) membrana presente entre os dedos III e IV do pé, uma membrana rudimentar presente entre os dedos II e III do pé; (26) quilhas laterais presentes nos lados pré e pós-axial na ponta dos dedos I-V do pé; (27) o comprimento do dedo III ultrapassa um tubérculo subarticular distal do dedo IV do pé; (28) discos dos dedos I e V do pé não expandidos, discos dos dedos II moderadamente expandidos (largura dos discos dos dedos do pé 1,5 vezes a largura de suas falanges distais); discos dos dedos III e IV do pé expandidos (largura média dos discos dos dedos, 1,5 e 2,3 vezes a largura de suas falanges distais, respectivamente); (29) faixa dorso lateral presente, de cor creme com borda interna irregular e externa regular, estendendo-se da região posterior do olho até o início ou meio do urostilo; (30) superfície dorsal do braço e antebraço creme em espécimes preservado e marrom-claro a avermelhado em espécimes vivos com manchas de melanóforos, antebraço com manchas de melanóforos no punho e meio do antebraço; (31) superfície dorsal da coxa creme com melanóforos e uma faixa transversal; perna: creme com melanóforos e faixa transversal e poucos tubérculos dispersos; tarso e pé: creme com manchas de melanóforos e uma faixa transversal escura; (32) faixa lateral marrom-escuro é estreita no focinho, alargando-se logo após os olhos até região inguinal, difusa do meio do corpo até a virilha, borda superior regular e inferior irregular; (33) faixa ventrolateral ausente; (34) marca paracloacal presente, em forma de meia-lua; (35) em vida, machos apresentam garganta branca translúcida e creme com melanóforos em espécimes preservado; (36) em vida, fêmeas apresentam desenho de forma piramidal branco no centro da garganta e bordas translúcidas, quando preservado a garganta é creme, com

melanóforos dispersos nas bordas; (37) em vida machos apresentam ventre branco e esbranquiçado quando preservado; (38) em vida, fêmeas apresentam superfície ventral branca, creme quando preservadas; (39) íris dourada, com reticulações marrons; (40) intestino grosso não pigmentado; (41) testículo não pigmentado; (42) ovócitos maduros cinza; (43) hábito diurno, machos vocalizam no início da manhã e final da tarde; (44) canto de anúncio caracterizados pela emissão de notas duplas em uma expiração, emitidas continuamente em arranjos irregulares de 1 a 9 cantos, com pico médio de frequência de 5.136 ± 294 Hz.

3.3.5 Comparações interespecíficas

Para descrição da nova espécie direcionamos as comparações fenotípicas ao grupo de *Allobates* marrons com 22 cromossomos com ocorrência para Amazônia brasileira N=20 espécies, (32% da diversidade total de *Allobates* descritas até o presente estudo).

Allobates bacurau Simões, 2016; *A. caeruleodactylus* (Lima e Caldwell, 2001); *A. conspicuus* (Morales, 2002); *A. flaviventris* Melo-Sampaio, Souza, e Peloso, 2013; *A. fuscellus* (Morales 2002); *A. gasconi* (Morales, 2002); *A. grillisimilis* Simões, Sturaro, Peloso, e Lima, 2013; *A. grillicantus* Moraes e Lima, 2021; *A. kamilae* Ferrão, Hanken, e Lima, 2022; *A. nidicola* (Caldwell e Lima, 2003); *Allobates nunciatus* Moraes, Pavan, e Lima, 2019; *A. pacaas* Melo-Sampaio, Prates, Peloso, Recoder, Vechio, Marques-Souza, e Rodrigues, 2020; *A. paleci* Silva, Marques, Folly, e Santana, 2022; *A. paleovarzensis* Lima, Caldwell, Biavati, e Montanarin, 2010; *A. subfolionidificans* (Lima, Sanchez, e Souza, 2007); *A. tapajos* Lima, Simões, e Kaefer, 2015; *A. tinae* Melo-Sampaio, Oliveira, e Prates, 2018; *A. trilineatus* (Boulenger, 1884); *A. vanzolinius* (Morales, 2002) e *A. velocicantus* Souza, Ferrão, Hanken, e Lima, 2020.

Os caracteres de diferenciação entre espécies comparadas encontram-se destacados entre parênteses. *Allobates* SL3 sp. nov. difere de *A. bacurau*, *A. flaviventris*, *A. fuscellus*, *A. gasconi*, *A. nidicola*, *A. nunciatus*, *A. paleovarzensis*, *A vanzolinius*, *A. trilineatus* por apresentar saco vocal branco (saco vocal preto, cinza ou violáceo); menor tamanho do corpo, SVL máximo de 17.0 mm em machos de *Allobates.* SL3 sp. nov. (SVL mínimo de *A. flaviventris* >16.7, *A. nidicola* >18.5mm, *A. nunciatus* >19.2mm, *A. paleovarzensis* >18.2mm e *A. vanzolinius* > 21.5mm); linha ventrolateral ausente em *Allobates*. SL3 sp. nov. (linha ventrolateral presente em *A. bacurau*, *A. gasconi*, *A.*

trilineatus); *Allobates* SL3 sp. nov. difere de *A. caeruleodactylus* por ter dedos marrons em vida e faixa dorsolateral (dedos azul-celeste, faixa dorsolateral ausente); de *A. pacaas* por apresentar um tubérculo subarticular no dedo IV e garganta branca com melanóforos (dois tubérculos subarticulares e garganta cinza escuro); de *A. caldwellae*, *A. crombiei*, *A. carajás*, *A. paleci*, *A. tinae*, e *A. kamilae* por apresentar superfície ventral branca, ausência de linha ventrolateral (garganta translucida amarelada, ventre amarelo, presença de linha ventrolateral, canto com notas simples); de *A. conspicuus* por apresentar dedo III da mão dilatado, abdômen liso e poucos tubérculos na tíbia (dedo III da mão não dilatado, abdômen pouco granulado e membros posteriores lisos); *Allobates* SL3 sp. nov. distingue-se de *A. grillisimilis* e *A. grillicantus* por exibir SVL mínimo de 16.9mm em fêmeas, franja lateral nos dedos, faixa ventrolateral ausente, vocaliza com notas duplas emitidas em series (SVL máximo 16.0 em fêmeas, ausência de franjas laterais nos artelhos, presença da faixa ventrolateral, vocaliza com multinotas); de *A. subfolionidificans* por exibir ventre de fêmeas branco, presença de faixa dorsolateral, dedo III inchado em machos, vocaliza com notas duplas emitidas em series (ventre amarelo em fêmeas, ausência de faixa dorsolateral, dedo III não inchado em machos, vocaliza com notas simples emitidas continuamente); *Allobates* SL3 sp. nov. diferencia-se de *A. velocicantus* pela ausência de linha ventrolateral, dedo IV alcança falange distal do dedo III, vocaliza com notas duplas emitidas em series (presença de linha ventrolateral, dedo IV não alcança o tubérculo subarticular distal do dedo III, vocaliza com notas simples emitidas em alta velocidade).

Allobates gasconi SL3 sp. nov. faz parte do complexo de espécies *A. gasconi* sensu lato e uma espécie candidata da região do alto rio Purus está aceita na revista Vertebrate Zoology. Por pertencer ao mesmo grupo de espécies, a nova espécie de *Allobates* referida como *A. gasconi* SL4 é a mais semelhante a *Allobates gasconi* SL3 sp. nov., por esta razão daremos mais detalhes nas comparações com esta espécie.

Proporcionalmente *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. tem cabeça 3,5 % mais larga que longa em comparação *A. gasconi* SL4 (HW/HL T-teste: t = -3.36 df = 38 P = 0.002); o comprimento da mão foi 4,5% mais longa em relação ao braço que em *A.* SL4 (HANDIII/UAL T-teste: t = 3.19 df = 38 P = 0.003); e teve o tímpano 4,0% mais largo que o diâmetro do olho quando comparado a *A.* SL4 (TYM/EL T-teste: t = -3.71 df = 38 P = 0.001), no entanto *A.* SL4 tem a relação do braço com o antebraço 7,8% mais longo que *A. gasconi* SL3 sp. nov. (UAL/FAL T-teste: t = 3.36 df = 38 P = 0.002). Além disto,

A. gasconi SL3 sp. nov. apresenta textura do dorso tuberculada, com grande concentração destes tubérculos nas pálpebras; focinho truncado levemente arredondado; canthus rostralis concavo; saco vocal branco com melanóforos; discos arredondados e claramente mais largo que as falanges (em *A. gasconi* SL4 a textura da pele dorsal é lisa com pequenos tubérculos achatados e pouco visíveis mais concentrados na região do urostilo; focinho semi-truncado; canthus rostralis reto; saco vocal branco-translúcido; discos levemente triangular e moderadamente expandido, ligeiramente mais largos que as falanges distais em *A. gasconi* SL4). Ovócitos maduros marrom-escuro em *A. gasconi* SL3 sp. nov. (castanho-claro em *A. gasconi* SL4), ovos acinzentados com polo vegetativo marrom escuro (ovos brancos com polo vegetativo negro em *A. gasconi* SL4). Embriões esverdeados em *A. gasconi* SL3 sp. nov. (acinzentados em *A. gasconi* SL4). Girinos de *A. gasconi* SL3 sp. nov. apresentam 2 ou 3 papilas piramidais em cada extremidade do lábio anterior (2 papilas nas extremidades do lábio anterior em *A. gasconi* SL4); comprimento relativo das fileiras de dente em *A. gasconi* SL3 sp. nov. é P3< P1 ≈ P2, P1 e P2 de igual comprimento, P3 ≈ 50% P1 (em *A. gasconi* SL4 comprimento relativo das fileiras dentarias é P-1 > P-2 > P-3; e P-3 ≈ 65% de P-1).

O canto de anúncio de *Allobates gasconi* SL3 tem duração média de 59± 4ms (em *A. gasconi* SL4 canto de anúncio tem duração 50± 4ms); a taxa de emissão de canto foi de 68.4±0.5 cantos por 30 segundos em *A. gasconi* SL3 sp. nov., 11% menor que em *A. gasconi* SL4 (76.6± 10.7 cantos por 30 segundos); as duas notas que constituem o canto de *A. gasconi* SL3 sp. nov. são em média mais longas que em *A. gasconi* SL4 (N1= 17± 2ms, N2= 26± 2ms em *A. gasconi* SL3 sp. nov.) e (N1= 13± 2ms, N2= 20± 2ms, em *A. gasconi* SL4); em *A. gasconi* SL3 sp. nov. o intervalo entre notas foi 17± 2ms (16± 2ms em *A. gasconi* SL4); frequência dominante foi 5.135± 293 Hz em *A. gasconi* SL3 (5. 849± 250 Hz em *A. gasconi* SL4).

3.3.6 Descrição do holótipo

Macho adulto (Fig.6 A, B e C), 15.9 SVL. Dorso granulado com melanóforos. Cabeça ligeiramente mais longa que larga (HW= 95% HL; HL = 33% SVL), região entre os olhos mais escura que o focinho, com presença de uma mancha escura em forma de meia esfera (Fig.6 A); garganta e tórax creme cobertos com melanóforos (Fig.6 B); abdômen liso sem melanóforos (Fig.6 B); focinho truncado em vista dorsal, levemente

arredondado em vista lateral, e ventral, ligeiramente mais curto que diâmetro do olho (SL= 1.95, El = 2.0 mm); cantos rostralis concavo; narinas localizadas lateralmente na região anterior do focinho, visível lateral e ventralmente; diâmetro do olho 39% do HL, HL= 5,5 mm; tímpano visível, com diâmetro ligeiramente menor que a metade do olho (TYM = 4% do EL); língua mais longa que larga (lanceolada), presa na extremidade anterior do assoalho da boca; processo lingual mediano ausente; coanas pequenas, esbranquiçadas e arredondas; dentes vomerianos ausentes; saco vocal subgular único; mão ligeiramente mais curta que antebraço (H3 =97% do UAL).

Comprimento relativo dos dedos IV<II<I<III (HIV=0.88% do HII, HII = 90% do HI, HI=76% do HIII); quando justapostos a ponta do dedo IV alcança a base do tubérculo subarticular distal do dedo III (HIV= 61% de HIII); discos dos dedos I e II arredondados levemente expandidos, discos dos dedos III e IV, ovais na visão horizontal e moderadamente expandidos; tubérculo tênar presente, arredondado e pouco desenvolvido, menor que o tubérculo subarticular do dedo I; tubérculo palmar conspícuo ovoide; tubérculos subarticulares presentes, elíptico nos dedos I e II, redondo em III e IV, não ultrapassando a largura das falanges; tubérculos supranumerários ausentes; dedo III inchado, com maior dilatação na base; largura da falange distal do dedo III menor que a largura do disco do respectivo dedo; franjas laterais presentes em todos os dedos, mais visível nos dedos I e IV (Fig.7 C). Coxa e pé de comprimento similar, ambos 6.6 mm, tíbia ligeiramente mais longa que a coxa (THL = 94% do TL); comprimento relativo dos dedos do pé I< II< V< III< IV; membrana basal dos dedos pé presente, entre os dedos II-III rudimentar, e III-IV desenvolvida (Fig.7 C); discos do dedo I do pé ovalado da mesma largura que a falange distal, II e V redondos ligeiramente expandidos, discos dos dedos III e IV horizontalmente ovoides ligeiramente expandidos; franjas laterais presente em todos os dedos; quilha tarsal presente, em forma de tubérculo curvado; tubérculos metatarsais presentes, interno elíptico e maior que o externo, redondo; franja metatarsal

presente, pouco desenvolvida (Fig.7 C); tubérculos subarticulares dos dedos dos pés presentes todos redondos, um tubérculo subarticular nos artelhos I e II, dois nos artelhos III e V, e três nos artelhos IV, sendo o tubérculo proximal no artelho IV consideravelmente menos desenvolvido; quando justapostos a ponta do dedo III ultrapassa o tubérculo subarticular medial do dedo IV do pé. As medições do holótipo são apresentadas na Tabela 3.

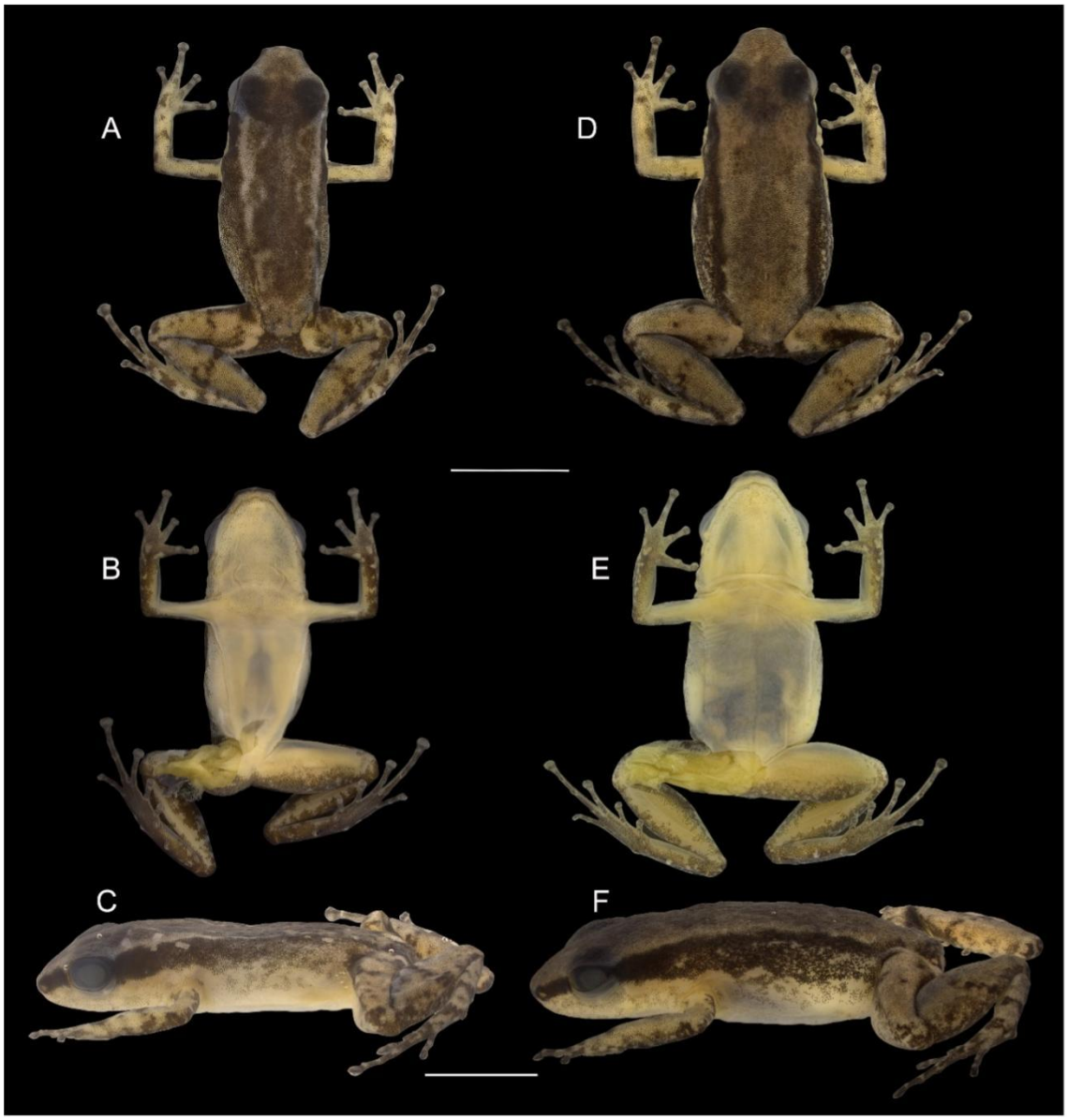

Figura 6. Vistas dorsais, ventrais e laterais do macho holótipo AP23783 (A–C) e fêmea parátipo APL23790 (D–F) de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. Barras de escala: 5 mm.

3.3.7 Coloração em preservativo do holótipo

Quando preservado, superfície de fundo do dorso é creme cobertos com machas escuras, formando uma faixa marrom escura do focinho a um terço do urostilo, na região da cabeça há uma concentração de melanóforos que forma um desenho de meia esfera marrom mais escuro entre as pálpebras e final do crânio (Fig.6 A). Entre os grânulos há tubérculos da região anterior dos olhos até final do urostilo, com maior concentração sobre as pálpebras; faixa dorso lateral marrom clara, com borda interna irregular e externa regular, estendendo-se da região posterior dos olhos até início do urostilo (Fig.6 A e C). Região dorsal do braço e antebraço de cor creme e manchas escuras, presença de uma mancha marrom-escuro próximo ao punho e região medial da ulna e radio em ambos os braços (Fig.6 A). Superfície dorsal e lateral da coxa, tíbia e pé creme com melanóforos e poucos tubérculos dispersos, coxa e pé com machas irregulares marrons escura e tíbia com uma faixa transversal marrom escura (Fig.6 A e C). A faixa lateral marrom-escura é estreita e bem definida na região anterior ao braço, toda a lateral da cabeça e focinho, mais larga e irregular a partir da região posterior a inserção do braço até a região ignal; faixa obliqua difusa (Fig.6 C). A região lateral do corpo creme com melanóforos dispersos, faixa ventre lateral não visível, região lateral do antebraço e braço creme com alta concentrações de melanóforos; região anterior e posterior das coxas e pernas com presença de uma faixa escura formada por altas concentrações de melanóforos, mais evidente na região lateral ao anus; superfície plantar marrom escuro; marca para cloacal presente, em forma de meia lua e com presença de melanóforos (Fig.6 C). Superfície ventral da região do abdômen, antebraço, parte interna do braço, perna, coxa e pé

esbranquiçados sem melanóforos. A garganta, tórax e mandíbula creme com melanóforos (Fig.6 B).

3.3.8 Variação da coloração em preservativo da série tipo

Allobates SL3 sp. nov. 59% (N=16) possui superfície de fundo do dorso creme cobertos com melanóforos, formando uma faixa marrom escura do focinho a um terço do urostilo semelhante ao holótipo (Fig.6 A e 8 A e G), em 37% (N=10) o dorso tem um desenho de ampulheta (Fig.6 B e 8 A e D); em 4% faixa clara quase imperceptível (Fig.8 J). Em todos os espécimes na região da cabeça entre as pálpebras e o final do crânio há uma concentração de melanóforos que forma um desenho de meia esfera marrom mais escuro (Fig.6 A e D; 8 A, D, G e J). A faixa dorso lateral creme varia em espessura entre os espécimes (Fig.6 A e B; 8 A, D, G, J). Lateral do corpo é esbranquiçada ou creme com manchas irregulares de melanóforos com as faixa lateral marrom-escuro, faixa oblíqua e linha ventre lateral semelhante ao holótipo (Fig.6 C e F; 8 C, F, I e L). Superfície dorsal de braços semelhante ao holótipo (Fig.6 A e 8 A, D e G); Superfície dorsal da coxa e perna creme com melanóforos 66 % dos indivíduos apresentam faixa transversal escura na coxas, tíbias, tarsos e pés (Fig.6 A, D e 8 A, D e G), 18% apresentam faixas nas coxas e tíbias, 11% não apresentam faixas em nenhum dos membros (Fig.8 J), demais espécimes apresentam manchas e faixas apenas no pé.

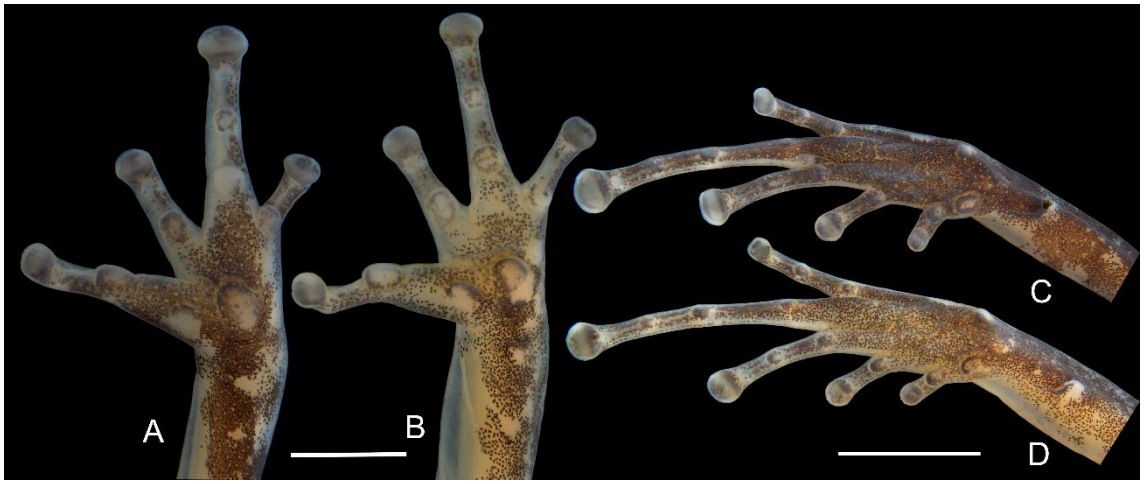

Figura 7. Vistas ventrais da mão e pé do macho holótipo APL23783 (A, C) e fêmea parátipo APL23790 (B, D) de Allobates gasconi SL3 sp. nov. Barras de escala: 2 mm.

Todos os machos possuem o ventre semelhante ao holótipo, branco liso sem melanóforos; garganta e região do tórax com variação na densidade de melanóforos (Fig.8

B, E, H); fêmeas apresentam a região ventral variando de creme a esbranquiçada, lisa com melanóforos dispersos nas bordas da mandíbula (Fig.6 E; 8 K); superfície ventral do pé marrom fortemente pigmentados com melanóforos (Fig.6 B, 5 B, E, H e K).

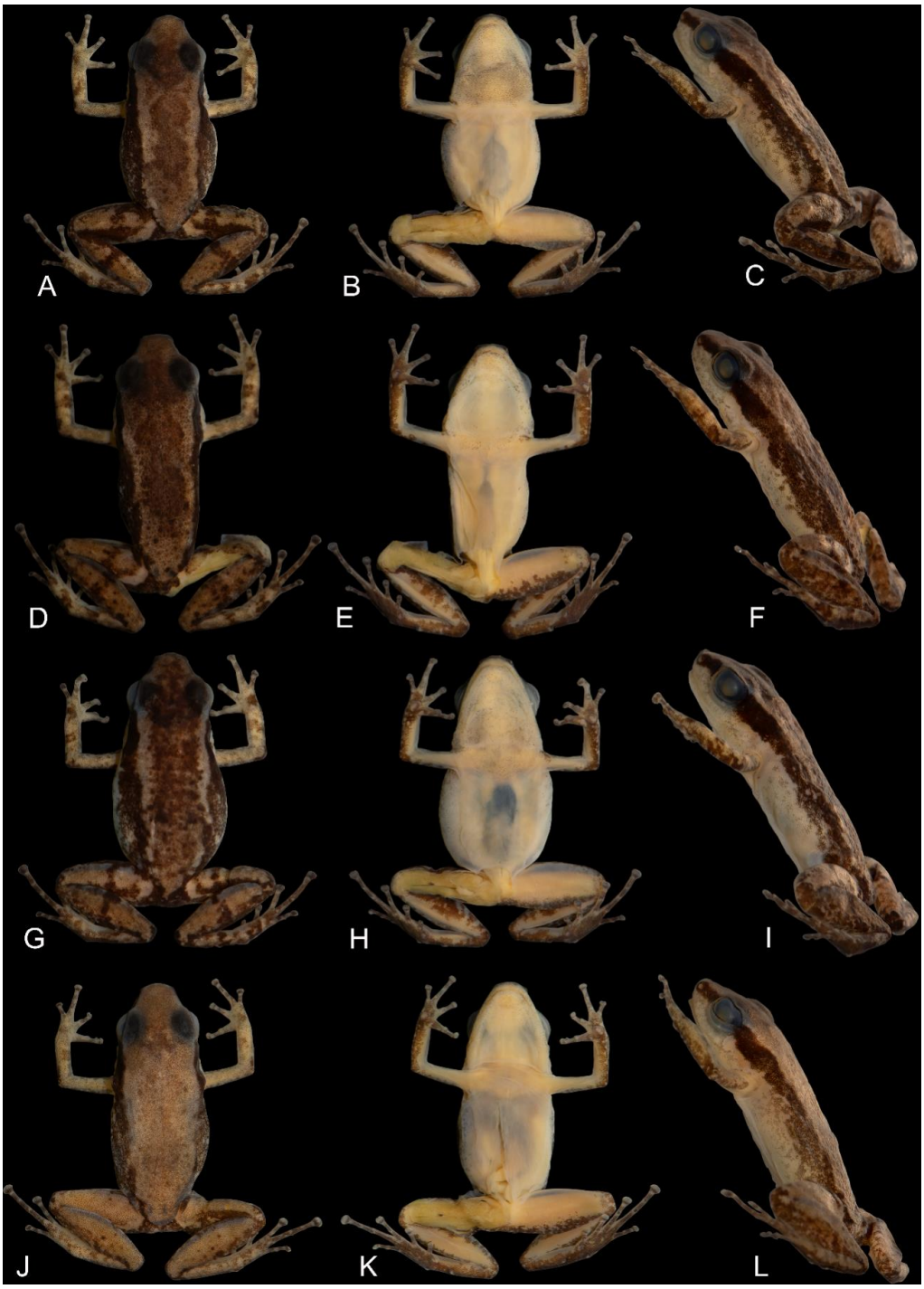

Figura 8. Variação da coloração em preservativo de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A–C) Macho, APL23774, SVL 15.8 mm. (D–F) Macho, APL23772, SVL 17.0 mm. (G–I) Macho, APL23777, SVL 17.0 mm. (J–L) Fêmea, APL23781, SVL 17.4 mm.

3.3.9 Coloração do holótipo e série tipo em vida

Dorso do holótipo e da série-tipo é coberto por grânulos e tubérculos de diferentes tons de marrons, mais protuberantes em fêmeas (Fig. 9), os tubérculos formam uma faixa marrom de tom mais escuro em 59% da série (N=27), (Fig.9 H) padrão semelhante ao holótipo; em 4%, esta faixa é quase imperceptível (Fig.9 B) ou pouco visível (Fig. 9 E). Em 37 % dos indivíduos é visível um desenho em forma de ampulheta discreta (Fig.9 K). Uma sombra marrom com tom mais escuro em forma de meia esfera está presente entre os olhos e final da cabeça, em todos os espécimes (Fig. 9 B, E, H e K); região anterior da cabeça, braços e pernas similar ao dorso, variando entre espécimes com manchas escuras de melanóforos formando ou não faixas sobre a coxas, pernas e pés (Fig.9 A, B, D, E, G, H, J, K).

Faixa dorso lateral marrom-claro com borda interna regular e externa irregular inicia-se atrás dos olhos, tornando-se difusa a partir da região do urostilo (Fig.9 E, H, K), em alguns espécimes a faixa é imperceptível em vida (Fig.9 B). Faixa lateral marrom-escura é solida e regular do focinho até a altura de inserção dos braços em todos os espécimes (Fig. 9 e 12), difusa e irregular até região da virilha em 69 % (Fig.9 A, D, J), completa em 31 % dos indivíduos (Fig.9 D e G). Região lateral abaixo da faixa marrom escura é formada por manchas brancas irregulares de diferentes formatos, não formando uma faixa ou linha continua. A superfície na região da virilha e anterior a coxa é levemente amarelada (Fig.9 C, F, I e L). Olhos com íris dourada com reticulações marrons na superfície superior e inferior, na porção anterior e posterior negra (Fig.9 e 12); marcas paracloacais creme em forma de meia lua; barriga com uma superfície translucida sutilmente amarelada sobre um fundo branco (Fig.9 C, F, I e L) sem manchas; em fêmeas a região gular apresenta mancha de forma piramidal branca no centro da garganta, bordas translúcidas, com melanóforos esparsos sobre a lateral da mandíbula (Fig.9 C, F), em machos a região do saco vocal translucido com melanóforos dispersos em 67 % (Fig.9 I e 12 B) e concentrado em 33% (Fig. 9 L); em machos o peritônio branco termina na região do tórax; superfície ventral das coxas e braços violácea sem melanóforos (Fig. 9 C, F, I e L).

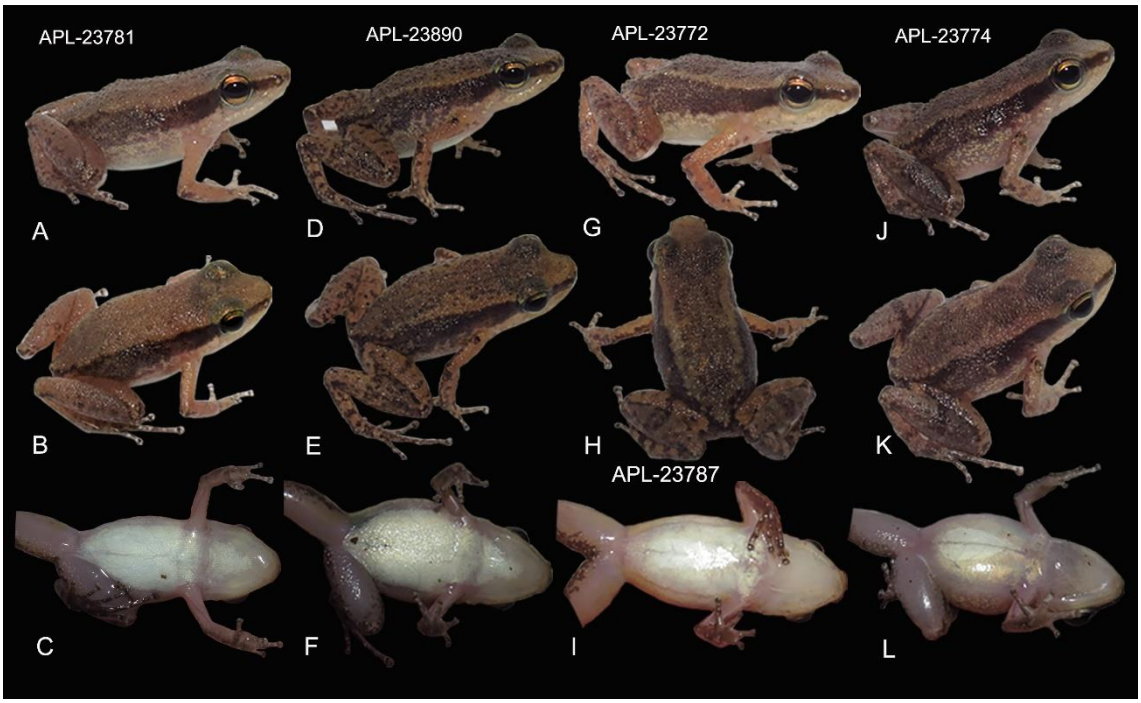

Figura 9. Variação da coloração em vida de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A–C) Fêmea, APL23781, SVL 17.4 mm. (D–F) Fêmea, APL23790, SVL 17.5 mm. (G–H) Macho, APL23772, SVL 17.0 mm. (I) Macho APL23787, SVL 16.9 mm. (J–L) Macho, APL23774, SVL 15.8 mm.

3.3.10 Variação morfológica dos parátipos

Em machos e fêmeas a pele ventral é lisa na garganta, peito, barriga e coxas. Machos e fêmeas se sobrepõem na maioria das medidas morfométricas, com fêmeas apresentando algumas características morfométricas expressivamente diferentes dos machos. Fêmeas (N=10) são 9% maiores que machos no SVL (Teste-t: t = 6.605, P<0.0001), possuem proporcionalmente 11,6 % da largura da cabeça maiores que os machos (HW/WL: Teste-t: t= 11.604, df = 25, P = 0.000); enquanto os machos são proporcionalmente maiores nas relações HL/SVL com HL 1,5 % mais longo (HL/SVL: Teste-t: t = -3,85, df = 25, P = 0,001), e largura do disco com a falange distal do dedo III, possuem os discos, 5,4% mais largos que as fêmeas (WPF3/WFD3: Teste-t: t = -2, 44, df = 25 P = 0.022). Focinho truncado nas vistas dorsal e ventral, ligeiramente arredondado na lateral (Fig. 6, 8 e 9). Narinas visíveis nas vistas ventral e lateral, localizadas póstero-lateralmente ao focinho (Fig. 6 e 9). Distância entre as narinas (2.1 mm) ≈ 2.5 vezes menor que a largura da cabeça (5.2mm). Canthus rostralis ligeiramente côncavo em vista

dorsal (Fig. 6, 8 e 9). Distância entre olho e narina (1.5 mm) ≈ 3.2 menor que o diâmetro do olho (4.8 mm). Região loreal côncava. Diâmetro do olho (4.8 mm), ≈ 3.4 vezes menor que o SVL. Tímpano redondo, pequeno (0.8 mm) ≈ 5.1 vezes menor que o diâmetro do olho. Anel timpânico visível. Prega supra timpânica visível. Dentes maxilares conspícuos sob ampliação. Processos dentígeros dos vômer ausentes. Coanas redondas, pequenas, posicionadas anteriormente ao globo ocular. Língua lanceolada. Processo lingual mediano ausente. Fendas vocais laterais bem visíveis. Saco vocal único, estendendo-se do nível médio da garganta ao tórax (Fig.6 B; 8 B, E, H; 9 I, L; 12 A e B). Tubérculo palmar conspícuo, redondo (Fig.7 A, B). Tubérculo tênar elíptico, comprimento médio (0.4 mm) ≈ 1.5 menor que o diâmetro do tubérculo palmar (0.6 mm) (Fig.7 A, B). Tubérculo subarticular proximal do Dedo IV redondo, não excedendo a largura da falange. Tubérculo subarticular distal ausente no Dedo IV (Fig. 3 A, B). Dedo III com tubérculo subarticular proximal e distal arredondado (Fig.7 A, B). Tubérculos subarticulares nos dedos I e II protuberantes, elípticos em I e II (Fig.7 A, B). Tubérculos supranumerários ausentes. Crista metacarpal ausente. Fêmeas têm todos os dedos levemente mais longos que machos; portanto, os comprimentos relativos dos dedos são dados para os machos. Comprimento do dedo II (2.8 mm) relativamente de igual comprimento do dedo I (2.7 mm). Comprimento do Dedo IV (2.45 mm), ≈ 1.35 vezes menor que o comprimento do Dedo III (3,8 mm). Ponta do dedo IV atingindo a base do tubérculo subarticular do dedo III quando os dedos são justapostos. Membrana basal ausente nos dedos da mão (Fig.7 A, B). Dedo III inchado em machos, maior expansão na base do dedo (Fig.7 A, B). Discos dos dedos I e IV correspondente a (0.3; 0.7 mm), igual à largura da falange (WPFI = 0,3) no dedo I e amplamente expandido em relação ao largura da falange no dedo IV (WPFIV = 0,3) em ambos os sexos. A largura das falanges distais do dedo III difere entre machos e fêmeas; nos machos a largura das falanges corresponde em média a 0.46 ± 0.03 e nas fêmeas 0.37± 0.04), 0.8% mais larga nos machos. Extremidade do disco III e IV oval em vista horizontal, I e II arredondados (Fig.7 A e B). Escudos digitais dorsais pareados presentes em todos os dedos. Tíbia ligeiramente maior que a coxa (THL = 93% do TL, TL= 7.5± 0.4 mm; comprimento do pé ligeiramente menor FL = 92% do TL, FL= 6.9 ±0.3 mm. Quilha tarsal tubercular curvada na região proximal do tubérculo metatarsal interno, não conectada por uma prega (Fig.7 C e D). Tubérculo metatarsal interno bem definido, grande, oval. Tubérculo metatarsal externo pequeno, arredondado (Fig.7 C e D). Prega metatarsal pouco evidente, presente entre o

tubérculo metatarsal externo e o tubérculo subarticular proximal do dedo V (Fig.7 C e D). Membrana basal presente entre os dedos III e IV e II - III em todos os espécimes (Fig.7 C e D), ausente entre os dedos I-II e IV-V em todos os espécimes. Todos os dedos com quilhas bem definidas nos lados pré-axial e pós-axial (Fig.7 C e D). Tubérculos subarticulares nos dedos I e II ovais, bem definidos, menores que o tubérculo metatarsal interno (Fig.7 C e D). Tubérculos supranumerários plantares ausentes. Comprimentos relativos dos dedos: I < II < V < III < IV. A ponta do dedo III ultrapassa o tubérculo subarticular central do dedo IV (Fig.7 C e D). Discos dos dedos I do pé não expandidos, II e V moderadamente expandidos e III e IV bastante expandidos. Escudos digitais dorsais emparelhados conspícuos e ligeiramente protuberantes em todos os dedos dos pés (características dos pés e dedos são apresentados na Fig.7 C e D).

Tabela 3 - Medidas morfométricas de *Allobates* SL3 sp. nov. e *A.* SL4. Os valores representam média ± desvio padrão (intervalo). As siglas dos caracteres são descritas no texto; n= número de espécimes.

		***Allobates* SL3 sp. nov.**		***Allobates* SL4**	
Caracteres	**Holótipo**	**Machos (n=18)**	**Fêmeas (n=9)**	**Machos (n=19)**	**Fêmeas (n=10)**
SVL	15.9	16.1± 0.7 (14.1 – 17.0)	17.4± 0.3 (16.9 – 18.2)	15.3± 0.5 (14.3 – 16.4)	16.5± 0.5 (15.7–17.5)
HL	5.4	5.4± 0.3 (4.8 – 5.8)	5.7± 0.2 (5.2 – 5.9)	4.9± 0.2 (4.6 – 5.4)	5.3± 0.2 (5.1–5.9)
HW	5.1	5.2± 0.3 (4.6 – 5.8)	5.3± 0.3 (4.8 – 5.8)	4.6± 0.2 (4.8 – 5.5)	5.5± 0.2 (5.1–5.9)
SL	2.0	1.9± 0.2 (1.5 – 2.4)	2.1± 0.3 (1.8 – 2.5)	2.0± 0.1 (1.8 – 2.3)	2.1± 0.2 (1.7–2.4)
END	1.5	1.5± 0.3 (1.1 – 2.6)	1.6± 0.1 (1.3 – 1.7)	1.5± 0.1 (1.9 – 2.3)	1.5± 0.1 (1.4–1.8)
IN	2.0	2.0± 0.1 (1.8 – 2.2)	2.2± 0.1 (2.1 – 2.5)	2.1± 0.1 (1.8 – 2.4)	2.2± 0.1 (2.0–2.5)
IOD	4.6	4.7± 0.2 (4.5 – 5.1)	4.9± 0.3 (4.4 – 5.3)	4.5± 0.2 (4.1 – 5.1)	4.7± 0.2 (4.4–5.0)
EL	1.9	1.9± 0.1 (1.8 – 2.1)	2.0± 0.1 (1.9 – 2.1)	2.0± 0.1 (1.8 – 2.2)	2.0± 0.1 (1.9–2.3)
TYM	0.8	0.8± 0.1 (0.6 – 0.9)	0.8± 0.1 (0.8 – 0.9)	0.7± 0.1 (0.6 – 0.9)	0.8± 0.1 (0.6–0.9)
FAL	3.4	3.5± 0.2 (3.3 – 3.9)	3.7± 0.2 (3.5 – 4.1)	3.4± 0.2 (3.1 – 3.8)	3.6± 0.2 (2.8–3.7)
UAL	3.7	3.7± 0.2 (3.0 – 3.9)	3.8± 0.2 (3.6 – 4.2)	3.8± 0.2 (3.5 – 4.2)	3.8± 0.3 (3.1–4.3)
HANDI	2.8	2.8± 0.2 (2.5 – 3.1)	2.9± 0.2 (2.5 – 3.0)	2.7± 0.1 (2.5 – 2.9)	2.8± 0.1 (2.6–3.0)
HANDII	2.5	2.7± 0.2 (2.3 – 3.1)	2.7± 0.1 (2.5 – 2.8)	2.6± 0.1 (2.3 – 2.8)	2.6± 0.1 (2.4–2.9)
HANDIII	3.6	3.8± 0.2 (3.5 – 4.1)	3.8± 0.2 (3.6 – 4.1)	3.6± 0.2 (3.3 – 4.0)	3.6± 0.2 (3.3–4.0)
HANDIV	2.2	2.4± 0.2 (2.0 – 2.8)	2.5± 0.2 (2.3 – 2.8)	2.3± 0.2 (1.9 – 2.6)	2.4± 0.1 (2.1–2.6)
TL	7.0	7.3± 0.6 (5.0 – 8.0)	7.7± 0.3 (7.3 – 8.2)	7.4± 0.4 (6.5 – 8.1)	7.5± 0.3 (7.0–8.0)
FL	6.6	6.8± 0.3 (6.1 – 7.2)	7.0± 0.4 (6.3 – 7.5)	6.6± 0.4 (6.0 – 7.6)	6.7± 0.3 (6.2–7.2)
THL	6.6	7.0± 0.4 (6.0 – 7.6)	7.2± 0.3 (6.6 – 7.8)	6.9± 0.4 (6.0 – 8.1)	7.3± 0.3 (6.9–8.1)
DPT	0.5	0.5± 0.1 (0.5 – 0.7)	0.6± 0.1 (0.5 – 0.6)	0.5± 0.1 (0.4 – 0.6)	0.5± 0.1 (0.4–0.6)
WTT	0.4	0.4± 0.1 (0.2 – 0.5)	0.4± 0.1 (0.3 – 0.5)	0.4± 0.1 (0.3 – 0.5)	0.4± 0.1 (0.3–0.5)
WFDI	0.4	0.4± 0.0 (0.4 – 0.5)	0.4± 0.0 (0.3 – 0.5)	0.4± 0.0 (0.3 – 0.5)	0.4± 0.1 (0.3–0.5)
WFDII	0.5	0.5± 0.0 (0.4 – 0.5)	0.4± 0.0 (0.4 – 0.5)	0.4± 0.1 (0.4 – 0.5)	0.4± 0.0 (0.3–0.5)
WFDIII	0.6	0.6± 0.0 (0.5 – 0.6)	0.5± 0.0 (0.5 – 0.6)	0.5± 0.0 (0.4 – 0.6)	0.5± 0.1 (0.4–0.6)
WFDIV	0.5	0.5± 0.0 (0.4 – 0.5)	0.5± 0.0 (0.4 – 0.6)	0.4± 0.1 (0.3 – 0.5)	0.5± 0.1 (0.3–0.6)
WPFI	0.3	0.3± 0.0 (0.3 – 0.4)	0.3± 0.1 (0.3 – 0.4)	0.3± 0.0 (0.2 – 0.4)	0.3± 0.0 (0.3–0.3)

WPFII	0.4	0.4± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.2−0.4)
WPFIII	0.4	0.4± 0.0 (0.3 − 0.5)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3−0.4)
WPFIV	0.3	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.3)	0.3± 0.0 (0.2 − 0.3)	0.3± 0.0 (0.3−0.3)
WTDI	0.3	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.4± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3 − 0.4)	0.3± 0.0 (0.3−0.4)
WTDII	0.5	0.5± 0.1 (0.5 − 0.7)	0.5± 0.0 (0.4 − 0.6)	0.5± 0.1 (0.4 − 0.6)	0.5± 0.1 (0.4−0.6)
WTDIII	0.6	0.6± 0.1 (0.5 − 0.7)	0.6± 0.0 (0.6 − 0.7)	0.6± 0.1 (0.5 − 0.7)	0.6± 0.1 (0.5−0.8)
WTDIV	0.7	0.7± 0.1 (0.5 − 0.8)	0.7± 0.0 (0.7 − 0.8)	0.6± 0.1 (0.5 − 0.8)	0.6± 0.1 (0.5−0.8)
WBF2	0.5	0.5± 0.0 (0.4 − 0.5)	0.4± 0.0 (0.5 − 0.6)	0.4± 0.0 (0.4 − 0.5)	0.4± 0.0 (0.3−0.4)
WBF3	0.6	0.6± 0.0 (0.6 − 0.7)	0.5± 0.0 (0.6 − 0.7)	0.6± 0.1 (0.5 − 0.7)	0.5± 0.0 (0.5−0.6)

3.3.11 Descrição do Girino

As medidas foram obtidas de oito girinos no estágio de desenvolvimento 36 de Gosner, (lote APL-23848). Os valores das medidas morfométricas de 29 girinos nos estágios 34–37 são apresentados na Tabela 4. Corpo obtuso em vista dorsal, arredondado anteriormente e truncado posteriormente (Fig.10 B, C), achatado em vista lateral. Comprimento total (TL) =19,7 ± 0,5mm; BL=6,5 ± 0,3mm; BL 32% da TL; TAL=13,2 ±0,4mm; TAL 67% da TL; Corpo mais largo que alto; BH=2,9 ±0,3mm, BW=4,1 ± 0,2mm; BH 70% do BW. Focinho arredondado nas vistas ventral, dorsal e lateral; (END=0,6 ± 0,04mm), ED=0,8 ± 0,1 mm, END 75% do ED; narinas pequenas e ovais (ND= 0,1 ± 0,01mm), com bordas finas, posicionadas dorsolateralmente e equidistantes do focinho aos olhos, NSD=0,6 ± 0,08mm, e ESD=1,6 ± 0,2mm. A distância internasal (IND: 1,5 ± 0,04mm) é menor que a distância interocular (IOD: 2,1 ± 0,1mm). Olhos grandes, posicionados dorsalmente (ED: 0,9 ± 0,04mm), com orientação lateral.

O espiráculo é sinistral, cilíndrico, com pequena abertura (WOS: 0,3 ± 0,04mm), livre, visível lateralmente e direcionado transversalmente; parede interna livre do corpo; comprimento do tubo 30% de BW. Comprimento da cauda 13,2 ± 0,4mm, (67%) do comprimento total. Musculatura caudal robusta, em vista dorsal, músculo da cauda ligeiramente menor que a metade da largura do corpo (TMW= 43% do BW), estreitando-se gradualmente até a extremidade da cauda. Nadadeiras dorsal e ventral são baixas (BMH=1,2 ± 0,1mm). A ponta da cauda é acuminada e sem flagelo. Intestino enrolado, visível a olho nu e direcionado para o lado esquerdo do corpo. O tubo anal é longo, unido à nadadeira ventral, posicionado medialmente e com abertura dextral.

Disco oral localizado anteroventralmente, emarginado lateralmente, largura média (OD=1,7 ± 0,1 mm). Lábio anterior com duas ou três papilas piramidais em cada margem lateral (Fig.10 C, D). Lábio posterior com uma única fileira marginal com 10 a 13 papilas de comprimento variável, papilas curtas piramidais localizadas próximas ao ângulo do lábio, todas as outras papilas centrais são como tentáculos alongados (Fig.10 D). Bainha da mandíbula superior em forma de arco e serrilhada; bainha da mandíbula inferior em forma de U com serrilhas alongadas ao longo de todo o seu comprimento. A fórmula oral é 2(2) /3(1), fileira de dentes A-1 completa; fileira de dentes A-2 interrompida por um

gap medial de (0,5 - 0,04mm); a fileira de dentes P3 é a metade de P2 e P1, ambas do mesmo tamanho (Fig.10 C). Linha lateral não visível.

Quando preservado a coloração é creme esbranquiçada, com aglomerados de melanóforos por toda a superfície dorsal, há maior densidade de melanóforos na região superior do corpo, formando manchas marrons; região ventral do corpo com poucas manchas de melanóforos, maior concentração na borda do corpo. Em vida, os girinos são translúcidos com manchas de cor cinza.

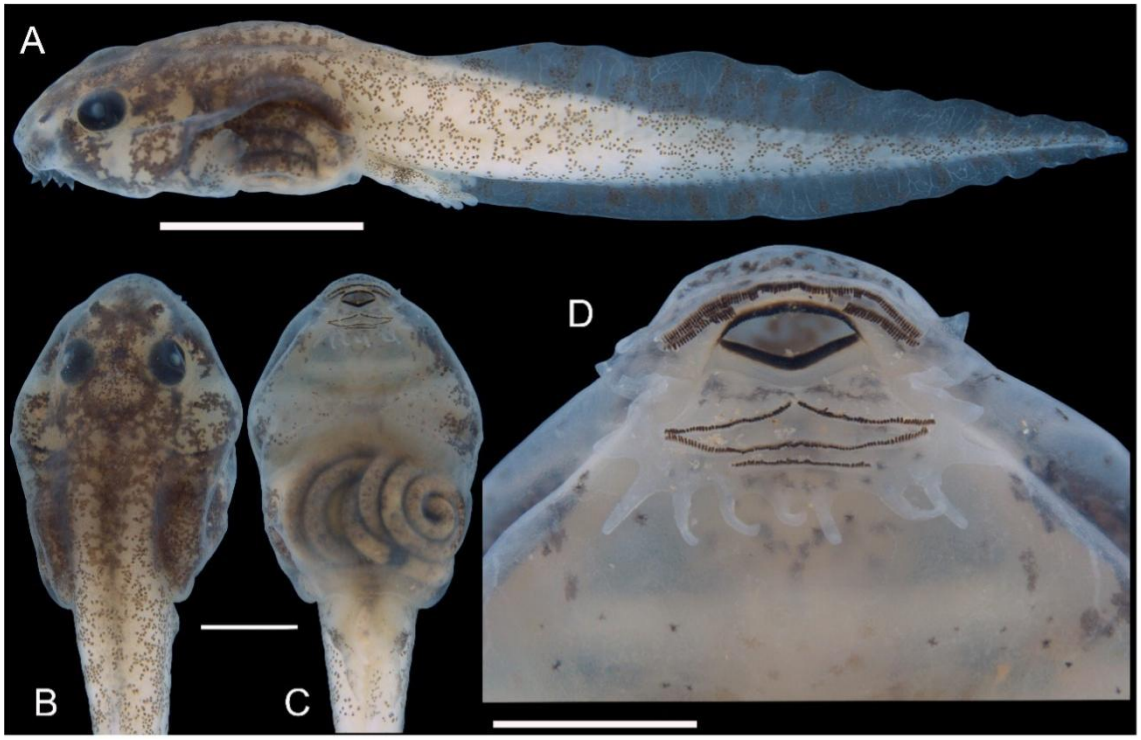

Figura 10. Girino de *Allobates* SL3 sp. nov. coletados em Vista Alegre do Abunã (lote APL–23784), estágio 36 de Gosner. Vistas lateral (A), dorsal (B), vista da região ventral (C), vista ventral do disco oral (D). Barras de escala: (A) 5 mm; (B, C) 1 mm; e (D) 2 mm.

3.3.12 Comparações entre Girinos

O girino de *Allobates* SL3 sp. nov. possui papilas longas, que o diferencias de (*A. nunciatus* e *A. granti* que possui papilas curtas no lábio posterior); *Allobates* SL3 sp. nov. possui duas a três papilas de forma triangular em cada lado do lábio superior e 12 ou 13 papilas longas no lábio posterior; (*A. subfolionidificans*, *A. brunneus*, *A. paleovarzensis*, *A. sumtuosus*, *A. tapajos* e *A. magnussoni* possuem quatro ou mais papilas curtas de pontas arredondadas em cada lado do lábio anterior; *A. kamilae* e *A. grillicantus* três ou quatro em cada lado do lábio anterior; *A. gasconi* duas papilas triangular em cada margem do lábio anterior; *A.* SL4 duas papilas marginais em cada margem do lábio anterior).

O Girino de *Allobates* SL3 sp. nov. possui comprimento total, TL= 20.7±0.3mm no estágio 36; em (*A. kamilae* o comprimento total TL= 18.8± 1.3 mm, no mesmo estágio); *Allobates* SL3 sp. nov. apresentam aglomerados de pequenos pontos marrom-claro na cauda, não formando manchas ou faixas; (*A. caeruleodactylus*, *A. marchesianus* e *A. grillisimilis* possuem barras transversais escuras na cauda). Girinos de *Allobates* SL3 sp. nov.12 ou 13 papilas alongadas no lábio posterior; (*A. grillicantus*, 18 papilas moderadamente alongadas no lábio posterior); *Allobates* SL3 sp. nov. fileiras de dentes P1 e P2 de tamanho similar, P3= 58% de P2; (*A. gasconi* fileira de dentes P3 ausente), ("Ferreira *et al*. *In press*"); os girinos de *A. SL3* sp. nov. são exotróficos, girinos (*A. nidicola* e *A. masniger* são endotróficos desenvolvem-se em ninhos terrestres, e não possuem estruturas do disco oral ou espiráculo).

O girino de *Allobates* SL3 sp. nov. difere do girino de *A.* SL4 pela ornamentação de manchas na pele, em *Allobates* SL3 sp. nov. o ornamento é formando por pequenos aglomerados marrom-claro, não formando manchas continuas na cauda (em *A*. SL4, a ornamentação é intensamente adensada, formando manchas marrom-escuro na cauda). As comparações foram baseadas em girinos de *Allobates* SL3 sp. nov. e *A*. LS4 no estágio 36 de Gosner, as medidas são apresentadas na (Tabela 4).

Tabela 4- Medidas morfométricas de 28 girinos de *Allobates* SL3 sp. nov., estágio Gosner 34–37, de Vista alegre do Abunã-Porto Velho-RO. Os valores representam média ± desvio padrão (intervalos). As siglas dos caracteres são definidas no texto; n= tamanho da amostra.

Caracteres	Estágio 34, n=7	Estágio 35, n=7	Estágio 36, n=7	Estágio 37, n=7
TL	18.5± 0.8 (20.0 – 17.4)	18.6± 0.8 (19.8 – 17.4)	19.7± 0.5 (20.5 – 19.1)	19.8± 1.0 (21.6 – 18.6)
BL	6.2± 0.3 (6.6 – 5.8)	6.2± 0.3 (6.6 – 5.8)	6.5± 0.3 (6.8 – 5.9)	6.6± 0.3 (7.2 – 6.3)
TAL	12.3± 0.6 (13.4 – 11.6)	12.4± 0.6 (13.4 – 11.6)	13.2± 0.4 (13.8 – 12.5)	13.2± 0.7 (14.4 – 12.2)
BH	2.8± 0.1 (2.9 – 2.5)	2.9± 0.2 (3.1 – 2.5)	2.9± 0.3 (3.2 – 2.3)	2.9± 0.2 (3.3 – 2.7)
BW	4.1± 0.1 (4.3 – 3.9)	4.0± 0.1 (4.1 – 3.7)	4.1± 0.2 (4.5 – 3.8)	4.1± 0.2 (4.3 – 3.8)
MTH	2.8± 0.2 (3.1 – 2.6)	2.9± 0.2 (3.1 – 2.5)	2.9± 0.1 (3.1 – 2.7)	2.9± 0.2 (3.1 – 2.5)
VMH	0.6± 0.1 (0.7 – 0.5)	0.7± 0.1 (0.9 – 0.5)	0.6± 0.1 (0.8 – 0.6)	0.6± 0.1 (0.7 – 0.5)
TMH	1.6± 0.1 (1.7 – 1.5)	1.7± 0.1 (1.7 – 1.5)	1.7 ± 0.1 (1.8 – 1.5)	1.6± 0.1 (1.7 – 1.5)
TMW	1.6± 0.1 (1.7 – 1.4)	1.6± 0.1 (1.8 – 1.4)	1.8± 0.1 (1.9 – 1.6)	1.8± 0.1 (1.9 – 1.6)
VTL	1.3± 0.2 (1.5 – 1.1)	1.2± 0.1 (1.3 – 1.1)	1.3± 0.1 (1.5 – 1.1)	1.2± 0.1 (1.2 – 1.0)
IOD	2.1± 0.1 (2.2 – 1.9)	2.1± 0.1 (2.2 – 1.9)	2.1± 0.1 (2.2 – 2.0)	2.1± 0.1 (2.3 – 1.9)
IND	1.4± 0.1 (1.5 – 1.3)	1.4± 0.0 (1.5 – 1.4)	1.5± 0.0 (1.5 – 1.4)	1.4± 0.1 (1.6 – 1.3)
ESD	1.6± 0.2 (1.8 – 1.2)	1.6± 0.1 (1.8 – 1.4)	1.6± 0.1 (1.8 – 1.4)	1.7± 0.1 (1.8 – 1.4)
NSD	0.6± 0.2 (0.8 – 0.3)	0.5± 0.1 (0.7 – 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 – 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 – 0.5)
ED	0.8± 0.0 (0.9 – 0.8)	0.9± 0.0 (0.9 – 0.8)	0.9± 0.0 (1.0 – 0.9)	0.9± 0.1 (1.0 – 0.8)
ND	0.1± 0.0 (0.1 – 0.1)	0.1± 0.0 (0.1 – 0.1)	0.1± 0.0 (0.1 – 0.1)	0.1± 0.0 (0.1 – 0.1)
END	0.6± 0.0 (0.6 – 0.5)	0.6± 0.0 (0.7 – 0.5)	0.6± 0.0 (0.6 – 0.6)	0.6± 0.0 (0.6 – 0.6)
STL	1.2± 0.1 (1.3 – 1.0)	1.2± 0.1 (1.3 – 1.1)	1.2± 0.1 (1.4 – 1.1)	1.2± 0.1 (1.4 – 1.0)
SW	0.5± 0.0 (0.6 – 0.5)	0.5± 0.1 (0.6 – 0.4)	0.5± 0.1 (0.6 – 0.5)	0.5± 0.0 (0.6 – 0.5)

WOS	0.2± 0.0 (0.3 − 0.2)	0.2± 0.0 (0.3 − 0.2)	0.2± 0.0 (0.3 − 0.1)	0.2± 0.0 (0.3 − 0.2)
SH	1.4± 0.1 (1.6 − 1.2)	1.3± 0.2 (1.6 − 1.0)	1.4± 0.2 (1.5 − 1.0)	1.4± 0.2 (1.7 − 1.2)
OD	1.6± 0.1 (1.7 − 1.4)	1.6± 0.2 (1.9 − 1.3)	1.7± 0.1 (1.8 − 1.5)	1.7± 0.1 (1.8 − 1.5)
AL	0.5± 0.0 (0.5 − 0.4)	0.5± 0.0 (0.5 − 0.4)	0.5± 0.0 (0.5 − 0.4)	0.5± 0.0 (0.5 − 0.4)
PL	0.6± 0.1 (0.8 − 0.5)	0.6± 0.1 (0.8 − 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 − 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 − 0.5)
GAP	0.5± 0.0 (0.5 − 0.5)	0.5± 0.0 (0.5 − 0.5)	0.5± 0.0 (0.6 − 0.5)	0.5± 0.0 (0.6 − 0.5)
A1	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.2± 0.0 (1.2 − 1.1)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.3± 0.1 (1.3 − 1.1)
A2	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.1± 0.1 (1.2 − 1.0)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)
P1	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.0)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.2± 0.0 (1.3 − 1.2)
P2	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.1± 0.1 (1.2 − 1.0)	1.2± 0.1 (1.3 − 1.1)	1.2± 0.1 (1.4 − 1.2)
P3	0.7± 0.1 (0.9 − 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 − 0.5)	0.6± 0.1 (0.7 − 0.6)	0.7± 0.1 (0.9 − 0.6)
UJW	0.8± 0.0 (0.9 − 0.8)	0.8± 0.0 (0.9 − 0.8)	0.8± 0.1 (0.8 − 0.8)	0.8± 0.0 (0.9 − 0.8)
UJL	0.6± 0.0 (0.6 − 0.6)	0.6± 0.0 (0.7 − 0.6)	0.6± .0 (0.7 − 0.6)	0.6± 0.0 (0.6 − 0.6)

3.3.13 Vocalização

O canto de anúncio de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. é formado por duas notas de diferente duração e frequência, emitido de forma continua e irregular, formando arranjos com um até nove cantos em sequência (Fig. 11). A Taxa de emissão dos cantos é de 68.4±0.5 cantos por minuto (N=7 machos). A duração média dos arranjos de cantos é de 1,155 ± 171 ms (937–1,422 ms), o intervalo entre os arranjos de canto é de 852 ± 131 ms (645–1,118 ms), a duração do canto é de 59 ± 4 ms (53–64 ms), o intervalo entre notas é de 17 ± 2 ms (14–17 ms) e o intervalo entre cantos é de 199 ± 24 ms (152–241 ms). Cada nota do canto de *A. gasconi* SL3 sp. nov. difere no tempo de duração. A primeira nota é significativamente mais curta que a segunda (T-teste: t = -9.40 df =18 P < 0.001), a nota 1 dura em média 17 ± 2 ms (variando de 14–20 ms) enquanto a nota 2 dura 26 ± 2 ms (variando de 22–29 ms). As notas também diferem expressivamente entre si na frequência baixa 4.800 ± 244 Hz (4.351–5.142 Hz), (T-teste: t = -4.38 df = 17.6 P < 0.001), frequência alta 5.354± 272 Hz (4.837–5.855 Hz), (T-teste: t = -3.69 df = 18.0 P = 0.002) e frequência dominante 5.135 Hz ± 293 (4.550–5.588 Hz), (T-teste: t = 3.95 df = 18.0 P = 0.001).

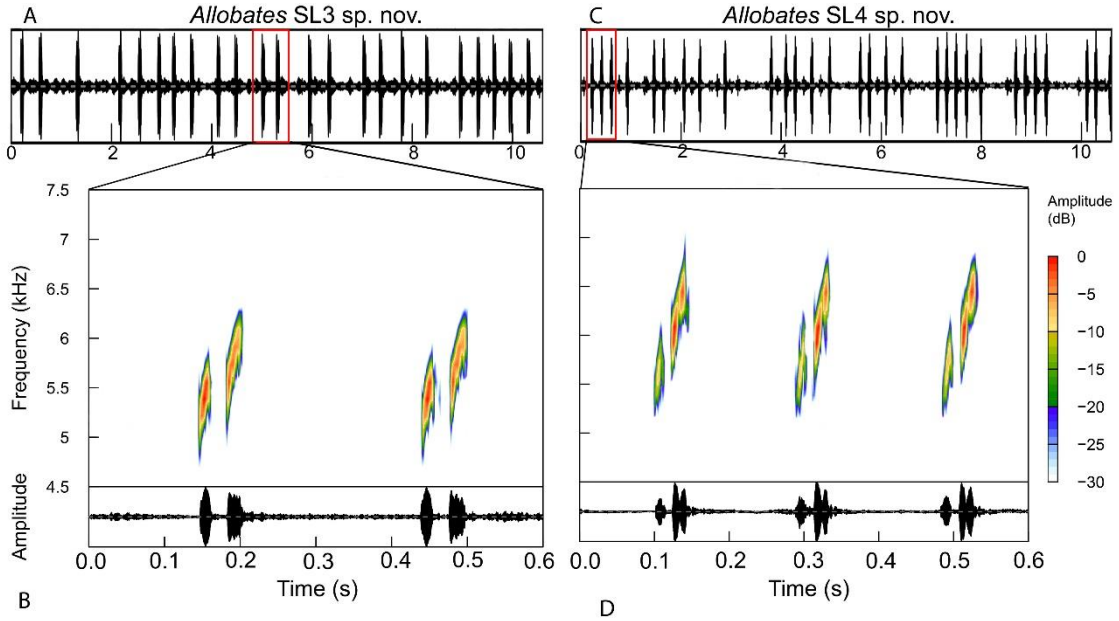

Figura 11. Canto de anúncio de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A–B) e *A. gasconi* SL4 (C–D). Oscilogramas na porção superior da figura mostram a emissão contínua de séries de cantos com arranjos distintos em *A. gasconi* SL3 sp. nov. (A) e *A. gasconi* SL4 (C). Espectrogramas e oscilogramas destacando a diferença nas frequências do canto de *A. gasconi* SL3 sp. nov. (B) e *A. gasconi* SL4 (D). (A–B) APL-23783, SVL-15.9 mm, FNJV

xxxxx, temperatura do ar entre 23.8 a 26° C. (C–D) APL-21553, SVL-16.3 mm, FNJV xxxxx, temperatura do ar 28° C.

3.3.14 Comparação bioacústica

Para comparação do canto de anúncio de *Allobates* SL3 sp. nov. seguiremos Köhler *et al*. (2017) página 25, onde cada canto corresponde a uma expiração.

Allobates SL3 sp. nov. apresenta canto de anúncio pouco comum, formado por duas notas (cada par de nota é emitida em uma expiração), emitidas continuamente em séries (grupos) e intervalos silenciosos também irregulares. O canto incomum de *Allobates* SL3 sp. nov. difere do canto de anúncio de 20 espécies que apresentam canto de nota única (cada nota emitida após uma expiração) emitidas continuamente ou em series: *A. bacurau*; *A. caldwellae*; *A. crombiei*; *Allobates juami; Allobates nunciatus*; *Allobates tinae*; *Allobates velocicantus; A. paleovarzensis*; *A. tapajos*; *A. carajas*; *A. flaviventris*; *A. fuscelus*; *A. kamilae*; *A. magnussoni*; *A. marchesianus*; *A. masniger*; *A. nidicola*; *Allobates nunciatus*; *A. paleci*; *A. paleovarzensis*; *A. subfolionidificans*; *A. sumtuosus*. *Allobates velocicantus, A. grillicantus* e *A. grillisimilis* cantam em series de notas simples ou nota única (multinotas) e intervalos silenciosos.

O canto de anuncio de *Allobates* SL3 sp. nov. é mais semelhante ao emitido pelas espécies *Allobates gasconi, Allobates trilineatus, A. flaviventris* e *Allobates* SL4 que também emitem cantos com duas notas em uma expiração (comparações com estas espécie serão apresentadas em parênteses). *Allobates* SL3 sp. nov. emite canto de anúncio com duas notas, arranjos de cantos e intervalos silenciosos irregulares; *Allobates* SL3 sp. nov. difere de *Allobates gasconi* por este (emitir cantos mais complexos formados por duas, três ou quatro notas em uma expiração, arranjados de forma irregular). Difere de *Allobates trilineatus* por este (emitir canto de anúncio com pares de notas formados por series regulares de 6 a 11 cantos, com longos intervalos silenciosos entre séries de cantos, frequência de pico 5.330 ± 220 Hz e duração do canto de1,24 ± 0,17 s). (Jaramillo et al. 2021); difere de *A. flaviventris* por este (exibir canto de anúncio com notas de similar duração, e frequência de pico 3.617– 4.651 Hz mais baixa, Lima et al. (2014)), primeira nota mais curta que a segunda nota em *Allobates* SL3 sp. nov. Por *Allobates* SL4 ser a espécie irmã de *Allobates* SL3 sp. Nov. iremos dar mais detalhes entre estas duas espécies. *Allobates* SL3 sp. nov. possui duração do canto 59 ± 4 s (50± 4 s em SL4); primeira nota possui duração de 17 ± 2 s (13±2 em SL4) e segunda nota tem duração de 26 ± 2 s (20±2

em SL4), o intervalo entre notas variou de 17 ± 2 s (16 ± 4 s em SL4) e), frequência de pico 5.135 ± 293 Hz (5.849 ± 250 Hz em SL4); taxa de emissão cantos 68.4±0.5 min. (76.6±10.7 min. em SL4).

Allobates conspicuus, *A. fuscellus*, *A. pacaas*, e *A. vanzolinius* não possuem descrições do canto de anúncio.

3.3.15 Distribuição e história natural

Até o momento, os únicos locais onde foram registrados formalmente indivíduos de *Allobates* SL3 sp. nov. foram na localidade tipo, margem esquerda do rio Madeira, distrito de Vista Alegre do Abunã, município de Porto Velho, e mencionado para Porto Velho e UHE de Jirau por (Réjaud et al. 2020, Vacher et al. 2020). Informalmente existe registro de cantos da espécie em Mutum-Paranã e 50 Km a jusante da vila de Abunã na margem esquerda do Rio Madeira (A. P. Lima Obs. Pessoal e registro no documento do EIA-Rima das Hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau sob o nome *Allobates sp. 2*).

Os espécimes de *Allobates* SL3 sp. nov. foram encontrados na serapilheira de mata ciliar na margem esquerda do rio Madeira, a área continha diversas poças de tamanhos variados, local de provável deposição dos girinos (Fig. 8A). Os espécimes foram encontrados durante o dia, período em que diversos machos foram avistados em atividade de vocalização e forrageio sobre serapilheira úmida e troncos caídos. Note que a emissão do som é logo após a contração dos músculos abdominais (expiração), (https://youtu.be/t9R9B1-5O2o; https://youtu.be/BPzuhFCGveY; https://youtu.be/Zb_01wbrssw). O maior número de machos vocalizando foi observado entre 06:00–11:30 e 15:00–18:30 horas.

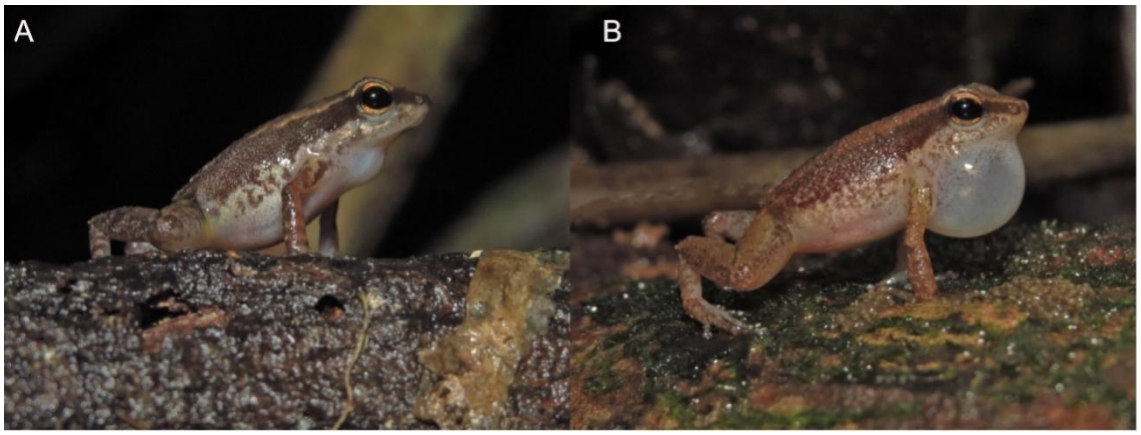

Figura 12. Machos de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. vocalizando. (A) Holótipo, SVL 15.94 mm. (B) Macho não coletado. Em alguns casos, os melanóforos presente na região gular podem ser melhor visualizados quando o saco vocal se encontra expandido (B).

Os ovos são depositados em massa gelatinosa translúcida sobre a superfície adaxial de folhas verdes de 2.8± 2.3 cm (1.5–5.0 cm) de largura por 6.7± 0.6 cm (3.0–16.0 cm) de comprimento de pequenos arbustos ou plântulas com altura média de 6.6 cm acima do solo. Ovos recém postos são de cor cinza, embriões são esverdeados (Fig. 13E, F). Durante as buscas, encontramos 17 desovas; quatro contendo em média 18±1.6 (17–21) ovos, três 20±1.4 (18–21) girinos desenvolvidos, cinco delas continham 26±2.5 (21–27) embriões, e, em outras cinco os girinos já haviam sido transportados. Portanto, o número de ovos por desova variou de 17–27. Das 17 desovas encontradas, três foram depositadas numa mesma folha (Fig.13F), as outras 14 desovas foram depositadas individualmente em cada folha (Fig.13D, E). A distância entre poças e desovas foi de 160 ± 110 (370–90 cm).

Figura 13. História natural de *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. (A) setas verdes indicam poças de provável deposição de girinos; (B) macho não coletado cantando; (C) fêmea não coletada; (D) desova recém-posta com 24 ovos; (E) desova com 20 embriões, note o vitelo esverdeado dos embriões; (F) ninho com três desovas em diferentes estágios de desenvolvimento larval.

4. DISCUSSÃO

Nos estudos de Melo-Sampaio et al. (2018), Réjaud et al. (2020), Vacher et al. (2020) os autores propuseram um complexo de espécies nominado como *Allobates gasconi* para a região do Alto rio Purus e rio Madeira, no qual, três novas linhagens foram indicadas. Nosso resultados demostram que as amostras (HJ480 and HJ299) em (Réjaud et al. (2020) e Vacher et al. (2020) agrupam-se com a linhagem *Allobates* SL3 sp. nov. De posse dessas informações, somado ao nosso conjunto de dados e de colaboradores, demostramos que o complexo *Allobates gasconi* senso lato é composto por 5 linhagens

que compreendem o clado *Allobates caeruleodactylus*, como também é indicado em Ferreira et al. e Souza et al. ambos estudos (in press).

As distâncias genéticas dentro do complexo *Allobates gasconi* senso lato são relativamente baixas, sendo as distancias mais altas entre *A. gasconi* SL3 sp. nov. e as candidatas (*A. gasconi* SL1), variando 3,0–4,4% e (*A. gasconi* SL2) 3,0–3,9%, e os menores valores de distância genética estão presentes entras linhagens *A. gasconi* SL3 sp. nov. e as duas candidatas (*A. gasconi* SL4) com distância 1.5–2.1% e (*A. gasconi* SL5) 1.7–2.6%. Porém, outros grupos de espécies crípticas já descritas apresentam valores de divergência igualmente baixos *Physalaemus* (1.6–4.5%), (Ron et al. 2005, Funk et al. 2007); *Ameerega* (1.8–5%), (Lötters et al. 2009);entre *Rhinella castaneotica/proboscidae* e *R. teotoniensis* (1.5–2.5%), (Ferrão et al. 2022), e *Osteocephalus taurinus* e *O. oophagus* cuja distância (0.9–2.2%), (Jungfer et al. 2013).

Além disso, as espécies pertencentes ao complexo *A. gasconi* senso lato apresentam baixa divergência populacional, a linhagem *A.* SL5, foi a que apresentou mais alto valor de divergência 0.4%, e esse baixo valor são entre as populações da boca do Acre e Teotonio, que tem pelo menos 200 km de distância entre si (Tabela 1), deixando evidente que valores acima de 1.5 são altos valores de divergência interespecífica (Zhang et al. 2019). Por tanto, *Allobates* SL3 sp. nov. que possui como espécie irmã mais próxima a linhagem *A.* SL4, e apresenta distância interespecífica 1.5 a 2.1%, mas foram reconhecidas através de três testes moleculares usando coalescência, distância e compartilhamento de alelos (pelos métodos Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Assemble Species by Automatic Partitioning 350 (ASAP) and Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) em Souza et al. (2023).

Além de divergência molecular, evidencias que indiquem isolamento reprodutivo, tais como, divergências comportamentais (canto de anúncio e modo reprodutivo, como no caso de *Osteochephalus taurinus* vs *oophagus*), que é semelhante ao nosso estudo, onde divergências reprodutivas e bioacústicas foram importantes na diagnose das duas novas linhagens irmãs *A.* SL3 sp. nov. e *A.* SL4. Os caracteres morfológicos também devem ter uma variação mínima dentro da espécie e ser altamente eficaz para identificar diferentes espécies (Vences et al. 2005, Fouquet et al. 2007, Vieites et al. 2009), o que pode ser facilmente evidenciado entre as linhagens *A.* SL3 sp. nov. e *A.* SL4.

Morfologicamente as espécies divergem pelo dorso fortemente tuberculado, discos e falanges dos dedos da mão expandidas, saco vocal branco recoberto com

melanóforos em *A.* SL3 sp. nov.; em *A.* SL4 o dorso é liso com poucos tubérculos próximo ao uróstilo, disco e falanges são moderadamente expandidos, possui saco vocal e ventre translúcidos. *Allobates gasconi* SL3 sp. nov. possui cabeça 3,5 % mais larga que longa quando comparamos *A. gasconi* SL4; a mão de *A.* SL3 sp. nov. é 4,5% mais comprida em relação ao braço que A. SL4, já *A.* SL4 tem a relação braço com antebraço 7,8% mais longo que *A.* gasconi SL3 sp. nov.

Além dos caracteres morfológicos, divergem também no canto de anúncio. *Allobates* SL3 sp. nov. apresenta importantes diferenças em relação à linhagem *A.* SL4, que possui duração do canto de anuncio mais curto (50± 4 ms vs 59 ± 4 ms), e frequência de pico mais alta de (5.849 ± 250 vs 5.135 ± 293 Hz)), e uma maior taxa de repetição de cantos (76.6±10.7 vs 68.4±0.5 cantos p/min).

Outra importante características diagnóstica que demonstra forte isolamento reprodutivo entre as duas linhagens diz respeito a fase do desenvolvimento embrionário, na qual em *A.* SL3 sp. nov. possui ovócitos marrom-escuro, ovos cinza, e embriões esverdeados enquanto *A.* SL4 os ovócitos são marrom-avermelhado, ovos brancos com o polo vegetativo negro e embriões acinzentados. Dentre o conjunto de evidências apresentadas para diferenciação entre nova espécie e as 62 espécies de *Allobates* descritas até o momento, o padrão "esverdeado" do girino talvez seja o mais incomum, não há em nenhum outro estudo menção desta característica para qualquer espécie do gênero.

Adicionalmente, o padrão biogeográfico do complexo *Allobates gasconi* sensu lato é ainda um tanto enigmático e parece estar relacionado a dinâmica da drenagem e complexidade histórica da região do interflúvio do alto rio Madeira e rio Purus. A formação desta região data do Plioceno por volta de 4 milhões de anos, com a elevação do arco de Fitzcarrald, causado pelo afundamento (subducção) da placa de Nazca (Espurt et al., 2010; Regard et al., 2009). A complexidade deste domínio geotectônico resultou em uma ampla variedade de ambientes, de terra firme ou sazonalmente alagada, tanto nas margens do rio Madeira como nas margens do rio Purus (Latrubesse, 2002; Latrubesse et al., 2017). A dinâmica dos pulsos de inundações e processos de erosão ao longo de anos tem permitido altos níveis de endemismos em aves Cohn-Haft et al. (2007), peixes Rapp Py-Daniel, (2007), e ao complexo de *Allobates femoralis* (Simões et al. 2008) e acreditamos que o mesmo possa ocorrer para o complexo *Allobates gasconi* sensu lato. Além disso, Simões et al. (2012) detectaram uma zona de contato entre duas espécies do complexo *Allobates femoralis* na margem esquerda do alto Rio Madeira, esta zona

coincide com os limites entre dois domínios geomorfológicos: a jusante Planalto Rebaixado da Amazônia Ocidental - e a montante-Planalto Dissecado Sul da Amazônia (DNPM 1978, Souza Filho et al. 1999). Coincidindo com a mesma região de ocorrência das linhagens *A*. SL3 sp. nov. e *A*. SL5, com *A*. SL3 sp. nov. distribuído a montante (acima da cachoeira do Jirau até Abunã) e *A*. SL5 a jusante do rio Madeira (ocorrendo abaixo da cachoeira do Jirau nas localidades cachoeira do Teotonio, rio Ituxi e Boca do Acre).

Da mesma forma que a região da cachoeira do Jirau na margem esquerda do rio Madeira é considerada uma zona de contato entre *Allobates hodli* e *A. femoralis* (Simoes et al, 2008, 2012). Nosso estudo também sugere que esta região seja uma zona de contacto entre *A*. SL3 sp. nov. e *A*. SL5 sp. nov., porém mais coletas precisam ser realizadas para comprovar esta possibilidade.

Além disso, amostragens lideradas por A.P. Lima durante 7 anos de monitoramento da Herpetofauna da Hidrelétrica de Santo Antônio e cachoeira do Jirau não registraram linhagens do clado *A. gasconi* senso lato na margem direita do rio Madeira, assim como nossa expedição em fevereiro de 2022. No entanto, (Réjaud et al. 2020 e Vacher et al. 2020) apresentam duas coordenadas que são bastante confusas quanto a sua real localização, a primeira localidade está dentro do centro urbano de Porto Velho e a segunda ao lado da nossa localidade tipo, porém na margem direita do rio Madeira. Nós suspeitamos que estes tenham sido um erro no momento de marcação da coordenada. Uma vez que não existe fragmentos florestais no centro urbano de Porto Velho e nossas buscas na margem direita do Rio Madeira na mesma posição indicada e outras localidades não registrou vocalizações semelhantes as espécies do clado. Que, por terem cantos com duas notas, o som é muito característico e facilmente reconhecido.

No Eia-Rima para construção das Hidrelétricas do Jirau e Santo Antônio (2004 e 2005) houve buscas intensas por A. P. Lima e equipe nas regiões de Mutum e Abunã em ambas as margens do Rio Madeira. Na ocasião foi registrado canto de *A*. SL3 sp. nov. tanto em Mutum como em Abunã, somente no lado esquerdo do Rio madeira, infelizmente o material foi perdido e somente o registro do canto foi encontrado. No mesmo período, a linhagem, *A*. SL5 foi encontrada entre a Cachoeira do Jirau e a Cachoeira do Teotônio, também margem esquerda do rio Madeira, coincidindo exatamente com a zona de contacto de *Allobates hodli* e *A. femoralis* mencionada no estudo de (Simões et. al 2012).

Por outro lado, a linhagem *A.* SL4 possui ocorrência reconhecida em terras baixas de quatro localidades no estado do Acre e uma no estado Amazonas, todas as localidades com bacias de drenagens para o Rio Purus (Fig. 1). Baseando-se nessas informações, sugerimos que *A.* SL3 sp. nov. é uma espécie que habita a margem esquerda do Rio Madeira a montante, no Planalto Dissecado Sul da Amazônia, coincidindo com parte da distribuição de *Allobates hodli* (Simões et al. 2010).

Esta região do Interflúvio Purus-Madeira tem sido palco de grandes descobertas para a anurafauna, muitas espécies tem sido descritas para aquela região; *A. caeruleodactylus*, *A. hodli*, *A. kamilae*, *A. tinae*, *Rhinella teotoniensis*, *Rhinella exostosica*, *Scinax onca*, *Dendropsophus bilobatus* são alguns exemplos (Lima and Caldwell, 2001; Simões et al. 2010; Ferrão et al. 2022 a, b; Melo-Sampaio et al. 2018; Ferrão et al. 2020; Ferrão et al. 2017), reforçando que está região pode estar entre as mais biodiversas do norte do país.

5. FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (BIODIVERSA, Edital 007/2021, Proc. 01.02.016301.03252/2021-67; POSGRAD UFAM-Zoologia). Albertina P. Lima recebeu bolsa do Programa FAPEAM Produtividade em CT&I - Edital 013/2022. Silionamã Dantas recebeu bolsa MS da FAPEAM. Miquéias Ferrão recebeu uma bolsa de pós-doutorado Edward O. Wilson Biodiversity do Harvard Museum of Comparative Zoology e uma bolsa do David Rockefeller Center for Latin American Studies da Harvard University. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

6. REFERÊNCIA

Bossuyt F, Milinkovitch MC (2000) Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 6585–6590. https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6585

Chiari Y, Vences M, Vieites DR, Rabemananjara F, Bora P, Ramilijaona Ravoahangimalala O, Meyer A (2004) New evidence for parallel evolution of colour patterns in Malagasy poison frogs (Mantella). Molecular Ecology 13: 3763–3774. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02367.x

Ferrão M, Souza RA, Colatreli OP, Hanken J and Lima AP. 2022. Hidden in the litter: cryptic diversity of the leaf-litter toad Rhinella castaneotica–proboscidea complex revealed through integrative taxonomy, with description of a new species from south-western Amazonia, Systematics and Biodiversity, 20(1): 1-24

Ferrão, M, J. Moravec, A. S. Ferreira, L. J. C. L. Moraes, and J. Hanken. 2022. A new snouted treefrog of the genus Scinax (Anura, Hylidae) from the white-sand forests of central Amazonia. Breviora. Museum of Comparative Zoology, Cambridge, Massachusetts 573: 1–36.

Ferrão M, Hanken J, Lima AP (2022) A new nurse frog of the Allobates tapajos species complex (Anura: Aromobatidae) from the upper Madeira River, Brazilian Amazonia. PeerJ 10: 1–36. https://doi.org/10.7717/peerj.13751

Ferrão M, Colatreli OP, De Fraga R, Kaefer IL, Moravec J, Lima AP (2016) High species richness of scinax treefrogs (hylidae) in a threatened amazonian landscape revealed by an integrative approach. PLoS ONE 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165679

Fouquet, A, M, Ferrão, and R. Jairam. 2023. Two new species of Allobates of the trilineatus clade (Anura: Aromobatidae) from the Eastern Guiana Shield. Zootaxa 5297: 533–561.

Fouquet A, Réjaud A, Rodrigues MT, Ron SR, Chaparro JC, Osorno M, Werneck FP, Hrbek T, Lima AP, Camacho-Badani T, Jaramillo-Martinez AF, Chave J (2022a) Diversification of the Pristimantis conspicillatus group (Anura: Craugastoridae) within distinct neotropical areas throughout the Neogene. Systematics and Biodiversity 20: 1–16. https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2130464

Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell NJ (2007) Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. PLoS ONE 2. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001109

Fouquet, A., Leblanc, K., Framit, M., Réjaud, A., Rodrigues, M. T., Castroviejo-Fisher, S., et al. (2021a). Species diversity and biogeography of an ancient frog clade from the Guiana Shield (Anura: Microhylidae: Adelastes, Otophryne, Synapturanus)

exhibiting spectacular phenotypic diversification. Biological Journal of the Linnean Society, 132(2), 233–256.

Fouquet A, Cornuault J, Rodrigues MT, Werneck FP, Hrbek T, Acosta-Galvis AR, Massemin D, Kok PJR, Ernst R (2022b) Diversity, biogeography, and reproductive evolution in the genus Pipa (Amphibia: Anura: Pipidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 170. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107442

Funk, W. C., J. P, Caldwell, C. E. Peden, J. M. Padial, I. De la Riva & D. C. Cannatella (2007): Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, Physalaemus petersi. – Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 825–837.

Gagliardi-urrutia G, Castroviejo-fisher S, Rojas-runjaic FJM, Jaramillo AF, Solís S, Simões PIVO (2021) A new species of nurse-frog (Aromobatidae, Allobates) from the Amazonian Forest of Loreto, Peru. https://doi.org/10.11646/zootaxa.5026.3.3

Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bulletin of the American Museum of Natural History: 1–262. https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)299[1:PSODFA]2.0.CO;2

Grant T, Rada M, Anganoy-Criollo M, Batista A, Dias PH, Jeckel AM, Machado DJ, Rueda-Almonacid JV. 2017. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives revisited (Anura: Dendrobatoidea). South American Journal of Herpetology 12:190 DOI 10.2994/SAJH-D-17-00017.1.

Jaramillo AF, Gagliardi-Urrutia G, Simões PI, Castroviejo-Fisher S (2021) Redescription and phylogenetics of Allobates trilineatus (Boulenger 1884 1883) (Anura: Aromobatidae) based on topotypic specimens. Zootaxa 4951: 201–235. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4951.2.1.

Jungfer, K. H., Faivovich, J., Padial, J. M., Castroviejo-Fisher, S., Lyra, M. M., Berneck, B. V. M., Iglesias, P. P., Kok, P. J. R., MacCulloch, R. D., Rodrigues, M. T., Verdade, V. K., Torres Gastello, C. P., Chaparro, J. C., Valdujo, P. H., Reichle, S., Moravec, J., Gvoždík, V., Gagliardi-Urrutia, G., Ernst, R., De la Riva, I., Means, D. B., Lima, A. P., Señaris, J. C., Wheeler, W. C. & Haddad, C. F. B. (2013). Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: Osteocephalus): an Amazonian puzzle. Zoologica Scripta, 42, 351 –380.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B., Wong, T. *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* **14**, 587–589 (2017). https://doi.org/10.1038/nmeth.4285.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28: 1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199

Köhler J, Jansen M, Rodríguez A, Kok PJR, Toledo LF, Emmrich M, Glaw F, Haddad CFB, Rödel MO, Vences M (2017) The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. Zootaxa 4251: 1–124. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1

de Lima Moraes LJC, Pavan D, Lima AP (2019) A new nurse frog of Allobates masniger-nidicola complex (Anura, Aromobatidae) from the east bank of Tapajós River, eastern Amazonia. Zootaxa 4648: 401–434. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4648.3.1

Lyra ML, Haddad CFB, de Azeredo-Espin AML (2017) Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. Molecular Ecology Resources 17: 966–980. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12648

Lötters, S, Schmitz, A., Reichle, S., Rödder, D. & Quennet, V. (2009) Another case of cryptic diversity in poison frogs (Dendrobatidae: Ameerega) - description of a new species from Bolivia. Zootaxa, 2028, 20–30.

Magalhães F de M, Lyra ML, de Carvalho TR, Baldo D, Brusquetti F, Burella P, Colli GR, Gehara MC, Giaretta AA, Haddad CFB, Langone JA, López JA, Napoli MF, Santana DJ, de Sá RO, Garda AA (2020) Taxonomic Review of South American Butter Frogs: Phylogeny, Geographic Patterns, and Species Delimitation in the Leptodactylus latrans Species Group (Anura: Leptodactylidae). Herpetological Monographs 34. https://doi.org/10.1655/0733-1347-31.4.131

Melo-Sampaio PR, Oliveira RMD, Prates I (2018) A new nurse frog from Brazil (Aromobatidae: Allobates), with data on the distribution and phenotypic variation of western Amazonian species. South American Journal of Herpetology 13: 131–149. https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00098.1

Mônico AT, Ferrão M, Chaparro JC, Fouquet A, Lima AP (2022) A new species of rain frog (Anura: Strabomantidae: Pristimantis) from the Guiana Shield and amended diagnosis of P. ockendeni (Boulenger, 1912). Vertebrate Zoology 72: 1035–1065. https://doi.org/10.3897/vz.72.e90435

Moraes LJCL, Werneck FP, Réjaud A, Rodrigues MT, Prates I, Glaw F, Kok PJR, Ron SR, Chaparro JC, Osorno-Muñoz M, Dal Vechio F, Recoder RS, Marques-Souza S, Rojas RR, Demay L, Hrbek T, Fouquet A (2022) With 3 figures. Museo de Biodiversidad del Perú, Urbanización Mariscal Gamarra A-61. Biological Journal of the Linnean Society: 1–17. https://doi.org/10.1093/biolinnean/blac006/6548182

de Oliveira EA, da Silva LA, Pereira Silva EA, Auzier Guimarães KL, Penhacek M, Martínez JG, Ribeiro Rodrigues LR, Santana DJ, Hernández-Ruz EJ (2020) Four new species of Pristimantis Jiménez de la Espada, 1870 (Anura: Craugastoridae) in the eastern Amazon. PLoS ONE 15: 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229971

Ortiz DA, Lima AP, Werneck FP (2018) Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. Evolutionary Ecology 32: 359–378. https://doi.org/10.1007/s10682-018-9939-2

Ortiz, D.A.; Hoskin, C.J.; Werneck, F.P.; Réjaud, A.; Manzi, S.; Ron, S.R.; Fouquet, A. Historical biogeography highlights the role of Miocene landscape changes on the diversification of a clade of Amazonian tree frogs. Org. Divers. Evol. 2022, 23, 395–414.

Réjaud A, Rodrigues MT, Crawford AJ, Castroviejo-Fisher S, Jaramillo AF, Chaparro JC, Glaw F, Gagliardi-Urrutia G, Moravec J, De la Riva IJ, Perez P, Lima AP, Werneck FP, Hrbek T, Ron SR, Ernst R, Kok PJR, Driskell A, Chave J, Fouquet A (2020) Historical biogeography identifies a possible role of Miocene wetlands in the diversification of the Amazonian rocket frogs (Aromobatidae: Allobates). Journal of Biogeography 47: 2472–2482. https://doi.org/10.1111/jbi.13937

Rojas RR, Fouquet A, Ron SR, Hernández-Ruz EJ, Melo-Sampaio PR, Chaparro JC, Vogt RC, de Carvalho VT, Pinheiro LC, Ávila RW, Farias IP, Gordo M, Hrbek T. 2018. A Pan-Amazonian species delimitation: high species diversity within the genus Amazophrynella (Anura: Bufonidae). PeerJ6: 1–56.

De Sá FP, Condez TH, Lyra ML, Haddad CFB, Malagoli LR (2022) Unveiling the

diversity of Giant Neotropical Torrent frogs (Hylodidae): phylogenetic relationships, morphology, and the description of two new species. Systematics and Biodiversity 20: 1–31. https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2039318

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution 38: 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Taucce PPG, Nascimento JS, Trevisan CC, Leite FSF, Santana DiJ, Haddad CFB, Napoli MF (2020) A New Rupicolous Species of the Pristimantis conspicillatus Group (Anura: Brachycephaloidea: Craugastoridae) from Central Bahia, Brazil. Journal of Herpetology 54: 245–257. https://doi.org/10.1670/19-114

Unha BIOAGC, Ampaio IRS, Arneiro JEC, Ogt RIC V (2021) A New Species of Amazon Freshwater Toad-Headed Turtle in the Genus Mesoclemmys (Testudines : Pleurodira : Chelidae) from Brazil. 20. https://doi.org/10.2744/CCB-1448.1

Vacher JP, Chave J, Ficetola FG, Sommeria-Klein G, Tao S, Thébaud C, Blanc M, Camacho A, Cassimiro J, Colston TJ, Dewynter M, Ernst R, Gaucher P, Gomes JO, Jairam R, Kok PJR, Lima JD, Martinez Q, Marty C, Noonan BP, Nunes PMS, Ouboter P, Recoder R, Rodrigues MT, Snyder A, Marques-Souza S, Fouquet A (2020) Large-scale DNA-based survey of frogs in Amazonia suggests a vast underestimation of species richness and endemism. Journal of Biogeography 47: 1781–1791. https://doi.org/10.1111/jbi.13847

Vences M, Thomas M, Van Der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in Zoology 2: 1–12. https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-5

Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 8267–8272. https://doi.org/10.1073/pnas.0810821106

Zhang W, Li F, Whiting-wagner N, Li Y (2019) Alternative treatments of genetic distances for species delimitation in Callosciurinae and Sciurinae (Rodentia : Sciuridae). Gene 702: 56–65. https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.048