



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

THAYNARA MENDES MACHADO

**VARIAÇÃO DO CHAMADO DE ANÚNCIO E COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO DA RÃ GLADIADORA, *Boana pardalis* (ANURA; HYLIDAE)**

**ADVERTISEMENT CALL VARIATION AND REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF
THE GLADIATOR FROG, *Boana pardalis* (ANURA; HYLIDAE)**

CAMPINAS

2023

THAYNARA MENDES MACHADO

VARIAÇÃO DO CHAMADO DE ANÚNCIO E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO
DA RÃ GLADIADORA, *Boana pardalis* (ANURA; HYLIDAE)

ADVERTISEMENT CALL VARIATION AND REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF THE
GLADIATOR FROG, *Boana pardalis* (ANURA; HYLIDAE)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Ecologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology of
the University of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master Ecology.

Orientador: PROF. DR. LUÍS FELIPE DE TOLEDO RAMOS PEREIRA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA THAYNARA MENDES MACHADO
E ORIENTADA PELO PROF. DR. LUÍS FELIPE DE
TOLEDO RAMOS PEREIRA.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M18v Machado, Thaynara Mendes, 1992-
Variação do canto de anúncio e comportamento reprodutivo da rã gladiadora, *Boana pardalis* (Anura; Hylidae) / Thaynara Mendes Machado. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anfíbio. 2. Animais - Sons. 3. Variação biológica individual. 4. Variação intraespecífica. 5. Seleção sexual em animais. I. Toledo, Luís Felipe, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Advertisement call variation and reproductive behavior of the gladiator frog, *Boana pardalis* (Anura; Hylidae)

Palavras-chave em inglês:

Amphibians

Animal sounds

Biological variation, Individual

Intraspecific variation

Sexual selection in animals

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestra em Ecologia

Banca examinadora:

Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira [Orientador]

Cynthia Peralta de Almeida Prado

Felipe Silva de Andrade

Data de defesa: 11-12-2023

Programa de Pós-Graduação: Ecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6626-7953>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8156852436840682>

Campinas, 11 de Dezembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Cyntia Peralta de Almeida Prado

Prof. Dr. Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

Dr. Felipe Silva de Andrade

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

**Dedico este trabalho aos alunos do ensino público
que sonham em ser cientistas.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luciana Mendes e Cesar Machado, pelo apoio, educação e exemplo que me deram como base para a vida, assim como à minha irmã, Caroline Mendes, por ter se tornado uma grande amiga, eu amo vocês de castelo.

Ao meu orientador, Professor Luís Felipe Toledo, agradeço por ter aceitado o meu pedido de orientação e por todos os ensinamentos que recebi ao longo desses dois anos.

Agradeço aos meus amigos de Campos, que, mesmo à distância, se mantiveram presentes, me apoiando sempre e lembrando de quem eu realmente sou, meu eterno agradecimento por vocês existirem.

Aos meus amigos do Herpeto em Foco, que me ensinam e motivam todos os dias, quando crescer quero ser igual a vocês.

Gostaria de agradecer à Estação Ecológica de Bananal e a todos os funcionários pelo suporte, que me permitiu realizar essa pesquisa, e por terem me acolhido como amiga e me dado força, sem vocês, não teria aguentado os 32 dias na estação.

Agradeço a todos que participaram da coleta de dados no campo comigo, como Camila Zornosa-Torres, Simone Dena, Mariana Pontes, Andres Carrasco, Joelma Prado, João Bovolon, Joice Ruggeri, Joyce Delprá, Julia Ernetti e, principalmente, ao meu amigo Diego Moura, que veio de Campos dos Goytacazes e me auxiliou quando outros colegas de trabalho estavam ocupados.

Gostaria de agradecer nominalmente algumas pessoas que estiveram comigo nesse processo e de certa forma marcaram esse trabalho e os últimos anos. Camila Zornosa-Torres, obrigada pela parceria nos momentos finais de campo, quando o cansaço estava extremo, e você chegou como uma salvação com seu humor e coração incrível. Simone Dena, obrigada pelos ensinamentos em bioacústica, por todo o acolhimento, amizade e confiança. Mariana Pontes, obrigada por ir me buscar e me ajudar em várias etapas durante o processo de escrita e análise de dados, assim como pelas terapias diárias no laboratório, pelo seu cuidado e preocupação. Andres Carrasco, pelo auxílio em campo, pela amizade eterna e por se tornar um irmão que dividiria comigo o último feijão, que venham muitos outros campos, risadas e espécies novas. Ao Guilherme Augusto Alves, agradeço por toda a assistência e paciência, que sei que tem que ter muita, mas que me auxiliou muito durante a redação deste trabalho, bem como as risadas e conversas. A Luisa Ribeiro, pela amizade e confiança que construímos mesmo em pouco tempo, sinceramente, me sinto privilegiada por ter conquistado isso. Ao Gabriel Ferreira, pelo auxílio nas análises e pelas conversas. A Julia de Oliveira, pelos abraços e companhia, e a Ubiratã Souza, que faz parte da minha vida antes mesmo do LaHNAB existir nela. Obrigada pela

amizade, pois quando cheguei na Unicamp, me senti deslocada e, muitas vezes, não conseguia imaginar construir amizades sólidas durante a pós-graduação, mas vocês mudaram completamente essa visão. Obrigada por estarem sempre presentes e por hoje ter a oportunidade de poder chamá-los de amigos.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia (IB, Unicamp), aos funcionários e professores pela estrutura oferecida.

À Fapesp, CNPq e pelo auxílio financeiro ao projeto, e aos membros da banca examinadora pela contribuição na melhoria do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.

(João Guimarães Rosa - Grande Sertão, p. 326)

RESUMO

Sinais acústicos desempenham um papel crucial na identificação de espécies, discriminação de indivíduos e atração de parceiros reprodutivos. Nesse contexto, este estudo concentrou-se em investigar a variação no canto de anúncio e no comportamento reprodutivo de uma população de *Boana pardalis*. Examinamos tanto a variação do canto dentro do indivíduo (intraindividual) quanto entre indivíduos (interindividual). A maioria dos parâmetros do canto exibiu níveis intermediários de variação dentro do indivíduo, enquanto na variação entre indivíduos classificamos a variação como dinâmica para características espectrais e temporais do canto. A variação nas propriedades do canto foi maior entre os indivíduos do que dentro de um mesmo indivíduo. Além disso, não encontramos nenhuma relação significativa entre os parâmetros espectrais e o tamanho corporal, exceto para o parâmetro temporal de pulsos por canto, que apresentou uma relação negativa significativa com o tamanho corporal dos machos. Observamos um comportamento facultativo de construção de ninhos na espécie, onde os machos se envolveram em um abraço axilar com as fêmeas firmemente agarradas usando seus espinhos pré-polex, o que resultou em cicatrizes no dorso e nas laterais das fêmeas. Este estudo contribui para aprimorar nossa compreensão da história natural de *B. pardalis* e levanta hipóteses adicionais que poderiam ser testadas com esta espécie ou outras rãs gladiadoras do gênero *Boana*.

Palavras chave: Anfíbios, variação acústica, intraindividual, interindividual, seleção sexual.

ABSTRACT

Acoustic signals play a crucial role in species identification, individual discrimination, and the attraction of reproductive mates. In this context, this study focused on investigating the variation advertisement call and reproductive behavior of one population of *Boana pardalis*. We examined both intra- and inter-individual advertisement call variation. Most call parameters exhibited intermediate levels of variation in the intra-individual variation, whereas in the inter-individual variation we classified the variation as dynamic for spectral and temporal call traits. The variation in call properties was greater between individuals than within an individual. Additionally, no significant relationship was found between spectral parameters and body size, except for the temporal parameter of pulses per call, which displayed a negative significant relationship with male body size. We observed a facultative nest-building behavior in the species, where males engaged in axillary amplexus with females tightly gripped by using their prepollex spines, leading to scars on the female's dorsum and flanks. This study contributes to enhance our understanding of the natural history of *B. pardalis* and raises additional hypotheses that could be tested with this or other gladiator frogs of the genus *Boana*.

Keywords: Amphibians, call variation, intra-individual, inter-individual, sexual selection.

SUMÁRIO

Introdução geral.....	12
Introduction.....	17
Methods	18
Study site and data sampling	18
Audio analyses	19
Natural history observations.....	19
Analyses	20
Results.....	21
Intra- and inter-individual call variation	21
Relationship between call properties and body size.....	21
Natural history observations.....	21
Discussion	22
Acknowledgements.....	25
References.....	26
Supplementary material	37
Conclusões gerais	41
Considerações finais.....	41
Referências	43
Anexos.....	46

Introdução geral

A comunicação animal é um processo fundamental para a transmissão de informações entre os indivíduos, ocorrendo entre um emissor e um receptor, por meio de sinais morfológicos e comportamentais especializados (Bradbury & Vehrencamps, 1998; Gerhardt & Huber, 2002). Desta maneira, a comunicação pode ocorrer de diferentes formas: visual, tátil, química, elétrica, acústica, entre outras (Augusto-Alves & Toledo, 2022; Pinheiro et al., 2022). Dentre as diversas formas de comunicação, a acústica é amplamente empregada pelos vertebrados, incluindo os anfíbios anuros - os sapos, pererecas e rãs, que são conhecidos por sua notável variedade de comportamentos relacionados à comunicação e reprodução (Köhler et al., 2017; Nunes-de-Almeida et al., 2021).

A comunicação acústica é utilizada especialmente durante a temporada reprodutiva (Wells & Schwartz, 2007), sendo classificadas em três grandes categorias: defensivas, emitidas como reação a uma possível ameaça ou investida de um predador; agressivas, utilizadas no contexto comportamental intraespecífico entre machos; e reprodutivas, emitidas como o principal mecanismo para atrair as fêmeas durante a estação reprodutiva (Toledo et al., 2015; Köhler et al., 2017).

Dentre os cantos reprodutivos, o canto de anúncio é o mais observado, e pode atuar como um forte mecanismo de isolamento reprodutivo pré-zigótico, sendo amplamente utilizados em estudos de taxonomia, auxiliando na delimitação das espécies (Guerra et al., 2017; Köhler et al., 2017). Além de atuarem como sinais específicos da espécie, essas vocalizações podem fornecer informações relevantes sobre o indivíduo emissor, tais como seu estado físico, condições energéticas e tamanho corporal (Gerhardt & Huber, 2002; Morais & Kwet, 2012).

Em sua maioria, as fêmeas são capazes de identificar os indivíduos e em alguns casos podem então avaliar a sua condição física com base nas características dos cantos (Joshi et al., 2019). A seleção de parceiros com cantos atrativos para as fêmeas aumenta as chances de sucesso reprodutivo desses machos e, consequentemente, a sobrevivência da prole, portanto está intimamente relacionada ao seu fitness (Wells & Schwartz, 2007). Além de atrair parceiras, os cantos de anúncio também desempenham um papel importante na competição entre machos, uma vez que, podem ser utilizados para atrair mais fêmeas e afastar rivais em disputas agressivas (Forti et al., 2022).

Köhler e colaboradores (2017) propuseram a padronização dos termos utilizados para a descrição do cantos dos anuros, definindo assim os parâmetros acústicos através de características do som, em parâmetros espectrais, como a frequência dominante – onde a maioria a energia sonora está concentrada; a largura da banda de frequência “*bandwidth*” – que

designa a gama total de frequências presentes no som emitido; os valores mínimos e máximos reais de frequência e os parâmetros temporais como, duração do canto; a quantidade de pulsos por canto, duração de um pulso – que corresponde ao número de pulsos repetidos em um período de tempo do canto.

Gerhardt em (1991), propôs um método para avaliar a tendência da variação dos parâmetros acústicos, levando em consideração o coeficiente de variação (CV) através da seguinte formula, $CV = (SD/média) \times 100$, sendo SD o desvio padrão que por sua vez é dividido pela média dos valores de cada parâmetro acústico, multiplicado por 100 para observar os valores em porcentagem.

Desta forma podemos interpretar que os parâmetros considerados estáticos (pouco variáveis) possuem valores de CV inferiores a 5 %, ao passo que parâmetros dinâmicos (altamente variáveis) possuem valores de CV acima de 12 % e valores intermediários, apresentam um CV que variam entre 5 % e 12 %. Os coeficientes de variação podem ser aplicados em nível intraindividual (within-individual, CVw) ou interindividual (between-individual, CVb) e a relação entre variação intraindividual e interindividual (CVw / CVb) é utilizada para testar se os indivíduos diferem uns dos outros pelos seus parâmetros acústicos (Bee et al., 2001).

Dados referentes a variação acústica são amplamente utilizados em diferentes áreas de estudo, como ecologia, variação genética, e para compreender comportamentos sociais e reprodutivos (Bastos et al., 2011; Nali et al., 2023). Os parâmetros mais variáveis, tais quais os parâmetros temporais, estão mais relacionados a fatores sociais e climáticos, como a fisiologia do indivíduo e a variação de sua temperatura corporal. Já os parâmetros mais estáveis, geralmente parâmetros espectrais, estão mais relacionados às características morfológicas como a massa da estrutura da laringe e comprimento das cordas vocais (Gerhardt, 1991; Gerhardt & Huber, 2002).

Desta maneira, o entendimento dos padrões de variação dos parâmetros acústicos pode trazer à luz informações sobre a fisiologia e morfologia, além de auxiliar no reconhecimento levando em conta a identidade individual ou populacional (Bee et al., 2001). Apesar de estudos descritivos e de história natural estarem aumentando nos últimos anos, muitas espécies ainda não possuem seus cantos descritos, e para espécies que a descrição do canto já existe, pouco se sabe sobre a variação dos parâmetros acústicos (Guerra et al., 2017; Forti et al., 2019).

Considerando que o Brasil é o país que apresenta a maior diversidade de espécies de anfíbios anuros no mundo, com mais de 1.188 espécies (Segalla et al., 2021), e que

apresentam um amplo repertório vocal e de comportamentos reprodutivos (Toledo et al., 2021). O aumento de estudos sobre a variação do canto dessas espécies se torna de essencial (Guerra et al., 2017).

Boana pardalis é uma das espécies que possui seu canto de anúncio descrito (Andrade et al., 2017), embora o canto seja conhecido, o nível de variação individual e populacional dos parâmetros acústicos ainda não é conhecida. Sendo esta uma espécie que pode ser especialmente interessante para se estudar as variações inter e intra individuais dos cantos por apresentar ampla distribuição na mata atlântica (Lutz, 1960; Bokerman, 1968; Andrade et al., 2017) e comportamento reprodutivo pouco estudado, apesar de algumas semelhanças no modo reprodutivo em comparação com a espécie *Boana faber* (Martins & Haddad, 1988).

Popularmente conhecida como "rã-gladiadora", *Boana pardalis* (Figura 1) pertence ao clado Cophomantini (Faivovich et al., 2005), que é caracterizado principalmente pela presença de espinhos pré-polex nos machos (Pinheiro et al., 2022). Esses espinhos são utilizados em combates físicos entre machos (Candaten et al., 2020), defesa contra predadores (Toledo et al., 2011) podendo ser utilizado também para a apreensão de fêmeas durante o amplexo (Noble, 1931; Pope, 1931; Lutz, 1960). O grupo *Boana faber*, ao qual *B. pardalis* pertence, apresenta comportamentos compartilhados entre as espécies (Faivovich et al., 2005), como a construção de ninhos de lama por machos (Martins & Haddad, 1988) e comportamento agressivo entre machos (Lutz, 1973). *B. pardalis* exibe um amplo repertório vocal, composto por três tipos descritos de vocalizações: cantos de anúncio, territorial e agonístico (Toledo & Haddad, 2009; Toledo et al., 2011; Andrade et al., 2017). Apesar de sabermos que *B. pardalis* também apresenta o comportamento de construção de ninhos (Lutz, 1960), havendo inclusive registro de desova em tanques de bromélias (Moura et al., 2011), existem lacunas no conhecimento específico em relação aos comportamentos reprodutivos da espécie (Pinheiro et al., 2022).



Figura 1. Indivíduo macho da espécie *Boana pardalis*.

Levando em consideração também as lacunas de conhecimento em relação as variações dos cantos em anuros (Guerra et al., 2017), especialmente de *B. pardalis*, apresentamos neste estudo a descrição e análise dos parâmetros acústicos em nível intraindividual e interindividual de uma população de *B. pardalis*, e relatamos também observações sobre o seu comportamento reprodutivo, colaborando para o conhecimento de sua história natural.

Advertisement call variation and reproductive behavior of the gladiator frog, *Boana pardalis* (Anura; Hylidae)

Thaynara Mendes Machado^{a,b} & Luís Felipe Toledo^a

^aLaboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento Biologia Animal, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

Introduction

Animal communication is defined as the transmission of information through the use of species-specific morphological or behavioral displays (signals) between an emitter and one or multiple receivers, which will influence the behavior of the receiver(s) (Bradbury & Vehrencamps, 1998; Gerhardt & Huber, 2002). Among the plethora of signal channels that animals can communicate, the acoustic one is widespread in animals and considered the most conspicuous in anurans (Wells & Schwartz, 2007; Augusto-Alves & Toledo, 2021). Anurans apply acoustic signaling in different behavioral contexts, for example, the advertisement call is the most used vocalization by male frogs to attract conspecific females (Toledo et al., 2015; Köhler et al., 2017; Nali et al., 2022). Calls allow specific receivers to access information about characteristics of the emitters, such as body size and physical conditions (Forester & Czarnecki, 1985; Ryan et al., 1990).

Therefore, the variation in the advertisement call between individuals can be interpreted by females in a sexual selection context (Wells & Schwartz, 2007) and also to evoke males to defend territories against intruders (Augusto-Alves et al., 2021). In addition, the call can vary both intra- and inter-individually (Gerhardt, 1991; Bee et al., 2001). Parameters of the calls that present less variation in their properties are considered static and are generally related to species recognition, such as the dominant frequency (Gerhardt, 1991; Guerra et al., 2017). Calls properties that show greater variation are considered dynamic and can imply in higher hormonal activity, as they are often associated with temporal parameters, such as call duration and number of calls and pulses per call (Guerra et al., 2017; Joshi et al., 2019).

The variation in call traits may be related to the degree of male-male competition (Endler, 1992). This is common ground among Cophomantini Hylidae treefrogs, which exhibit conspicuous aggressiveness (Candaten et al., 2020; Luría-Manzano et al., 2023). These species commonly engage in physical combats, fighting for calling or egg laying sites, where males generally use prepollex spines that injures the opponent (Candaten et al., 2020; Pinheiro et al., 2022). It is expected that in species where dominant morphs (larger individuals) use powerful weapons to access resources, subordinates (smaller individuals) should avoid potentially costly fights and, therefore, present lower levels of lesions (as scars) than the dominant ones (e.g., Siva-Jothy, 1987; Lailvaux et al., 2004; Moore et al., 2009). Surprisingly females can also suffer injuries during mating (e.g., Scott et al., 2005). In amphibians, females may be hurt during the amplexus (Noble, 1931; Lutz, 1960; Höbel, 2014), as male's spines can be used to grab females with more force (Pope, 1931), especially when females are disputed for males (Bruning et al., 2010).

One species that commonly engages in fights and that males have prominent spines is *Boana pardalis*, an Hylidae Cophomantini endemic to the Atlantic Forest in Brazil (Lutz, 1973). Three types of vocalizations have been described for *B. pardalis*: the advertisement, territorial and distress calls (Toledo & Haddad, 2009; Toledo et al., 2011; Andrade et al., 2017). The species reproduces in open areas and temporary ponds, laying eggs in small mud nests constructed by males, similar to *Boana faber* (Lutz, 1960; Martins & Haddad, 1988; Toledo et al., 2021). Alternatively, there are occasional observations of egg-laying inside bromeliads as well (Moura et al., 2011). Besides using the spines in male-male combats, *B. pardalis* also utilize them to grasp females during the amplexus (Lutz, 1960).

Despite being abundant and widely distributed in the Atlantic Forest (Bokermann, 1968) the acoustic attributes of intra- and inter-individual variation have not yet been explored for populations of *B. pardalis*, and little is known about their reproductive behavior. Considering these gaps, we aimed to: i) describe the advertisement call of a population of *B. pardalis* in Bananal, São Paulo State, ii) describe the intra- and inter-individual variation of the advertisement call, iii) evaluate injuries in males and females, iv) test the relationship of acoustic parameters with male's body size, and v) provide insights into the species natural history.

Methods

Study site and data sampling

We conducted the study in a temporary pond at the Estação Ecológica de Bananal in the state of São Paulo, southeastern Brazil (22°48'26.7"S, 44°22'20.1"W, 1.117 m). Bioacoustic data were collected on 10 December 2021, between 19:00 and 22:00. Additional observational fieldwork was conducted at the same site between 21 January 2022 and 19 February 2022, during which we took notes about the natural history. Individuals were observed in activity on just three nights. We sampled sexually mature males who were actively participating in a breeding chorus. Males were identified based on their call activity. We recorded the advertisement calls of *B. pardalis* males using a ZOOM H4n PRO digital recorder with its built-in microphones. The recordings were conducted at a distance of ~ 1 m from the focal male, lasting approximately 5 minutes, with in an average 7 calls per male. We set the sampling rate at 96 kHz and 16 bits of resolution. After recording, males were captured for measuring the snout-vent length (SVL) with a digital caliper (0.05 mm of precision). Lastly, the males were placed into individual plastic bags to prevent recaptures and were released at the same capture site at the end of the sampling night.

The audio files were deposited in the Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard (FNJV), Museu de Diversidade Biológica (MDBio), Unicamp (FNJV 50673; 50677–80; 50682; 50685; 50688–91; 50693; 50696). The study was approved by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio; SISBio #77947-1), ethics committee of Unicamp (CEUA #5755-1/2021), and registered in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGen #A01125F).

Audio analyses

Prior to analysis, all recordings were normalized (peak - 1dB) and converted to a sample rate of 44.1 kHz using Audacity software. Additionally, a low pass filtering process was applied to each recording, with a cut-off frequency of 0.5 kHz, to eliminate undesired low-pitched background noise. Subsequently, we analyzed the calls in Raven 1.6.1 PRO software (Center for Conservation Bioacoustics 2019), with the following configuration: 21 % contrast, 59 % brightness, and 1024 Discrete Fourier Transform (DFT). The calls were characterized based on the description of temporal, spectral, and quantitative properties: call duration, pulses per call, pulse rate, minimum frequency (frequency 5 % function in Raven), maximum frequency (frequency 95 % function in Raven), dominant frequency (peak frequency function in Raven), and frequency bandwidth (BW 90 % function in Raven). Spectral measurements were obtained using the spectrogram, while quantitative and temporal measurements were obtained using the oscillogram. We adhered to the note-centered concept and utilized the nomenclature proposed by Köhler et al. (2017). The results were presented as mean $\pm$ standard deviation, range interval, and sample size. The spectrogram and oscillogram representations of the *B. pardalis* advertisement call from Bananal were generated using the Seewave R package (Sueur et al., 2008).

Natural history observations

During the field sampling we conducted natural history observations of *B. pardalis* males and females, gathering information about their calling sites and reproductive behavior. Additionally, we analyzed *B. pardalis* individuals housed at Museu de Diversidade Biológica (MDBio), Unicamp, observing the presence of scars in the dorsal region of males and females (Table S1).

Analyses

Intra- and inter-individual call variation

We evaluated the patterns of intra-individual variability in the calls by calculating the coefficient of variation for the acoustic parameters (CV). It was calculated using the following formula: $CV = (SD/mean) \times 100$ for each individual. According to Gerhardt (1991) we classified the variation in a specific property as 'static' if the CV was less than 5 %. If the CV was equal to or greater than 12 %, we classified the properties of the calls as 'dynamic'. For cases where the CV were between greater than 5 % and less than 12 %, we classified the property of the call as 'intermediate'.

We calculated the intraindividual (CVw) and interindividual coefficients of variation (CVb) using the overall mean and standard deviation (SD). To assess the relative variability among males, we computed the ratio of inter- to intraindividual coefficients of variation (CVb/CVw). A CVb/CVw ratio greater than 1 indicated that a specific vocalization property had the potential to exhibit greater variability among individuals, making it a potential cue for individual recognition (Bee et al., 2001).

We also utilized the *SoundShape* R package (Rocha & Romano, 2021) to implement a geometric morphometric approach for comparing the acoustic space of individual calls. With this approach, we applied a 3D sampling grid to the spectrogram of four calls from each individual, extracting coordinates (semilandmarks) that represent the acoustic attributes and their spatial distribution. These coordinates were then used as input for a principal coordinate analysis (PCA), which condensed the acoustic information and facilitated comparison among different calls. All figures and analyses were performed using R software version 1.4.1106 (R Core Team, 2023).

Relationship between call properties and body size

Due to the lack of normality of our data, we fitted a generalized linear model (GLM) to evaluate the relation between the body size and call traits. To avoid multicollinearity among the acoustic data, we removed properties highly correlated, based on the Spearman correlation with $|r| > 0.7$ (Dormann et al., 2013). We removed pulse rate from our model due to its high collinearity with call duration. Additionally, we excluded minimum frequency and bandwidth from the model because of their collinearity with maximum frequency. Therefore, the four models were built, with call duration, pulses per call, dominant frequency, and maximum frequency as the response variables and SVL as predictor. Model was implemented using R software 1.4.1106 (R Core Team, 2023).

Results

Intra and inter-individual call variation

We analyzed 143 calls emitted by 13 males present during fieldwork. The advertisement call of *B. pardalis* consisted of a pulsed note with a mean duration of 0.13 seconds. The number of pulses per call ranged from 4 to 8, with a mean pulse rate of 19 ms. The mean dominant frequency was 0.62 kHz (Figure 1A). See Table 1 for all acoustic data values.

The CVw for call traits was found to be intermediate for five properties: call duration, pulses per call, pulse rate, dominant frequency, and minimum frequency. Dynamic CVw was observed for minimum frequency and 90 % bandwidth. None of the call properties were classified as static (Table 2). When considering the between-individual variation (CVb), all parameters were dynamic (Table 2). The CVB/CVW ratio was above 1.0 for all acoustic parameters analyzed, with between-individual variation being 1.66 to 3.66 times higher than within-individual variation (Table 2).

The principal component analysis (PCA) allowed us to visualize the variation of acoustic attributes along a reduced number of axes. The positions of the coordinates were obtained from the 3D spectrogram (Figure 1BC) and summarized in a PCA plot. The ordination plot captured 37.6 % of the total spatial acoustic variation in the first two PCA axes, resulting in a high overlap of the acoustic space used by the individuals (Figure 1D).

Relationship between call properties and body size

Only pulse per call was positively associated with body size (SVL), with a *p* value of 0.026 (Figure 2; Table S2). No association was observed between other analyzed acoustic properties and SVL (Table S2).

Natural history observations

Boana pardalis males were observed calling in different microhabitats of the temporary pond. On the night when we recorded the males, all individuals in the chorus were calling from the ground near the pond margin, occupying small concavities in the soil. Such concavities had different levels of water (Figures 3A and 3B). However, during the other nights of observation, we observed two males (which were not recorded) emitting advertisement calls in bush leaves at an approximate 60 cm above the ground (Figure 3C).

We observed two pairs in amplexus on 12 February 2022, between 20:00 and 21:00, both were on the ground, and far from any clay nest. In both cases, the amplexant males were holding the females at the axillar region, i.e., axillary amplexus. Upon collecting these pairs, we observed that the males were gripping the females with their prepollex spines, which resulted in scratches along the females' dorsal region and flanks. Furthermore, we examined 34 preserved individuals (30 males and 4 females), and scars were observed in 62 % (21 individuals) of them, 63 % of the males (19 males; Figure 4A) and 50 % (2 females; Figure 4B) of the females (Table S1).

Discussion

The advertisement call of *B. pardalis* population from Bananal is similar to that described for four other populations (Andrade et al., 2017), overlapping in the range of all call properties. The intra-individual variation showed intermediate levels for most parameters, contrary to what was reported for *Boana versicolor*, *Boana cinerea* (Gerhardt, 1991), and *Boana goiana* (Andreani et al., 2021), which exhibit extreme variation values (static or dynamic). The intermediate variation may be related to female preferences for values close to the population mean to avoid heterospecific amplexus (Ryan et al., 1990; Gerhardt, 1991). However, the maximum frequency and 90 % bandwidth were classified as dynamic traits, indicating directional selection as females tend to prefer extreme values (Reichert & Gerhardt, 2013; Andreani et al., 2021).

Boana pardalis males exhibited greater acoustic variation among individuals than within individuals, as the inter-individual parameters analyzed showed dynamic and values greater than 1, which may indicate genetic, morphophysiological, and/or sexual selection-driven variation (Morais & Kwet, 2012). Thus, the pattern observed in the present study reinforces that individual recognition in anurans occurs through a set of different acoustic parameters (Bee et al., 2001; Guerra et al., 2017). A long-term study may yield different results, as observed in calls of anuran species where populations were analyzed over the years, such as *B. goiana* (Andreani et al., 2021) and *Scinax constrictus* (Gambale et al., 2014), where the type of variation in call properties changed throughout the years.

There is a negative relationship between dominant frequency and body size, known as acoustic allometry (Gingras et al., 2013; Tonini et al., 2020; Augusto-Alves et al., 2021). Although there are a few exceptions to this pattern (Tonini et al., 2020) no significant relationship was observed between spectral parameters and SVL in *B. pardalis*. However, a relationship was found between the temporal parameter of pulses per call and body size in

males, similar to findings in *Bokermannohyla ibiiguara* (Nali et al., 2022). This parameter may be accentuated during courtship rituals and play a pivotal role in female mate choice (Joshi et al., 2019), as it indicates male energy reserves (Wells & Taigen, 1986). Conversely, larger body size in males does not necessarily confer greater attractiveness to females (Halliday & Tejedo, 1995). In species with high male-male competition, where aggressive encounters are frequent, the difference in body size between males and females becomes insignificant (Luría-Manzano et al., 2023), which might be the case for *B. pardalis*, given the observed high proportion of males with scratches. Additionally, sexual dimorphism in body size can affect the males grip strength on females, making it easier for larger competing males to displace smaller males from the amplexus (Bruning et al., 2010).

Anurans exhibit one of the greatest diversity in reproductive modes among vertebrates (Nunes-de-Almeida et al., 2021) and ecological and population structure factors such as desiccation in temporary ponds, availability of moist microhabitats in terrestrial environments, and predation, are the main selective forces that shape most reproductive modes (Carvajal-Castro et al., 2020). In the monophyletic group of *Boana faber*, composed of *B. pardalis* and five other species, they generally exhibit different behaviors related to nest construction and calling sites (Faivovich et al., 2005).

However, one of these species, *Boana crepitans*, presents a facultative nest construction, and throughout the reproductive period it can differentiate, shaped by environmental factors, such as drought and low temperatures (Caldwell, 1992; Nascimento et al., 2015), as observed for *B. pardalis*, where males build nests for spawning (Lutz, 1960) or spawn in bromeliad tanks (Moura et al., 2011). In the present study, we observed males of *B. pardalis* vocalizing in different locations and two couples in amplexus in an open area with a thin layer of water on the ground, away from apparent nests, similarly as reported before (Andrade et al., 2017). We suggest that similar to *B. crepitans*, *B. pardalis* presents a facultative behavior of nest construction and that they approach the females and spawn independently of nests.

Inguinal amplexus is considered the ancestral condition for anurans, while axillary amplexus is considered a derived state (Duellman & Trueb, 1986; Wells & Schwartz, 2007; Pough et al., 2016). Axillary amplexus is widely observed in Hylidae frogs in approximately 540 species (Candaten et al., 2020), representing an intermediate form that was later diversified into other types of amplexus (Lutz, 1960; Andrade et al., 2017; Carvajal-Castro et al., 2020). Studies have documented the use of prepollex spikes in male-male combat (Martins & Haddad, 1988), although they are also associated with amplexus (Noble, 1931; Pope, 1931; Lutz, 1960).

Amplectant males benefit from tightly gripping the female, and axillary amplexus is particularly effective in achieving this (Carvajal-Castro et al., 2020).

Females ability to choose a specific mate can be limited by male behaviors, including forced copulations, such as observed for sharks (Ritter & Amin, 2019), fishes (Morris et al., 2008) and mammals (Scott et al., 2005). Nonetheless, females may possess the ability to influence male-male competition and alter their mating outcomes by inflating their bodies, making it more challenging for males to grasp them (Bruning et al., 2010). In species with prepollex spines, which exhibit axillary amplexus (Carvajal-Castro et al., 2020), injuries such as scratches on the females back or flanks can occur and may even lead them to death (Lutz, 1960). In this context, we hypothesize that *B. pardalis* females do not have the freedom to choose reproductive partners based on parameters of the advertisement call, size, or nests, because instead, males attract females through advertisement calls, and subsequently grab them strongly attaching with the aid of spines. Additional observations similar to what we report for *B. pardalis*, as those for *Boana rosenbergi* (Höbel, 2014), where the proportion of frogs with scars did not differ significantly between the male and female, corroborate this hypothesis. Confirmatory studies describing the courtship behavior, amplexus, and nest construction are required to further explore this suggestion. The information presented in this study contributes to understanding of the natural history of *B. pardalis* and underscores the importance of research on the natural history of abundant and understudied.

Acknowledgements

We thank Estação Ecológica de Bananal and its staff, T. Filete, L. Cabral, R. Da-Silva, D. Silva, P. Guimarães, R. Valente, W. Pereira, C. Da-Silva, T. Souza, L. Maia, and R. Nascimento, for their field support. We are also thank D. Moura, C. Zornosa-Torres, S. Dena, M. Pontes, A. Carrasco, J. Prado, J. Bovolon, J. Ruggeri, J. Delprá, and J. Ernetti, for their assistance during fieldwork; and M. Pontes and G. Augusto-Alves for assistance in preparing the manuscript. T.M.M. thanks the Programa de Pós-Graduação em Ecologia (IB, Unicamp) for their support, T.M.M. and L.F.T. thanks São Paulo Research Foundation (FAPESP #2016/25358-3; #2019/18335-5), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq #302834/2020-6), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES- Finance Code 001) for their grants and fellowships.

References

- Andrade, F. S., Carvalho, T. R., Martins, L. B., & Giaretta, A. A. (2017). Reassessment of the vocal repertoire of a nest-building gladiator frog, *Boana pardalis* (Anura, Hylidae, Cophomantinae): implications for its diagnosis within the *B. faber* species group. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(2), 157–167.
- Andreani, T. L., Bastos, R. P., Dias, T. M., Prado, C. P. A., & Morais, A. R. (2021). Acoustic variability among male gladiator frogs, *Boana goiana* (Lutz, 1968) (Anura: Hylidae): An 18-year analysis across several reproductive seasons. *Amphibia Reptilia*, 42, 43–57.
- Augusto-Alves, G., Dena, S., & Toledo, L. F. (2021). Acoustic allometry, background stream noise and its relationship with large-bodied and voiceless rheophilic frogs. *Zoologischer Anzeiger*, 295, 156–162.
- Augusto-Alves, G., & Toledo, L. F. (2022). Communication across multiple sensory modes: quantifying the rich behavioural repertoire of a Neotropical torrent frog. *Behaviour*, 159(3–4), 351–375.
- Bee, M. A., Kozich, C. E., Blackwell, K. J., & Carl Gerhardt, H. (2001). Individual variation in advertisement calls of territorial male green frogs, *Rana clamitans*: Implications for individual discrimination. *Ethology*, 107(1), 65–84.
- Bokermann. (1968). Observações sobre *Hyla pardalis* Spix (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira Biologia*, 1(28), 1–5.
- Bradbury, J. W., & Vehrencamps, S. L. (1998). *Principles of animal communication* Sinauer Associates (Vol. 132). Sinauer Associates.
- Bruning, B., Phillips, B. L., & Shine, R. (2010). Turgid female toads give males the slip: A new mechanism of female mate choice in the anura. *Biology Letters*, 6(3), 322–324.
- Caldwell, J. P. (1992). Diversity of reproductive modes in anurans: facultative nest construction in gladiator frogs. In *Reproductive Biology of South American Vertebrates* (pp. 85–97).
- Candaten, A., Possenti, A. G., Mainardi, Á. A., da Rocha, M. C., & Palaoro, A. V. (2020). Fighting scars: heavier gladiator frogs bear more injuries than lighter frogs. *Acta Ethologica*, 23(1), 39–44.
- Carvajal-Castro, J. D., López-Aguirre, Y., Ospina-L, A. M., Santos, J. C., Rojas, B., & Vargas-Salinas, F. (2020). Much more than a clasp: evolutionary patterns of amplexus diversity in anurans. *Biological Journal of the Linnean Society*, 129(3), 652–663.
- Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., Marquéz, J. R. G., Gruber, B., Lafourcade, B., Leitão, P. J., Münkemüller, T., Mcclean, C., Osborne, P. E.,

- Reineking, B., Schröder, B., Skidmore, A. K., Zurell, D., & Lautenbach, S. (2013). Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, 36(1), 27–46.
- Duellman, W. E., & Trueb, J. (1986). Biology of amphibians. In *The Johns Hopkins University Press*. The John Hopkins University Press.
- Endler, J. A. (1992). Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist*, 139, 125–153.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–227.
- Forester, D. C., & Czarnowsky, R. (1985). Sexual Selection in the Spring Peeper, *Hyla crucifer* (Amphibia, Anura): Role of the Advertisement Call. *Behaviour*, 92(1), 112–128.
- Gambale, P. G., Signorelli, L., & Bastos, R. P. (2014). Individual variation in the advertisement calls of a Neotropical treefrog (*Scinax constrictus*). *Amphibia Reptilia*, 35(3), 271–281.
- Gerhardt H. C. (1991). Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Anim. Behav*, 42(4), 615–635.
- Gerhardt, H. C., & Huber, F. (2002). *Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions*. University of Chicago Press.
- Gingras, B., Mohandesan, E., Boko, D., & Fitch, W. T. (2013). Phylogenetic signal in the acoustic parameters of the advertisement calls of four clades of anurans. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1).
- Guerra, V., de Moraes, A. R., Gambale, P. G., Oda, F. H., & Bastos, R. P. (2017). Variation of the advertisement call of *Physalaemus centralis* Bokermann, 1962 (Anura: Leptodactylidae) in the Cerrado of central Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(2), 103–111.
- Halliday, T., & Tejedo, M. (1995). Intersexual selection and alternative mating behaviour. In Heatwole H & Sullivan B (Eds.), *Amphibian biology* (Social behaviour., Vol. 2, pp. 419–468). Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons.
- Höbel, G. (2014). Reproductive Ecology of *Hyla rosenbergi* in Costa Rica. *Herpetologica*, 446–454.
- Joshi, A. M., Narayan, E. J., & Gramapurohit, N. P. (2019). Vocalisation and its association with androgens and corticosterone in a night frog (*Nyctibatrachus humayuni*) with unique breeding behaviour. *Ethology*, 125(11), 774–784.

- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C. F. B., Rödel, M. O., & Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1), 1–124.
- Lailvaux, S. P., Herrel, A., VanHooydonck, B., Meyers, J. J., & Irschick, D. J. (2004). Performance capacity, fighting tactics and the evolution of life-stage male morphs in the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1556), 2501–2508.
- Luría-Manzano, R., Pinheiro, P. D. P., Kohlsdorf, T., Haddad, C. F., & Martins, M. (2023). Evolution of territoriality in Hylineae treefrogs: Ecological and morphological correlates and lineage diversification. *Journal of Evolutionary Biology*.
- Lutz, B. (1960). The clay nests of *Hyla pardalis* Spix. In *Copeia* (4th ed., Vol. 4).
- Lutz, B. (1973). *Brazilian species of Hyla* (1st ed.). University of Texas Press.
- Martins, M., & Haddad, C. F. (1988). Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). *Amphibia Reptilia*, 9(1), 49–60.
- Moore, J. C., Obbard, D. J., Reuter, C., West, S. A., & Cook, J. M. (2009). Male morphology and dishonest signalling in a fig wasp. *Animal Behaviour*, 78(1), 147–153.
- Morais, A., & Kwet, A. (2012). Description of the advertisement call of *Physalaemus lisei* (Anura: Leiuperidae). *Salamandra*, 48(4), 227–229.
- Morris, M. R., Rios-Cardenas, O., & Darrah, A. (2008). Male mating tactics in the northern mountain swordtail fish (*Xiphophorus nezahualcoyotl*): Coaxing and coercing females to mate. *Ethology*, 114(10), 977–988.
- Moura, M. R., Motta, A. P., & Feio, R. N. (2011). An unusual reproductive mode in *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Zoologia*, 28(1), 142–144.
- Nali, R. C., Turin, R. A., & Prado, C. P. (2022). The courtship call of *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura: Hylidae) and details of its mating behavior. *Caldasia*, 44(2), 317–324.
- Nascimento, A. P. B., Almeida, A., Lantyer-Silva, A. S. F., & Zina, J. (2015). Biologia reprodutiva de *Hypsiboas crepitans* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 271–291.
- Noble, G. K. (1931). *The biology of the amphibia*. McGraw-Hill.
- Nunes-de-Almeida, C. H. L., Haddad, C. F., & Toledo, L. F. (2021). A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*, 57(3), 413–427.

- Pinheiro, D. P., Blotto, B. L., Ron, S. R., Stanley, E. L., Garcia, P. C., Haddad, C. F., Grant, T., & Faivovich, J. (2022). Prepollex diversity and evolution in Cophomantini (Anura: Hylidae: Hylinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 195, 995–1021.
- Pope, C. H. (1931). Notes on amphibians from Fukien, Hainan, and other parts of China. In *Bulletin American Museum of Natural History* (Vol. 109, pp. 499–500).
- Pough, F. H., Andrews, R. M., Savitzky, A. H., Wells, K. D., & Brandley, M. C. (2016). *Herpetology*. Sunderland, MA.
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Reichert, M. S., & Gerhardt, H. C. (2013). Gray tree frogs, *Hyla versicolor*, give lower-frequency aggressive calls in more escalated contests. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(5), 795–804.
- Ritter, E. K., & Amin, R. W. (2019). Mating scars among sharks: evidence of coercive mating? *Acta Ethologica*, 22(1), 9–16.
- Rocha, P. C., & Romano, P. S. R. (2021). The shape of sound: A new R package that crosses the bridge between bioacoustics and geometric morphometrics. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(6), 1115–1121.
- Ryan, M. J., Cocroft, R. B., & Wilczynski, W. (1990). The role of environmental selection in intraspecific divergence of mate recognition signals in the Cricket Frog, *Acris crepitans*. *Evolution*, 44(7), 1869–1872.
- Scott, E. M., Mann, J., Watson-Capps, J. J., & Sargeant, B. L. (2005). Brill aggression in *Bottlenose dolphins*: evidence for sexual coercion, male-male competition, and female tolerance through analysis of tooth-rake marks. *Behaviour*, 142(1), 21–44.
- Siva-Jothy, M. T. (1987). mate securing tactics and the cost of fighting in the japanese horned beetle, *Allorhyina dichotoma* (Scarabaeidae). *Journal of Ethology*, 5, 165–172.
- Sueur, J., Aubin, T., & Simonis, C. (2008). Equipment review: Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. In *Bioacoustics* (Vol. 18, Issue 2, pp. 213–226).
- Toledo, L. F., Dena, S., Segalla, M., Prado, C. P. A., Loebmann, D., Gasparini, J. L., Sazima, I., & Haddad, C. F. (2021). Anfíbios da Mata Atlântica. In *Econature, consultoria, pesquisa e educação Ambiental: Vol. 1.0.1* (1.0.1). Econature, Consultoria.
- Toledo, L. F., Martins, I. A., Bruschi, D. P., Passos, M. A., Alexandre, C., & Haddad, C. F. (2015). The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethologica*, 18(2), 87–99.

- Tonini, J. F. R., Provete, D. B., Maciel, N. M., Morais, A. R., Goutte, S., Toledo, L. F., & Pyron, R. A. (2020). Allometric escape from acoustic constraints is rare for frog calls. *Ecology and Evolution*, 10(8), 3686–3695.
- Wells, K. D., & Schwartz, J. J. (2007). The behavioral ecology of anuran communication. In Peter M. Narins, Albert S. Feng, Richard R. Fay, & Arthur N. Popper (Eds.), *Hearing and sound communication in amphibians*. (pp. 44–46). Springer Verlag.
- Wells, K. D., & Taigen, T. L. (1986). The effect of social interactions on calling energetics in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19, 9–18.

Table 1. Spectral and temporal data of the advertisement calls of *Boana pardalis* recorded in different municipalities of Brazilian states (SP = São Paulo; MG = Minas Gerais; RJ = Rio de Janeiro). Values presented as mean $\pm$ SD (range; sample size). Data from Bananal is from the present study and that of the other sites were extracted from Andrade et al., (2017).

Call properties	Bananal, SP n = 13 (143)	Salesópolis, SP n = 3 (43)	Cunha, SP n = 1 (20)	Chiador, MG n = 2 (25)	Duas Barras, RJ n = 2 (30)
Call duration (s)	0.13 $\pm$ 0.02 (0.09 – 0.18)	0.11 $\pm$ 0.006 (0.09-0.14)	0.156 (0.12- 0.19)	0.153 $\pm$ 0.008 (0.141 – 0.174)	0.138 $\pm$ 0.004 (0.122 – 0.006)
Dominant frequency (kHz)	0.62 $\pm$ 0.15 (0.47 – 1.12)	0.63 $\pm$ 0.02 (0.61 – 0.66)	0.72 (0.66 – 1.55)	0.95 $\pm$ 0.30 (0.70 – 1.22)	1.04 $\pm$ 0.12 (0.66 – 1.31)
Minimum frequency (kHz)	0.45 $\pm$ 0.04 (0.37 – 0.47)	0.38 $\pm$ 0.01 (0.37 – 0.47)	0.47 (0.47 – 0.51)	0.48 $\pm$ 0.01 (0.41 – 0.51)	0.46 $\pm$ 0.01 (0.42 – 0.51)
Maximum frequency (kHz)	1.22 $\pm$ 0.16 (0.94 – 1.69)	1.28 $\pm$ 0.10 (1.08 – 1.59)	1.74 (1.68 – 2.01)	1.61 $\pm$ 0.01 (1.55 – 1.64)	1.48 $\pm$ 0.25 (0.02 – 0.02)
Bandwidth 90 % (kHz)	0.80 $\pm$ 0.14 (0.56 – 1.22)	-	-	-	-
Pulse rate (s)	0.019 $\pm$ 0.005 (0.005 – 0.04)	-	-	-	-
Pulses per call	6.5 $\pm$ 0.6 (4 – 8)	6.8 $\pm$ 0.7 (6 – 8)	6.6 (6 – 8)	7.8 $\pm$ 0.2 (7 – 9)	8.0 $\pm$ 0.0 (7 – 9)

Table 2. Within-individual (CVW) and between-individual (CVB) coefficients of variation, CVB/CVW ratios of 13 individuals of *Boana pardalis* recorded at Estação Ecológica de Bananal in the state of São Paulo, southeastern Brazil. Call properties are in parentheses: D = dynamic and I = intermediate.

Call property	Intra (CVw)	Inter (CVb)	CVb/CVw
Call duration (s)	10.98 (I)	24.44 (D)	2.22
Dominant frequency (kHz)	10.82 (I)	25.47 (D)	2.35
Minimum frequency (kHz)	6.42 (I)	18.84 (D)	2.93
Maximum frequency (kHz)	12.65 (D)	24.64 (D)	1.94
Bandwidth 90 % (kHz)	16.94 (D)	28.21 (D)	1.66
Pulses per call	6.73 (I)	21.91 (D)	3.25
Pulse rate (s)	8.92 (I)	32.65 (D)	3.66

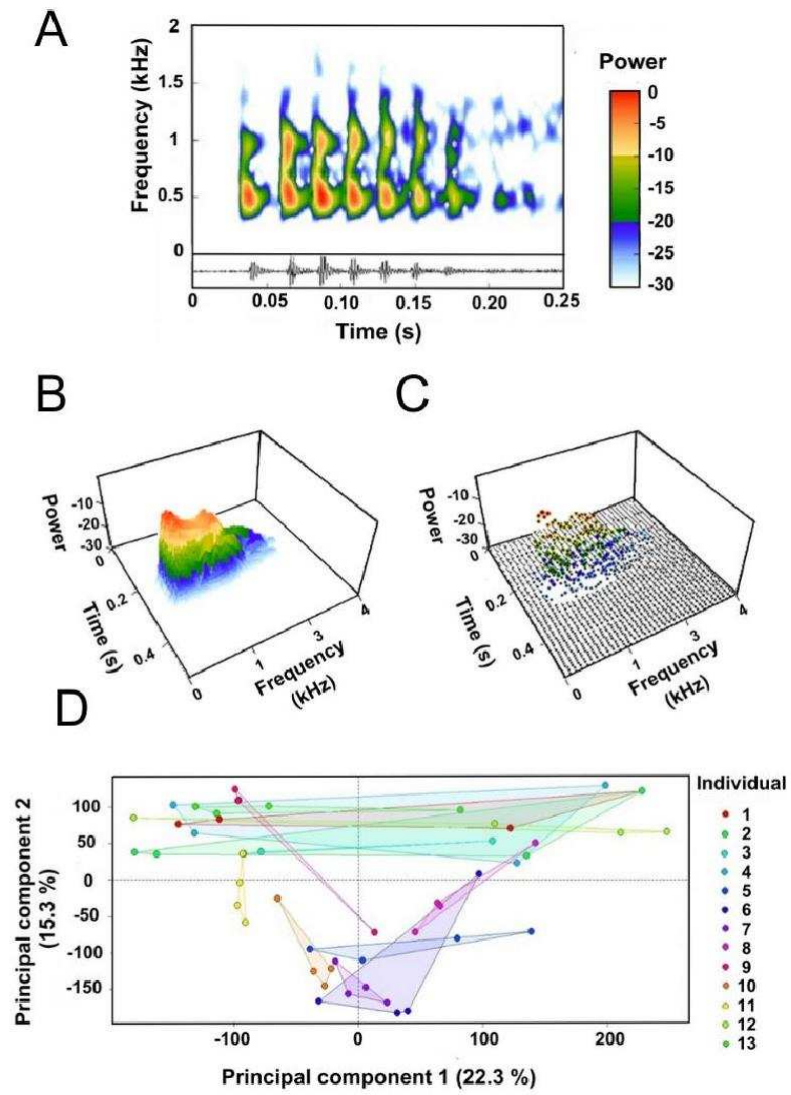


Figure 1. Spectrogram and oscillogram (A), 3D spectrogram (B), 3D semilandmarks (C), and projection of four calls of 13 individuals of *Boana pardalis* calls on the PCA ordination axes, each point represents a sampled call (D).

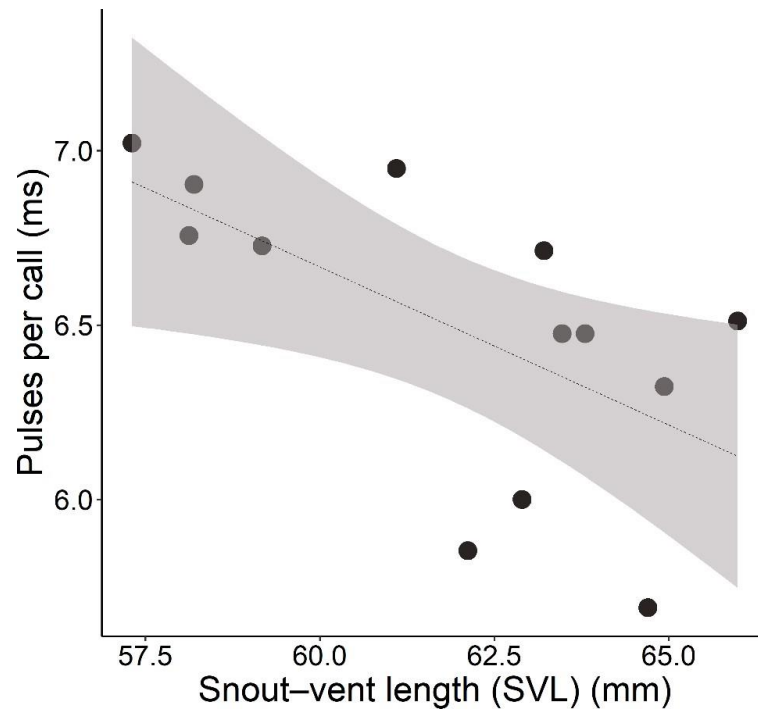


Figure 2. Relationship between pulses per call (ms) and snout-vent length (SVL) in males of *Boana pardalis*, with a 95% confidence interval.



Figure 3. Males of *Boana pardalis* were recorded emitting vocalizations in different microhabitats: concavities in the soil with water (A), water wet soil without concavity (B), and on top of bush leaves, 60 cm above the ground (C).

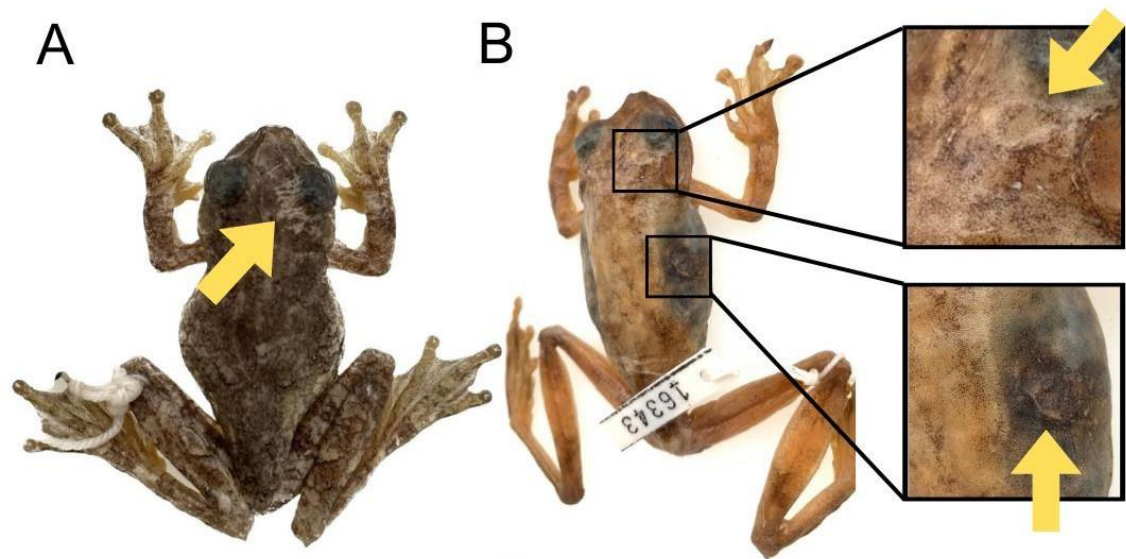


Figure 4. Museum specimens, an adult male (A) and an adult female (B) of *Boana pardalis*. The arrows indicate the scars of male's spine scratches.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Advertisement call variation and reproductive behavior of the gladiator frog, *Boana pardalis* (Anura; Hylidae)

Thaynara Mendes Machado^{a,b} & Luís Felipe Toledo^a

^a *Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970.*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970.*

Table S1. Museum voucher number, sex, and presence of spine scars in adult individuals of *Boana pardalis* deposited in Museu de Diversidade Biológica (MDBio).

MDBio number	Sex	Scars
ZUEC-AMP 2185	Male	Present
ZUEC-AMP 3624	Male	Absent
ZUEC-AMP 3625	Male	present
ZUEC-AMP 6050	Male	Absent
ZUEC-AMP 6152	Male	Present
ZUEC-AMP 6153	Male	Present
ZUEC-AMP 6496	Male	Present
ZUEC-AMP 6576	Male	Absent
ZUEC-AMP 6617	Male	Present
ZUEC-AMP 16140	Male	Absent
ZUEC-AMP 16342	Female	Present
ZUEC-AMP 16343	Female	Present
ZUEC-AMP 18274	Male	Present
ZUEC-AMP 18639	Male	Present
ZUEC-AMP 19468	Male	Absent
ZUEC-AMP 20191	Male	Present
ZUEC-AMP 20871	Male	Absent
ZUEC-AMP 20896	Male	Absent
ZUEC-AMP 22872	Male	Present
ZUEC-AMP 22873	Male	Absent
ZUEC-AMP 23481	Female	Absent
ZUEC-AMP 23594	Male	Absent
ZUEC-AMP 23595	Male	Present
ZUEC-AMP 23622	Female	Absent
ZUEC-AMP 24116	Male	Present
ZUEC-AMP 24346	Male	Present
ZUEC-AMP 24347	Male	Present
ZUEC-AMP 24348	Male	Absent
ZUEC-AMP 24349	Male	Present
ZUEC-AMP 24350	Male	Present
ZUEC-AMP 24359	Male	Absent
ZUEC-AMP 24372	Male	Present
ZUEC-AMP 24373	Male	Present

ZUEC-AMP 24562	Male	Present
----------------	------	---------

Table S2. Estimates of the Generalized Linear Model (GLM) showing the effect of Snout-vent length (SVL) on call duration, pulses per call, dominant frequency, and maximum frequency of *Boana pardalis*. Bold numbers are the significant values of p .

Response variable	α	SE	t	P
Pulses per call	0.002	0.001	2.562	0.026
Call duration	0.099	0.096	1.038	0.322
Maximum frequency	0.000	0.000	-0.192	0.851
Dominant frequency	0.000	0.000	0.455	0.658

Conclusões gerais

Análises sobre o canto de anúncio e o comportamento reprodutivo de *Boana pardalis* foram apresentadas neste estudo, com o propósito de descrever a chamada de anúncio da população de Bananal, São Paulo; avaliar a variação intraindividual e interindividual do canto; e, testar a relação dos parâmetros acústicos com o tamanho corporal dos machos. Além disso, foram fornecidas informações relevantes sobre a história natural dessa espécie.

Em relação aos resultados obtidos:

- O canto de anúncio de *B. pardalis* de Bananal é similar ao canto de outros indivíduos de diferentes populações;
- A variação nos parâmetros acústico em nível intraindividual e interindividual nos parâmetros acústicos foram evidentes e em sua maioria comportaram-se de forma de dinâmica;
- Houve uma relação negativa significativa entre o número de pulsos por chamada e o tamanho corporal dos machos;
- Especulamos através de observações em campo novidades em relação ao comportamento reprodutivo da espécie, onde machos apresentaram comportamento facultativo de construção de ninho e sítios de canto, pois os machos emitiam cantos de anúncio em diferentes locais no sítio reprodutivo, e casais foram observados em amplexo distante de ninhos de lama;
- Machos também apresentaram amplexo axilar agarrando-se nas fêmeas com o auxílio dos espinhos pré plex, levando a cicatrizes nas costas e laterais das fêmeas;
- Indivíduos machos e fêmeas depositados em coleções biológicas também foram observados com cicatrizes no dorso.

Considerações finais

Os principais achados do presente estudo estão relacionados às variações intra e interindividuais dos parâmetros acústicos e suas implicações para a seleção sexual, contribuindo assim para uma maior compreensão da história natural de *B. pardalis*, além de gerar hipóteses adicionais que poderão ser relevantes não apenas para o entendimento específico dessa espécie, mas também para o conhecimento mais amplo sobre a ecologia e

comportamento das rãs gladiadoras do gênero *Boana*. A pesquisa também destacou a importância da investigação em espécies de anuros abundantes e pouco estudadas, como é o caso de *B. pardalis*.

Referências bibliográficas gerias

- Andrade, F. S., Carvalho, T. R., Martins, L. B., & Giaretta, A. A. (2017). Reassessment of the vocal repertoire of a nest-building gladiator frog, *Boana pardalis* (Anura, Hylidae, Cophomantinae): implications for its diagnosis within the *B. faber* species group. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(2), 157–167.
- Augusto-Alves, G., & Toledo, L. F. (2022). Communication across multiple sensory modes: quantifying the rich behavioural repertoire of a Neotropical torrent frog. *Behaviour*, 159(3–4), 351–375.
- Bastos, R. P., Signorelli, L., Morais, A. R., Costa, T. B., Lima, L. P., & Pombal, J. P. (2011). Advertisement calls of three anuran species (Amphibia) from the Cerrado, Central Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6(2), 67-72.02
- Bee, M. A., Kozich, C. E., Blackwell, K. J., & Carl Gerhardt, H. (2001). Individual variation in advertisement calls of territorial male green frogs, *Rana clamitans*: Implications for individual discrimination. *Ethology*, 107(1), 65–84.
- Bradbury, J. W., & Vehrencamps, S. L. (1998). *Principles of animal communication Sinauer Associates* (Vol. 132). Sinauer Associates.
- Candaten, A., Possenti, A. G., Mainardi, Á. A., da Rocha, M. C., & Palaoro, A. V. (2020). Fighting scars: heavier gladiator frogs bear more injuries than lighter frogs. *Acta Ethologica*, 23(1), 39–44.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–227.
- Forti, L. R., de Melo, S. M. R., Pires, C. R., Szabo, J. K., & Toledo, L. F. (2022). Torrent frogs emit acoustic signals of a narrower spectral range in habitats with longer-lasting biotic background noise. *Behavioural Processes*, 200.
- Forti, L. R., Haddad, C. F., Leite, F., Drummond, L. D. O., De Assis, C., Crivellari, L. B., Mello, C. M., Garcia, P. C. A., Zornosa-Torres, C., & Toledo, L. F. (2019). Notes on vocalizations of Brazilian amphibians IV: Advertisement calls of 20 Atlantic Forest frog species. *PeerJ*, 2019(9).
- Gerhardt H. C. (1991). Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Anim. Behav*, 42(4), 615–635.
- Gerhardt, H. C., & Huber, F. (2002). *Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions*. University of Chicago Press.

- Guerra, V., de Morais, A. R., Gambale, P. G., Oda, F. H., & Bastos, R. P. (2017). Variation of the advertisement call of *Physalaemus centralis* Bokermann, 1962 (Anura: Leptodactylidae) in the Cerrado of central Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(2), 103–111.
- Joshi, A. M., Narayan, E. J., & Gramapurohit, N. P. (2019). Vocalisation and its association with androgens and corticosterone in a night frog (*Nyctibatrachus humayuni*) with unique breeding behaviour. *Ethology*, 125(11), 774–784.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P. J. R., Toledo, L. F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C. F. B., Rödel, M. O., & Vences, M. (2017). The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1), 1–124.
- Lutz, B. (1960). The clay nests of *Hyla pardalis* Spix. In *Copeia* (4th ed., Vol. 4).
- Lutz, B. (1973). *Brazilian species of Hyla* (1st ed.). University of Texas Press.
- Martins, M., & Haddad, C. F. (1988). Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). *Amphibia Reptilia*, 9(1), 49–60.
- Morais, A., & Kwet, A. (2012). Description of the advertisement call of *Physalaemus lisei* (Anura: Leiuperidae). *Salamandra*, 48(4), 227–229.
- Moura, M. R., Motta, A. P., & Feio, R. N. (2011). An unusual reproductive mode in *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Zoologia*, 28(1), 142–144.
- Nali, R. C., Zamudio, K. R., & Prado, C. P. A. (2023). Phenotypic differentiation in populations of a gladiator tree frog: environment, genetic drift and sexual selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1–14.
- Noble, G. K. (1931). *The biology of the amphibia*. McGraw-Hill.
- Nunes-de-Almeida, C. H. L., Haddad, C. F., & Toledo, L. F. (2021). A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*, 57(3), 413–427.
- Pinheiro, D. P., Blotto, B. L., Ron, S. R., Stanley, E. L., Garcia, P. C., Haddad, C. F., Grant, T., & Faivovich, J. (2022). Prepollex diversity and evolution in Cophomantini (Anura: Hylidae: Hylinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 195, 995–1021.
- Pope, C. H. (1931). Notes on amphibians from Fukien, Hainan, and other parts of China. In *Bulletin American Museum of Natural History* (Vol. 109, pp. 499–500).
- Segalla, M. V., Berneck, B., Canedo, C., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G., Garcia, P. C. A., Grant, T., Haddad, C. F. B., Lourenço, A. C. C., Mângia, S., Mott, T., Nascimento, L. B., Toledo, L. F., Werneck, F. P., & Langone, J. A. (2021). List of Brazilian Amphibians. *Herpetologia Brasileira*, 10(1), 121–216.

- Toledo, L. F., Dena, S., Segalla, M., Prado, C. P. A., Loebmann, D., Gasparini, J. L., Sazima, I., & Haddad, C. F. (2021). Anfíbios da Mata Atlântica. In *Econature, consultoria, pesquisa e educação Ambiental: Vol. 1.0.1* (1.0.1). Econature, Consultoria.
- Toledo, L. F., & Haddad, C. F. (2009). Defensive vocalizations of neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology*, 4(1), 25–42.
- Toledo, L. F., Martins, I. A., Bruschi, D. P., Passos, M. A., Alexandre, C., & Haddad, C. F. (2015). The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethologica*, 18(2), 87–99.
- Toledo, L. F., Sazima, I., & Haddad, C. F. (2011). Behavioural defences of anurans: An overview. *Ethology Ecology and Evolution*, 23(1), 1–25.
- Wells, K. D., & Schwartz, J. J. (2007). The behavioral ecology of anuran communication. In Peter M. Narins, Albert S. Feng, Richard R. Fay, & Arthur N. Popper (Eds.), *Hearing and sound communication in amphibians*. (pp. 44–46). Springer Verlag.

ANEXOS

Anexo I. Declaração de bioética e biossegurança.

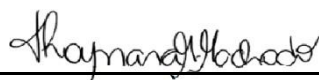


COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada “***Variação do chamado de anúncio e comportamento reprodutivo da rã gladiadora, Boana pardalis (Anura; Hylidae)***”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Thaynara Mendes Machado

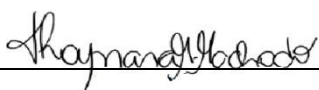
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Dr. Luís Felipe Toledo

Data: 25 de outubro de 2023

Anexo II. Declaração de direitos autorais.**DECLARAÇÃO**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Variação do chamado de anúncio e comportamento reprodutivo da rã gladiadora, *Boana pardalis* (Anura; Hylidae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de outubro de 2023

Assinatura :  _____

Nome do(a) autor(a): **Thaynara Mendes Machado**

RG n.º 4886475309

Assinatura :  _____

Nome do(a) orientador(a): **Dr. Luís Felipe Toledo**

RG n.º 28.465.361.5