



SYSTEMATIC STUDIES AND CALL CHARACTERIZATION OF THE PEARLY TREE FROG, *Nyctixalus margaritifer* BOULENGER, 1882

ROULAND IBNUDARDA



ANIMAL BIOSCIENCES STUDY PROGRAM
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
BOGOR AGRICULTURAL UNIVERSITY
BOGOR
2024

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



STATEMENT REGARDING DISSERTATION AND SOURCES OF INFORMATION AND COPYRIGHT ASSIGNMENT

I hereby declare that the dissertation with the title “Systematic studies and call characterization of the pearly tree frog, *Nyctixalus margaritifer* Boulenger, 1882” is my written work with instruction from the supervisor and has not been submitted in any form to any college. Sources of information derived from or cited from published or unpublished works from other authors have been mentioned in the text and listed in the Bibliography at the end of this dissertation.

I hereby delegate the copyright of my written work to IPB University.

Bogor, September 2024

Rouland Ibnudarda
G362190061

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang menggunakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



SUMMARY

ROULAND IBNUDARDA. Systematic studies and call characterization of the pearly tree frog, *Nyctixalus margaritifer* Boulenger, 1882. Supervised by RR DYAH PERWITASARI, ACHMAD FARAJALLAH, and AMIR HAMIDY.

The genus *Nyctixalus* was first proposed in 1882 by Boulenger from a male specimen of *N. margaritifer* obtained from the East Indies. The genus *Nyctixalus* consists of three species, namely *Nyctixalus margaritifer* is restricted in Java Island, *Nyctixalus pictus* is widely distributed from Myanmar, Thailand, Malay Peninsula, Sumatra to Borneo, and *Nyctixalus spinosus* occurs in Philippines. Recent molecular studies have shown a high probability of genetic divergence in some populations of *N. pictus*. The vocalization characteristics of the genus *Nyctixalus* are currently only described in males of *N. pictus*. However, *N. margaritifer*, type species of the genus *Nyctixalus*, its acoustic reference is unknown. Therefore, this dissertation aimed to evaluate taxonomic status of *N. margaritifer* from several localities representing its whole range of distribution through molecular and morphological analysis and evaluate the systematic position of species in the genus. Henceforth, acoustic analyses were performed to characterize the call characters of *N. margaritifer* within its natural habitat and establish a comprehensive reference collection. The result showed that the *N. margaritifer* exhibited few significant differences in body ratios and there was no variation between morphology characters with another species within genus from Indonesia, *N. pictus*. The PCA analysis revealed that *N. margaritifer* population from Java formed a group, while *N. pictus* could not be separated on the scatter plot. Based on DNA barcoding using fragments of the mitochondrial 16S rRNA gene, the genetic distance within the population of both *N. margaritifer* and *N. spinosus* showed a variation of intraspecific genetic distance, respectively (0-1.52% in *N. margaritifer* and 0-0.2 in *N. spinosus*). The population within *N. pictus* exhibited high genetic diversity that showed the existence of multiple lineages ranging from 1 to 6, representing interspecific variations (4.3-9.9%). Based on the result of acoustic studies in *N. margaritifer*, it revealed that male calls were organized in note groups, which were arranged in different series. This fundamental note type had fast/shorter calls and was present in every note group. In certain conditions, male frogs emitted notes that were longer and slower compared to the fundamental note type. These notes were found to be the first (introductory) or last in a group of notes. Nevertheless, the female frogs recognized and responded to the conspecific acoustic stimuli. The response calls emitted after the call of note groups consisting of 10 and 12 notes. Additionally, the notes in male call and the reciprocal calls showed similar characteristics of an unpulsed, sparse spectrum and consisted of numerous harmonics. Nevertheless, further studies will help evaluate taxonomic status, particularly in *N. pictus* populations in Indonesia, and reveal anomalies of acoustic behaviour in *N. margaritifer*.

Keywords: amphibians, anura, bioacoustics, DNA barcoding, *Nyctixalus*, Southeast Asia

RINGKASAN

ROULAND IBNUDARDA. Studi sistematis dan karakterisasi panggilan katak pohon mutiara, *Nyctixalus margaritifer* Boulenger, 1882. Dibimbing oleh RR DYAH PERWITASARI, ACHMAD FARAJALLAH, dan AMIR HAMIDY.

Marga *Nyctixalus* pertama kali diusulkan pada tahun 1882 oleh Boulenger dari specimen jantan *N. margaritifer* yang diperoleh dari East Indies. Marga *Nyctixalus* terdiri dari tiga spesies, yaitu *Nyctixalus margaritifer* yang tersebar luas di Pulau Jawa, *Nyctixalus pictus* tersebar luas dari Myanmar, Thailand, Semenanjung Malaya, Sumatera hingga Kalimantan dan *Nyctixalus spinosus* terdapat di Filipina. Studi molekuler terbaru menunjukkan probabilitas tinggi divergensi genetik pada beberapa populasi *N. pictus*. Karakteristik vokalisasi dari marga *Nyctixalus* saat ini hanya dijelaskan pada jantan *N. pictus*. Namun, *N. margaritifer*, jenis dari marga *Nyctixalus*, referensi akustiknya tidak diketahui. Oleh karena itu, disertasi ini bertujuan untuk mengevaluasi status taksonomi *N. margaritifer* dari beberapa daerah yang mewakili seluruh rentang distribusinya melalui analisis molekuler dan morfologi dan mengevaluasi posisi sistematis jenis dalam marga *Nyctixalus*. Untuk selanjutnya, analisis akustik dilakukan untuk mengkarakterisasi karakter panggilan *N. margaritifer* dalam habitat aslinya dan membentuk koleksi referensi yang komprehensif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *N. margaritifer* menunjukkan sedikit perbedaan signifikan dalam rasio tubuh dan tidak ada variasi antara karakter morfologi dengan jenis lain dalam Marga dari Indonesia, *N. pictus*. Analisis PCA mengungkapkan bahwa populasi *N. margaritifer* dari Jawa membentuk kelompok, sedangkan *N. pictus* tidak dapat dipisahkan pada plot sebar. Berdasarkan barcode DNA menggunakan fragmen gen *16S* rRNA mitokondria, jarak genetik dalam populasi *N. margaritifer* dan *N. spinosus* menunjukkan variasi jarak genetik intraspesifik, masing-masing (0-1,52% pada *N. margaritifer* dan 0-0,2 pada *N. spinosus*). Populasi dalam *N. pictus* menunjukkan keragaman genetik yang tinggi yang menunjukkan adanya beberapa garis keturunan mulai dari 1 sampai 6, mewakili variasi interspesifik (4,3-9,9%). Berdasarkan hasil studi akustik pada *N. margaritifer*, ini terungkap bahwa panggilan jantan diatur dalam kelompok *note*, yang disusun dalam seri yang berbeda. Jenis *note* dasar ini memiliki panggilan cepat/pendek dan hadir di setiap kelompok *note*. Pada kondisi tertentu, katak jantan menghasilkan *note* yang lebih panjang dan lebih lambat dibandingkan dengan jenis *note* dasar. *Note* ini ditemukan hanya pada *note* pertama (pengantar) atau terakhir dalam sekelompok *note*. Namun demikian, penelitian ini menunjukkan bahwa katak betina mampu mengenali dan menanggapi rangsangan akustik yang spesifik. panggilan timbal balik yang dihasilkan setelah panggilan kelompok *note* yang terdiri dari 10 dan 12 catatan dari panggilan stimulus. Selain itu, *note* baik dalam panggilan jantan dan panggilan timbal balik menunjukkan karakteristik yang sama. Karakteristik *note* memiliki ciri dengan spektrum yang jarang dan tidak berdenyut (*unpulsed*) dan terdiri dari variasi deret harmonik. Namun demikian, penelitian lebih lanjut akan membantu mengevaluasi status taksonomi, khususnya pada populasi *N. pictus* di Indonesia, dan mengungkapkan anomali perilaku akustik pada *N. margaritifer*.

Kata kunci: amfibi, anura, akustik, DNA *barkoding*, *Nyctixalus*, Asia Tenggara



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

© Copyright belongs to IPB University, the year 2024
All Rights Reserved

It is forbidden to cite part or all of this paper without including or citing the source. Citations are only for education, research, writing scientific papers, preparing reports, writing criticisms, or reviewing a problem, and the citation does not harm the interests of IPB University.

It is prohibited to publish and reproduce part or all of this paper without IPB University's permission



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

**SYSTEMATIC STUDIES AND CALL CHARACTERIZATION
OF THE PEARLY TREE FROG, *Nyctixalus margaritifer*
BOULENGER, 1882**

ROULAND IBNUDARDA

Dissertation
as one of the requirements for obtaining
the Doctoral degree
in the Animal Biosciences Study Program

**ANIMAL BIOSCIENCES STUDY PROGRAM
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
BOGOR AGRICULTURAL UNIVERSITY
BOGOR
2024**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Advisory Committee External Examiner on Dissertation Closed Examination:

- 1 Windra Priawandiputra, S.Si., M.Si., Ph.D.
(Animal Biosystematics and Ecology, IPB University)
- 2 Dr. Rury Eprilurahman, S.Si. M.Sc.
(Animal systematics laboratory, Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada)

Advisory Committee External Examiner on Dissertation Promotion Examination:

- 1 Windra Priawandiputra, S.Si., M.Si., Ph.D.
(Animal Biosystematics and Ecology, IPB University)
- 2 Dr. Rury Eprilurahman, S.Si. M.Sc.
(Animal systematics laboratory, Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada)



Dissertation Title : Systematic studies and call characterization of the pearly tree frog, *Nyctixalus margaritifer* Boulenger, 1882
Name : Rouland Ibnudarda
NIM : G362190061

@Hak cipta milik IPB University

Approved by,

Supervisor 1:
Prof. Dr. Ir. RR. Dyah Perwitasari, M.Sc.



Supervisor 2:
Dr. Ir. Achmad Farajallah M.Si.



Supervisor 3:
Dr. Amir Hamidy, M.Sc.



Verified by

Head of Animal Biosciences Study Program:
Prof. Dr. Drs. Tri Atmowidi, M.Si.
NIP 196708271993031003



Dean of Faculty of Mathematics and Natural Sciences:
Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.
NIP 197807232007011001



The Dissertation Examination Date: 16 August 2024
The Doctoral Promotion Examination Date:
06 September 2024

Graduate Date:

PREFACE

In the name of Allah Almighty the omnipotent, the omnipresent, the Most Gracious and the Most Merciful who always bless me with sound health, realistic thinking and opportunity for higher study. Alhamdulillah all praises and gratitude to Allah subhanahu wa ta'ala for the strengths and His blessing in my life so that this scientific work was successfully completed. Sholawat and greetings are bestowed on the Prophet Muhammad SAW and his companions. This research was conducted from January 2021 until December 2023 with the title “Systematic studies and call characterization of the pearly tree frog, *Nyctixalus margaritifer* Boulenger, 1882”. This dissertation is submitted in partial fulfilment of the requirements for a Doctoral Degree for the author in Graduate School of Bogor Agricultural University. This work could only be succeeded thanks to the invaluable contribution of many people. Therefore, on this opportunity, the author would present a deepest acknowledgment and highest appreciation to:

1. Prof. Dr. Drs. Tri Atmowidi, M.Si., as the Head of the Animal Biosciences Study Program.
2. Prof. Dr. Ir. RR. Dyah Perwitasari, M.Sc., Dr. Ir. Achmad Farajallah, M.Si., and Dr. Amir Hamidy, M.Sc., as the Supervisor for all the wise advice and guidance. Thank for their kindness, patience and all their hard work in correction my Dissertation.
3. Ministry of Education and Culture, Research and Technology of Indonesia for generously funding this study under the Doctoral Dissertation Research Grant Implementation for the year 2022.
4. All laboratory assistants and staff of the Animal Biosciences Study Program, the Laboratorium of Herpetology and the Laboratorium of Genetics in the Research Center for Biosystematics and Evolution, National Research and Innovation Agency (BRIN).
5. My beloved family, my dad, my mom, and my sisters for your inspiration, motivation and encouragement.
6. Mr. Nyong, Mulyana, and Gunawan who has accompanied, motivated, and provided a lot of assistance during the field work.
7. To those who indirectly contributed in this research, your kindness means a lot for me.

Hopefully this scientific work is useful for those who need it and for the advancement of science. Thank you very much.

Bogor, September 2024

Rouland Ibnudarda



TABLE OF CONTENT

LIST OF TABLES	xiii
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF APPENDIXES	xiii
INTRODUCTION	1
1.1 Background	1
1.2 Research Problem	2
1.3 Research Aims	3
1.4 Benefits of This Research	3
1.5 Novelty of This Research	3
1.6 Research Stage	3
II Genetic variation and morphometric of genus <i>Nyctixalus</i> in Indonesia	5
2.1 Introduction	5
2.2 Material and Method	5
2.3 Results	8
2.4 Discussion	11
2.5 Conclusion	12
III A reference collection of the acoustic signals of male <i>Nyctixalus margaritifera</i> Boulenger, 1882 (Anuran: Rhacophoridae)	13
3.1 Introduction	13
3.2 Material and Method	13
3.3 Results	14
3.4 Discussion	16
3.5 Conclusion	17
IV Female reciprocal calling in <i>Nyctixalus margaritifera</i> (pearly tree frog) in West Java, Indonesia (Anura, Rhacophoridae)	18
4.1 Introduction	18
4.2 Material and Method	18
4.3 Results	19
4.4 Discussion	20
4.5 Conclusion	21
V GENERAL DISCUSSION	22
VI CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS	24
6.1 Conclusions	24
6.2 Suggestions	24
REFERENCE	25
APPENDIXES	37
BIOGRAPHY	50

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

LIST OF TABLES

1	Morphological character loadings, eigenvalues, and percentage of explained variance. The analysis was based on the residuals of the morphometric character of adult <i>N. margaritifer</i> and <i>N. pictus</i> . Bold figures indicate the highest loadings.	8
2	Acoustic parameters of the male <i>Nyctixalus margaritifer</i> .	15

LIST OF FIGURES

1	Research flowchart of systematic studies and call characterization of the pearly tree frog, <i>Nyctixalus margaritifer</i> Boulenger, 1882	4
2	An illustration showing physical location for the 24 morphometric measurements (A) ventral view, (B) dorsal view (C) lateral view. See the main text for the definitions of these characters	6
3	Principal Component Analysis plot based on seven size-corrected morphological characters genus <i>Nyctixalus</i> from Indonesia.	9
4	Maximum Likelihood phylogram showing the phylogenetic position and relationship within genus <i>Nyctixalus</i> , based on a 542 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene. Values at the branches indicate Neighbor Joining probability (NJB), Ultrafast Bootstrap Support (UFB), and Bayesian Posterior Probabilities (BPP).	10
5	Various note groups emitted by males of <i>Nyctixalus margaritifer</i> . A–B. note groups consisting of seven to eight notes from males from Telaga Warna, West Java. C. Note group of 12 notes emitted from a male from Mt. Slamet, Central Java	16
6	A male <i>Nyctixalus margaritifer</i> (A). B–C. general structure of notes within a note group. B. one of the basic/fundamental note types. C. one of the longer notes	16
7	A female <i>N. margaritifer</i> (A). The first type of call (B), the second type of call (C), the third type of call (D), and the note type structure of a male call (E).	20

LIST OF APPENDIXES

1	Samples of mitochondrial 16S rRNA gene from <i>Nyctixalus</i> and outgroup species analyzed along with voucher information, collection location, and GenBank accession number.	38
2	Measurements of adult male <i>N. margaritifer</i> and <i>N. pictus</i> . SVL (Mean \pm SD, in mm). * $P < 0.05$ See text for character abbreviations.	40
3	The neighbor-joining phylogram based on the studied 542 bp of the mitochondrial 16S rRNA gene. The value at the branch represents bootstrap support.	41



4	Bayesian consensus phylogram based on the studied 542 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene. Values at the branches indicate Bayesian Posterior Probabilities (BPP).	42
5	Average uncorrected p-distances (%) based on 542 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene within genus <i>Nyctixalus</i> .	43
6	Table of call distribution of males <i>N. margaritifer</i>	45
7	Figures of call distribution of males <i>N. margaritifer</i> . A – B. Male from Telaga Warna, C. Male from Mt. Slamet.	46
8	Table of call distribution of females <i>N. margaritifer</i> .	47
9	Figures of call distribution of females <i>N. margaritifer</i> . A – C. Female from Telaga Warna, D. Female from Situ Gunung.	49

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.