



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

SULAMITA PEREIRA GUIMARÃES

**COMPLEXOS *RHINELLA MARINA* E *RHINELLA GRANULOSA* (AMPHIBIA,
ANURA, BUFONIDAE): UMA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR**

SÃO LUÍS - MA
2018

SULAMITA PEREIRA GUIMARÃES

**COMPLEXOS *RHINELLA MARINA* E *RHINELLA GRANULOSA* (AMPHIBIA,
ANURA, BUFONIDAE): UMA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR**

Dissertação apresentado ao colegiado do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Área: Reprodução e conservação Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudene Barros –
CESC/UEMA

SÃO LUÍS – MA

2018

SULAMITA PEREIRA GUIMARÃES

**COMPLEXOS *RHINELLA MARINA* E *RHINELLA GRANULOSA* (AMPHIBIA,
ANURA, BUFONIDAE): UMA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR**

Dissertação apresentado ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação Mestrado em
Ciência Animal da Universidade Estadual do
Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Claudene Barros – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA

Prof. Dr. Mauro Sérgio Cruz Souza Lima – Membro
Doutorado em Biologia Animal
Universidade Federal do Piauí - CAFS/UFPI

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga – Membro
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA

A Deus, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu Deus, pois é a força que inspira a recomeçar todos os dias, a Ele devo meus talentos.

A minha querida orientadora Profa. Maria Claudene Barros pela orientação, pelos ensinamentos no qual durante todo esse tempo me ajudou a melhorar como profissional e como pessoa.

A Instituição de Ensino Universidade Estadual do Maranhão - UEMA pela formação. Ao programa de Pós-Graduação Ciência Animal pelo curso de mestrado.

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

Aos professores do programa de Mestrado em Ciência Animal.

Ao professor Elmary da Costa Fraga pela parceria e colaboração, sempre solícito a este trabalho.

Ao professor Mauro Sérgio pela parceria e colaboração.

A todos da turma 2017/2018 pela amizade e companheirismo nesses dois anos.

A todos da Família GENBIMOL pela amizade construída durante esses anos de pesquisa, em especial minhas amigas Maria Histelle e Samira Brito.

Aos amigos que conheci e que me acolheram durante o tempo em que passei em São Luís, Carmelita, Patrícia e Júnior, minha sincera gratidão.

A minha família por serem minha base. Minha mãe Francisca Guimarães, meu pai Antônio Francisco Guimarães, meu avô José Guimarães e meus irmãos: Aurilene, Jônatas, Josias e Jobson. A meus sobrinhos João Neto e Jeferson Naamã.

“Nada temos a temer quanto ao futuro, a menos que nos esqueçamos como Deus tem nos conduzido no passado”. (White, E.).

RESUMO

Os anfíbios do gênero *Rhinella* pertencem à família Bufonidae, possuindo grande diversidade, com 92 espécies, onde 20 destas espécies ocorrem na região meio norte do Brasil distribuindo se nos biomas Amazônico (Pará e Maranhão), Cerrado (Maranhão e Piauí) e Caatinga (Piauí). Este estudo objetivou identificar as espécies dos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* avaliando sua unidade evolutiva em áreas de biomas Amazônico, Cerrado, Caatinga e ecótonos na região meio norte do Brasil. Os espécimes foram obtidos através dos métodos: Procura Limitada por Tempo (PLT), Amostragem em Sítios Reprodutivos e Armadilha de Interceptação e Queda (*Pitfall trap*). O DNA total foi extraído, a partir de tecido muscular utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Promega. Para o isolamento e amplificação dos genes nucleares e mitocondriais foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos das PCRs foram purificados usando o kit ExoSap IT e submetidos à reação de sequenciamento. Os dados obtidos foram analisados em softwares específicos, tais como: BioEdit, MEGA, DNAsp e plataformas BLAST e BOLD Systems. Os dados deste estudo mostraram que através da morfologia externa foram identificadas espécies pertencentes a dois complexos *R. marina* e *R. granulosa*, onde o *Rhinella marina* compreende as espécies *R. marina*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis* e *Rhinella granulosa* as espécies, *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*. Além disso, foi identificada a espécie *R. margaritifera* que não faz parte de nenhum dos complexos. Diferentemente da morfologia, com o uso do gene rRNA16S, evidenciou-se o complexo *R. marina* formado apenas pelas espécies *R. schneideri* e *R. marina* e *R. granulosa* por *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*. A espécie *R. cf. margaritifera* foi confirmada como uma unidade evolutiva independente. A magnitude das divergências genéticas somada a filogenia indicaram que ocorre diferenciação interespecíficas entre e dentro dos complexos. No entanto não houve diferenciação para seis espécies como morfologicamente esperado, mas para apenas quatro espécies. Os dados apontam para hibridização e introgressão entre as espécies *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis*, isto é explicado por essas coabitarem e por geneticamente não haver diferenciação que separem em status taxonômicos distintos.

Palavras-Chave: Sapo, DNA, taxonomia.

ABSTRACT

Amphibians of the genus *Chaunus* belong to the family Bufonidae, possessing great diversity, with 93 species, where 20 of these species occur in the region North of Brazil being distributed in the biomes Amazon (Pará and Maranhão), Cerrado, if we Amazon biomes (Pará and Maranhão), Savannah (Maranhão and Piauí) and Caatinga (Piauí). This study aimed at identifying the species of the complex *Rhinella marina* and *chaunus granulatus* evaluating their evolutionary unit in areas of the Amazon, Cerrado, Caatinga biomes and ecotones in North region of Brazil. The specimens were obtained through the methods: Search limited by time (PLT), sampling in Reproductive Sites; Pitfall traps and by donations. Total DNA was extracted from muscle tissue using Genomic DNA Purification kit Promega Wizard. For the isolation and amplification of nuclear and mitochondrial genes was used the technique of polymerase chain reaction (PCR). The products of PCRs were purified using kit ExoSap IT and submitted to the sequencing reaction. The data obtained were analysed in specific software, such as: BioEdit, MEGA, DNAsp BLAST and BOLD platforms and Systems. The data from this study showed that through the external morphology were identified belonging to two species complex *R. marina* and *R. granulosa*, where the *R. marina* group comprises the species *R. marina*, *R. diptycha*, *R. jimi* and *R. cerradensis* and the *R. granulatus* species, *R. granulosa* and *R. mirandaribeiroi*. A specie *R. cf. margaritifera* foi confirmed as an independent evolutionary unit. A magnitude of genetic divergences somada a phylogeny indicate that ocrere interespecíficas difference between e within two complexes. No entanto não houve diferenciação for six species as morphologically expected, but for only four species. The data given for hybridization and introgression between the species *R. schneideri*, *R. jimi* and *R. cerradensis*, is explained by essas coabitarem e for genetically não haver diferenciação that separem em different taxonomic status.

Keywords: Frog, DNA, taxonomy.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Área de estudo, evidenciando os pontos de coletas nos biomas Amazônico, Cerrado, Caatinga e ecótonos (Pará, Maranhão e Piauí). 19
- Figura 2.** Espécies encontradas para este estudo. Complexo marina: A) *Rhinella marina*. B) *Rhinella schneideri*. C) *Rhinella jimi*. D) *Rhinella cerradensis*. Complexo granulosa: E) *Rhinella granulosa*. F) *Rhinella mirandaribeiroi*. Para a espécie *Rhinella margaritifera* não houve registro fotográfico. Fonte: QUEIROZ, (2016). 28
- Figura 3.** Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene rRNA 16S. Os valores de *bootstrap* estão na seguinte ordem: Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ). 32
- Figura 4.** Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando as espécies identificadas pelo gene rRNA16S. As cores representam as espécies da seguinte forma: vinho=*R. mirandaribeiroi*; Amarelo= *R. schneideri*; Vermelho; *R. granulosa*; Azul claro=*R. margaritifera*; Verde=*R. marina* 33
- Figura 5.** Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene COI. Os valores de *bootstrap* estão na seguinte ordem: Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ). 36
- Figura 6.** Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando as espécies identificadas pelo gene COI, na plataforma BLAST. As cores representam as espécies da seguinte forma: vinho=*R. mirandaribeiroi*; Amarelo= *R. schneideri*; Verde=*R. marina*. Azul =*R. jimi*; róseo=*R. ornata* 37
- Figura 7.** Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene RPL35. 40
- Figura 8.** Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando as espécies identificadas pelo gene RPL35 na plataforma BLAST. A cor representa a espécie *R. marina*. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidades amostradas neste estudo.	19
Tabela 2. Quantidade e concentrações de reagentes utilizados na PCR	22
Tabela 3. Relação de <i>primers</i> utilizados para amplificação de genes mitocondriais e nucleares em espécimes de anfíbios do gênero <i>Rhinella</i> .	22
Tabela 4. Distribuição e similaridade obtida para os haplótipos do gênero <i>Rhinella</i> de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BLAST.	29
Tabela 5. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Tamura 3- parâmetro para haplótipos do gênero <i>Rhinella</i> do Meio Norte do Brasil, com base em sequencias do gene rRNA 16S.	31
Tabela 7. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Tamura 3- parâmetro para haplótipos do gênero <i>Rhinella</i> do Meio Norte do Brasil, com base em sequencias do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).	35
Tabela 8. Distribuição e similaridade obtidas para os haplótipos do gênero <i>Rhinella</i> de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BLAST.	38
Tabela 9. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Kimura 2- parâmetro para haplótipos do gênero <i>Rhinella</i> do Meio Norte do Brasil, com base em sequencias do gene Ribosomal Protein Lateral - RPL 35.	39
Figura 8. Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando a espécie identificadas pelo gene RPL35 na plataforma BLAST A cor representa a espécie <i>R. marina</i> .	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Incertezas taxonômicas do gênero <i>Rhinella</i>	14
2.2 Evidências de diversidade críptica em anuros	15
2.3 Evidências de híbridos em <i>Rhinella</i>	16
2.4 O uso de marcadores moleculares	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral	18
3.2 Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Área de Estudo	19
4.2 Obtenção das Amostras	20
4.3 Preparação e Identificação do material biológico	20
4.4 Técnicas moleculares	21
4.4.1 Extração do DNA	21
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	22
4.4.3 Sequenciamento do DNA	23
4.4.4 Análises dos dados	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Dados Morfológicos	25
5.1.1 Espécies do complexo <i>marina</i>	25
5.1.2 Espécies do complexo <i>granulosa</i>	25
5.1.3 Espécie <i>R. margaritifera</i> Laurenti, 1768	27
5.2 Dados Moleculares	28
5.2.1 Gene <i>rRNA 16S</i>	28
5.2.2 Gene <i>Citocromo Oxidase Subunidade (COI)</i>	33
5.2.3 Gene <i>Ribosomal Protein Lateral – RPL 35</i>	34
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	44
REFERENCIA	46

1 INTRODUÇÃO

Os tetrápodes da classe Amphibian (do grego *amphi*, duas, e *bios vida*) possuem modo de vida duplo e possivelmente foram os primeiros vertebrados a habitar o ambiente terrestre. Os grupos de anfíbios vivos surgiram no Triássico e pertencem à subclasse Lissamphibia. Estes são classificados em quatro clados distintos: Albanerpetonídeos que estão extintos; Anura que compreendem os sapos, rãs e pererecas; Urodela, compostos por salamandras e tritões e Gymnophiona, formados por Cecílias ou Apodes. De acordo com Frost (2018) são conhecidas cerca de 7.919 espécies de anfíbios, sendo na maioria anuros.

Os anuros possuem um papel importante no meio ambiente, sendo seu destaque principal a cadeia alimentar, onde atuam como reguladores de populações de invertebrados e ainda como fonte de alimento para algumas espécies de vertebrados, até mesmo para a espécie humana, a exemplo a ranicultura (CARDOZO JUNIOR, 2014; SEGALLA et al., 2018). Esses animais habitam o ambiente terrestre e dependem da água ou locais úmidos para a sua sobrevivência, principalmente para a sua reprodução e proteção de sua pele sensível. São considerados bioindicadores do meio ambiente, assim quando há alguma modificação como mudança de temperatura, umidade, diminuição ou ausência de água, ou mudança na vegetação, eles reagem a essas alterações refletindo em diminuição de suas populações e susceptibilidade a doenças ou mesmo extinção (TOLEDO, 2009).

Outra função dos anuros é o crescente uso de secreções retiradas da sua pele para a produção de fármacos como anestésicos, antimicrobianos, cicatrizantes e produtos cosméticos. Além do seu valor cultural na sabedoria popular, no folclore e em histórias de contos de fadas. São essenciais também em ensaios de experimentos científicos, onde por vezes são usados como cobaias (DORNELLES et al., 2010; FROST, 2018).

Os anuros estão distribuídos em 52 famílias, dentre estas a família Bufonidea com 52 gêneros, sendo um deles o gênero *Rhinella* Fitzinger, 1826, que compreende 93 espécies que se distribuem amplamente no mundo (FROST, 2018). As espécies deste gênero são conhecidas popularmente como “sapos-cururus”, sendo caracterizadas por apresentarem a pele rugosa e patas relativamente curtas. Possuem adaptação ao modo de vida terrestre na sua grande maioria (com ressalva para algumas espécies arborícolas) e portam duas glândulas paratóides localizadas

dorsalmente atrás dos olhos. Entre as espécies existem variações quanto aos caracteres morfológicos, tamanho corporal, coloração e modo de vida (SEGALLA et al., 2018).

A sistemática do gênero *Rhinella*, não é conclusiva o bastante para compreender as relações das espécies pertencentes ao gênero (FROST, 2018). As evidências morfológicas, acústicas e ecológicas não têm sido suficientes para elucidar com precisão os complexos. Nesse sentido, questões de ausência de sinapomorfias, reagrupamento de espécies para o gênero *Rhinella*, ampla diversidade taxonômica, variação morfológica inter e intraespecíficas têm levado a uma grande discussão quanto a taxonomia do gênero (FROST, 2006).

A região meio norte do Brasil é considerada uma área de transição entre os biomas Amazônico, Cerrado e Caatinga, formando áreas de ecótonos (Amazônia-Cerrado e Cerrado-Caatinga). Nessas áreas há constante contato entre diferentes comunidades ecológicas e suas interações, sendo abundante nesse tipo de ecossistema espécies provenientes dos biomas que o formam ou até mesmo espécies endêmicas. Para esta região há registro de 20 espécies do gênero *Rhinella* (FROST, 2018), no entanto muitas dessas espécies são representadas por complexos de espécies o que evidencia uma problemática taxonômica.

Este estudo usa a ferramenta molecular para inferir quanto à diversidade críptica dos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* na região meio norte do Brasil, além de fornecer informações quanto aos padrões de distribuição geográfica das espécies, diversidade genética, introgressão e hibridização, contribuindo assim para esclarecimentos da taxonomia do grupo, distinção de espécies e informações que podem servir para subsidiar futuras medidas de conservação desse grupo.

Assim, considerando a extensão geográfica da área estudada, que abriga uma grande diversidade de espécies do gênero *Rhinella*, a problemática levantada neste estudo tem sido resumida nas seguintes questões:

Rhinella marina é composta de apenas uma unidade evolutiva significativa? ou *Rhinella marina* é composta por mais de uma unidade evolutiva significativa, existindo diversidade críptica?

Rhinella granulosa é composta de apenas uma unidade evolutiva significativa? ou *Rhinella granulosa* é composta por mais de uma unidade evolutiva significativa, existindo diversidade críptica?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Incertezas taxonômicas do gênero *Rhinella*

Anura é uma das ordens mais diversas dentre os vertebrados, possuindo distribuição cosmopolita, exceto apenas na latitude norte do globo terrestre, Antártida e parte das ilhas oceânicas. Contudo é nas regiões tropicais que encontra-se a predominância das espécies desta ordem, principalmente na região da América do Sul, local onde se agrega grande parte da diversidade de anfíbios (FROST, 2018).

O gênero *Rhinella* foi revalidado por Frost et al. (2006) e posteriormente redefinido por Chaparro et al. (2007) onde este incluiu a maioria das espécies sul-americanas previamente atribuídas ao gênero *Bufo*. Grande parte das espécies alocadas em “*Bufo*” eram reconhecidas com base em caracteres osteológicos e morfologia externa, entre eles os grupos: *Rhinella crucifer*, *Rhinella granulosa*, *Rhinella margaritifera*, *Rhinella marina*, *Rhinella spinulosa* e *Rhinella veraguensis* (TIHEN, 1962; CEI, 1972; MARTIN, 1972; DUELLMAN e SCHULTE, 1992).

Os estudos filogenéticos de Pramuk (2006) com base em análises de dados morfológicos e moleculares, não revelou evidência de monofilia para *R. spinulosa* e *R. veraguensis* e recuperou *Rhamphophryne* para o gênero *Rhinella*. Grant e Bolívar (2014) definiram o grupo *Rhinella acrolopha* compreendendo as espécies do antigo *Rhamphophryne*. Atualmente, a monofilia de alguns grupos de espécies, como *R. marina*, *R. spinulosa* e *R. veraguensis* não são corroborados e várias espécies não fazem parte de qualquer grupo (VALLINOTO et al., 2010; PYRON e WIENS, 2011; MORAVEC et al., 2014).

O gênero *Rhinella* foi considerado morfológicamente conservado, embora algumas sinapomorfias possam ser usadas para diagnosticar grupos de sapos da América do Sul como: *R. margaritifera*, *R. marina*, *R. granulosa*, *Rhaebo guttatus* e *Incilius valliceps*. No entanto a escassez de variação em caracteres osteológicos tem dificultado a separação de algumas espécies dentro desses grupos (PRAMUK, 2006). Essas incertezas taxonômicas prevalecem e tem evidenciado a existência de espécies crípticas para esses grupos.

O complexo *Rhinella marina* é composto por cerca de 10 espécies e apesar de muito estudado (fisiologia e ecologia) sua taxonomia ainda não está resolvida. Cerca de 31 sinônimos foram propostos ao longo de sua história taxonômica

(FROST, 2015) isto evidência a complexidade deste táxon. Os traços morfológicos podem ser pouco informativos para amostrar os limites das espécies, as dúvidas sobre sua evolução estão no fato de não ser conhecido se as espécies evoluíram sob uma forte seleção estabilizadora que reduz as variações morfológicas ou se o comportamento ecológico está baseado em características não morfológicas, como ocorre com mais frequência em anuros (BORKIN et al., 2004; STUART et al., 2006).

O complexo *Rhinella granulosa* compreende cerca de 13 espécies, no entanto há grande controversa. O comportamento reprodutivo das espécies deste complexo, como em muitos outros bufonídeos, é caracterizado por congregações de reprodução explosiva e competitiva (WELLS, 2007; NARVAES & RODRIGUES, 2009) situações estas que são favoráveis à hibridação (GREEN & PARENT, 2003; FONTENOT et al., 2011). Dados de genes mitocondrial e nuclear mostram introgressão neste complexo (FONTENOT et al., 2011; SEQUEIRA et al., 2011; GARCIA-PORTA et al., 2012).

2.2 Evidências de diversidade críptica em Anuros

A principal dificuldade encontrada para a elucidação da taxonomia em anuros é a prevalência de espécies crípticas (ELMER et al., 2007; JUNGFER, 2013). Estas ocorrem tanto em bioma Amazônico quanto de Cerrado e por sua vez ainda compartilha com biomas vizinhos, incluindo a Caatinga. O bioma Caatinga, junto a estes, também reserva espécies com expressivo endemismo (JUNGFER, 2013).

Os estudos relacionados à filogenia dos anuros baseado somente em características morfológicas, pode resultar em análises errôneas como árvores de baixa resolução, que apenas reflete a evolução conservativa dos anuros sem sinal filogenético significativo (AUSTIN et al., 2002).

A existência de espécies crípticas pode ser considerada como erro de identificação, nos casos em que a morfologia se mostra conservada. Este fato ocorre devido a diferenciação ou especiação recente em um determinado grupo, onde os traços morfológicos não divergiram o suficiente para serem usados como base confiáveis na identificação (BICKFORD et al., 2006).

Os anuros possuem morfologia altamente conservada, o que torna difícil selecionar características externas para identificá-los facilmente, e quando somado ao alto grau de convergência existente nesse grupo, impede a definição correta de sua filogenia por meio de características morfológicas (FOUQUET et al., 2007).

Os estudos mostram que para se entender melhor a evolução de anfíbios anuros é necessário uma revisão taxonômica, através de dados moleculares (FOUQUET et al., 2007; ELMER e CANNATELLA, 2008; PADIAL e DE LA RIVA, 2009). Fouquet et al. (2007) relata que a sistemática dos anfíbios é confusa e subestimada, sendo assim delimitar as espécies precisamente é de extrema importância do ponto de vista da biogeografia, ecologia, macroevolução e para a conservação.

2.3 Evidências de híbridos no gênero *Rhinella*

Os aspectos da variação morfológica sempre foram incorporados na taxonomia de anuros, mais recentemente a resolução taxonômica tem combinado dados morfológicos com diversificação genética para elucidar, por exemplo, a diversificação de linhagens nas espécies crípticas (ORTEGA-ANDRADE et al., 2015; CLEMENTE-CARVALHO et al., 2016).

Os híbridos de acordo com Wagner-jr (1969) e Haddad et al. (1990) sempre foram uma incógnita para os estudos de biologia evolutiva, sendo considerados como ocorrências pouco frequente. No entanto foi observado que o processo de hibridização ocorre de forma muito comum e com bastante frequência entre as espécies (ABBOTT et al., 2013), sendo um importante fenômeno para evolução e especiação, tanto em espécies animais, quanto vegetais (VANHAECKE et al., 2012; ABBOTT et al., 2013).

A presença ou ausência de híbridos no meio ambiente é algo complexo, não existindo um entendimento real de sua atuação, já que não é estabelecida a forma que estes surgem no meio, se por interações naturais ou decorrentes de mudanças ambientais (ALLENDORF et al., 2001; DETWILER et al., 2005; SEEHAUSEN et al., 2008).

As espécies de anuros em que há hibridização são marcadas por apresentarem modo de reprodução rápida e competitiva, onde por vezes a escolha da fêmea não ocorre de forma correta, isso devido a aglomerados dos espécimes em determinado ambiente, onde não há defesa territorial pelos machos, isso implica na escolha de parceiros de uma outra espécie para a reprodução, ou seja, muitas vezes ocorre acasalamento entre espécies distintas (PEARL et al., 2005; WELLS, 2007).

O uso de marcadores moleculares em espécies simpátricas, incorporação da análise de caracteres morfológicos e acústicos tornam possível verificar se há presença, frequência e/ou possíveis mecanismos de hibridização em anuros, mesmo nos grupos onde o sistema de reprodução é complexo (HADDAD et al., 1994; FROST, 2017).

Os estudos genéticos mostraram evidências de espécies com problemas taxonômicos dentro do complexo *R. marina*, como a presença de espécies crípticas e ruptura filogenética em populações. Outras questões que têm sido levantada para este complexo é que a história evolutiva independe da morfologia e que as populações podem estar incorporando características morfológicas através de introgressão e eventos de hibridização. Isto é evidente entre as espécies *R. marina* com *R. schneideri* (FROST, 2017; ACEVEDO, 2016).

A hibridização também é um evento aparentemente comum no complexo *Rhinella granulosa*, tendo relatos de híbridos entre *R. bergi* x *R. major*; *R. dorbignyi* x *R. fernandezae*; *R. fernandezae* x *R. major*; *R. granulosa* x *R. mirandaribeiroi* e *R. major* x *R. mirandaribeiroi* (GALLARDO, 1969; NARVAES & RODRIGUES, 2009; PEREYRA, 2015). Relações de híbridos entre espécies deste complexo também mostram a espécie *Rhinella pombali* sendo reconhecida como um híbrido entre *R. ornata* e *R. crucifer* que passou a ser sinônimo júnior das duas espécies (THOMÉ et. al. 2012).

2.4 O uso de marcadores moleculares

O uso de marcadores moleculares tem mostrado resultados importantes em estudos que envolvem padrões de variação genética, estrutura de populações, filogenia, filogeografia, sistemática e identificação de espécies. Através dessa metodologia tem sido encontradas respostas para a problemática taxonômica, introgressões e eventos de hibridização (PEREYRA, 2015; ACEVEDO, 2016).

Genes individuais do genoma mitocondrial e nuclear vêm sendo utilizados como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, tais como variabilidade, padrões de migração, seleção e deriva genética. Evolutivamente o genoma mitocondrial possui conteúdo genético conservado e com elevada taxa evolutiva, por outro lado o genoma nuclear tem taxas evolutivas baixas, assim a combinação de marcadores pertencentes a estes

dois genomas formam uma importante ferramenta na resolução de incertezas taxonômicas (ARIAS et al., 2003).

Dentre os genes do genoma mitocondrial o gene rRNA 16S que é usado neste estudo apresenta-se conservado com baixas taxas de mutações, no entanto possui regiões variáveis que possibilita estudos filogenéticos ao nível de espécie. Este gene vem sendo utilizado como o *DNA Barcoding* para identificar espécies de anfíbios (VENCES et al., 2005; MOTA, 2010).

O gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) por possuir divergências intraespecíficas menores que as interespecíficas funcionam como um bom marcador molecular apresentando um código de barra único para cada espécie (HEBERT et al., 2003; SILVA, 2012). Esta subunidade representa o *DNA Barcoding* que está sendo utilizado em grande escala como um método de rotina para auxiliar na identificação de espécies de vertebrados e tem sido proposto como marcador universal de espécies (HENRIQUES, 2010; CAMINER & RON, 2014).

Os Ribosomal Protein Lateral - RPL são genes com produtos proteicos, que codificam proteína ribossômica componente da subunidade 60S, normalmente codificam proteínas localizadas no citoplasma, existem múltiplos pseudogenes processados deste gene dispersos através do genoma.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a diversidade críptica dos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* a fim de definir quanto a sua unidade evolutiva nos biomas Amazônico, Cerrado, Caatinga e área de ecótonos do meio norte do Brasil.

3.2 Específicos

➤ Identificar as espécies do gênero *Rhinella* pertencentes aos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* de ocorrência no meio norte do Brasil utilizando sequências de DNA;

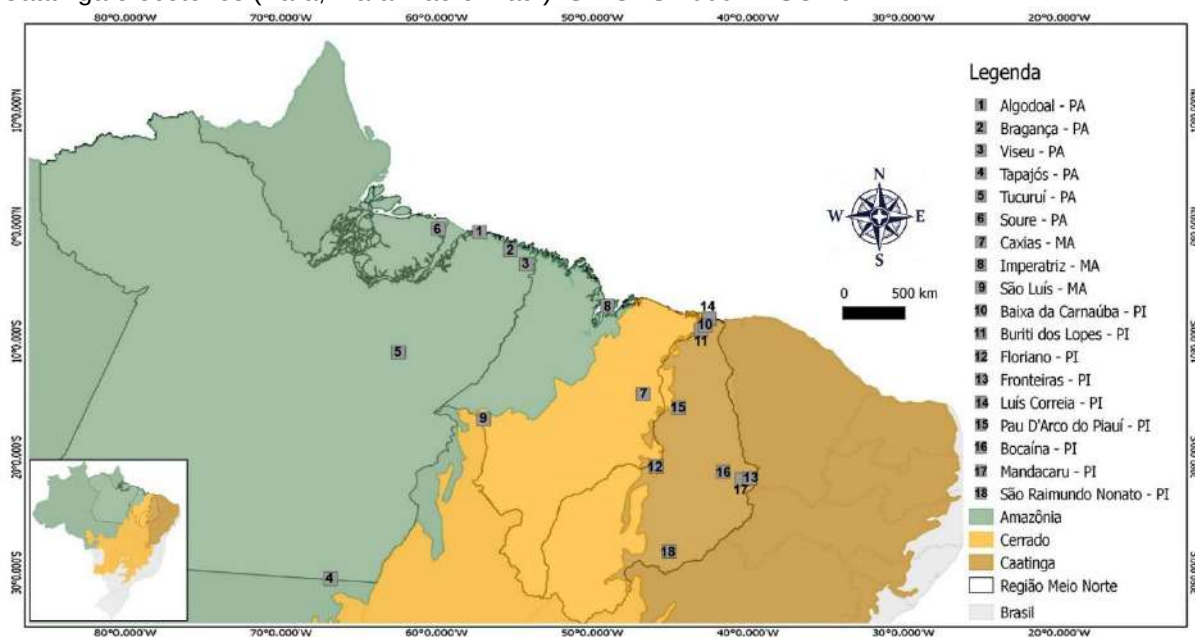
- Estimar a diversidade genética intra e interespecífica das espécies dos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* utilizando sequências dos genes mitocondriais e nuclear;
- Investigar questões de introgressão e hibridização dos complexos de espécies *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* nos biomas Amazônico, Cerrado e Caatinga e áreas de ecótonos utilizando sequenciamento de DNA mitocondrial;
- Fornecer dados informativos quanto aos padrões de distribuição geográfica das espécies do gênero *Rhinella* pertencentes aos complexos de espécies *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* de ocorrência na região meio norte do Brasil.
- Contribuir com informações para medidas de conservação destes grupos da anurofauna.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

Este estudo foi realizado na região meio norte do Brasil em biomas Amazônico, Cerrado, Caatinga e áreas de ecótonos: Cerrado/Amazônia e Cerrado/Caatinga, em pontos específicos localizados nos estados do Pará, Maranhão e Piauí (Figura 1 e Tabela 1).

Figura 1. Área de estudo, evidenciando os pontos de coletas nos biomas Amazônico, Cerrado, Caatinga e ecótonos (Pará, Maranhão e Piauí). SIRGAS 2000 EPSG:4674.



FONTE: autor.

Tabela 1. Localidades amostradas neste estudo.

Localidades		Coordenadas geográficas
Estados	Cidades	
Maranhão	Caxias	04° 51' 32" S 43° 21' 22" W
	Imperatriz	05° 31' 35" S 47° 29' 30" W
	São Luís	02° 31' 47" S 44° 18' 10" W
Pará	Vizeu	01° 11' 48" S 46° 08' 24" W
	Bragança	01° 03' 13" S 46° 45' 56" W
	Algodoal	00°35'19.46"S 47°34'28.38"W
	Souré	00° 43' 00" S 48° 31' 24" W
	Tapajós	09°44'8.54"S 51°25'10.34"W
	Tucuruí	03° 45' 58" S 49° 40' 21" W
Piauí	Bocaina	06° 56' 33" S 41° 19' 21" W
	Pau Dar'co	5°13'46.45"S 42°27'10.12"W
	Floriano	06° 46' 01" S 43° 01' 21" W
	Fronteiras	07° 05' 17" S 40° 36' 59" W
	Mandacaru	07° 7'0.00"S 40°49'0.00"W
	São Raimundo Nonato	09° 00' 55" S 42° 41' 58" W
	Baixa da Carnaúba	03° 3'32.66"S 41°45'46.95"W
	Buriti dos Lopes	03° 10' 46" S 41° 52' 12" W
	Luís Correia	02° 52' 45" S 41° 40' 01" W

4.2 Obtenção das Amostras

Os espécimes foram obtidos através de coletas na área de estudo que ocorreram por meio de expedições aos pontos amostrados, com pelo menos uma visita em cada ponto, a amostragem incluiu tanto áreas de ecótonos quanto áreas de biomas predominantes. Cada expedição durou em média três dias.

As coletas foram realizadas nos períodos diurno e noturno através dos métodos: Busca ativa que consiste em procura visual e auditiva em locais propícios a presença de anfíbios em períodos diurnos e noturnos; Amostragem em Sítios Reprodutivos, onde procura-se as espécies de forma visual e auditivamente durante o período noturno e Armadilha de Interceptação e Queda que consiste de recipientes enterrados no solo (*pitfalls*) e interligados por cercas-guia (*Pitfall trap*) (VANZOLINI & PAPAVERO, 1967; WILLAMS & BRAUN, 1983; LEMA & LEITÃO-DE-ARAÚJO, 1985; FRANCO et al., 1992; HEYER ET AL., 1994; CORN, 1994; CECHIN & MARTINS, 2000).

Além destas, foram obtidas amostras do Núcleo de pesquisa de História Natural da Universidade Federal do Piauí. As coletas foram licenciadas por: IBAMA/ SISBIO N° 31119-1 e N°61118-1.

4.3 Preparação e Identificação do material biológico

Os espécimes coletados em campo foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA, onde foram identificados morfológicamente com auxílio de bibliografia especializada com base em caracteres morfológicos e dados de distribuição geográfica (FROST et al., 2018). Após a identificação foram fotografados e eutanasiados por superdosagem de anestésico (Cloridrato de Lidocaína 2%). Amostras de tecido muscular (membros inferiores e fígado) foram coletadas e armazenadas em microtubos (1,5 ml) contendo álcool 70%. Após este procedimento os espécimes foram fixados em formol a 10%, após 48 horas foram fixados em álcool 70% e armazenados (AURICCHIO & SALOMÃO, 2002).

4.4 Técnicas Moleculares

4.4.1 Extração do DNA

O DNA total foi extraído de tecido muscular utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Promega, seguindo indicações do fabricante que consistiu em:

- Adicionou-se um fragmento de 20mg tecido em um microtubo de 1,5 ml;
- Preparou-se uma solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), em quantidade proporcional as amostras;
- Misturou-se a solução manualmente;
- Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos (proporcional à quantidade dos reagentes), com cuidado para não congelar;
- Para cada µl de cada amostra, utilizou-se 300 µl da solução preparada
- Colocou-se 15 µl de proteinase K e deixou-se as amostras em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido (cerca de 3hs);
- Adicionou-se 10 µl de RNase e levou-se os tubos à estufa a 37° C por 30 minutos;
- Após retirou-se as amostras da estufa adiciona-se 150 µl do reagente Protein Precipitation.
- Agitou-se delicadamente os tubos;
- Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- Colocou-se no freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;

- Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 rpm;
- Adicionou-se o sobrenadante a um novo tubo
- Adicionou-se 600 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
- Agitou-se (homogeneíza-se) gentilmente os tubos;
- Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- Descartou-se o isopropanol e colocou-se o tubo sobre papel absorvente;
- Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA;
- Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- Descartou-se o álcool;
- Submeteu-se as amostras a um spin;
- Retirou-se o excesso de álcool com a ponteira branca, tomando cuidado para não remover o pellet;
- Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;
- Colocou-se 50 µl de solução DNA rehydration ou TE;
- O DNA foi visualizado por meio de um sistema de eletroforese em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol). A concentração do DNA extraído também foi analisada através de quantificação no espectrofômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.4.2 *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Para o isolamento e amplificação dos genes mitocondriais e nucleares foi utilizado a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando um termociclador convencional em tubos de 0,2 ml com um volume total de 25 µL nas proporções evidenciada na tabela 2.

Tabela 2. Quantidade e concentrações de reagentes utilizados na PCR.

Reagentes/Concentrações	Quantidade
DNTPs (1,25 M)	4 µL
Solução tampão (10x)	2,5 µL
Solução de MgCL ₂ (50 mM)	0,5 µL
DNA (250 ng/ µL)	1 µL
Primer 1 (200 ng/ µL)	0,25 µL
Primer 2 (200 ng/ µL)	0,25 µL
Taq polimerase (5U/ µL)	0,2 µL
Água de injeção	16,30 µL
TOTAL	25 µL

O protocolo de amplificação genica ocorreu com uso de *primers* específicos como descrito na tabela 3.

Tabela 3. Relação de *primers* utilizados para amplificação de genes mitocondriais e nucleares em espécimes de anfíbios do gênero *Rhinella*.

GENOMAS	GENES	PRIMERS	Autores
Mitocondrial	rRNA 16S	16SL 1987 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' 16SH 2609 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	(PALUMBI et al. 1991)
	COI	M13FAnF1 5' TGTAACACGACGGCCAGTHAAYCAYAAAGAYATYGG 3' M13RAnR1 5' CAGGAAACAGCTATGACCCRAARAATCARAADARRTGTTG3'	(Mariana Lyra – comunicação pessoal).
Nuclear	RPL35	RPL35F 5' AAGAAGTCYACCTCATGGAGAT 3' RPL36RA 5' AGTTTCTTTGTGTGCCAACGGCTAG 3'	(SEQUEIRA et al. 2011).

A amplificação gênica para o gene rRNA 16S consistiu em 30 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 5 minutos (Desnaturação); 50°C por 1 minuto (*Annealing*) e 72°C por 2 minutos (Extensão). Inicialmente ocorreu uma desnaturação de 5 min a 94°C e ao final da reação uma extensão 7 minutos a 72°C.

O protocolo de amplificação para o gene COI consistiu de 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 5 vezes à 95°C por 30s (Desnaturação); 48°C por 30s (*Annealing*); 60°C por 1: 30s (Extensão) e 30 vezes à 95°C por 30s (Desnaturação); 50°C por 30s (*Annealing*) e 60°C 1: 30s (Extensão). Inicialmente ocorreu uma desnaturação de 95°C por 3 minutos e ao final uma de extensão de 3 minutos por 60°C.

Para os genes nucleares o protocolo consistiu de 40 ciclos com os seguintes parâmetros: 92°C por 30s (Desnaturação); 50°C por 30s (*Annealing*); 70°C por 90s (Extensão). Inicialmente ocorreu uma desnaturação de 92°C por 5 minutos e ao final uma extensão de 5 minutos por 72°C.

Ao final de cada reação os produtos de PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1%.

4.4.3 Sequenciamento do DNA

Os produtos das PCRs foram purificados usando o kit ExoSap IT de acordo com o fabricante e submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger et al. (1977) com o Kit *ABI Prism™ Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Reading Reaction* (Applied Biosystems).

Para reação de sequência foram utilizados: 4µl de H₂O; 1,5µl de Buffer; 2µl de Primer (0,8 pmol/µl); 1,5µl de DNA; 1µl de Big Dye. O programa de amplificação para

reação de sequência consistiu-se em 35 ciclos de 96° C a 1 minuto, 96° C a 15 segundos, 50° C a 15 segundos e 60° C a 4 minutos. Os produtos da reação de sequência foram submetidos ao seguinte protocolo.

- Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionou-se 2,5µl de EDTA (125 mM);
- Vedou-se a placa e submeteu-se a um spin;
- Adicionou-se 30µl de Etanol 100%;
- Vedou-se a placa e misturou-se invertendo 4-5x;
- Envolheu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e seca-se sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- Adicionou-se 30µl de Etanol a 70%;
- Vedou-se a placa;
- Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 segundos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secou-se sobre o papel absorvente;
- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- Congelou-se a placa com Formamida (10µl) para sequenciar

Após precipitação o produto da reação foi submetido ao sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) instalado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular no CESC/UEMA.

4.4.4 Análises dos dados

As sequências foram analisadas em softwares específicos, sendo editadas e alinhadas no programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2, (HALL, 1999). O número de sítios variáveis, conservados e informativos para parcimônia, modelo evolutivo, matriz de divergência genética e árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ) utilizando o algoritmo Tamura-3-Parâmetros foram obtida no programa MEGA 7.0. (KUMAR et al., 2016). O número

de haplótipos, foram estimados no DNAsp versão 5 (ROZAS et al., 2006). As redes de haplótipos foram obtidas com o Network. Sequências do Genbank foram incorporadas ao banco de dados deste estudo como grupo externo (JX961679M, DQ502739). Sequências dos genes RNA 16S, RPL e Citocromo Oxidase subunidade I foram plotadas nas plataformas BLAST e BOLD (The Barcode of Life Data Systems) para verificar o grau de similaridade entre as espécies.

5 RESULTADOS

5.1 Dados Morfológicos

Através da morfologia externa foram identificadas espécies do complexo *Rhinella marina*, sendo elas: *R. marina*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis* e para o complexo *Rhinella granulosa* as espécies: *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*. Além disso, foi encontrada a espécie *R. margaritifera* que não faz parte de nenhum dos complexos, mas é do gênero em estudo. Algumas amostras foram identificadas apenas a nível de gênero, sendo assim receberam a denominação *Rhinella* sp.

5.1.1 Espécies do complexo *marina*

O complexo *marina*, deste estudo e considerando os caracteres morfológicos, está representado pelas espécies *R. marina*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis*.

A espécie *R. marina* Linnaeus, 1758 (Figura 2A) apresentou padrão característico da espécie com cor marrom-amarelada, com a cor amarelo mais pronunciado ao longo dos lados e na garganta ou com manchas marrons irregulares em sua superfície dorsal no caso de imaturos; grande porte, rostro-cloacal; pele coberta por verrugas irregularmente dispersas; paratóides relativamente grandes e, muitas vezes de forma triangular e com aparência de inchaço; cristas cranianas bem desenvolvidas, tímpano bem desenvolvido e região interorbital côncava; ausência de glândulas inguinais. Esta espécie alcança vários estados do Brasil particularmente as regiões Norte e Centro oeste.

A espécie *R. schneideri* Werner, 1894 mostrou o espécime macho ligeiramente menor do que a fêmea; cabeça curta e larga, com cristas cefálicas distintas; focinho arredondado em vista dorsal e truncado de perfil; tímpano visível e distinto, ligeiramente menor do que o próprio olho; grandes glândulas paratóides em

forma de feijão por trás dos olhos. O corpo é globular, curto e robusto; membros apresentam-se curtos, e as pernas traseiras pouco robustas; glândula tibial, que segrega uma bufotoxina leitosa, localiza-se quase que em baixo de cada perna; dedos são finos; não há tubérculos nos dedos das mãos ou dos pés; os machos apresentam almofadas nupciais em seus polegares; a pele é áspera com verrugas espinhosas do dorso. Dorsalmente, *R. schneideri* se mostrou marrom-amarelado; barriga e garganta esbranquiçadas e salpicada de manchas escuras; ao longo do meio das costas possuem manchas castanho chocolate transversais; os lados e dorso com manchas esbranquiçadas; os machos apresentaram grandes manchas pretas dorsalmente. Está distribuída em vários estados brasileiros compreendendo as regiões Nordeste, Centro oeste, Sudeste e Sul.

A espécie *R. jimi* Stevaux, 2002 (Figura 2C) apresentou-se de grande porte; cabeça mais larga do que longa; focinho arredondado de perfil e semicírculo em vista ventral; crânio muito amplo e côncavo; cristas cranianas presentes, bem espessas; cristas no focinho espessas e moderadamente projetada; região superior do lábio curto e grosso; canto do olho rostral distinta, região loreal levemente côncava, narinas ligeiramente protuberantes e espessas para trás e para cima; tímpano arredondado, de tamanho mediano e distinto; braços moderadamente fortes no sexo masculino, porém magro nas fêmeas; glândulas no antebraço na região dorsal bem definida; dois agregados evidentes de glândulas simetricamente localizadas em ambos os lados da cloaca, sem forma definida, mas sempre presente. Esta espécie alcança apenas a região Nordeste e Sudeste.

A espécie *R. cerradensis* Maciel, 2007 (Figura 2D) se caracterizou pelo grande porte e por não possuir glândulas tibiais; cristas craniais bem desenvolvidas, mãos curtas, possuindo coloração distinta entre machos e fêmeas; presença de numerosas espículas queratinosas e pontiagudas no dorso, dedos e braços. Esta espécie é endêmica do Brasil e distribui-se apenas nos estados do Piauí, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e no Distrito Federal.

5.1.2 Espécies do complexo *granulosa*

O complexo *granulosa*, deste estudo e considerando os caracteres morfológicos, está representado pelas espécies *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*.

A espécie *R. granulosa* Spix, 1824 (Figura 2E) mostrou-se de pequeno porte; cabeça subtriangular, mais larga que longa e baixa; focinho arredondado em vista

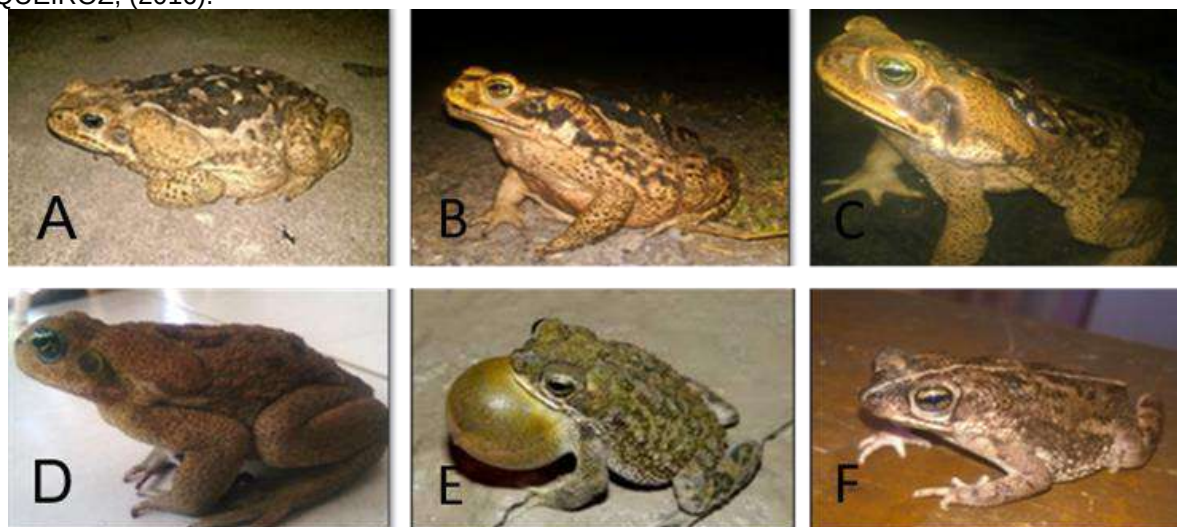
dorsal e lateral; maxila projetada sobre a mandíbula anteriormente; tímpano oval, na parte superior mais ampla, próximo a crista pós-orbital; glândula paratóide localizada dorsolateral, com fronteiras bem delimitadas, subtriangular, com vértice apontando para baixo; presença de cristas cranianas; parótides com tubérculos individualizados e carnudos, achatado dorsalmente e cônico em superfícies laterais da glândula. Embora extremamente raros alguns indivíduos não apresentaram uma faixa longitudinal dorsal. Distribui-se por vários estados do Brasil principalmente nos estados da região Nordeste.

A espécie *R. mirandaribeiroi* Gallardo, 1965 (Figura 2F) aparentou-se de pequeno porte; focinho inclinado dorsoventralmente, arredondado na região dorsal e lateral, região loreal distintamente visível em vista dorsal, tímpano muito perto da crista postorbital, lábio superior com bordas ligeiramente convexas, listra longitudinal dorsal presente. Glândulas paratóides dorsolateral, conspícuas, com terminação não bem delimitada, subtriangular, com vértice apontando para baixo, mais larga do que alta. Cristas cefálicas predominantemente granulosas, com conspícuos, queratinizadas. Dorso com tubérculos de tamanhos variáveis, cônico com ápices queratinizados. Barriga com pequenos grânulos. Pálpebra superior com pequenos e dispersos grânulos de tamanhos variáveis, espiculadas ou arredondadas. Esta espécie é encontrada em todas as regiões brasileiras, exceto região Sul.

5.1.3 Espécie *R. margaritifera* Laurenti, 1768

A espécie *R. margaritifera* é conhecida pelo nome vulgar de sapo-folha. A espécie apresentou tamanho médio; pele do dorso possui tubérculos e o espinho neural da vértebra é proeminente; ventre granular; uma faixa diagonal de tubérculos cônicos se estende da parte de trás da cabeça até o fim do tronco; o tímpano é bem aparente; crestas pós-orbitais elevadas; nariz pontiagudo em vista dorsal; em vista lateral, o nariz apresentou-se afinado e proeminente; glândulas paratóides subtriangulares, seguindo o padrão das crestas craniais; faixa média-dorsal com coloração mais clara, bege e ventre bege, com manchas. Está distribuída em vários estados brasileiros incluindo principalmente os das regiões Norte e Nordeste.

Figura 2. Espécies encontradas para este estudo. Complexo marina: A) *Rhinella marina*. B) *Rhinella schneideri*. C) *Rhinella jimi*. D) *Rhinella cerradensis*. Complexo granulosa: E) *Rhinella granulosa*. F) *Rhinella mirandaribeiroi*. Para a espécie *Rhinella margaritifera* não houve registro fotográfico. Fonte: QUEIROZ, (2016).



5.2 Dados Moleculares

5.2.1 Gene rRNA 16S

Foram sequenciadas 162 amostras para o gene rRNA 16S, resultando em um fragmento de 563 pares de bases com 469 sítios conservados, 94 variáveis, 79 informativos para parcimônia e 28 haplótipos.

O haplótipo 6 (H6) foi o mais frequente ($f=96$) estando presente em 14 localidades, seguido pelo haplótipo 8 (H8) frequente 17 vezes ($f=17$) em seis localidades, haplótipo 2 ($f=8$) em duas localidades, haplótipo 25 ($f=6$) em uma localidade, haplótipo 14 ($f=4$) três localidades, haplótipo 20 ($f=4$) em uma localidade e o haplótipo 22 ($f=3$) uma localidade. Os haplótipos 4 e 15 ($f=2$) ocorreram em apenas uma localidade cada. O haplótipo 16 ($f=2$) ocorreu em duas localidades. Os haplótipos H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H17, H18, H19, H21, H23, H24, H26, H27 e H28 ocorreram apenas uma vez ($f=1$) e em apenas uma localidade cada (Tabela 4).

As sequências do gene rRNA16S foram plotadas na plataforma BLAST revelando o seguinte resultado: Complexo *marina* compreendeu as espécies *R. schneideri* e *R. marina* (haplótipos 1 ao 21); complexo *granulosa* as espécies *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa* (haplótipos 22 ao 26) e a espécie *R. cf. margaritifera* (dois haplótipos 27 e 28) que não pertence aos complexos acima citado sendo uma unidade evolutiva independente (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição e similaridade obtida para os haplótipos do gênero *Rhinella* de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BLAST.

NH	Freq.	Localidade	Ident. morfológica	Ident. BLAST	Similaridade (%)
H1	1	Soure/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H2	8	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
		Pau Dar'co/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
		Floriano/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
H3	1	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H4	2	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H5	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H6	96	Floriano/PI	<i>R. schneideri</i>	<i>R. schneideri</i>	99
		Fronteiras/PI	<i>R. jimi/ R. schneideri</i>		
		Mandacaru/PI	<i>R. jimi</i>		
		Buriti dos Lopes/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
		Luís Correia/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
		Baixa da Carnaúba/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
		São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>		
		Bocaina/PI	<i>Rhinella</i> sp.		
		Imperatriz/MA	<i>Rhinella</i> sp.		
		São Luís/MA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Vizeu/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Bragança/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Algodoal/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Caxias/MA	<i>R. jimi/ R. schneideri</i>		
H7	1	Floriano/PI	<i>R. schneideri</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H8	17	Floriano/PI	<i>R. schneideri</i>	<i>R. schneideri</i>	99
		Fronteiras/PI	<i>R. schneideri/R. jimi</i>		
		Algodoal/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Imperatriz/MA	<i>Rhinella</i> sp.		
		Caxias/MA	<i>Rhinella jimi</i>		
H9	1	Floriano/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H10	1	Mandacaru/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H11	1	Luís Correia/PI	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H12	1	Luís Correia/PI	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H13	1	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H14	4	Vizeu/PA; Algodoal/PA; Soure/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H15	2	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H16	2	Caxias/MA	<i>Rhinella marina</i>	<i>R. schneideri</i>	99
		Pau Dar'co/PI	<i>Rhinella cerradensis</i>		
H17	1	Soure/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. schneideri</i>	99
H18	1	Pau Dar'co/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H19	1	Caxias/MA	<i>R. jimi</i>	<i>R. schneideri</i>	99
H20	4	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. marina</i>	99
H21	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. marina</i>	99

H22	3	Caxias/MA	<i>R. mirandaribeiroi</i> / <i>R. granulosa</i>	<i>R. mirandaribeiroi</i>	99
		Pau Dar'co/PI	<i>R. mirandaribeiroi</i>		
H23	1	Caxias/MA	<i>R. granulosa</i>	<i>R. mirandaribeiroi</i>	99
H24	1	Caxias/MA	<i>R. granulosa</i>	<i>R. mirandaribeiroi</i>	99
H25	6	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. mirandaribeiroi</i>	<i>R. granulosa</i>	99
H26	1	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. mirandaribeiroi</i>	<i>R. granulosa</i>	99
H27	1	Tapajós/MA	<i>R. margaritifera</i>	<i>R. cf. margaritifera</i>	99
H28	1	Tapajós/MA	<i>R. margaritifera</i>	<i>R. cf. margaritifera</i>	99

NH=Número de haplótipos, Freq=Frequência, Ident=Identificação.

A matriz de divergência nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura 3-parâmetro mostrou uma variação de 0,0 a 16,0%.

Os haplótipos de H1 a H19, identificados morfologicamente como diferentes espécies *R. jimi*, *R. schneideri*, *R. marina* e *Rhinella* sp., geneticamente (rRNA 16S) foram identificadas como apenas uma espécie a *R. schneideri*. Isso foi evidenciado pela divergência ser relativamente baixa variando de 0,0 a 1,1%, indicativo de uma única unidade evolutiva, apesar de morfologicamente apresentarem características interespecíficas. Os haplótipos H20 e H21 identificados morfologicamente como *Rhinella* sp. foram geneticamente (rRNA 16S) determinada como *R. marina*, pois a sua divergência foi baixa alcançado apenas 0,3%, no entanto variando de 2,2 a 3,6%, em relação aos haplótipos H1 a H19, isto indica geneticamente duas unidades evolutivas independente, isto é a ocorrência de duas espécies no complexo marina: *R. schneideri* e *R. marina*.

Para o complexo *R. granulosa* é observado duas espécies: *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa* tanto pela morfologia quanto pela genética (Tabela 4). Esta mesma evidência de duas espécies foi confirmada na divergência genética que mostrou uma variação de 0,3 a 5,0% (Tabela 5). Foi evidenciado ainda a ocorrência da espécie *R. margaritifera* tanto pela morfologia quanto pela genética (Tabelas 4 e 5).

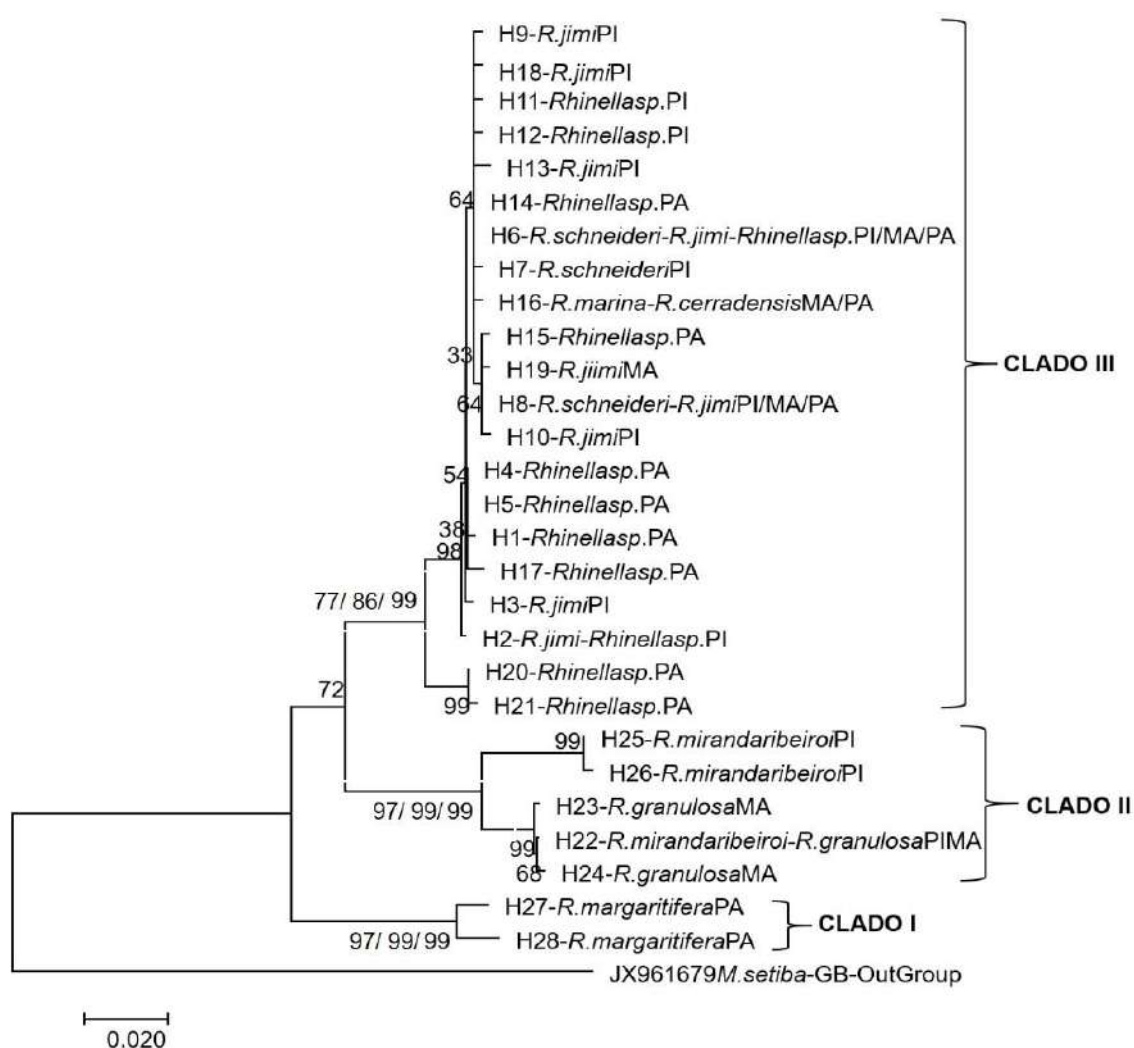
Considerando os dois complexos, *R. marina* e *R. granulosa*, a divergência foi alta variando de 9,9 a 11,8% indicativo de unidades evolutivas diferentes. A magnitude desta divergência entre os complexos é tão alta quanto a divergência entre o complexo *R. marina* e a espécie *R. margaritifera* e o complexo *R. granulosa* e a espécie *R. margaritifera* que varia de 9,7 a 16% (Tabela 5).

Tabela 5. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Tamura 3- parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil, com base em sequências do gene rRNA 16S.

HAPLÓTIPOS/ESPÉCIES	DIVERGÊNCIA GENÉTICA (%)																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1 <i>H1-Rhinellasp.PA</i>	-																												
2 <i>H2-R.jimi-Rhinella sp.PI</i>	0,5	-																											
3 <i>H3-R.jimiPI</i>	0,5	0,5	-																										
4 <i>H4-Rhinella sp.PA</i>	0,3	0,3	0,3	-																									
5 <i>H5-Rhinella sp.PA</i>	0,3	0,3	0,3	0,0	-																								
6 <i>H6-R.schneideri-R.jimi-Rhinellasp.PI/MA/PA</i>	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	-																							
7 <i>H7-R.schneideriPI</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	-																						
8 <i>H8-R.schneideri-R.jimiPI/MA/PA</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	-																					
9 <i>H9-R.jimiPI</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	-																				
10 <i>H10-R.jimiPI</i>	1,1	1,1	1,1	0,8	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	-																			
11 <i>H11-Rhinella sp.PI</i>	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,5	-																		
12 <i>H12-Rhinella sp.PI</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	-																	
13 <i>H13-R.jimiPI</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	-																
14 <i>H14-Rhinella sp.PA</i>	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,5	0,0	0,3	0,3	-															
15 <i>H15-Rhinella sp.PA</i>	1,1	1,1	1,1	0,8	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	0,5	0,5	0,8	0,8	0,5	-														
16 <i>H16-R.marina-R.cerradensisPA/MA</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,5	0,3	0,8	-													
17 <i>H17-Rhinellasp.PA</i>	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,8	0,8	0,8	1,1	0,5	0,8	0,8	0,5	1,1	0,8	-												
18 <i>H18-R.jimiPI</i>	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,8	0,3	0,5	0,5	0,3	0,8	0,5	0,8	-											
19 <i>H19-R.jiimiMA</i>	1,1	1,1	1,1	0,8	0,8	0,5	0,8	0,3	0,8	0,5	0,5	0,8	0,8	0,5	0,5	0,8	1,1	0,8	-										
20 <i>H20-Rhinellasp.PA</i>	2,7	2,2	2,4	2,4	2,4	2,7	3,0	3,0	3,0	3,3	2,7	3,0	3,0	2,7	3,3	3,0	2,7	3,0	3,3	-									
21 <i>H21-Rhinellasp.PA</i>	3,0	2,4	2,7	2,7	2,7	3,0	3,3	3,3	3,3	3,6	3,0	3,3	3,3	3,0	3,6	3,3	3,0	3,3	3,6	0,3	-								
22 <i>H22-R.mirandaribeiroiR.granulosaPI/MA</i>	11,2	10,9	10,9	10,9	10,9	10,5	10,9	10,9	10,9	11,2	10,5	10,9	10,2	10,5	10,9	10,9	11,2	10,9	11,2	10,2	10,6	-							
23 <i>H23-R.granulosaMA</i>	11,2	10,9	10,9	10,9	10,9	10,5	10,9	10,9	10,9	11,2	10,5	10,9	10,2	10,5	10,9	10,9	11,2	10,9	11,2	10,2	10,6	0,3	-						
24 <i>H24-R.granulosaMA</i>	11,5	11,2	11,2	11,2	11,2	10,9	11,2	11,2	11,2	11,5	10,9	11,2	10,5	10,9	11,2	11,2	11,5	11,2	11,5	9,9	10,2	0,3	0,5	-					
25 <i>H25-R.mirandaribeiroiPI</i>	11,8	11,5	11,5	11,5	11,5	11,2	11,5	11,5	11,5	11,8	11,2	11,5	11,5	11,2	11,2	11,2	11,8	11,5	11,8	11,2	11,5	4,4	4,4	4,7	-				
26 <i>H26-R.mirandaribeiroiPI</i>	12,1	11,8	11,8	11,8	11,8	11,5	11,8	11,8	11,8	12,1	11,5	11,8	11,8	11,5	11,5	11,5	12,1	11,8	12,1	11,5	11,8	4,7	4,7	5,0	0,3	-			
27 <i>H27-R.margaritiferaPA</i>	10,7	10,0	10,7	10,3	10,3	10,0	10,3	10,0	10,3	10,4	10,0	10,3	10,3	10,0	10,3	10,3	10,7	10,3	9,7	10,6	11,0	14,3	14,3	14,0	15,0	14,7	-		
28 <i>H28-R.margaritiferaPA</i>	10,7	10,1	10,7	10,4	10,4	10,1	10,4	10,4	10,4	10,7	10,1	10,4	10,4	10,1	10,7	10,4	10,7	10,4	10,0	11,3	11,7	15,3	15,3	15,7	16,0	15,7	2,4	-	
29 <i>JX961679M.setiba-GB-OutGroup</i>	33,4	33,0	33,0	33,0	33,0	33,4	33,4	33,4	33,8	33,9	33,4	33,8	33,8	33,4	33,5	33,4	33,4	33,8	33,9	32,6	32,2	33,5	33,9	33,1	35,2	35,2	32,6	34,3	-

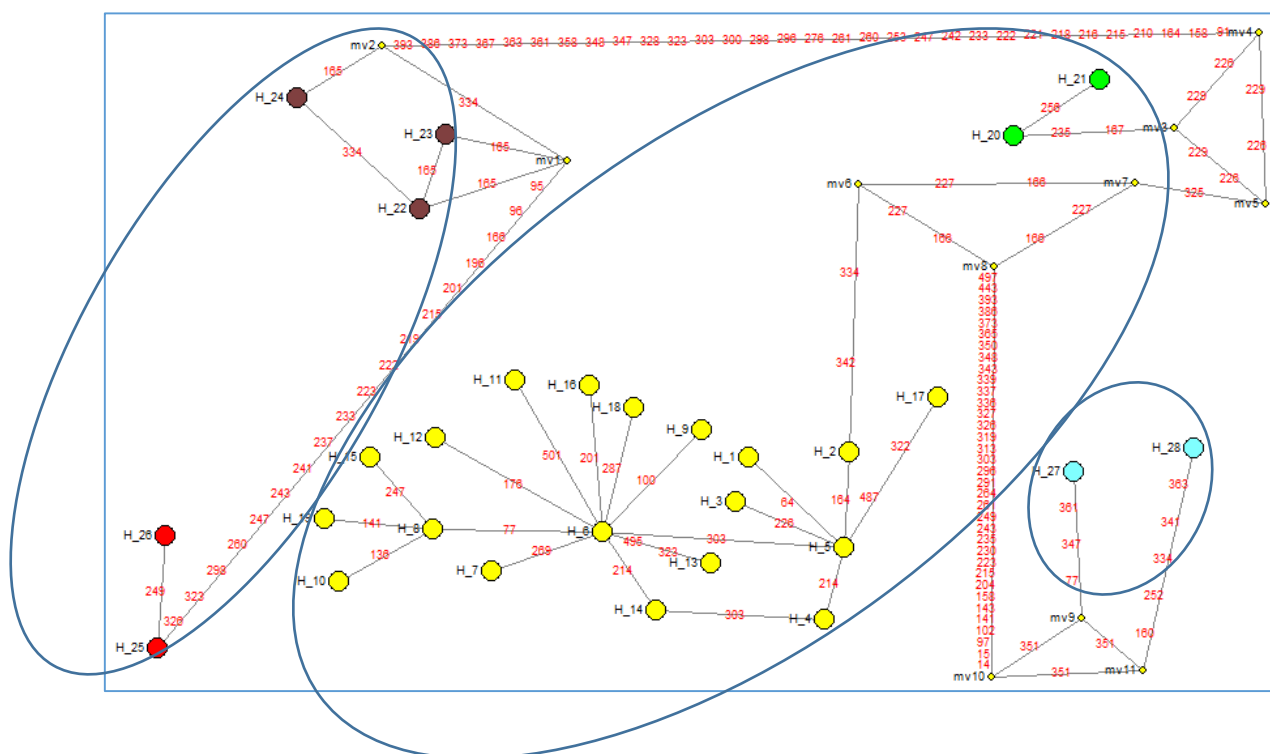
As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostraram topologias similares, onde ocorreu a formação de três clados, o clado I formado pela espécie *R. margaritifera* com valor de *bootstrap* altamente significativo. O clado II foi formado pelas espécies do complexo *R. granulosa* fortemente agrupadas e mostrou-se como grupo irmão do complexo *R. marina* (clado III) com *bootstrap* moderado. O clado III uniu as espécies do complexo *R. marina* morfologicamente identificadas como *R. jimi*, *R. schneideri*, *R. cerradensis* e *Rhinella* sp.(Figura 3).

Figura 3. Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene rRNA 16S. Os valores de *bootstrap* estão na seguinte ordem: Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ).



Foi gerada uma rede de haplótipos não enraizada que mostrou o número de sítios mutacionais existentes entre as espécies, o maior número de sítios foi entre as espécies *R. schneideri* (ex.H2) e *R. mirandaribeiroi* (ex. H23), bem como *R.margaritifera* (ex.H28). O menor número de sítios mutacionais está entre as espécies *R. schneideri* (ex.H2) e *R. marina* (ex.H21)

Figura 4. Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando as espécies identificadas pelo gene rRN16S. As cores representam as espécies da seguinte forma: vinho=*R. mirandaribeiroi*; Amarelo= *R. schneideri*; Vermelho; *R. granulosa*; Azul claro=*R. margaritifera*; Verde=*R. marina*.



5.2.2 Gene Citocromo Oxidase Subunidade (COI)

Para análises do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) foram sequenciadas 22 amostras do gênero *Rhinella*, obtendo-se um fragmento de 589 pares de bases, sendo 460 sítios conservados, 129 variáveis, 47 informativos para parcimônia e 20 haplótipos, cada sequência apresentou-se quase exclusivamente como haplótipo único, para cada localidade representada, excetuando os haplótipos 1 (H1) e 15 (H15). Para este gene, diferentemente do gene rRNA 16S, foi verificada a ocorrência de *R. jimi* e *R. ornata* (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição e similaridade obtida para os haplótipos do gênero *Rhinella* de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BoldSystems.

NH	Freq.	Localidade	Ident. Morfológica	Ident. BOLDSYSTEMS	Similaridade (%)
H1	2	Fronteiras/PI	<i>R. jimi</i> , <i>R. schneideri</i>	<i>R. jimi</i>	100
H2	1	Fronteiras/PI	<i>R. jimi</i> ,	<i>R. ornata/R.jimi</i>	99,82
H3	1	São Luís/MA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	99,47
H4	1	Vizeu/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	100,00
H5	1	Soure/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	100,00
H6	1	Bragança/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	99,64
H7	1	São Luís/MA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. ornata</i>	99,64
H8	1	Vizeu/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. schneideri</i>	99,93
H9	1	Florianópolis/SC	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. ornata</i>	98,93
H10	1	Vizeu/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	99,82
H11	1	Soure/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. schneideri</i>	99,00
H12	1	Bocaína/PI	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. ornata</i>	100,00
H13	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. jimi</i>	99,47
H14	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. marina</i>	99,47
H15	2	Tucuruí/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. marina</i>	99,47
H16	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella sp.</i>	<i>R. ornata</i>	99,29
H17	1	Caxias/MA	<i>R. jimi</i>	<i>R. ornata</i>	99,64
H18	1	Caxias/MA	<i>R. Mirandaribeiroi</i>	<i>R. Mirandaribeiroi</i>	99,47
H19	1	Caxias/MA	<i>R. jimi</i> .	<i>R. ornata</i>	99,64
H20	1	Caxias/MA	<i>R. jimi</i>	<i>R. ornata</i>	99,64

NH=Número de haplótipo, Freq=Frequência, Ident=Identificação.

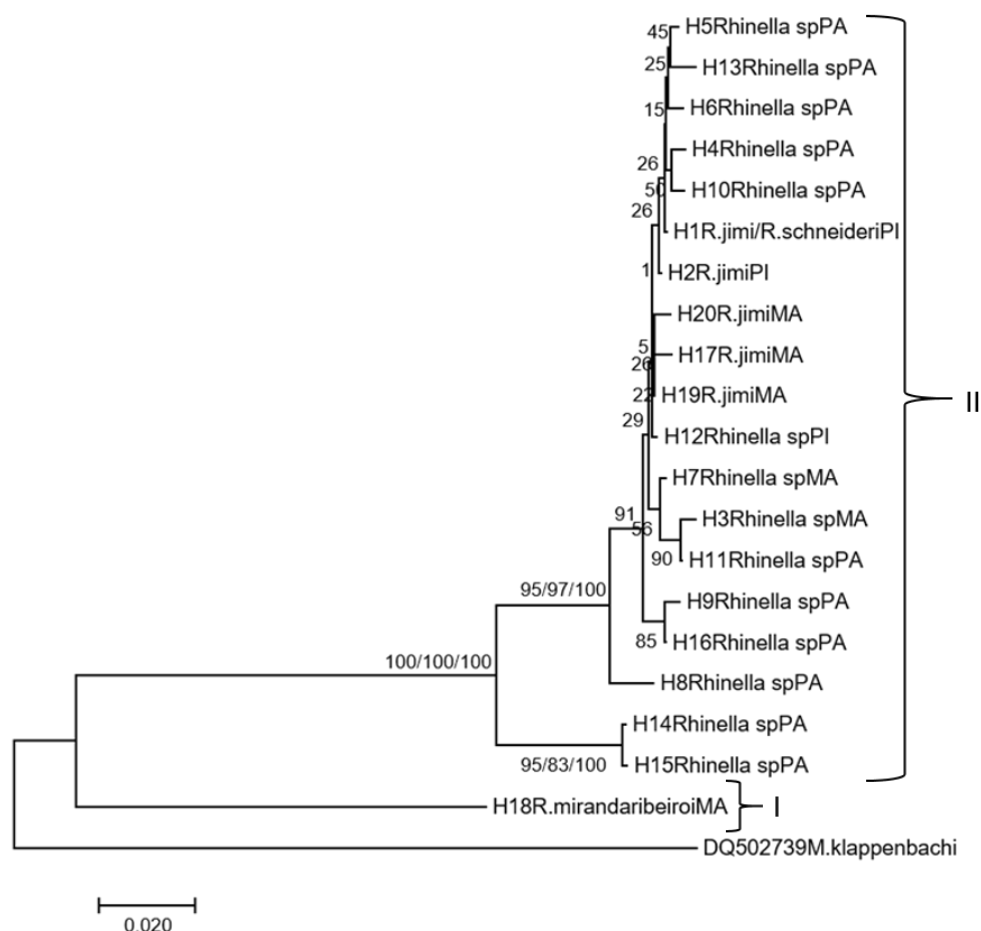
A matriz de divergência genética mostrou uma variação quando considerado o gênero de 0,2 a 7,0% evidenciando, portanto mais de uma unidade taxonômica, no entanto para a maioria dos haplótipos a variação foi baixa alcançando apenas 2,8%. Os haplótipos 14 e 15 identificados morfolologicamente como *Rhinella sp.*, assim como para o gene rRNA 16S, foram geneticamente identificada como *R. marina*, pois a sua divergência foi baixa alcançado apenas 0,2%, no entanto variando de 6,1 a 7,0% em relação aos demais haplótipos, isto indica geneticamente no mínimo duas unidades evolutivas independente, isto é a ocorrência de no mínimo duas espécies no complexo marina: *R. schneideri/jimi* e *R. marina*.

Tabela 7. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Tamura 3- parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil, com base em sequências do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).

HAPLÓTIPOS/ESPÉCIES	DIVERGÊNCIA GENÉTICA (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
H1 <i>R.jimi</i> / <i>R.schneideri</i> /PI	-																				
H2 <i>R.jimi</i> PI	0,2																				
H3 <i>Rhinella</i> spMA	1,6	1,4																			
H4 <i>Rhinella</i> spPA	0,5	0,7	1,4																		
H5 <i>Rhinella</i> spPA	0,3	0,5	1,2	0,5																	
H6 <i>Rhinella</i> spPA	0,5	0,7	1,4	0,7	0,5																
H7 <i>Rhinella</i> spMA	0,7	0,5	0,9	1,2	1,1	1,2															
H8 <i>Rhinella</i> spPA	1,9	2,1	2,8	2,1	1,9	2,1	2,3														
H9 <i>Rhinella</i> spPA	1,1	1,2	1,4	1,6	1,4	1,2	1,1	2,7													
H10 <i>Rhinella</i> spPA	0,3	0,5	1,9	0,5	0,7	0,9	1,1	2,3	1,4												
H11 <i>Rhinella</i> spPA	1,2	1,0	0,3	1,0	1,2	1,4	0,5	2,5	1,4	1,6											
H12 <i>Rhinella</i> spPI	0,5	0,3	1,0	0,7	0,5	0,7	0,5	1,8	1,2	0,9	0,7										
H13 <i>Rhinella</i> spPA	0,7	0,9	1,9	0,9	0,7	0,9	1,4	2,3	1,8	1,0	1,6	0,9									
H14 <i>Rhinella</i> spPA	6,1	6,3	7,0	6,7	6,5	6,3	6,5	5,9	6,1	6,5	7,0	6,3	6,8								
H15 <i>Rhinella</i> spPA	6,3	6,5	6,8	6,5	6,3	6,1	6,7	5,7	6,3	6,7	6,8	6,1	6,6	0,2							
H16 <i>Rhinella</i> spPA	0,7	0,9	1,6	1,2	1,1	1,2	0,7	2,3	0,3	1,1	1,2	0,9	1,4	6,1	6,3						
H17 <i>R.jimi</i> MA	0,7	0,5	1,6	1,2	1,1	1,2	0,7	2,3	1,4	1,1	1,2	0,5	1,4	6,1	6,3	1,1					
H18 <i>R.mirandaribeiroi</i> MA	20,7	20,7	22,2	21,4	21,2	20,9	20,9	20,5	21,2	21,2	21,6	20,7	21,4	20,7	20,9	20,7	20,4				
H19 <i>R.jimi</i> MA	0,3	0,2	1,2	0,9	0,7	0,9	0,3	1,9	1,1	0,7	0,9	0,2	1,0	6,1	6,3	0,7	0,3	20,4			
H20 <i>R.jimi</i> MA	0,7	0,5	1,6	1,2	1,1	0,9	0,7	2,3	1,4	1,1	1,2	0,5	1,4	6,5	6,7	1,1	0,7	20,4	0,3		
DQ502739 <i>M.klappenbachii</i>	27,9	27,6	28,4	28,2	28,2	27,6	28,2	28,5	27,6	27,9	28,7	28,2	28,7	26,3	26,6	28,2	28,5	24,2	27,9	27,9	-

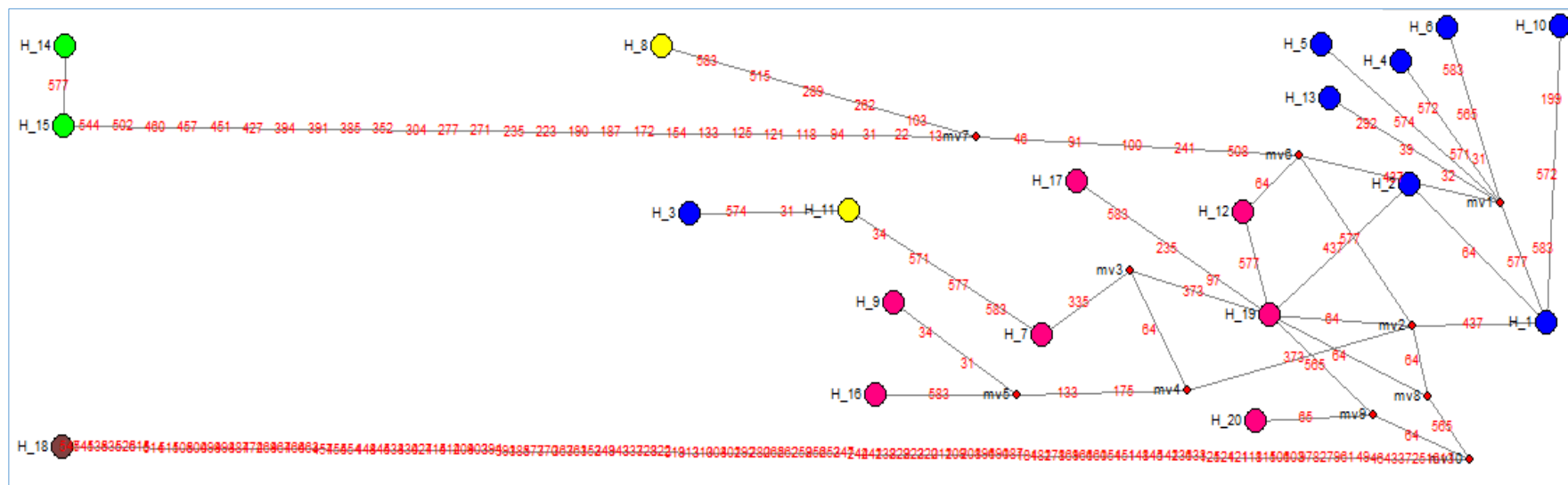
As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostraram topologias similares, formando dois clados, assim como no gene rRNA 16S formou-se um clado com a espécie *R. mirandariberoi* (clado I) e o clado II foi formado pelo complexo *R. marina* compreendendo as espécies *Rhinella* sp. e *R. schneideri/jimi* (Figura 5).

Figura 5. Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene COI. Os valores de *bootstrap* estão na seguinte ordem: Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia e Agrupamento de Vizinhos (NJ).



Foi gerada uma rede de haplótipos não enraizada que mostrou o número de sítios mutacionais existentes entre as espécies, o maior número de sítios foi entre o H18 *R. mirandariberoi* do complexo *R. granulosa* e as demais espécies do complexo *Rhinella. marina*. O menor número de sítios mutacionais foi entre as espécies *R. jimi* e *R. ornata*.

Figura 6. Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando as espécies identificadas pelo gene COI, na plataforma BLAST. As cores representam as espécies da seguinte forma: vinho=*R. mirandaribeiroi*; Amarelo=*R. schneideri*; Verde=*R. marina*. Azul =*R. jimi*; róseo=*R. ornata*



5.2.3 Gene Ribosomal Protein Lateral – RPL 35

Para o gene RPL 35 foram sequenciadas 32 amostras, resultando em um fragmento de 637 pares de bases com 610 sítios conservados, 28 sítios variáveis, 11 sítios informativos para parcimônia e 18 haplótipos.

O haplótipo H7 e o H8 foram os mais frequentes, ambos com frequência (f=5), os H9 (f=4) e H1 (f=3) ocorreram em três localidades cada. Os haplótipos H2, H3, H4, H5, H6, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18 e H19 foram únicos (f=1) e ocorreram em cada localidade (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição e similaridade obtidas para os haplótipos do gênero *Rhinella* de ocorrência no Meio Norte do Brasil na plataforma BLAST.

NH	Freq.	Localidades	Ident. Morfológica	Ident. BLAST	Similaridade (%)
H1	3	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
		Bragança/PA	<i>Rhinella</i> sp		
		São Luís/MA	<i>Rhinella</i> sp		
H2	1	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
H3	1	Mandacaru/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
H4	1	Mandacaru/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
H5	1	Mandacaru/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
H6	1	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
H7	5	São Raimundo Nonato/PI	<i>R. jimi</i>	<i>R. marina</i>	99
		Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp.		
H8	5	São Luís/MA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. marina</i>	99
		Algodoal/PA			
		Vizeu/PA			
H9	5	Algodoal/PA	<i>Rhinella</i> sp.	<i>R. marina</i>	99
		Vizeu/PA			
		Soure/PA			
H10	1	Algodoal/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H11	1	Bragança/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H12	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H13	1	São Luís/MA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H14	1	Bragança/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H15	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H16	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H17	1	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99
H18	2	Tucuruí/PA	<i>Rhinella</i> sp	<i>R. marina</i>	99

NH=Número de haplótipos, Freq=Frequência, Ident=Identificação.

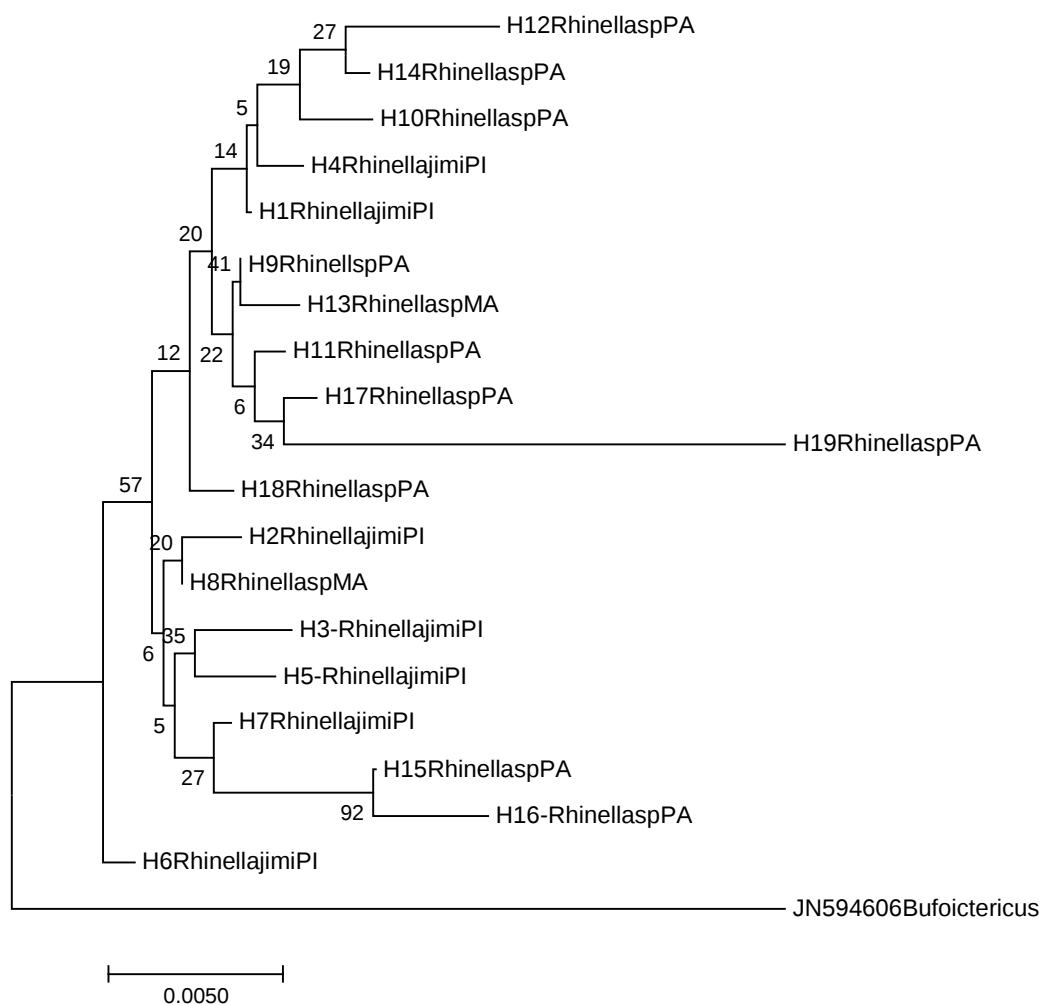
A matriz de divergência genética mostrou uma variação de 0,2 a 1,7%. Isto evidencia apenas uma unidade taxonômica. Para *R. jimi* (H1 a H7) A variação foi de 0,3 a 0,8%. Para *Rhinella* sp. (H8 a H18) a variação foi de 0,2 a 1,7% (Tabela 9)

Tabela 9. Divergência nucleotídica utilizando o modelo Kimura 2- parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do Meio Norte do Brasil, com base em sequências do gene Ribossomal Protein Lateral - RPL 35.

	DIVERGÊNCIA GENÉTICA (%)																		
Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
H1 <i>Rhinellajimi</i> PI	-																		
H2 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,5																		
H3 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,8	0,7																	
H4 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,2	0,7	0,7																
H5 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,7	0,5	0,5	0,5															
H6 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,3	0,5	0,8	0,5	0,7														
H7 <i>Rhinellajimi</i> PI	0,5	0,3	0,7	0,7	0,5	0,5													
H8 <i>Rhinellasp</i> MA	0,3	0,2	0,5	0,5	0,3	0,3	0,2												
H9 <i>Rhinellasp</i> PA	0,2	0,7	0,7	0,3	0,8	0,5	0,7	0,5											
H10 <i>Rhinellasp</i> PA	0,3	0,8	1,2	0,5	1,0	0,7	0,5	0,7	0,5										
H11 <i>Rhinellasp</i> PA	0,3	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,3	0,2	0,7									
H12 <i>Rhinellasp</i> PA	0,8	,14	1,4	0,7	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	0,8	1,2								
H13 <i>Rhinellasp</i> MA	0,3	0,8	0,8	0,5	1,0	0,7	0,8	0,7	0,2	0,7	0,3	1,2							
H14 <i>Rhinellasp</i> PA	0,3	0,8	1,2	0,5	1,0	0,7	0,5	0,7	0,5	0,3	0,7	0,5	0,7						
H15 <i>Rhinellasp</i> PA	1,0	0,8	0,8	0,8	0,7	1,0	0,5	0,7	1,2	1,0	1,0	0,8	1,4	1,0					
H16 <i>Rhinellasp</i> PA	1,4	1,2	1,2	1,2	1,0	1,4	0,8	1,0	1,5	1,4	1,4	1,2	1,7	1,4	0,3				
H17 <i>Rhinellasp</i> PA	0,3	0,8	0,8	0,5	1,0	0,7	0,8	0,7	0,2	0,7	0,3	0,8	0,3	0,7	1,4	1,7			
H18 <i>Rhinellasp</i> PA	0,3	0,5	0,5	0,5	0,7	0,3	0,5	0,3	0,2	0,7	0,3	1,2	0,3	0,7	1,0	1,4	0,3		
JN594606 <i>Bufoictericus</i>	2,9	2,7	3,1	3,1	2,9	2,6	2,7	2,6	3,1	3,3	2,9	3,8	3,3	3,3	3,3	3,6	3,3	4,5	-

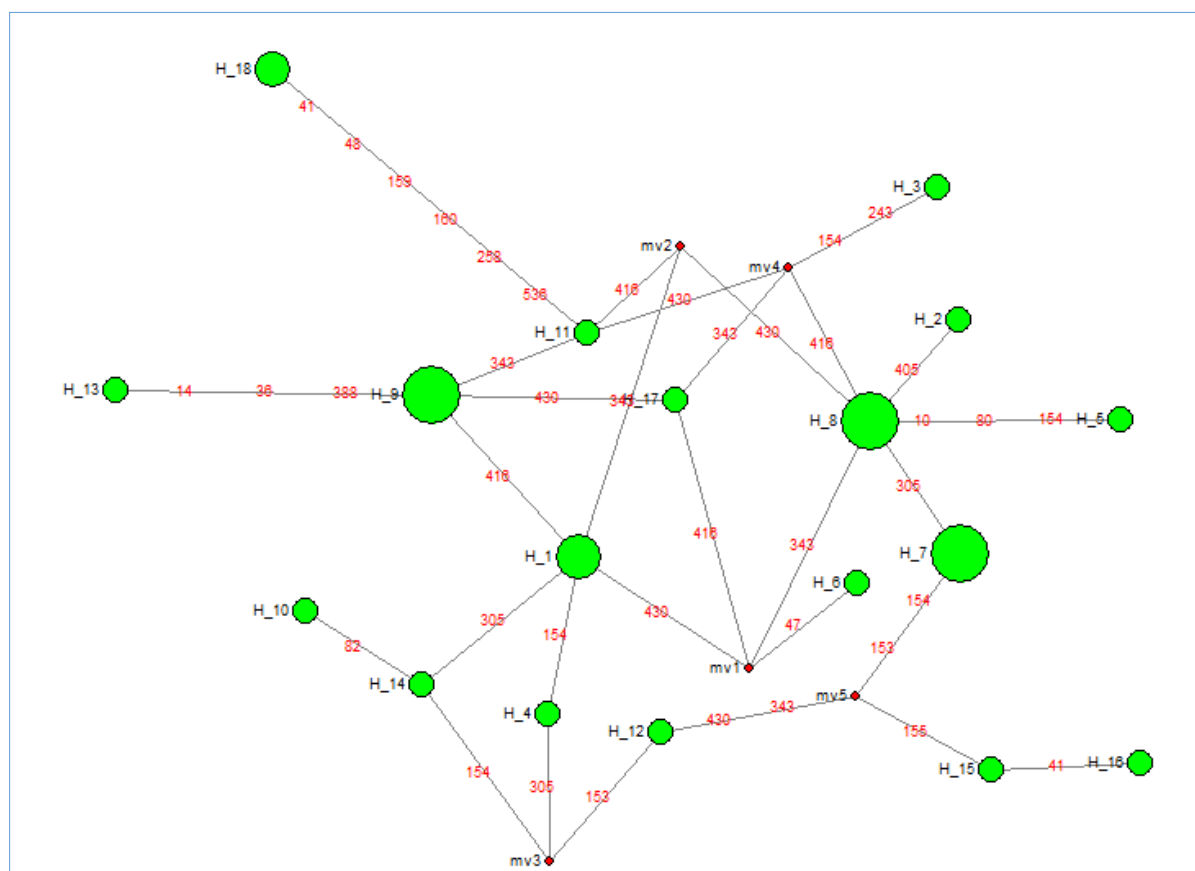
A árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostrou apenas um clado fortemente agrupado correspondendo a *R. marina*.

Figura 7. Árvore filogenética obtida através da abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) usando o algoritmo Tamura-3 Parâmetro para haplótipos do gênero *Rhinella* do meio norte do Brasil, com base no gene RPL35.



Foi gerada uma rede de haplótipos não enraizada que mostrou o número de sítios mutacionais existentes entre os haplótipos. Para o gene RPL 35 verificou-se poucos sítios mutacionais, portanto evidenciando a existência de apenas uma unidade taxonômica: *R. marina* (Figura 8).

Figura 8. Rede de haplótipos gerada pelo programa network, mostrando a espécie identificadas pelo gene RPL35 na plataforma BLAST A cor representa a espécie *R. marina*.



6 DISCUSSÃO

As espécies foram analisadas morfológicamente e excetuando uma que não foi identificada (*Rhinella* sp.) as demais mostraram-se similar a literatura, sendo identificadas quatro espécies pertencentes ao complexo *R. marina*, duas ao complexo *R. granulosa* e uma espécie como *R. mirandaribeiroi*. Para o complexo *R. marina*, as espécies foram *R. marina*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis*. Para *R. granulosa*, as espécies foram *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi* (LUTZ, 1934; EASTEAL, 1963; NORMAN, 1994; STEVAUX, 2002; NARVAES & RODRIGUES, 2009; SANTANA et al., 2010; VALLINOTO et al., 2011; FROST, 2018).

A espécie *R. schneideri* encontra-se sob nova nomenclatura *Rhinella diptycha*, pois de acordo com o estudo de Lavilla & Brusquetti (2018) trata-se de uma espécie sinônima. A espécie *R. schneideri* (Werner 1894) é sinônimo júnior de *Bufo diptychus* Cope, 1862, porém esta denominação não pode ser aplicada, sendo impedida pela lei do Código Internacional de Zoologia e Nomenclatura (ICZN 1999), por questões de prioridade de nome. No entanto, Lavilla & Brusquetti (2018) em seu estudo propõe que a fim de preservar a correta aplicação do nome, deve-se considerar o neótipo para *R. diptycha*, ou seja um espécime similar ao descrito por Werner (1894), que por sua vez, é também o holótipo do sinônimo júnior *R. Schneideri*. Portanto, se considerar os autores acima citados o nome da espécie a ser considerado é *R. diptycha* e não *R. schneideri*, mas considerando a Nomenclatura Zoológica permanece o *R. schneideri* assim definido neste estudo.

As análises moleculares mostram-se semelhantes a morfologia em muitos aspectos, porém divergiram-se em alguns casos, onde foram evidenciadas similaridades próximas e divergências baixas para espécies morfológicamente distintas. Os espécimes identificados morfológicamente como *R. schneideri* e *R. margaritifera* mostraram-se semelhantes tanto para as análises morfológicas quanto para as moleculares. Os espécimes identificados morfológicamente como *Rhinella* sp. foram identificados como *R. schneideri* e *R. marina*.

Os dados para as espécies do complexo *Rhinella marina* mostram relações de hibridização e introgressão já observadas em outros trabalhos.

Neste estudo espécimes morfológicamente diferentes correspondendo as espécies *R. marina*, *R. cerradensis*, *R. jimi* e *Rhinella* sp. mostraram valores de similaridades de 99% com a espécie *R. schneideri* corroborando em alguns aspectos com o estudo de Vallinoto et al. (2011) onde as espécies *R. marina* e *R. schneideri* mostram-se geneticamente semelhantes, sendo entendidas como um caso de introgressão e hibridização no qual exibem valores de distâncias genéticas relativamente baixos para o genoma mitocondrial.

Ao ser considerado que existe o evento de hibridização natural entre as espécies animais e que este ocorre em cerca de 10% entre as espécies que ocupam o mesmo habitat, verifica-se que a hibridização é um fator importante para a especiação (MACIEL, 2008; SEQUEIRA et al., 2011). Neste estudo duas espécies que morfológicamente são diferentes, *R. marina* e *R. cerradensis* foram encontradas coexistindo no mesmo habitat (Pau Dar'co/PI) permitindo assim introgressão e hibridização.

Em relação a espécie *R. cerradensis* o estudo de Maciel et al. (2010) sugere que esta seja filogeneticamente irmã de *R. schneideri* ou relativamente próximas. Apesar disso a magnitude da divergência genética neste estudo, bem como o barcode revela a presença de apenas um status taxonômico *R. schneideri* indicando que seja a espécie de identificação.

Os resultados deste estudo também mostram a espécie morfológicamente identificada como *R. jimi* similarmente como *R. schneideri* para o gene rRNA 16S e como *R. jimi* para o gene COI, esses dados corroboram com os achados de Cunha (2016) em estudo com essas espécies, onde foi observado padrões semelhantes em áreas de cerrado. Em seu estudo dados morfológicos também foram divergentes dos genéticos, espécies morfológicamente identificadas como *R. jimi* foram geneticamente similar a *R. jimi* e *R. schneideri* e, por sua vez os dados genéticos mostraram *R. jimi* compartilhando alelos típicos de *R. schneideri* em um ou mais loci.

Considerando a morfologia e a genética foi verificado que morfológicamente a espécie *R. granulosa* foi similarmente a espécie *R. mirandaribeiroi* quando considerado a genética e vice-versa, embora a alta divergência definam-as como dois status taxonômicos distintos.

Os valores de divergência genética para o gene rRNA 16S encontrados mostraram-se baixos tanto para o complexo *Rhinella marina* quanto para o

complexo *Rhinella granulosa*, para o complexo *Rhinella marina* a variação foi de 0,0 a 3,6%; para o complexo *Rhinella granulosa* a variação foi de 0,3 a 4,7%; no entanto entre os dois complexos a variação atingiu 9,9 a 12,1%. Ao considerar Fouquet et al. (2007) que afirma que o valor para distinguir espécie seja maior que 3% de divergência pode ser inferido quanto aos complexos *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* a presença de quatro unidades taxonômicas, duas unidades para o complexo *Rhinella marina* (*R. schneideri* e *R. marina*) e duas para o complexo *Rhinella granulosa* (*R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*). Ainda foi definido a espécie *R. margaritifera* para este estudo. A árvore filogenética mostrou valores de *bootstrap* bastantes fortes para os clados, onde verificou-se a separação dos complexos, isto também foi evidenciado tanto para a plataforma BLAST quanto para a matriz de distância genética.

As sequências para o gene COI foram plotadas na plataforma BOLD SYSTEMS e mostraram valores de similaridade variando entre 98,93 a 100% para as seguintes espécies: *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. marina*. No entanto semelhanças entre o gene COI e rRNA 16S foram identificadas em ambos os marcadores para a espécie de *R. marina* de ocorrência em Tucuruí no estado do Pará.

Apesar de *R. ornata* aparecer para o gene COI, a sua distribuição geográfica mostra-se muito distante da região meio norte do Brasil, sendo encontrada apenas na Mata Atlântica do Brasil, sul do estado do Espírito Santo, passando pelos estados do Rio de Janeiro e São Paulo até o norte do estado do Paraná e possivelmente também ocorra no nordeste da Argentina (IUNC, 2018). Assim a similaridade destas sequências aparecem na mesma proporção para a espécie *R. jimi* podendo esta ser considerada a espécie de identificação. O Gene RPL mostrou-se similar aos outros genes quanto a variabilidade genética e assim como no gene rRNA 16s e COI definiu a espécie *Rhinella* sp. de ocorrência em Tucuruí no Pará como *R. marina*.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram:

A ocorrência de dois complexos de espécies *Rhinella marina* e *Rhinella granulosa* na região meio norte do Brasil. No entanto revelou a presença de quatro unidades taxonômicas, duas unidades para o complexo *Rhinella marina*, sendo elas *R. schneideri* e *R. marina* e duas para o complexo *Rhinella granulosa*: *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*.

A magnitude das divergências genéticas somada a filogenia foram indicativos de diferenciação interespecíficas entre e dentro dos complexos. No entanto não houve diferenciação para seis espécies como morfologicamente esperado, mas para apenas quatro espécies.

Os dados apontam para hibridização e introgressão entre as espécies *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis*, isto é explicado por coabitarem e por geneticamente não haver diferenciação que separem em status taxonômicos distintos.

Quanto aos padrões de distribuição geográfica para o meio norte do Brasil foi verificado a presença do complexo *Rhinella marina* nos biomas Caatinga, Cerrado e Amazônia e do complexo *Rhinella granulosa* nos biomas Caatinga e Cerrado.

Pela importância dos anuros como bioindicadores de ambiente e pela preservação das espécies faz-se necessário um “olhar” diferenciado, não somente para as espécies, quanto para a preservação dos biomas.

REFERÊNCIA

ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; *et al.* (39 co-autores). Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 229-246, 2013.

ACEVEDO, A. A.; LAMPO M. & CIPRIANI. R. The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. **Zootaxa**, 4103 (6): 574–586. 2016.

ALLENDORF, F.; LEARY, R.; SPRUELL, P.; WENBURG, J. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, p. 613-622, 2001.

ARIAS, M. E. et al. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 1953–1958, 2003.

AMPHIBIA WEB. Informações sobre a biologia e conservação de anfíbios. Berkeley, California: **amphibia Web**. Disponível em: <http://amphibiaweb.org> (Acessado em: 13 de janeiro de 2017).

AURICCHIO, P & SALOMÃO, M. G **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados**, São Paulo: Arujá: Instituto Pau Brasil de História Natural, ed. Terra brasiliis, 2002.

AUSTIN, J.D.; LOUGHEED, S.C.; TANNER, K.; CHEK, A.A.; BOGART, J.P.; BOAG, P.T. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 134: 335-346. 2002.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22(3): 148-155. 2006.

BORKIN L. J., KORSHUNOV A. V., LADA G. A., LITVINCHUK S. N., ROSANOV J. M., SHABANOV D. A., ZINENKO A. I. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine // **Russian Journal of Herpetology**,. – Vol. 11, No 3. – P. 194–213, 2004.

CARDOZO JUNIOR, F. Principais cultivos: O pulo da rã. In: BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. 1º Anuário estatístico brasileiro da pesca e aquicultura: 2014. Brasília: ACEB/MPA, 2014. p. 50-51.

CAMINER, M.A, RON, S.R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **ZooKeys** 370: 1–68, 2014.

CAMPBELL, H.W.; CIIRISTMAN, S.P. **Field techniques in herpetotàunal community analysis**, p. 193-200/11: N.J. SCOTT JR. (Ed.). Herpetological communities. Washington, U.S. Fish Wild. Servo Wildl. Res. Rep. 1982.

CEI, J.M. Bufo of South America. In: Blair, W.F. (Ed.), **Evolution in the Genus Bufo**. University of Texas Press, Austin, pp. 82–92. 1972.

CORN, P. S. Straight line drift fences and pitfall traps. In W. R. Heyer, M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek, and M. S. Foster (eds.), *Measuring And Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. **Smithsonian Institute**. Press, Washington, D.C. 1994.

CUNHA, D. B. **Caracterização Genética e morfológica de espécies de sapos *Rhinella marina*, *R. schneideri* e *R. jimi* (Anura: Bufonidae): Estudo**

de zona híbrida. 2016. Tese (Doutorado - Programa Biologia Animal) - Universidade Federal do Pará, Pará.

DUELLMAN, W.E., SCHULTE, R. Description of a new species of *Bufo* from northern Peru with comments on phenetic groups of South American toads (Anura: Bufonidae). **Copeia**, 162–172. 1992.

CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; PEREZ, S. I.; TONHATTI, C. H.; CONDEZ, T. H.; SAWAYA, R. J.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. Boundaries of morphological and molecular variation and the distribution of a miniaturized froglet, *Brachycephalus nodoterga* (Anura: Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**, v. 50, p. 169-178, 2016.

CHAPARRO, J.C., PRAMUK, J.B., GLUESENKAMP, A.G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica** 63, 203–212. 2007.

EASTEAL, S. "Bufo marinus" Catalogue of American Amphibians and Reptiles. **American Society Ichthyology Herpetology**, v. 395, p. 1-395, 1963.

ELMER, K.R.; DÁVILA, J.A.; LOUGHEED, S.C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 247- 260. 2007.

ELMER, K. R. AND.; D.C CANNATELLA. Three new species of leaf litter frogs from the upper Amazon forests: cryptic within *Pristimantis "ockendeni"* (Anura: Strabomantidae).

FARIA, M. H. G. & RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52(2): 165-171. 2005.

FITZINGER, L. J. F. Neue Classification der Reptilien nach ihren Natürlichen verwandtschaften nebs einer verwandtschafts-Tafel und einem verzeichnisse der Reptilien-sammlung des K. K. **Zoologisch Museum's zu Wien**. Wien. Wien: J. G. Heubner. 1826.

FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.D.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the ***Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups**. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 43: 567-582. 2007a.

FRANCO, F. L.; SALOMÃO, M.G. & AURICCHIO, P. Répteis. In: AURICCHIO, P. & SALOMÃO, M. G. 2002. Técnicas de Coleta e Preparação. **São Paulo, Instituto Pau Brasil de História Natural**. P. 75/123.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER W.C. The

Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the american museum of natural history**. 2006.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an online reference, American Museum of Natural History, New York. Available from:** <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. (acesso em abril de 2015).

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History, New York, USA, 2017.**

FROST, DARREL R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (*Date of access*). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History, New York, USA. 2018.**

FONTENOT, B.E., MAKOWSKY, R., CHIPPINDALE, P.T. Nuclear mitochondrial discordance and gene flow in a recent radiation of toads. **Mol. Phylogenet. Evol.** 59, 66–80. 2011.

DETWILER, K. M.; BURRELL, A. S.; JOLLY, C. J. Conservation implications in hybridization in African cercopithecine monkeys. **International Journal of Primatology**, v. 26, p. 661-684, 2005.

GALLARDO, J. M. The species *Bufo granulosus* Spix (Salientia: Bufonidae) and its geographic variation. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. Cambridge, Massachusetts 134: 107–138. 1965.

GALLARDO, J.M. La distribución de las subespecies de *Bufo granulosus* Spix: su fidelidad a los sistemas hidrográficos Sudamericanos. **Cienc. Invest.** 25, 406–416. 1969.

GARCIA-PORTA, J., LITVINCHUK, S.N., CROCHET, P.A., ROMANO, A., GENIEZ, P.H., LO-VALVO, M., LYMBERAKIS, P., CARRANZA, S. Molecular phylogenetics and historical biogeography of the westpalearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). **Mol. Phylogenet. Evol.** 63, 113–130. 2012.

GRANT, T., BOLIVAR-G., W. A new species of semiarboreal toad with a salamander-like ear (Anura: Bufonidae: Rhinella). **Herpetologica** 70, 198–210. 2014.

GREEN, D.M., Parent, C. Variable and asymmetric introgression in a hybrid zone in the toads, *Bufo americanus* and *Bufo fowleri*. **Copeia**, 34–43. 2003

HALL, T.A. BioEdit: **a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis**. Department of Microbiology. North Carolina State University. 1999.

HADDAD, C. F. B.; POMBAL-Jr, J. P.; BATISTIC, R. F. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 425-430, 1994.

HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J.; CASTANHO, L. M. Hibridação natural entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 739-744, 1990.

HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA Barcorde) dos peixes pertencentes a Bacia do rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do estado de São Paulo**. 105f. Dissertação (mestrado Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Botucatu. 2010.

HEYER, W. R. et al. **Measuring and Monitoring Biological Diversity**. Standard Methods for Amphibians. Washington. Smithsonian Institution Press. 384 p, 1994.

HEBERT P. D. N., CYWINSKA, A., BALL S. L. E WAARD J. R. **Biological identifications through DNA barcodes**. 2003a.

INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL REOSURCES. IUNC Red List of Threatened Species. Version 2018.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acessado em Jan. 2018.

JUNGFER, K.-H. et al. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: Osteocephalus): an Amazonian puzzle. **Article first published online**, v. 42, n.4, p. 351-380, 2013.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**. Jul;33(7):1870-4. 2016.

LAURENTI, J. N. Specimen Medicum, Exhibens Synopsin Reptilium Emendatum cum Experimentis Circa Venena et Antidota Reptilium Austriacorum. **Wien, Austria: Joan. Thom. nob. de Trattner**. 1768.

LAVILLA, O. E & BRUSQUETTI. On the identity of *Bufo diptychus* Cope, 1862 (Anura: Bufonidae). **Zootaxa**. 4442 (1): 161-170. 2018.

LEMA, T & LEITÃO DE ARAÚJO, M. 1985. Manual de Técnicas para preparação de coleções zoológicas, 38. São Paulo, Sociedade Brasileira de Zoologia. 20p.

LUTZ, A. Notas sobre espécies brasileiras do genero *Bufo*/ Zur Kenntnis der Brasilianischen Kroeten vom Genus *Bufo*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro 28: 111–134 (Portuguese), 135–159 (German). 1934.

LINNAEUS, C. Systema Naturae per Regna Tria Nature, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Charactericis, Differentiis, Synonymis, Licis. 10th Edition. Volume 1. Stockholm, Sweden: L.salvii. 1758.

MACIEL, N. M., R. A. BRANDÃO, L.A. CAMPOS, And A. SEBBEN. A large new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Cerrado os Brasil. *Zootaxa*. 1627: 23-39. 2007.

MACIEL, N.M. Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae). 189f. Dissertação (mestrado Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, **Instituto de Ciências Biológicas**. Brasília. 2008.

MARTIN, R.F. Evidence from osteology. In: Blair, W.F. (Ed.), *Evolution in the Genus Bufo*. University of Texas Press, Austin, pp. 37–70. 1972.

MENGAK, M.T.; JR GUYNN, O.C. Pitfalls and snap traps for sampling small Illammals and herpetofauna. *American Midle. Nature*. 1987.

MORAVEC, J., LEHR, E., CUSI, J.C., C_ORDOVA, J.H., GVO_ZD_IK, V. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. **ZooKeys** 371, 35–56. 2014.

MOTA, E. P. **Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura: Hylidae) na Amazônia brasileira**. 54f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 2010.

NARVAES, P., RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arq. Zool.** 40, 1–73. 2009.

NORMAN, D. R. *Anfibios y Reptiles del Chaco Paraguayo*, Tomo 1. (Amphibians and Reptiles of the Paraguayan Chaco. **Private printing**, San José, Costa Rica. 1994.

ORTEGA-ANDRADE, H. M.; ROJAS-SOTO, O. R.; VALENCIA, J. H.; DE LOS MONTEROS, A. E.; MORRONE, J. J.; RON, S. R.; CANNATELLA, D. C. Insights from integrative systematics reveal cryptic diversity in *Pristimantis* frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin. **PloS ONE**, v. 10, p. e0143392, 2015.

PADIAL, J.M., CHAPARRO, J.C., KEOHLER, J., DE LA RIVA, I. Resurrection and redescription of *Rhinella leptoscelis* (Boulenger, 1912) (Anura: Bufonidae). **Zootaxa** 2115, 56–64. 2009.

PALUMBI, S; MARTIN, A.; ROMANO, S.; McMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. **The simple fool's guide to PCR**, version 2.0. University of Hawaii, Honolulu, 1991.

PEREYRA, MARTIN O. et al. Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): a molecular perspective with comments on hybridization and introgression. **Cladistics**, 1–18. 2015.

PEARL, C. A.; HAYES, M. P.; HAYCOCK, R.; ENGLER, J. D.; BOWERMAN, J. Observations of interspecific amplexus between western North American ranid frogs and the introduced American bullfrog (*Rana catesbeiana*) and an hypothesis concerning breeding interference. **American Midland Naturalist**, v. 154, p. 126-134, 2005.

PYRON, R.A., WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Mol. Phylogenet. Evol.** 61, 543–583. 2011.

PRAMUK, J.B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zool. J. Linn. Soc.** 146, 407–452. 2006.

ROZAS, J. Sanchez-Delbarrio J. C, Messenguer; Rozas, DnaSP, *DNA Polymorphis manalysesthecoalescentando ther methods*. **Bioinformatics**, 19: 2496-2427. 2006.

SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Lista oficial de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfíbios.htm (acessado em dezembro de 2014).

SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Lista oficial de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfíbios.htm (acessado em janeiro de 2018).

SANGER, F, NICKLEN, S, COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.12 p.5463-5467, 1977.

SANTANA, D.J.; GAIGA, R.; STORTI, L.F.; SANTOS, T.G.; DIXO, M. New state record and distribution map of *Rhinella cerradensis* (Anura, Bufonidae) in the Cerrado biome, Brazil. **Herpetology Notes**. 2010.

SEEHAUSEN, O.; TAKIMOTO, G.; ROY, D.; JOKELA, J. Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. **Molecular Ecology**, v. 17,p. 30-44, 2008.

SEGALLA, M. V et al. **Herpetologia Brasileira** - Volume 8 - Número 1 - Fevereiro de 2018.

SEMILITSCH, R.O.; BROWN, K.L.; CALDWEL, J.P. Habitat utilization, seasonal activity and population size structure of the southeastern crowned snake *Tantilla carona*/a. **Herpetologica**. 1981.

SEQUEIRA, F., SODRÉ, D., FERRAND, N., BERNARDI, J.A., SAMPAIO, I., SCHNEIDER, H. & VALLINOTO, M. Hybridization and massive mtDNA

unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. **BMC Evolutionary Biology**, 11, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-11-264>. 2011.

SILVA, S.A.; KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. Uso do sequenciamento de genes mitocondriais na identificação de files de salmão. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**. 2012.

SPIX, J. B. Animalia nova sive species nova e testudinum et ranarum quas in itinere per Bbrassilian annis MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. **Bavariae Regis**. Munchen: F.S. Hubschmann. 1824.

STEVAUX, M.N. A new species of *Bufo* Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 2002.

STUART, B.L., INGER, R.F. & VORIS, H.K. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. **Biology Letters**, 2, 470–474. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2006.0505>. 2006.

TIHEN, J.A. Osteological observations on New World *Bufo*. **Am. Midl. Nat.** 67, 157–183. 1962.

THOMÉ, M. T. C., K. R. ZAMUDIO, C. F. B. HADDAD, and J. ALEXANDRINO. 2012. Delimiting genetic units in Neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. **BMC Evolutionary Biology** 12: 1-13.

VANHAECKE, D.; GARCIA DE LEANIZ, C.; GAJARDO, G.; YOUNG, K.; SANZANA, J.; ORELLANA, G., FOWLER, D.; HOWES, P.; MONZON-ARGUELLO, C.; CONSUEGRA, S. DNA barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered galaxiid fishes. **PLoS ONE**, v. 7, p. e32939, 2012.

VALLINOTO, M., SEQUEIRA, F., SODR_E, D., BERNARDI, J.A.R., SAMPAIO, I., SCHNEIDER, H. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. **Zool. Scr.** 39, 128–140. 2011.

VANZOLINI, P. E. & PAPAVERO, N. (ORG.) 1967. Manual de coleta e preparação de animais terrestres e de água doce. Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo e Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, Brasil, 222pp.

VENCES, M.; THOMAS, M.; BONETT, R.M.; VIEITES, D.R. **Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding**: chances and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005a.

WAGNER-Jr, W.H. The role and taxonomic treatment of hybrids. **BioScience**, v. 19, p. 785-95, 1969.

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago, The University of Chicago Press, 2007.

WERNER, F. Herpetologische Nova. **Zoologischer Anzeiger** 17: 410–415. 1894.

WILLIAMS, O.F.; BRAUN, S.E. Comparison of pitfall and conventional traps for sampling small mammal populations. **Journal Wildlife Manage.** 1983.