



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso

**FOTOIDENTIFICAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE MARCAÇÃO
NÃO INVASIVA PARA O SAPINHO MICROENDÊMICO
Melanophryniscus admirabilis (ANURA: BUFONIDAE)**

Michelle Abadie de Vasconcellos

Orientador: Márcio Borges-Martins

Porto Alegre, Dezembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por sempre apoiarem minhas decisões, por me incentivarem a estudar e proporcionarem o meu conhecimento. Vocês são os responsáveis por esta conquista.

A minha irmã pelos conselhos, pela parceria durante a graduação, por aderir às minhas “bichogrílices” e se orgulhar de ter uma irmã louca e do contra!

Aos meus amigos e minha família por se interessarem no meu trabalho, se orgulharem das minhas conquistas e apoiarem as minhas viagens frequentes, mesmo que isso custasse a minha ausência.

Ao Isma pelo amor, pelo companheirismo, pela imensa ajuda e longas discussões sobre o trabalho, por aguentar a minha insegurança, pela paciência e por entender a minha ausência.

Ao meu orientador, Prof. Márcio, pela paciência, pelos conselhos, pelas ideias criativas, pela amizade, pelo aprendizado e, sobretudo, por me incentivar e sempre acreditar na minha capacidade.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Herpetologia da UFRGS pela companhia, pelo apoio, pelas risadas e pela amizade. Em especial, quero agradecer a Carol Zank por me co-orientar e ao Lui por me desorientar (hehe)! Não imagino sequer ter iniciado as saídas de campo sem a ajuda de vocês! Ao Diego pelos conselhos, pelo apoio e pelo incentivo. A Prof. Laura pelo aprendizado não só herpetológico, pelo incentivo e por acreditar em mim. E a Thay pela amizade e por tornar as saídas de campo muito mais divertidas! O mestrado nos espera!!

Aos meus queridos amigos da Bio pelo companheirismo e amizade ao longo desses seis anos, e por fazerem desses anos a melhor época da minha vida!

A Moema e a Lu, da FZB, pela amizade, por me iniciarem no mundo herpetológico e me incentivarem a fazer pesquisa.

A Dona Zeni e seu Dulça por nos receberem com alegria na Pousada Perau de Janeiro e sempre prontos para ajudar no que fosse preciso.

A Fundação Grupo O Boticário pela concessão da bolsa de iniciação científica, pelo apoio financeiro às saídas de campo e compra do material necessário através do projeto “Avaliação do Status de Conservação do raro sapinho-de-barriga-vermelha, *Melanophryniscus admirabilis*”.

Ao ICMBio pelo apoio financeiro e concessão da licença (25463-1) para a realização do estudo e eventual coleta de espécimes de *Melanophryniscus admirabilis*.

Manuscrito formatado conforme
normas editoriais da revista
South American Journal of Herpetology.

FOTOIDENTIFICAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE MARCAÇÃO NÃO
INVASIVA PARA O SAPINHO MICROENDÊMICO *Melanophryniscus admirabilis*
(ANURA: BUFONIDAE)

MICHELLE ABADIE^{1,2}, CAROLINE ZANK¹, LUIS F. M. DA FONTE¹, THAYNÁ MENDES¹ & MÁRCIO
BORGES-MARTINS¹

1. Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500. CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Autor para correspondência: Email: abadie.mi@gmail.com

RESUMO: Uma alternativa às técnicas de marcação artificial é o reconhecimento dos indivíduos através do seu padrão de marcas naturais. Uma das limitações da fotoidentificação é sua utilização em estudos de grandes amostragens. Nesses casos, o reconhecimento dos indivíduos torna-se inviável caso não seja auxiliado por um *software*. *Melanophryniscus admirabilis* é um sapo recentemente descrito, microendêmico e ameaçado de extinção. Devido à situação de vulnerabilidade da única população conhecida de *M. admirabilis* e à falta de conhecimento sobre o efeito que a amputação de falanges teria sobre a capacidade de deslocamento dos indivíduos, optamos por empregar o reconhecimento individual através do padrão de coloração e evitar o uso de uma técnica invasiva de marcação. O objetivo desse trabalho foi validar o método da fotoidentificação como uma alternativa de marcação não invasiva para indivíduos adultos da espécie, comparando a eficiência entre a fotoidentificação realizada manualmente e a fotoidentificação auxiliada por um *software*. As amostragens foram realizadas mensalmente durante um ano, quando os indivíduos capturados tiveram seus ventres fotografados. No primeiro teste realizado, dois pesquisadores identificaram igual e independentemente nove recapturas. Das 889 imagens, o *software* sugeriu 92,11% das recapturas entre as três primeiras candidatas, apresentando um bom desempenho para o grande número de imagens. No teste para avaliar a eficiência dos dois métodos, das 450 imagens analisadas, a fotoidentificação manual reconheceu 71 de 74 recapturas, enquanto que o reconhecimento auxiliado pelo *software* identificou 61 como recapturas. Houve diferença significativa entre as proporções de erro da fotoidentificação manual (0,67%) e auxiliada pelo *software* (2,89%). Todos os erros foram falsos negativos. O método de fotoidentificação pôde ser empregado com sucesso em *M. admirabilis* e a fotoidentificação manual foi mais eficiente que a auxiliada pelo *software*, apesar do maior tempo despendido. Durante um ano de amostragem, não identificamos alterações no padrão de colorido de nenhum indivíduo recapturado. Nossas observações acerca da utilização do *software* Wild-ID demonstraram que a remoção do fundo (tornando-o homogêneo e sem sombras) foi a melhor alteração pós-processamento das imagens. Apresentamos, por fim, uma compilação de sugestões compondo um protocolo de fotoidentificação para anfíbios.

PALAVRAS-CHAVE: marcação e recaptura, fotoidentificação auxiliada por *software*, marcas naturais, padrão de coloração, Wild-ID, Mata Atlântica.

ABSTRACT: An alternative to artificial marking techniques is the recognition of individuals through natural marking. One of the limitations of photo-identification is its use in studies of large samples. In these cases, recognition of individuals becomes impractical if not assisted by software. *Melanophryniscus admirabilis* is a recently described frog, micro-endemic and endangered. Due to the vulnerability of the unique known population of this species and the lack of knowledge about the effect of toe-clipping on the movement ability of individuals, we chose to individually recognize specimens through color pattern, avoiding the use of any invasive marking technique. The objective of this study was to validate the photographic identification method (PIM) as a non-invasive alternative of marking adult individuals of this species, comparing the efficiency between Manual PIM and Computer-aided PIM. Samples were collected monthly during a year. The belly of 889 captured individuals was photographed. On the first

test, two researches identified the same nine recaptures independently. Of the 889 images, the software suggested 92.11% of correct matches in the top 3, showing a good performance for the large number of images. In the test to evaluate the efficiency between the two methods, of the 450 analyzed images, Manual PIM recognized 71 of 74 recaptures, while Computer-aided PIM identified 61 as recaptures. There were significant differences in the proportion of errors between Manual PIM and Computer-aided PIM. All errors were false negatives. PIM could be successfully applied in *M. admirabilis* and Manual PIM was more efficient than Computer-aided PIM, despite being more time-consuming. During a year of sampling, we did not identify changes in color pattern of any recaptured individual. Our observations on the use of Wild-ID software showed that removal of the background (making it homogeneous and shadowless) was the best of post processing modification of images. We present a protocol for PIM in amphibians and a compilation of suggestions.

KEYWORDS: mark-recapture, computer-aided photographic identification, natural marking, color pattern, Wild-ID, Atlantic Forest.

INTRODUÇÃO

Estudos demográficos, comportamentais e reprodutivos (*e.g.* Denton & Beebee, 1993; Measey, 2001; Measey *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2007) são essenciais para o entendimento de aspectos da história de vida de espécies de anfíbios e, assim, são fortemente recomendados para o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (Donnelly & Guyer, 1994; Bradfield, 2004; Wells, 2007; Gamble *et al.*, 2008). Métodos de marcação e recaptura são frequentemente empregados nesses estudos, os quais exigem o reconhecimento específico dos indivíduos (Donnelly *et al.*, 1994; Krebs, 1999). Numerosas técnicas de marcação individual estão disponíveis para o uso em anfíbios adultos e as mais tradicionais envolvem uma marcação artificial, como a amputação de falanges, a implantação de elastômeros (marcação subcutânea com um polímero fluorescente), Transponder Integrado Passivo (PIT) ou tatuagens (ver Donnelly *et al.*, 1994; Ferner, 2007, 2010; Beausoleil *et al.*, 2004).

Visando uma marcação ideal, alguns critérios devem ser considerados na escolha da técnica. É usualmente desejado (1) que não existam efeitos na sobrevivência, no comportamento e na fisiologia dos organismos, (2) que a marcação seja permanente (ou resista o tempo suficiente para a realização do estudo) e, preferencialmente, (3) que a técnica seja de fácil aplicação e baixo custo (Ferner, 2007). Evidentemente, nenhuma técnica satisfaz todos os critérios e cabe ao pesquisador decidir qual delas atende melhor as necessidades do estudo proposto (Mellor *et al.*, 2004).

A amputação de falanges é a técnica de marcação mais amplamente utilizada, por ser de fácil aplicação e baixo custo (Donnelly *et al.*, 1994; Ferner, 2007; Beausoleil

et al., 2004). No entanto, técnicas consideradas invasivas têm sido frequentemente questionadas e revisadas e cada vez mais os pesquisadores estão interessados em técnicas de marcação e maneiras não invasivas de identificar os indivíduos (Davis & Ovaska, 2001; Ferner, 2007, 2010; Perry *et al.*, 2011).

Os estudos sobre os efeitos das técnicas de marcação em anfíbios são em geral contraditórios, variando de espécie para espécie e dificultando generalizações (Bradfield, 2004; Ferner, 2010). Alguns autores defendem que a amputação de falanges prejudica os resultados, pois relatam a possibilidade de regeneração dos dedos cortados ou de perda natural/espontânea deles (Miranda *et al.*, 2005; Ferner, 2007; Ursprung *et al.*, 2011), assim como indicam alterações nas taxas de recaptura, na sobrevivência e no comportamento dos indivíduos, devido à potencial infecção causada pelo corte dos artelhos (Clarke, 1972; Davis & Ovaska, 2001; Parris & McCarthy, 2001; McCarthy & Parris, 2004; Bradfield, 2004). Outros autores relatam que a amputação de falanges não afetou significativamente a sobrevivência dos indivíduos, não interferindo no resultado dos estudos (Gelder & Strijbosch, 1996; Berger, 2001; Liner *et al.*, 2007; Phillot *et al.*, 2007, 2011).

Além da preocupação com a qualidade dos estudos, questões éticas e de conservação também têm sido debatidas (Halliday, 1994; May, 2004; Funk *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2011) a fim de minimizar os distúrbios causados na populações de anfíbios, especialmente quando se trata de espécies raras, endêmicas ou ameaçadas (Beausoleil *et al.*, 2004; Bradfield, 2004; McCarthy & Parris, 2008). Durante estudos populacionais com rãs (*Lithobates catesbeianus*), Briggs & Storm (1970) optaram por não amputar os polegares dos espécimes devido a sua importância durante o amplexo. Os autores também mencionaram a relevância desse artelho na sexagem dos animais.

Uma alternativa às técnicas de marcação artificial é o reconhecimento dos indivíduos através do seu padrão de marcas naturais (Donnelly, *et al.*, 1994; Bradfield, 2004; Ferner, 2007). Essa técnica de marcação individual não invasiva tem sido principalmente empregada em estudos de mamíferos, tanto marinhos (*e.g.* baleias-jubartes, Glockner & Venus, 1983; baleias-francas, Payne *et al.*, 1983; focas-monge-do-mediterrâneo, Forcada & Aguilar, 2000), quanto terrestres (*e.g.* zebras, Petersen, 1972; leões, Schaller, 1972; chimpanzés, Goodall, 1986; guepardos, Caro, 1994 e Kelly, 2001; elefantes, Whitehouse & Hall-Martin, 2000; texugos-europeus, Dixon, 2003; ursos-polares, Anderson *et al.*, 2007). Mais recentemente essa técnica vem sendo utilizada também como a alternativa menos invasiva em estudos populacionais de anfíbios, em

salamandras (e.g. Davis & Ovaska, 2001; Bailey, 2004) e em anuros (e.g. Denton & Beebee, 1993; Kurashina *et al.*, 2003; Bradfield, 2004; Bailey, 2004; Caorsi *et al.*, 2012).

Embora a identificação de anfíbios por meio de marcas naturais normalmente envolva a manipulação deles, essa técnica está se tornando popular para o reconhecimento de indivíduos de populações que requerem maiores cuidados (Beausoleil *et al.*, 2004), sendo uma alternativa ideal para ser empregada nas pesquisas com espécies ameaçadas ou endêmicas (Kelly, 2001). Além disso, é relativamente prática e acessível (necessidade apenas de uma máquina fotográfica digital).

Para que o método de identificação fotográfica (Photographic Identification Method - PIM) possa ser empregado com sucesso nos estudos ecológicos de anfíbios, o padrão de coloração dos indivíduos deve variar suficientemente para o reconhecimento individual (não havendo indivíduos aparentemente idênticos; Bradfield, 2004; Kenyon *et al.*, 2009), mas não deve ser tão variável que dificulte a identificação. Além disso, é necessário que as marcas não mudem ao longo do tempo (variação ontogenética, por exemplo; Kenyon *et al.*, 2010). Outra limitação do PIM é sua utilização em estudos com grandes amostragens. Nesses casos, o reconhecimento dos indivíduos através de fotografias do padrão de coloração torna-se inviável caso não seja auxiliado por um *software* (*recognition-assistance software*; Whitehead, 1990; Beausoleil *et al.*, 2004; Arzoumanian *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2006; Gamble *et al.*, 2008; Speed *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2011; Bolger *et al.*, 2012).

Muitas espécies do gênero neotropical *Melanophryniscus* ocorrem em áreas restritas e sob um forte impacto ambiental, o que as predispõe a problemas de conservação. Contudo, para a maioria dessas espécies inexitem estudos de história natural, de distribuição geográfica e de tamanho populacional, o que dificulta uma correta avaliação do seu status de conservação (IUCN, 2012). O sapinho-verde-de-barriga-vermelha, *Melanophryniscus admirabilis* Di Bernardo, Maneyro & Grillo, 2006, foi recentemente descrito e é um exemplo da carência de informações. Trata-se de uma espécie de distribuição altamente restrita, endêmica de apenas uma localidade (Perau de Janeiro, Arvorezinha, RS, Brasil), e que vem sendo considerada ameaçada de extinção e, por isso, uma das prioridades para a conservação da herpetofauna no sul do Brasil (Portaria nº 25, de 17 de fevereiro de 2012). Essa é uma região especialmente vulnerável, já que está situada em uma bacia hidrográfica com grande potencial para construção de usinas hidrelétricas. Além disso, o Perau de Janeiro está localizado em

um dos maiores fragmentos de Mata Atlântica da região, mas que vem sendo destruído principalmente devido à monocultura extensiva de fumo e *Eucalyptus sp.* e à criação de gado. A sobrevivência de *M. admirabilis* pode depender do desenvolvimento de políticas específicas para sua conservação e, para isso, é necessário que sejam conhecidos alguns aspectos-chave da sua biologia, a fim de que sejam elaboradas estratégias de ação efetivas. Portanto, existe a necessidade de estudo do tamanho e das tendências populacionais da espécie e, para isso, a utilização de uma técnica de marcação não invasiva é ideal. Observações preliminares permitiram notar a existência de um padrão de colorido ventral único em cada indivíduo, como observado em outras espécies do gênero (Vaira, 2002; Cairo & Tada, 2005; Caorsi, *et al.*, 2012). Além disso, foi observado que os indivíduos são capazes de escalar os paredões íngremes na beira do Rio Forqueta (*dados não publicados*; Figura 1). Portanto, devido à situação de vulnerabilidade da única população conhecida de *Melanophryniscus admirabilis* e à falta de conhecimento sobre o efeito que a amputação de falanges teria sobre a capacidade de deslocamento dos indivíduos, optamos por empregar o reconhecimento individual através das marcas naturais e evitar o uso de uma técnica invasiva de marcação.



FIGURA 1. Espécime de *Melanophryniscus admirabilis* escalando paredão rochoso com vegetação.

Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho é validar o método da fotoidentificação como uma ferramenta alternativa de marcação individual não invasiva para *Melanophryniscus admirabilis*, comparando a eficiência entre a fotoidentificação realizada manualmente e a fotoidentificação auxiliada por um *software*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para registrar os espécimes de *Melanophryniscus admirabilis*, foram realizadas saídas de campo mensais, de outubro de 2010 a outubro de 2011. A área de amostragem está situada em uma Região Fitoecológica de transição, não só apresentando elementos típicos da Floresta Ombrófila Mista, como o pinheiro-brasileiro (*Araucaria angustifolia*), mas também se caracterizando pela quase integral decidualidade da cobertura superior da floresta e pelo clima regularmente úmido, típicos da Floresta Estacional Decidual (Leite & Klein, 1990).

Durante as expedições a campo, os indivíduos eram encontrados por Procura Visual (Visual Encounter Survey – VES; Crump & Scott Jr., 1994), não controlada por tempo, em um transecto de aproximadamente 700m ao longo da margem esquerda do Rio Forqueta, no Perau de Janeiro (município de Arvorezinha, Rio Grande do Sul), em um vale estreito, limitado por encostas de acentuada declividade. A espécie utiliza como sítio reprodutivo pequenas poças nas margens rochosas do rio e a disponibilidade dessas poças varia periodicamente, dependendo do nível do rio (*dados não publicados*).

Todos os indivíduos adultos de *M. admirabilis* encontrados foram capturados e levados ao laboratório instalado no campo, onde eram medidos, pesados, sexados e fotografados. Os indivíduos machos foram reconhecidos através da presença de calosidade sexual na mão ou pela emissão do canto agonístico. Em todas as ocasiões amostrais, os indivíduos foram liberados nos locais de captura no dia seguinte, após um máximo de 24h. Essas informações foram catalogadas em um banco de dados, onde cada captura recebeu um código sequencial (MA XXX). Os recipientes de coleta (sacos plásticos) nunca foram reutilizados, a fim de evitar a transmissão de patógenos (como fungos quitrídios) entre os indivíduos. Não foi necessário o uso de qualquer anestésico para fotografar os exemplares, que ficam imóveis por tempo suficiente para o procedimento, sempre que colocados de costas para o substrato. Para a realização do estudo de marcação e recaptura e eventual coleta de espécimes de *M. admirabilis*, foi

obtida uma licença (25463-1) junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

O padrão de coloração de *M. admirabilis* apresenta cores aposemáticas claramente contrastadas. No dorso predomina a coloração verde com glândulas bem desenvolvidas verde-amareladas. Ventralmente, os indivíduos apresentam a região inguinal e a planta das patas em vermelho vivo. O restante do ventre (queixo, região gular, peito e barriga) tem fundo preto e suas glândulas arredondadas são facilmente distinguíveis pelo tamanho e por sua contrastante coloração, que varia de verde à amarela. A região axilar frequentemente apresenta glândulas arredondadas na cor vermelha, também contrastando fortemente com o fundo preto (Figura 2; Di-Bernardo *et al.*, 2006).



FIGURA 2. Padrão de coloração dorsal e ventral de indivíduos adultos de *M. admirabilis*.

Os espécimes tiveram seu ventre fotografado preferencialmente por uma câmera digital Nikon P90 (resolução 12.1 Megapixels), em fundo branco, para dar destaque ao padrão de colorido ventral, e usando iluminação com flash. A distância da câmera até o indivíduo fotografado não foi completamente padronizada, porém usualmente foi de cerca de 20 cm. Para melhores resultados, os indivíduos foram fotografados diversas vezes, e posteriormente a melhor fotografia foi selecionada, a qual recebeu o código correspondente às suas informações no banco de dados. O ventre deveria estar limpo e pouco úmido, para não refletir muita luz. Tomou-se o cuidado de que a vista ventral do

corpo ficasse de preferência em ângulo reto em relação à posição da câmera e no centro do campo de visão. Antes do reconhecimento fotográfico, as fotografias foram todas recortadas tangencialmente ao corpo do animal, reduzindo a imagem à área de interesse, como sugerido por Bolger *et al.* (2011).

O álbum do banco de dados foi composto por imagens de todos os eventos de captura, numerados sequencialmente em ordem de aquisição. A comparação das fotos seguiu duas metodologias: o reconhecimento fotográfico realizado manualmente (PMR: *Photographic mark-recapture*) e o reconhecimento fotográfico auxiliado por um *software* (CAPI: Computer-assisted photo identification), conforme descrito a seguir.

Fotoidentificação Manual

Cada imagem do álbum foi comparada com o conjunto de imagens correspondente aos eventos de captura anteriores, visando identificar as possíveis recapturas. Algumas regiões do corpo eram principalmente observadas: a região gular e a barriga, onde frequentemente se formam desenhos pela junção de algumas glândulas; e a região axilar, que apresenta poucas glândulas vermelhas ou não as apresenta, facilitando o reconhecimento (Figura 3). Depois de identificarmos os candidatos como recapturas ou como um novo indivíduo, essa informação era inserida no banco de dados e na imagem correspondente do álbum.

Com o objetivo de testar a fotoidentificação visual, dois pesquisadores procuraram independentemente por correspondência entre as fotografias no banco de dados, classificando-as como uma recaptura ou como um novo indivíduo. Este teste foi realizado com as 169 imagens dos dois primeiros meses de amostragem.

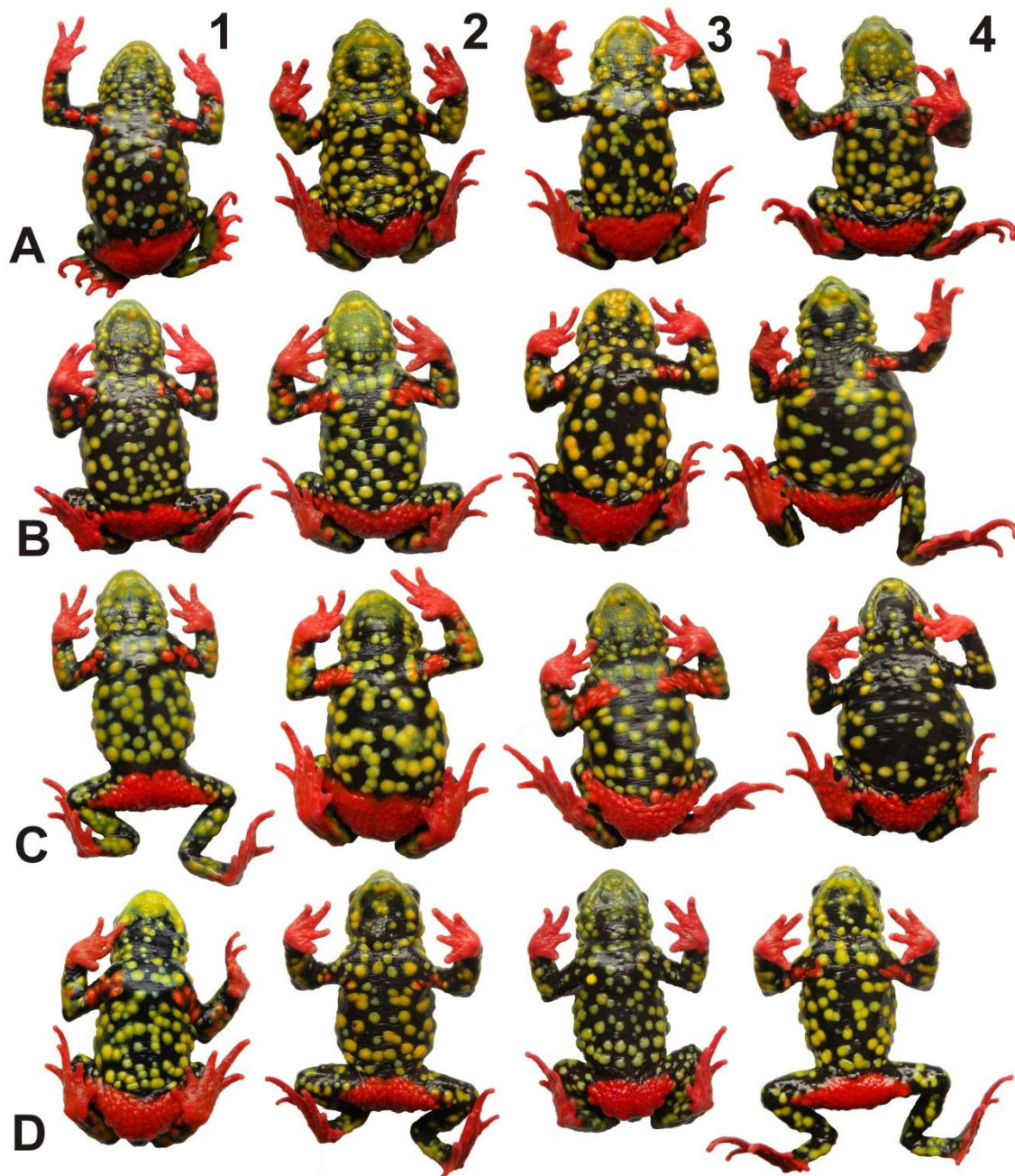


FIGURA 3. Variação do padrão de coloração em indivíduos adultos de *M. admirabilis*. Note os desenhos que se formam a partir da junção das glândulas e a coloração da região axilar. (A1) macho, CRC = 34,62; (A2) macho, CRC = 35,32; (A3) macho, CRC = 30,12; (A4) macho, CRC = 33,48; (B1) macho, CRC = 32,88; (B2) macho, CRC = 34,84; (B3) macho, CRC = 32,50; (B4) fêmea, CRC = 34,70; (C1) macho, CRC = 31,30; (C2) macho, CRC = 33,55; (C3) macho, CRC = 35,36; (C4) fêmea, CRC = 36,68; (D1) macho, CRC = 32,44; (D2) macho, CRC = 31,69; (D3) macho, CRC = 32,02; (D4) macho, CRC = 34,36.

Reconhecimento Auxiliado Por Software

O software utilizado para a fotoidentificação foi o Wild-ID 1.0 (Bolger *et al.*, 2011), o qual trabalha baseado no operador SIFT (Scale Invariant Feature Transform; Lowe 2004). Ele foi desenhado para identificar aspectos distintivos das imagens,

independentemente de escala e rotação. Não é necessário marcar na imagem os pontos a serem comparados. Esse *software* é livre e foi desenvolvido pela Faculdade de Dartmouth (EUA). O *software* compara cada registro com todas as imagens de registros anteriores disponíveis no álbum do banco de dados. Após esta análise, o *software* oferece, para cada um dos registros, vinte imagens candidatas potenciais. Cabe ao usuário do programa aceitar uma imagem como correspondente (recaptura) ou rejeitar as opções disponíveis, assumindo o registro como um novo indivíduo. Ao final de todos os confrontos, o *software* cria um arquivo com as comparações, informando as imagens que foram reconhecidas pelo usuário como recapturas, a posição em que estavam classificadas entre as vinte opções e o valor de similaridade entre a imagem dada e a imagem correspondente. Com o objetivo de avaliar o comportamento do *software* em indivíduos de *M. admirabilis*, rodamos 889 imagens de capturas do nosso banco de dados.

Fotoidentificação Manual *versus* Fotoidentificação Auxiliada Por *Software*

A fim de comparar a eficiência do reconhecimento individual realizado manualmente e do auxiliado pelo *software*, fotoidentificamos as mesmas capturas com os dois métodos separadamente. Na ausência de um controle possível, para o total de recapturas foi utilizada a estimativa agregada dos dois métodos, ou seja, o somatório do número de recapturas identificadas por ambos os métodos, do número de recapturas reconhecidas somente pela fotoidentificação manual e do número de recapturas reconhecidas somente pela fotoidentificação auxiliada pelo *software*. O erro de cada um dos métodos foi calculado sobre o total de capturas realizadas. Todos os erros foram classificados em falso negativo (quando uma recaptura não é identificada como tal) ou falso positivo (quando um novo indivíduo é erroneamente identificado como uma recaptura).

O tempo total dedicado para a fotoidentificação em cada um dos métodos também foi estimado. Considerando que o tempo necessário para comparar uma imagem com outra seria em média dois segundos, calculamos uma estimativa máxima para ambos os métodos, ou seja, supondo que não encontraríamos nenhuma recaptura e teríamos que comparar cada registro com todas as outras imagens do banco de dados. Para a fotoidentificação realizada manualmente, foram comparadas 450 imagens com

outras 450, gastando dois segundos por comparação ($450*449*2s$). Para a fotoidentificação auxiliada pelo *software*, foram comparadas as mesmas 450 imagens do banco de dados com outras 20 potenciais para cada registro, gastando dois segundos por comparação ($450*20*2s$).

Para testar se a eficiência entre métodos diferiu significativamente, realizamos um teste χ^2 de Pearson com a correção para continuidade de Yates, utilizando o *software* R (v. 2.13.2) e assumindo um nível de significância de 0.05.

Efeito da padronização na capacidade de identificação do software

Durante a análise dos dados, percebemos que a maioria dos erros do *software* estava relacionada a um mesmo evento amostral. Buscando entender a relação entre os erros, percebemos que as imagens desse evento não foram padronizadas como as outras e os indivíduos foram fotografados sobre a mão de um pesquisador, sem flash e/ou por uma máquina fotográfica ou pesquisador diferente dos usuais. Decidimos, então, verificar se a eficiência entre os dois métodos diferiria caso excluíssemos todas as capturas do evento de amostragem que não apresentavam um mínimo de padronização ($n=84$). Para isso, realizamos o teste exato de Fisher com as 366 imagens padronizadas restantes, utilizando o *software* R 2.13.2 e assumindo um nível de significância de 0.05.

No entanto, a eliminação de todas as fotografias não padronizadas significaria perda de informação, sobretudo se considerarmos que, às vezes, no campo, metodologias inflexíveis são difíceis de serem aplicadas. Logo, fizemos observações acerca da utilização do *software* Wild-ID, na tentativa de aprimorar o seu uso e, assim, ampliar a utilização do padrão de colorido ventral como técnica de marcação, sobretudo para espécies de *Melanophryniscus*, de maneira prática e com alta qualidade. Para isso, todas as imagens foram tratadas de diferentes maneiras (Figura 4): (1) removendo o fundo (FR), (2) através da correção automática (CA) ou (3) removendo o fundo de todas as imagens e editando contraste, brilho e/ou nitidez somente das fotos que o usuário julgasse necessário (FR+CM). A remoção do fundo da imagem foi realizada utilizando o *software* Adobe Photoshop CS5 e as outras alterações, utilizando o Microsoft Office 2010.

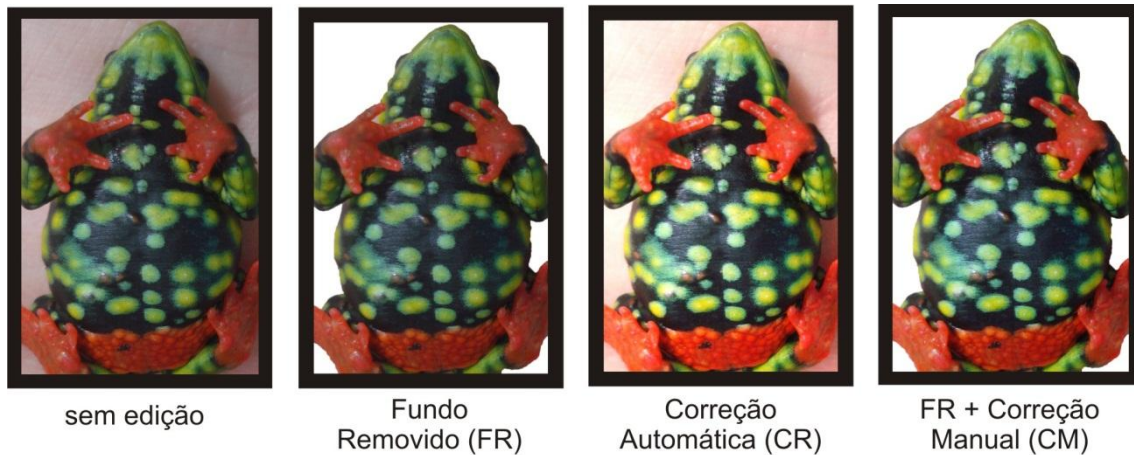


FIGURA 4. Exemplo das edições pós-processamento referidas nos testes da fotoidentificação auxiliada por *software* em *Melanophryniscus admirabilis*.

RESULTADOS

Fotoidentificação Manual

No primeiro teste realizado, 169 fotografias foram comparadas. Dessas, nove foram identificadas como recapturas independentemente pelos dois pesquisadores, sendo o restante considerado como novos indivíduos.

Reconhecimento Auxiliado Pelo *Software*

Das 889 capturas, a fotoidentificação auxiliada pelo *software* reconheceu 190 recapturas de um total de 699 indivíduos, variando de uma a quatro recapturas por indivíduo. O *software* Wild-ID encontrou 87,37% dos correspondentes na primeira posição entre as vinte candidatas potenciais, 3,16% na segunda e 1,58% na terceira posição. Ou seja, 92,11% das imagens correspondentes estavam entre as três primeiras candidatas que o *software* sugere como potencial recaptura (Figura 5). Nenhum indivíduo idêntico foi encontrado durante as comparações entre todos os indivíduos provenientes da mesma amostragem.

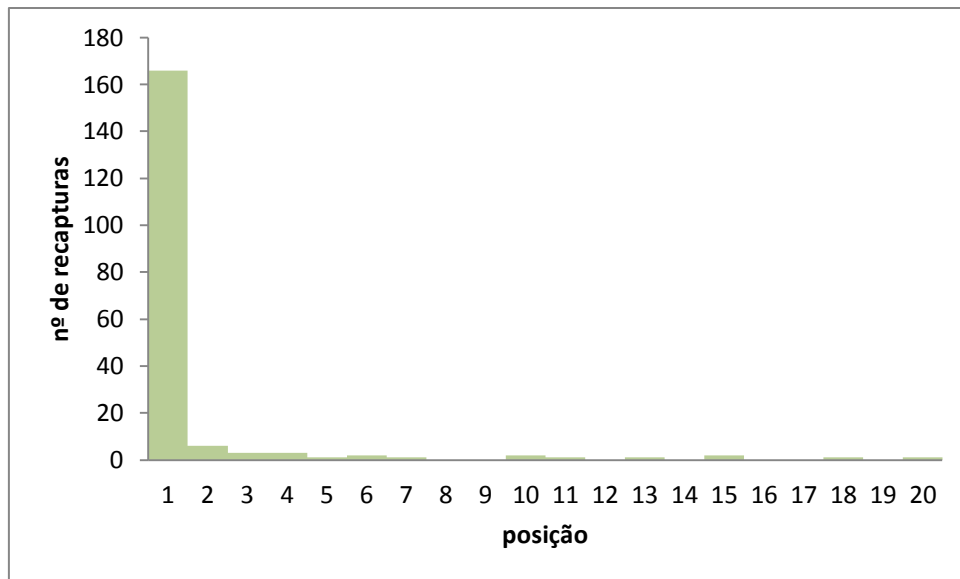


FIGURA 5. Número de recapturas de indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis* (n=889 capturas) em cada uma das vinte posições sugeridas pelo *software* Wild-ID.

Fotoidentificação Manual *versus* Auxiliada Pelo *Software*

A estimativa máxima de tempo despendido para fotoidentificar 450 imagens por ambos os métodos foi de aproximadamente 112 horas na fotoidentificação realizada manualmente e de 5 horas na auxiliada pelo *software*. No teste para avaliar a eficiência dos dois métodos com todos os eventos de amostragem, as 450 imagens fotoidentificadas corresponderam a 376 indivíduos. A fotoidentificação manual reconheceu 71 recapturas, enquanto que o reconhecimento auxiliado pelo *software* identificou 61 como recapturas. A estimativa agregada indicou 74 recapturas. O erro da fotoidentificação manual, portanto, foi estimado em 0,67% (3 em 450) e o erro da fotoidentificação auxiliada pelo *software*, em 2,89% (13 em 450). A diferença entre as proporções de erro dos dois métodos analisados foi significativa ($\chi^2 = 5,6761$; $p = 0,0172$). Todos os 16 erros, tanto da fotoidentificação visual, quanto da auxiliado pelo *software*, foram falsos negativos. Não foram identificados erros do tipo falsos positivos.

Na comparação entre os dois métodos, usando somente fotografias padronizadas, a amostra de 366 imagens correspondeu a 323 indivíduos. A fotoidentificação manual reconheceu 42 recapturas, enquanto que a fotoidentificação auxiliada pelo *software* reconheceu 41. A estimativa agregada foi de 43 recapturas. O erro da fotoidentificação manual foi estimado em 0,273% (01 em 366) e o erro da fotoidentificação auxiliada

pelo *software*, em 0,546% (02 em 366). Não houve diferença entre as proporções de erro dos dois métodos ($p= 1$). Os três erros encontrados foram falsos negativos.

Quando o fundo de todas as imagens foi removido (FR), o *software* reconheceu mais oito recapturas, reduzindo o erro a cinco. No entanto, outras quatro recapturas anteriormente reconhecidas, não foram encontradas, aumentando o erro para nove. Quando utilizamos somente a correção automática (CA) para todas as 450 fotos, o erro foi reduzido a sete em relação às treze anteriores, mas três novos erros foram gerados, totalizando 10. Quando as fotos foram testadas com o fundo removido e com a edição das imagens realizada pelo usuário (FR+CM), o *software* identificou cinco antes não identificadas, porém também gerou três novos erros, totalizando 11 recapturas não sugeridas previamente entre as vinte opções pelo *software* (Tabela 1).

TABELA 1. Comparação do Método de Identificação Fotográfica (PIM) manual e auxiliada pelo *software*, com três diferentes edições de pós-processamento, aplicado em *Melanophryniscus admirabilis*. Teste χ^2 de Pearson calculado em comparação aos erros e acertos da PIM Manual, com a correção para continuidade de Yates e assumindo um nível de significância de 0,05. n = 450 (dados baseados em fotografias não padronizadas).

PIM	Erros	Acertos	% de erros	χ^2
Manual	3	71	0,67	-
Software – sem edição	13	61	2,89	p=0,017*
Software – remoção do fundo (FR)	9	65	2,00	p=0,132
Software – correção automática (CA)	10	64	2,22	p=0,081
Software – FR + correção manual (CM)	11	63	2,44	p=0,049*

* resultado estatisticamente significativo.

Somente dois pares correspondentes dos treze erros iniciais não puderam ser reconhecidos pelo *software* em nenhuma das ocasiões de edição das imagens. Essas fotografias apresentavam o corpo dos indivíduos em ângulos diferentes e assim o padrão de colorido ficava distorcido. Ao se trocar uma das fotos por outra menos torcida, o *software* pôde encontrar a correspondente (Figura 6).

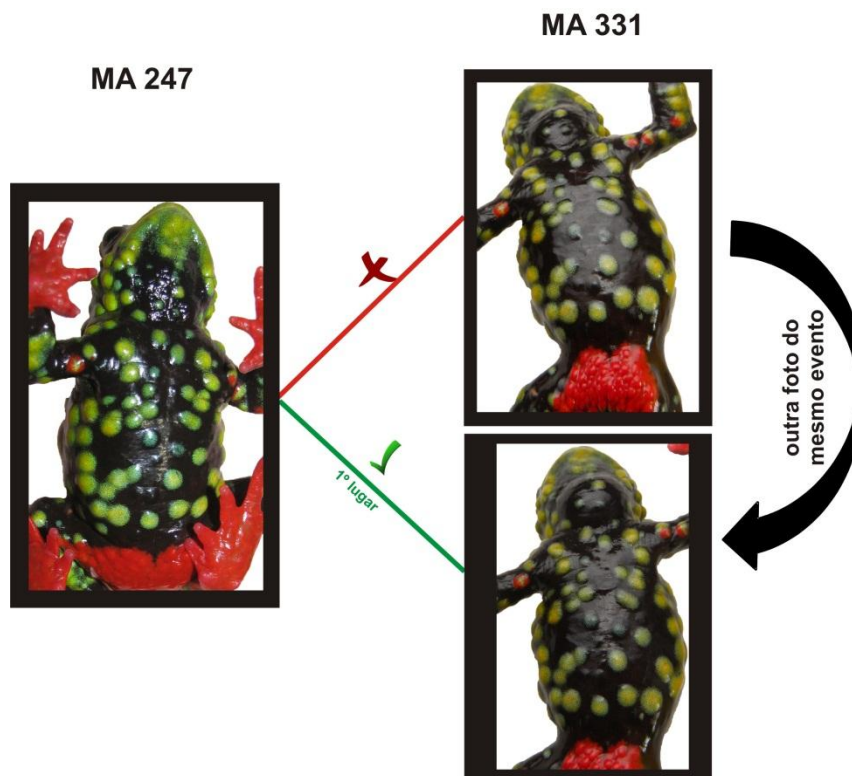


FIGURA 6. Exemplo do efeito da seleção de diferentes imagens de um mesmo evento de recaptura, resultando em reconhecimento ou não pela fotoidentificação auxiliada pelo *software*

DISCUSSÃO

Os indivíduos de *Melanophryniscus admirabilis* puderam ser facilmente distinguidos nesse estudo e consideramos que a técnica de marcação por meio do padrão de colorido ventral pode ser empregada com sucesso. Cairo *et al.* (2005) destacaram o uso do padrão de coloração como uma poderosa ferramenta para reconhecimento individual de *Melanophryniscus sp.* em uma população da Argentina. Caorsi *et al.* (2012) apresentaram dados de que a identificação através do padrão de colorido teve um melhor desempenho em *M. cambaraensis* do que a amputação de falanges, técnica muitas vezes tida como referência em estudos de marcação e recaptura. Além disso, o PIM já foi utilizado por outros autores como controle de técnicas de marcação em anfíbios ou como grupo controle para avaliar os efeitos de técnicas invasivas (Hero, 1989 *apud* Miranda *et al.*, 2005 ; Davis & Ovaska, 2001; Beausoleil *et al.*, 2004). Nosso trabalho corrobora a ideia de que uma técnica mais invasiva de marcação é desnecessária em estudos com *M. admirabilis* e indesejável por se tratar de uma espécie microendêmica e ameaçada.

Durante um ano de amostragem, não identificamos alterações no padrão de colorido de nenhum indivíduo recapturado, como já observado previamente em outros estudos com anfíbios (Denton & Beebee, 1993; Miranda *et al.*, 2005; Caorsi *et al.*, 2012). Kenyon *et al.* (2009) demonstraram mudanças na coloração dorsal de *Litoria genimaculata* em um intervalo de dois meses, mas validou o método de fotoidentificação para juvenis da mesma espécie em um período curto de tempo (Kenyon *et al.*, 2010), pois os indivíduos não apresentaram nenhuma variação ontogenética nas manchas. Provavelmente essa diferença nos resultados esteja associada ao tipo de mancha do padrão de colorido, as quais são muito conspícuas em *M. admirabilis* e não se alteram com a intensidade de luz, temperatura, umidade ou de acordo com o sexo dos indivíduos. A mesma justificativa foi sugerida por Caorsi *et al.* (2012) para *M. cambaraensis*. Sugerimos que novos estudos abordem a variação no padrão de coloração em jovens, visto que neste estudo o método foi testado somente em indivíduos adultos.

Indivíduos diferentes com padrão de coloração muito parecido poderiam levar a erros do tipo falso positivo, induzindo a identificação de uma recaptura em um evento de nova captura. A identificação deste tipo de erro só é possível se os indivíduos puderem ser reconhecidos por algum método independente. Neste estudo, testamos a existência de falsos positivos avaliando a eventual identificação de recapturas em um mesmo evento de captura (onde os indivíduos eram sabidamente diferentes). Esse tipo de erro não foi identificado em nosso estudo, nem pela fotoidentificação manual nem pela auxiliada pelo *software*, não apresentando indivíduos semelhantes em uma mesma amostragem.

A fotoidentificação manual gerou um erro muito baixo (0,67%) e mostrou-se muito eficiente quando comparada com a fotoidentificação auxiliada pelo *software* (13 erros; 2,89%). Ela somente falhou no reconhecimento de três recapturas e isso provavelmente se deu devido ao cansaço humano após uma série muito longa de comparações. Contudo, o tempo necessário para fotoidentificar um conjunto grande de imagens é um fator indiscutivelmente limitante da técnica. O reconhecimento auxiliado pelo *software*, no entanto, apresentou baixo tempo despendido em comparação com a fotoidentificação manual, contribuindo também para reduzir o erro causado pelo cansaço humano, visto que a tendência é aumentar o número de erros conforme aumenta o número de fotos a serem visualizadas. Além disso, o *software* Wild-ID teve um bom desempenho, sugerindo 92,11% das recapturas reconhecidas por ele nas três primeiras

posições. O *software* também foi capaz de reconhecer imagens com baixa resolução e até mesmo fora de foco.

A fotoidentificação auxiliada pelo *software* apresentou um número relativamente maior de erros, que podem ser inadmissíveis em alguns estudos ecológicos; falsos negativos podem superestimar o tamanho da população (Donnelly & Guyer, 1994; Bolger *et al.*, 2012), por exemplo, causando possíveis problemas de conservação. Contudo, o baixo tempo necessário torna o método uma alternativa de escolha para estudos com bancos de dados grandes. Na tentativa de aprimorar e ampliar a utilização do padrão de colorido como técnica de marcação, nossas observações acerca da utilização do *software* Wild-ID, assim como o resultado não significativo do teste qui-quadrado recalculado, demonstraram que a remoção do fundo (tornando-o homogêneo e sem sombras) foi a melhor alteração pós-processamento das imagens.

Consideramos, por fim, que a técnica de fotoidentificação pode ser eficientemente aplicada ao estudo de *M. admirabilis* e provavelmente de outras espécies do gênero. Nosso estudo permitiu também identificar potenciais fontes de erros, que podem ser observadas em outros estudos, visando aprimorar o processo. Ao longo de todas as tentativas de aprimoramento da fotoidentificação auxiliada por *software*, o nosso melhor resultado foi quando as fotografias não padronizadas foram simplesmente removidas. Ou seja, a fonte dos erros pôde ser reconhecida *a posteriori* e todas corresponderam a fotografias de qualidade inferior. Desenvolvemos a partir de nossos resultados um protocolo para anfíbios, baseado nas imagens não identificadas como recaptura pelo *software*:

- (i) *Precisão e boa qualidade das fotos.* Conforme já observado anteriormente por Whitehead (1990) e Kelly (2001), a baixa qualidade das imagens interfere no reconhecimento. Sugerimos que as fotografias sejam tiradas de preferência sempre por uma mesma máquina fotográfica ao longo do estudo, sempre com flash ou sempre utilizando outra luz externa e que o espécime seja fotografado diversas vezes, até que uma das fotos esteja com foco, sem brilho extra (os quais podem ser identificados como uma mancha pelo *software*) e com boa resolução;
- (ii) *Fundo homogêneo.* De preferência branco, pois reduz a formação de sombra e dá mais contraste ao padrão de colorido. Se for necessária a remoção posterior do fundo, o branco também facilita este processo;

- (iii) *Cinturas pélvica e escapular alinhadas.* A torção de uma das cinturas atrapalha no momento do reconhecimento, pois em uma fotografia o indivíduo pode estar torcido para um lado e na outra, para o outro, dificultando assim a identificação da posição das manchas;
- (iv) *Ângulo reto entre a lente da máquina fotográfica e a linha imaginária que tangencia o plano corporal sendo fotografado.* Da mesma forma que o item anterior, ângulos diferentes em imagens diferentes de um mesmo indivíduo podem atrapalhar no reconhecimento;
- (v) *Adicionar ao banco de dados caracteres observados nos indivíduos.* Desenhos formados pela aglomeração de manchas ou de pontos, deformidades, cicatrizes e algum comportamento individual (Beausoleil *et al.*, 2004; Kenyon *et al.*, 2010). Isso também ajuda a garantir a identificação caso ocorra alguma alteração no padrão de colorido;
- (vi) *Cortar as fotografias,* reduzindo a imagem à área de interesse (Bolger *et al.*, 2011);
- (vii) *Priorizar fotografias que estejam em um bom ângulo.* Na hora de selecionar a melhor foto para compor o banco de dados, escolher sempre a que estiver em melhor ângulo e não a de melhor resolução. A nitidez da foto pode ser melhorada num editor de imagens, a torção não;
- (viii) *Limitar a edição das fotos.* Somente editar as imagens que estiverem fora de foco ou muito escuras/claras;
- (ix) *Olhar sempre as três primeiras opções sugeridas pelo software.* Após a execução do *software* Wild-ID, mesmo que a recaptura seja indicada na primeira opção, olhar, no mínimo, as três primeiras posições. Durante nosso estudo, também pudemos observar que os indivíduos recapturados mais de uma vez, geralmente, apresentam todas as suas recapturas como imagens candidatas potenciais. Isto é, se um indivíduo foi capturado uma vez e teve duas recapturas, as duas provavelmente vão ser apresentadas em sequência como possíveis recapturas. Logo, se o *software* não reconhecer a primeira recaptura, quando a segunda for reconhecida, poderá também identificar a primeira.

REFERÊNCIAS

- Anderson, C. J. R., J. D. Roth, and J. M. Waterman. 2007. Can whisker spot patterns be used to identify individual polar bears? *Journal of Zoology* 273:333–339.
- Arzoumanian, Z., J. Holmberg, and B. Norman. 2005. An astronomical pattern-matching algorithm for computer-aided identification of whale sharks *Rhincodon typus*. *Journal of Applied Ecology*, 42:999-1011.
- Bailey, L.L. 2004. Evaluating elastomer marking and photo identification methods for terrestrial salamanders: marking effects and observer bias. *Herpetological Review*, 35:38-41.
- Beausoleil, N.J., D.J. Mellor, and K.J. Stafford. 2004. Methods for marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals. Department of Conservation, Wellington, 147 pp.
- Berger, L. 2001. The effect of toe-clipping on survival in metamorphs of western Palearctic water frogs (Anura, Ranidae). *Mitt Mus Nat Berl Zool Reihe*, 77(1):87-90
- Bolger, D.T., B. Vance, T. A. Morrison, and H. Farid. 2011. WildID User Guide: Pattern Extraction and Matching Software for Computer-Assisted Photographic Mark-Recapture Analysis. http://software.dartmouth.edu/Macintosh/Academic/Wild-ID_1.0.0.zip.
- Bolger, D.T., T.A. Morrison, B. Vance, D. Lee, and H. Farid. 2012. A computer-assisted system for photographic markrecapture analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00212.x.
- Bradfield, K.S. 2004. Photographic identification of individual Archey's Frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings. *DOC Science Internal Series*, 191:1-36.
- Briggs, J.L. and R.M. Storm. 1970. Growth and Population Structure of the Cascade Frog, *Rana cascadae* Slater. *Herpetologica*, 26(3):283-300.
- Cairo, S.L., and I.E. di Tada. 2005. Patrones de coloración de *Melanophryniscus* sp. (Anura: Bufonidae) en Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 16:44-51.

- Caorsi, V.Z., R.R. Santos, & T. Grant. 2012. Clip or Snap? An Evaluation of Toe-Clipping and Photo-Identification Methods for Identifying Individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of Herpetology*, 7(2):79-84.
- Caro, T.M. 1994. Cheetahs of the Serengeti Plains: group living in an asocial species. University of Chicago Press, Chicago, 478 pp.
- Clarke, R.D. 1972. Effect of Toe Clipping on Survival in Fowler's Toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Copeia*, 1:182-185.
- Crump, M.L., and N. J. Scott Jr. 1994. Visual encounter surveys. pp. 84-92. In: W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.A.C. Hayek, M.S. Foster, (Eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity - Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press. Washington D. C.
- Davis, T.M., and K. Ovaska. 2001. Individual Recognition of Amphibians: Effects of Toe Clipping and Fluorescent Tagging on the Salamander *Plethodon vehiculum*. *Journal of Herpetology*, 35(2):217-225.
- Denton, J.S. and T.J.C. Beebee. 1993. Reproductive strategies in a female-biased population of natterjack toads, *Bufo calamita*. *Animal Behaviour*, 46:1169-1175.
- Di Bernardo, M., R. Maneyro, and H. Grillo. 2006. New Species of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Journal of Herpetology*, 40(2):261-266
- Dixon, D.R. 2003: A non-invasive technique for identifying individual badgers *Meles meles*. *Mammal Review* 33: 92-94.
- Donnelly, M.A. and C. Guyer. 1994. Estimating population size - Mark-recapture. pp. 183-200. In: W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.A.C. Hayek, M.S. Foster, (Eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity - Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press. Washington D. C.
- Donnelly, M.A., C. Guyer, J.E. Jutterbock, and R.A. Alford. 1994. Techniques for marking amphibians. Appendix 2, pp. 277-284 In: W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.A.C. Hayek, M.S. Foster, (Eds). *Measuring and Monitoring*

Biological Diversity - Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press. Washington D. C.

Ferner, J.W. 2007. A Review of Marking and Individual Recognition Techniques for Amphibians and Reptiles. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Salt Lake City, 72 pp.

Ferner, J.W. 2010. Measuring and marking post-metamorphic amphibians. pp. 123-141. In: C.K. Dodd, (ed.). Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques. Oxford University Press. Oxford.

Forcada, J. & A. Aguilar. 2000. Use of photographic identification in capture-recapture studies of Mediterranean monk seals. *Marine Mammal Science*, 16: 767–793.

Foster G., H. Krijger, and S. Bangay. 2006. Zebra fingerprints: towards a computer-aided identification system for individual zebra. *African Journal of Ecology*, 45(2):225–227.

Funk, W.C., M.A. Donnelly, and K.A. Lips. 2005. Alternative views of amphibian toe-clipping. *Nature*, 433:193.

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

Gelder, J.J. van, and H. Strijbosch. 1996. Marking amphibians: effects of toe-clipping on *Bufo bufo* (Anura: Bufonidae). *Amphibia-Reptilia* 17:169-174.

Glockner, D.A. & S.C. Venus. 1983. Identification, growth rate, and behaviour of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) cows and calves in the waters off Maui, Hawaii 1977–1979. pp. 223–258 in R. Payne, (Ed.). Communication and behavior of whales. Westview Press, Colorado.

Goodall, J. 1986. The Chimpanzees of Gombe: patterns of behaviour. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 673 pp.

Halliday, T. 1994. Marking amphibians by toe-clipping. *Froglog*, 10:2-3.

- Hero, J.M. 1989. A simple code for toe clipping anurans. *Herpetological Review*, 20: 66-67.
- IUCN 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 October 2012.
- Kelly, M.J. 2001. Computer-aided photograph matching in studies using individual identification: an example from Serengeti cheetahs. *Journal of Mammalogy*, 82:440-449.
- Kenyon, N., A.D. Phillott, and R.A. Alford. 2009. Evaluation of photographic identification method (PIM) as a tool to identify *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology*, 4:403-410.
- Kenyon, N., A.D. Phillott, and R. A.Alford. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile greeneyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology*, 5:126-131.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological Methodology*. Menlo Park, California, 619 pp.
- Kurashina, N., T. Utsunomiya, Y. Utsunomiya, S. Okada, and I. Okochi. 2003. Estimating the population size of an endangered population of *Rana porosa brevipoda* Ito (Amphibia: Ranidae) from photographic identification. *Herpetological Review* 34:348–349.
- Leite, P.F. & R.M. Klein. 1990. Vegetação. pp. 113–150. In: *Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Geografia do Brasil, Vol. 2, Região Sul*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Liner, A.E., L.L. Smith., and S.B. Castleberry. 2007. Effects of Toe-Clipping on the Survival and Growth of *Hyla squirella*. *Herpetological Review*, 38(2), 143–145.
- Lowe, D. 2004. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International Journal of Computer Vision*, 60:91-110.
- May, R.M. 2004. Ethics and amphibians. *Nature*, 431:403.
- McCarthy, M.A., and K.M. Parris. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology*, 41:780–786.

- McCarthy, M.A. and K.M. Parris. 2008. Optimal marking of threatened species to balance benefits of information with impacts of marking. *Conservation Biology*, 22: 1506-1512.
- Measey, G.J. 2001. Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U.K. *Journal of Zoology*, 254:547-555.
- Measey, G.J., D.J. Gower, O.V. Oommen, and M. Wilkinson. 2003. A mark-recapture study of caecilian amphibian *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) in southern India. *Journal of Zoology*, 261: 129-133.
- Mellor, D.J., N.J. Beausoleil, and K.J. Stafford. 2004. Marking amphibians, reptiles and marine mammals: animal welfare, practicalities and public perceptions in New Zealand. Department of Conservation, Wellington. 55 pp.
- Miranda, T., M. Ebner, M. Solé, and A. Kwet. 2005. Estimativa populacional de *Pseudis cardosoi* com emprego de método fotográfico para reconhecimento individual. *Biociências*, 13: 49-54.
- Morrison, T., J. Yoshizaki, D. Bolger, and J. Nichols. 2011. Estimating survival with computer-assisted identification and mark-recapture: the problem of misidentification error. *Methods in Ecology and Evolution*, 2: 454-463.
- Parris, K.M. and M.A. McCarthy. 2001. Identifying effects of toe-clipping on anuran return rates: the importance of statistical power. *Amphibia-Reptilia*, 22: 275-289.
- Payne, R., O. Brazier, E.M. Dorsey, J.S. Perkins, V.J. Rowntree, and A. Titus. 1983. External features in southern right whales (*Eubalaena australis*) and their use in identifying individuals, pp. 371-445. In: Payne, R. (Ed.), *Communication and behavior of whales*. Westview Press, Colorado.
- Perry, G., M.C. Wallace, D. Perry, H. Curzer, and P. Muhlberger. 2011. Toe Clipping of Amphibians and Reptiles: Science, Ethics, and the Law. *Journal of Herpetology*, 45:547-555.
- Petersen, J.C.B. 1972. An identification system for zebra (*Equus burchelli*, Gray). *African Journal of Ecology*, 10: 59-63.

- Pham, L., S. Boudreaux, S. Karhbet, B. Price, A. Ackleh, J. Carter, and N. Pal. 2007. Population Estimates of *Hyla cinerea* (Schneider) (Green Tree Frog) in an Urban Environment. *Southeastern Naturalist*, 6(2): 203-216.
- Phillott, A.D., L.F. Skerratt, K.R. McDonald, F.L. Lemckert, H.B. Hines, J.M. Clarke, R.A. Alford, and R. Speare. 2007. Toe-clipping as an acceptable method of identifying individual anurans in mark recapture studies. *Herpetological Review* 38:305-308.
- Phillott, A., K. McDonald and L. Skerratt. 2011. Inflammation in digits of unmarked and toe-tipped wild hylids. *Wildlife Research* 38(3): 204-207.
- Schaller, G.B. 1972. The Serengeti Lion: A Study of Predator-Prey Relations. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Speed, C.W., M. G. Meekan & C.J.A. Bradshaw. 2007. Spot the match – wildlife photo-identification using information theory. *Frontiers in Zoology* 4: 1184-1182.
- Ursprung, E., M. Ringler, R. Jehle, and W. Hödl. 2011. Toe regeneration in the Neotropical frog *Allobates femoralis* (Aromobatidae). *The Herpetological Journal* 21: 83-86.
- Vaira, M. 2002. Variación de la coloración en poblaciones argentinas de *Melanophryniscus rubriventris* (Vellard, 1947). *Cuadernos de Herpetología*, 16(2): 151 – 163.
- Wells, K. D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago, 1148 pp.
- Whitehead, H. 1990. Computer Assisted Individual Identification of Sperm Whales Flukes. *Reports of the International Whaling Commission*, Special Issue 12:71–77.
- Whitehouse, A.M. and A. J. Hall-Martin. 2000. Elephants in Addo Elephant National Park, South Africa: reconstruction of the population's history. *Oryx*, 34: 46–55.