



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Pós-graduação em Biologia Animal



# Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae)



*Rhinella veredas*

Foto: Natan Maciel

Tese  
apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia  
Animal da Universidade de  
Brasília, como requisito para a  
obtenção do Título de Doutor  
em Biologia Animal

Orientadora: Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz  
Co-orientador: Dr. Guarino Rinaldi Colli

Brasília, 2008

Universidade de Brasília (UnB)  
Instituto de Ciências Biológicas (IB)  
Curso de Pós-graduação em Biologia Animal (BIOANI)

# Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae)

Natan Medeiros Maciel

Tese apresentada ao  
Programa de  
Pós-graduação em Biologia  
Animal da Universidade de Brasília,  
como requisito para a obtenção do  
Título de Doutor em Biologia Animal

Orientadora: Dra Elisabeth Ferroni Schwartz

Co-orientador: Dr. Guarino Rinaldi Colli

Brasília, 2008

Maciel, Natan Medeiros  
Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina*  
(Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae)/Natan Medeiros Maciel  
128f.

Tese (doutorado) – Universidade de Brasília. Instituto  
de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas.  
Pós-graduação em Biologia Animal. Brasília, 2008.  
Orientadora: Elisabeth F. Schwartz  
Co-orientador: Guarino R. Colli

1. Sistemática 2. Biogeografia 3. *Rhinella*

*Corpus orbiculare verrucosum, fordium, tetrum; caput antice obtusum, rotundatum, supra gibbum; dorsum rectum; at latera tumido-inflata; pedes breves: hinc fatus exiguus, amplexatio femellae in coitu imperfecta; urethra jaculatoria. Ova in taeniam longissimam connexa. Vita nocturna; lucem, folemque perofae latent de die in humidis obicuris; fi protrahuntur, pupilla angustata in rima. At noctu vagantur, praedae (maxime phalaenis) inhiantes. Hinc differunt ab affinibus; uti frix a falcone, caprimulgus ab hirundine, phalaena a papilione.*

Laurenti (1768)

## **Dedicatória:**

Esta tese é dedicada ao zoólogo Werner Calos Augusto Bokermann (*in memoriam*) pela sua contribuição para a herpetologia e pela inspiração

## **Agradecimentos:**

À minha mãe, meu pai e irmão.

À Elisabeth Schwartz, Guarino Colli e Rosane Collevatti pela orientação.

Aos grandes amigos Rubens Matsushita, Marcelo Kokubum, Armando Teixeira Jr., Leandro Campos, Flávio Dourado, Lilian Giugliano, Reuber Brandão, Fabrícus Maia, Ludmila Franco, Daniel Sifuentes, Leonora Tavares-Bastos, Vinícius Pereira, Bruno Pimenta, Daniel Mesquita, Roberta Figueiredo, Mariana Zatz.

Aos amigos e professores Carlos Schwartz, Antonio Sebben, Osmino Pires Jr., Renato Caparroz, Hélio da Silva.

À minha namorada Tatiane Grobério.

À minha amiga Ludmila, pela ajuda e pelo trabalho de Iniciação Científica sobre avaliação de variações de indolalquilaminas.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Karla Martins e Rafael Magalhães ajudaram na digitação da matriz com dados osteológicos.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Fernanda Werneck, Gustavo Vieira e Mariana Mira ajudaram bastante.

Muito obrigado a Lilian Giugliano e Leonora Tavares-Bastos pela ajuda nas análises filogenéticas.

A Mariana Mira por possibilitar o trabalho de Iniciação Científica da Ludmila sobre avaliação de variações de indolalquilaminas e pela ajuda com os trâmites na CHUNB.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

Ao grande amigo Reuber Brandão por me ensinar sobre taxonomia.

À Luciana Nascimento por me iniciar no mundo herpetológico e pelas ricas observações na parte da taxonomia.

Aos herpetólogos que de alguma forma ajudaram na execução deste projeto.

Aos amigos Raúl Maneyro (coleta de material de *R. achavali* e por me abrigar em Rivera no Uruguai), Rodrigo Lignau (coleta e envio de material de *Bufo ictericus mertensi* de Santa Catarina e por me abrigar em Porto Alegre), Marcus Di-Bernardo (*in memoriam*) (empréstimo de material de *R. achavali*), Daniel Loebmann (coleta e envio de exemplares de *R. arenarum*), Ignácio da La Riva (doação de tecidos de *R. poeppigii* provenientes da Bolívia), amigos da herpetologia da UFMT pelo acesso a coleção de anfíbios, ao Tiago Serafini pela coleta e envio de exemplares de *Rhinella jimi*, Daniel Nadaletto pelo empréstimo de material tipo de *R. jimi*, Paulo Bernarde pela coleta de *Rhaebo guttatus*.

Ao José Pombal Jr. pelo acesso a coleção Adolpho Lutz e do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

A Jennifer Pramuk pela ajuda com seu conhecimento com bufonídeos. Além de outros pesquisadores que trabalham ou trabalharam com bufonídeos e que contribuíram de alguma forma este trabalho: Roy McDiarmid, Marinus Hoogmoed, Cláudia Vélez, Gregory Pauly, Patrícia Narvaes.

Aos amigos Allan Crema e Guilherme Fajardo pelo auxílio durante as coletas.

Ao Roy McDiarmid pela orientação do estágio no exterior (CAPES-PDEE) e todo os amigos do Division of Amphibians and Reptiles, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution.

Aos curadores e responsáveis pelas coleções/museus que enviaram informações relevantes sobre espécimes e espécimes-tipo das espécies do grupo *Rhinella marina* (revisão taxonômica).

Ao Eric e Priscila Antonini por me abrigarem em sua casa em Alexandria, Virginia durante o estágio no exterior.

Ao grande amigo Omar Torres-Carvajal.

Ao Washington e Cesinha pela ajuda sempre que precisei.

À Marisia e Chiquinho do Laboratório de Enzimologia e Biofísica (Universidade de Brasília), respectivamente.

À Nara pela grande ajuda durante o período de pós-graduação.

A todas as pessoas que ajudaram, mesmo que indiretamente, durante o período de execução do doutorado.

Aos responsáveis pela Fazenda Trijunção (Teodoro Machado e Neuber dos Santos).

Aos responsáveis pelo Centro de Instrução e Adestramento de Brasília (CIAB).

Aos responsáveis pela Fazenda Jatobá (Yago e Mariana Zatz).

Aos autores que enviaram (doaram) livros relevantes utilizados nesta tese: Roy McDiarmid, John Wiens, Friedrich Pfeil e Masatoshi Nei.

Adrian Garda conseguiu bibliografia difícil de obter.

À organização Norte-americana Ideawild pela concessão do “gift” laptop iBook G3 essencial para as análises filogenéticas.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas de doutorado e estágio de doutorado no exterior (PDEE) e auxílio nas atividades discentes.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Brasília por conceder auxílio financeiro para a realização do projeto de tese (viagens de coleta e compra de reagentes).

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal pelas facilidades.

Ao RAN/IBAMA pela licença de coleta e transporte dos animais concedidos.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	I
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VI
INTRODUÇÃO .....	1
Considerações gerais .....	1
Taxonomia do grupo <i>Rhinella marina</i> .....	4
JUSTIFICATIVA .....	13
OBJETIVOS .....	15
APRESENTAÇÃO DA TESE .....	17
CAPÍTULO 1 .....	18
Descrição de duas novas espécies do grupo <i>Rhinella marina</i> .....	18
CAPÍTULO 2 .....	19
Filogenia das espécies do grupo <i>Rhinella marina</i> .....	19
2.1) INTRODUÇÃO .....	19
2.1.1) Filogenia de “ <i>Bufo</i> ” e do grupo <i>Rhinella marina</i> .....	19
2.1.2) Caracteres de secreção cutânea de anfíbios .....	20
2.1.3) Caracteres moleculares para estudos filogenéticos .....	21
2.1.4) Caracteres morfológicos para estudos filogenéticos .....	23
2.1.5) Análises combinadas com diferentes conjuntos de dados .....	24
2.2) MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.2.1) Caracteres de secreção cutânea .....	26
Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea (uso da espécie <i>Rhinella schneideri</i> como modelo) .....	28
2.2.2) Caracteres moleculares .....	29
2.2.3) Caracteres morfológicos .....	32
2.2.4) Análises filogenéticas .....	33
2.2.4.1) Caracteres de secreção cutânea .....	35



2.2.4.2) Caracteres moleculares .....	36
2.2.4.3) Caracteres morfológicos .....	36
2.2.4.4) Análises combinadas .....	37
 2.3) RESULTADOS .....	 39
2.3.1) Dados das espécies coletados para este estudo .....	39
2.3.2) Caracteres de secreção cutânea .....	39
Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea (uso da espécie <i>Rhinella</i> <i>schneideri</i> como modelo) .....	41
2.3.3) Caracteres moleculares .....	41
2.3.4) Caracteres morfológicos .....	43
2.3.5) Análise combinada dos caracteres .....	45
Caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados .....	47
Caracteres morfológicos e moleculares combinados .....	47
Caracteres de secreção cutânea, morfológicos e moleculares combinados .....	48
 2.4) DISCUSSÃO .....	 50
2.4.1) Caracteres de secreção cutânea .....	50
Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea (uso da espécie <i>Rhinella</i> <i>schneideri</i> como modelo) .....	51
2.4.2) Caracteres moleculares .....	52
2.4.3) Caracteres morfológicos .....	53
2.4.4) Caracteres combinados .....	56
Caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados .....	56
Caracteres morfológicos e moleculares combinados .....	57
Caracteres de secreção cutânea, morfológicos e moleculares combinados .....	58
 CAPÍTULO 3 .....	 87
Biogeografia das espécies do grupo <i>Rhinella marina</i> .....	87
 3.1) INTRODUÇÃO .....	 87
3.1.1) Biogeografia e origem de Bufonidae e de “ <i>Bufo</i> ” .....	87
 3.2) MATERIAL E MÉTODOS .....	 91
 3.3) RESULTADOS .....	 93
 3.4) DISCUSSÃO .....	 95
 CONCLUSÃO .....	 104
 Trabalhos Futuros .....	 107

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
ANEXOS .....	128

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 <i>Rhinella marina</i> .....	8
Figura 2 <i>Rhinella arenarum</i> .....	8
Figura 3 <i>Rhinella icterica</i> .....	9
Figura 4 <i>Rhinella poeppigii</i> .....	9
Figura 5 <i>Rhinella schneideri</i> .....	10
Figura 6 <i>Rhinella rubescens</i> .....	10
Figura 7 <i>Rhinella jimi</i> .....	11
Figura 8 <i>Rhinella achavali</i> .....	11
Figura 9 <i>Rhinella veredas</i> .....	12
Figura 10 <i>Rhinella cerradensis</i> .....	12
Figura 11 Crânio diafanizado de um exemplar de <i>Rhinella cerradensis</i> (ASUnB 2554). (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral. A área azul corada por Azul de Alcian é cartilagem. (C) Vista ventral do crânio de um exemplar macerado de <i>R. cerradensis</i> (ASUnB 2553). A seta indica a única sinapomorfia morfológica do grupo <i>R. marina</i> . Os números arábicos indicam características do crânio desta espécie (ver anexo na descrição de <i>Rhinella cerradensis</i> ). As premaxilas foram perdidas durante a preparação ....	61
Figura 12 Desenho do crânio de um exemplar do grupo <i>Rhinella marina</i> mostrando com a seta a única sinapomorfia morfológica irreversível do grupo: a articulação entre o ramo medial do pterigóide e a ala do paraesfenóide formado por uma sutura (retirado de Pramuk, 2004) .....	62
Figura 13 Cromatografia em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTB, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cima. De 2 à 11: perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides das seguintes espécies: 2. <i>Melanophryniscus fulvoguttatus</i> (Bonito-MS); 3. <i>Rhaebo guttatus</i> (Rondolândia-MT); 4. <i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i> (Rondolândia-MT); 5. <i>Rhinella granulosa</i> (Cocos-BA); 6. <i>Rhinella crucifer</i> (Itacarê-BA); 7. <i>Rhinella arenarum</i> (Rio Grande-RS); 8. <i>Rhinella rubescens</i> (Brasília-DF); 9. <i>Rhinella achavali</i> (Rivera-Uruguaí); 10. <i>Rhinella veredas</i> (Cocos-BA); 11. <i>Rhinella veredas</i> (Buritizeiro-MG).....	63

Figura 14 Cromatografia em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTD, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cim. De 2 à 12: perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides das seguintes espécies: 2. *Rhinella marina* (Belém-PA); 3. *Rhinella icterica* (Atibaia-SP); 4. *Rhinella icterica* (Lebon Régis-SC); 5. *Rhinella schneideri* (Botucatu-SP); 6. *Rhinella schneideri* (Prado-BA); 7. *Rhinella schneideri* (São Gonçalo do Pará-MG); 8. *Rhinella schneideri* (Buritizeiro-MG); 9. *Rhinella schneideri* (Brasília-DF); 10. *Rhinella jimi* (Arembepe-BA); 11. *Rhinella cerradensis* (Brasília-DF); 12. *Rhinella cerradensis* (Cocos-BA)..... 64

Figura 15 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia resultante da análise de 16 caracteres de indolalquilaminas (70508 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 51, CI = 0,313 e RI = 0,125). O número acima do nó indica valor de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações ..... 65

Figura 16 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia resultante da análise de 16 caracteres de indolalquilaminas (70508 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 45, CI = 0,356 e RI = 0,098) ..... 66

Figura 17 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 451 caracteres moleculares (50 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 344, CI = 0,706 e RI = 0,576). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações ..... 67

Figura 18 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia resultante da análise de 451 caracteres moleculares (50 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 344, CI = 0,721 e RI = 0,605).. 68

Figura 19 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 451 caracteres moleculares. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 4 milhões de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações ..... 69

Figura 20 Cladograma mais parcimonioso da análise de parcimônia proveniente da análise de 83 caracteres morfológicos (Comprimento = 132, CI = 0,727 e RI = 0,591). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações ..... 70

Figura 21 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 83 caracteres morfológicos. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 1 milhão de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações ..... 71

Figura 22 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados (10 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 162, CI = 0,654 e RI = 0,517). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações ..... 72

Figura 23 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia proveniente da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados (10 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 161, CI = 0,658 e RI = 0,526) .....	73
Figura 24 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 1 milhão de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações .....	74
Figura 25 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 534 caracteres moleculares e morfológicos combinados (três árvores parcimoniosas) (Comprimento = 427, CI = 0,721 e RI = 0,530). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações .....	75
Figura 26 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados (cinco árvores parcimoniosas) (Comprimento = 459, CI = 0,706 e RI = 0,507). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações .....	76
Figura 27 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia proveniente da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados (cinco árvores parcimoniosas) (Comprimento = 476, CI = 0,681 e RI = 0,445) .....	77
Figura 28 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 4 milhões de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações .....	78
Figura 29 Cromatografias em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTB, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cima. Placa 1 (de 2 à 5); e placa 2 (de 2 à 4): perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides de diferentes espécimes de <i>Rhinella schneideri</i> coletados no mesmo dia demonstrando uma variação quantitativa .....	79
Tabela 1. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres de secreção cutânea .....	80
Tabela 2. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres moleculares .....	82
Tabela 3. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres morfológicos.....	84
Tabela 4. Parâmetros do modelo de substituição molecular encontrado pelo programa Modeltest para região do fragmento citocromo <i>b</i> .....	86

Figura 30. Filograma representando as linhagens do grupo *Rhinella marina* e outras espécies de *Rhinella* da análise de datação molecular usando métodos Bayesianos. Foram utilizados 451 nucleotídeos (fragmento mitocondrial citocromo *b*) de cada terminal e a análise foi enraizada com *Melanophryniscus* (não representado). A escala (0.1) representa unidades de tempo dos ramos referente a um milhão de anos..... 102

Figura 31. Cinco grandes áreas geográficas dos Neotrópicos usadas na análise de dispersão-vicariância. Reconstruções da distribuição ancestral para cada nó das duas soluções mais parcimoniosas obtidas (A e B). Setas indicam dispersões e barras indicam eventos vicariantes. ACN: América Central e do Norte, (EG): escudo da Guiana, (EC): escudo central brasileiro, (EB): escudo da costa brasileira, (S): região meridional do continente Sul-americano. \**Rhinella granulosa* presente em todas as localidades..... 103

## **RESUMO:**

O presente trabalho versa sobre a sistemática e biogeografia das espécies do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758). O projeto de tese foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta a descrição de duas novas espécies do grupo de estudo com ocorrência na região central do Brasil e aborda discussões acerca de sua taxonomia. O segundo capítulo aborda as relações de parentesco (filogenia) das espécies do grupo *R. marina* utilizando a evidência total (caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos) e métodos cladísticos (parcimônia e análise Bayesiana). Uma análise sobre variação populacional, individual, sazonal e sexual demonstrou não haver alto grau de polimorfismos nos caracteres de secreção cutânea para a filogenia do grupo em estudo. Os caracteres forneceram uma boa quantidade de informação para a resolução das relações de parentesco e o grupo interno foi considerado monofilético. Foram feitas várias discussões acerca da contribuição de cada grupo de caracter (partição) para a filogenia do grupo de sapos de estudo. Parece haver certa incongruência nos sinais filogenéticos fornecidos por cada um dos grupos de caracteres. Análise de datação molecular utilizando-se o relógio molecular relaxado e calibração por fósseis indica que o grupo *R. marina* é bem recente, sendo que seu ancestral originou-se há cerca de 8,5 milhões de anos, no final do Mioceno irradiando até o Quaternário. Uma combinação de fatores geológicos, climáticos e requerimentos fisiológicos podem explicar a presente distribuição das espécies (cenário biogeográfico) do grupo no tempo e espaço. Análises de áreas ancestrais indicam que o grupo de estudo teria se originado no escudo central brasileiro e, posteriormente irradiado para outras áreas do Neotrópico, principalmente por padrões de dispersão.

## **ABSTRACT:**

This research aims the study of systematics and biogeography of the species in *Rhinella marina* group (Linnaeus, 1758). The present dissertation was structured in three chapters. The first chapter presents the description of two new species, throughout central Brazil, and also focuses discussions about the taxonomy of the group. The second chapter investigated relationships (phylogeny) of the species in *R. marina* group using the total evidence (cutaneous secretions, molecular, and morphological characters), and cladistic methods (maximum parsimony and Bayesian analysis). An analysis of populational, individual, seasonal, and sexual variation proved that the cutaneous secretions characters seem not to have polymorphisms among the species studied. The characters provided a good number of information to resolve the relationships of the ingroup species, considered monophyletic. Discussions related to the contribution to phylogeny of each dataset (partition) were carried out. There is some incongruence among the characters sampled (cutaneous secretions, molecular, and morphological characters). Analyses of times of divergences using relaxed molecular clock, and fossils calibration indicate that the *R. marina* group is recent, and that it's most recent ancestral originated about 8.5 million years, in Miocene irradiating until the Quaternary. A combination of factors involving geological, climatic, and physiological requirements could explain the present time species distribution (biogeographic scenario) in time and space. Ancestral analyses also indicate that the *R. marina* group originated in Brazilian central shield and, lately irradiated to other neotropic areas, mainly by dispersion.



# **SISTEMÁTICA E BIOGEOGRAFIA DO GRUPO *Rhinella marina* (LINNAEUS, 1758) (ANURA: BUFONIDAE)**

## **INTRODUÇÃO**

### **Considerações Gerais**

ATÉ RECENTEMENTE, o gênero *Bufo* Laurenti, 1768 era considerado um grande agrupamento de espécies não monofilético (Graybeal e Cannatella, 1995; Pauly *et al.*, 2004; Pramuk, 2006; Frost *et al.*, 2006). *Bufo*, até então, era composto por mais de 250 espécies (Frost, 2004) distribuídas por todos os continentes, com exceção do Ártico, Antártico, Madagascar, Nova Guiné, Austrália e ilhas oceânicas. Algumas espécies, como o até então *Bufo marinus*, agora *Rhinella marina* (sensu Pramuk *et al.*, 2008), foram introduzidas em diversos lugares do mundo (Zug e Zug, 1979; Eastal, 1981; Eastal, 1988; Slade e Moritz, 1998; Frost *et al.*, 2006; Lever, 2001).

Até 2006, mais da metade das espécies de Bufonidae estava alocada no gênero *Bufo*, agrupada em 40 grupos fenéticos (Frost, 2004). Sua distribuição geográfica é maior do que qualquer gênero de anfíbio e uma das maiores entre os vertebrados. Por essa ampla distribuição e histórias de vida variadas, esses sapos são interessantes para trabalhos de história evolutiva e biogeografia (Pramuk *et al.*, 2001). Para simplificação, nesta tese, quando citado “*Bufo*” ou “*B.*” (*Bufo* ou *B.* entre aspas) é para se referir a este nome como um agrupamento não-monofilético, antes dos trabalhos de Frost *et al.* (2006), Chaparro *et al.* (2007) e Pramuk *et al.* (2008). A sistemática das espécies de “*Bufo*”, até pouco tempo, era pouco compreendida, particularmente por esse gênero possuir caracteres morfológicos conservados e por sua ampla distribuição. No entanto, diversos trabalhos recentes vêm contribuindo para o conhecimento sobre sistemática e biogeografia de Bufonidae (Pauly *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2006; Pramuk, 2006; Pramuk *et al.*, 2008). De acordo com Graybeal (1997) e Graybeal e Cannatella (1995), parece mesmo não existirem sinapomorfias suportando o gênero “*Bufo*”.

Blair e colaboradores (1972a) em “*Evolution in the Genus Bufo*”, definiram o que chamaram de linhagens de “crânios largos e de crânios estreitos”, baseados na largura do osso frontoparietal. Cei (1972) usou essa mesma característica de crânio reconhecendo duas

linhas principais de irradiação de “*Bufo*” na América do Sul, delimitadas pela cordilheira dos Andes. Os sapos de “crânio largo” estão representados pelos grupos “*B*”. *marinus*, “*B*”. *crucifer*, “*B*”. *granulosus*, “*B*”. *margaritifer* e “*B*”. *guttatus* e os sapos de “crânio estreito”, representados pelos grupos “*B*”. *spinulosus* e “*B*”. *veraguensis*. Em sua filogenia de espécies de bufonídeos sul-americanos, Pramuk (2004, 2006) argumenta que os caracteres de crânio podem ser altamente convergentes em “*Bufo*”, o que poderia ter favorecido os grandes problemas na sistemática deste grupo de sapos.

De acordo com Duellman e Schulte (1992), das 51 espécies reconhecidas até então na América do Sul, 45 estariam alocadas em oito grupos feneticamente definidos: “*B*”. *veraguensis*, “*B*”. *valliceps*, “*B*”. *typhonius* (=“*B*”. *margaritifer*), “*B*”. *spinulosus*, “*B*”. *marinus*, “*B*”. *guttatus*, “*B*”. *granulosus* e “*B*”. *crucifer*. Pramuk (2004, 2006) também considera oito grupos fenéticos, mas com uma visão de agrupamento de táxons naturais (monofiléticos): “*B*”. *veraguensis*, “*B*”. *valliceps*, “*B*”. *margaritifer*, “*B*”. *spinulosus*, “*B*”. *marinus*, “*B*”. *guttatus*, “*B*”. *granulosus*, “*B*”. *crucifer* e sugere o ressurgimento do grupo “*B*”. *variegatus* para agrupar “*B*”. *cophotis*, “*B*”. *corynetes* e “*B*”. *variegatus*. Todas as análises de Pramuk (2006), utilizando-se de caracteres morfológicos e moleculares (métodos de parcimônia, máxima verossimilhança e Bayesiana), suportam o monofiletismo de cinco linhagens de sapos sul-americanos, como definidos por Duellman e Schulte (1992), “*B*”. *granulosus*, “*B*”. *guttatus*, “*B*”. *margaritifer*, “*B*”. *marinus* e “*B*”. *valliceps*. A maioria dos grupos de “*Bufo*” sul-americanos tem pelo menos uma sinapomorfia morfológica não reversível que foi usada como diagnose por Pramuk (2006). Os grupos não-monofiléticos são os grupos “*B*”. *veraguensis* e “*B*”. *spinulosus*. O grupo “*B*”. *veraguensis* é monofilético apenas nas análises filogenéticas morfológicas. O grupo “*B*”. *spinulosus* é polifilético em todas as análises.

Pramuk (2006) considera 72 espécies do até então gênero “*Bufo*” reconhecidas na América do Sul. No entanto, esta não considera a revisão do grupo “*B*”. *crucifer* por Baldissera Jr. *et al.* (2004) que eleva o número deste grupo, até então monotípico, para cinco espécies. Além disso, novas espécies têm sido descritas, principalmente do grupo “*B*” *margaritifer*, considerado o mais problemático taxonomicamente (Hoogmoed, 1990). É difícil precisar

o número de espécies de “*Bufo*” reconhecidas atualmente. O sítio *Amphibiaweb* (2008), mantido pela Universidade de Berkeley, na Califórnia, não considera as mudanças de Frost *et al.* (2006), mantém a maioria dos nomes dos táxons e é atualizado constantemente. Uma rápida pesquisa por “*Bufo*” revela um total de 283 espécies no mundo todo. O sítio da Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2007) também mantém a relação atualizada das espécies de anfíbios com ocorrência no Brasil, mas segue as mudanças de Frost (2007). Até sua última atualização, em Novembro de 2007, são listadas um total de 825 espécies de anfíbios com ocorrência no Brasil (país com a maior biodiversidade desse grupo de vertebrados). O mesmo sítio relaciona 59 espécies de bufonídeos com ocorrência no Brasil. O sítio *Amphibian Species of the World* (Frost, 2007) sofre atualizações a cada dois anos. No entanto, sofreu atualização nos anos de 2006 e de 2007, principalmente devidos aos arranjos relacionados à filogenia de Bufonidae (Chaparro *et al.*, 2007; Pramuk *et al.*, 2008). A recente atualização apresenta 72 espécies de *Rhinella* (Frost, 2007).

Além das diversas descrições recentes de espécies, revisões taxonômicas têm demonstrado que animais que foram classificados como uma única espécie constituem, na realidade, um grupo de espécies distintas. Na América do Sul, um complexo de espécies que foi considerado como uma única espécie, até então “*B*”. *granulosus*, agora *R. granulosa*, é, na verdade, constituído de várias espécies (Ceí, 1972). E, recentemente, esse grupo sofreu nova revisão (Narvaes, 2003). As espécies do até então gênero “*Bufo*” apresentam um grande número de conjuntos de caracteres que podem ser utilizados na sua sistemática (taxonomia e filogenia), como morfológicos, genéticos, comportamentais, químicos e bioacústicos (Blair, 1972). Apesar da importância dos agrupamentos fenéticos para a organização de gêneros, principalmente os com grande número de espécies, a maioria não foi testada dentro de um contexto cladístico.

Frost *et al.* (2006) sugerem que o gênero *Chaunus* Wagler, 1828, deveria ser revalidado para agrupar a maioria das espécies de “*Bufo*” neotropicais. Nesse trabalho, esse clado é suportado basicamente por caracteres moleculares. Além de *Chaunus*, *Rhinella* Fitzinger, 1826, e *Rhaebo* Cope, 1862 foram revalidados para alocar as demais espécies pertencentes ao gênero “*Bufo*” sul-americanas. Apesar das grandes mudanças, a composição dos grupos

fenéticos permaneceu inalterada.

Recentemente, Pramuk *et al.* (2008) publicaram um estudo filogenético de Bufonidae baseada na análise de 2521 pares de base de DNA (incluindo fragmentos gênicos mitocondriais e nucleares). Sua filogenia difere marcadamente das de Frost *et al.* (2006) e Pauly *et al.* (2004), principalmente na alocação de *Rhinella margaritifera* e *Rhamphophryne* que ficam inseridos dentro do grande clado de “*Bufo*” sul-americano (*Chaunus*, *fide* Frost *et al.*, 2006). Pramuk *et al.* (2008) usam a própria argumentação de Frost *et al.* (2006) de que se *Rhinella* Fitzinger, 1826, fosse encontrado em uma topologia dentro de *Chaunus* Wagler, 1828 o nome *Rhinella* seria o nome que tomaria precedência de um grupo mais inclusivo. Pramuk *et al.* (2008) argumentam que os clados da análise de Frost *et al.* (2006) poderiam ter sofrido por um artefato de baixa amostragem de táxons e caracteres entre *Rhinella* e *Rhamphophryne*. Então, de acordo com Frost *et al.* (2006) e os resultados do seu trabalho, Pramuk *et al.* (2008) sugerem o nome *Rhinella* para agrupar a maioria dos clados “recentes” de “*Bufo*” sul-americanos. Pramuk *et al.* (2008) encontram forte ligação entre as relações filogenéticas e os achados bigeográficos de Bufonidae. Sugerem nova hipótese biogeográfica e para origem de Bufonidae (detalhes no CAPÍTULO 3). Neste trabalho sigo Chaparro *et al.* (2007) e Pramuk *et al.* (2008) usando o gênero *Rhinella* para me referir às espécies do grupo *R. marina*.

#### Taxonomia do grupo *Rhinella marina*

O grupo *Rhinella marina* é composto até o momento por 10 espécies: *R. arenarum* (Hensel, 1867), *R. icterica* (Spix, 1824), *R. marina* (Linnaeus, 1758), *R. schneideri* (Werner, 1894), *R. poeppigii* (Tschudi, 1845), *R. rubescens* (A. Lutz, 1925), *R. jimi* (Stevaux, 2002), *R. achavali* (Maneyro, Arrieta e de Sá, 2004), *R. veredas* (Brandão, Maciel e Sebben, 2007) e *R. cerradensis* Maciel, Brandão, Campos e Sebben, 2007 (Figs. 1 a 10). Essas espécies de grande porte possuem ampla distribuição nativa, desde o Texas nos Estados Unidos, México e por toda a América do Sul até o Uruguai (Frost, 2007).

Segundo Duellman e Schulte (1992), as espécies do grupo *R. marina* são caracterizadas por (1) frontoparietais largos, fundidos aos proóticos; (2) canal occipital completamente coberto; (3) exostose dos ossos dermais pronunciada; (4) todas as cristas cranianas presentes,

elevadas, queratinizadas ou não; (5) pele no dorso com tubérculos grandes e pequenos; (6) série lateral de tubérculos largos ausentes; (7) glândulas parotóides largas, ovóides ou alongadas; (8) tímpano distinto; (9) focinho arredondado em vista dorsal e truncado em perfil; (10) primeiro dedo maior do que o segundo.

Pramuk (2004, 2006) apresenta a seguinte diagnose para o grupo *R. marina*: (1) grandes sapos com crânios bem ossificados, com exostose e profundas estriações, marcas e rugosidades; (2) crânio com todas as cristas craniais bem desenvolvidas; (3) crânio relativamente amplo (mais largo do que longo), com o maior comprimento sendo ao nível de quadrado jugal; (4) esfenotmóide coberto completamente pela articulação medial dos nasais e frontoparietais; (5) nasais não expandidos dorso-lateralmente e formando uma sutura quase transversa com os frontoparietais; (6) articulação da mandíbula posterior ao nível da fenestra ovalis e uma arcada temporal completa (Lynch, 1971); (7) diapófises sacrais não expandidas e mais cilíndricas do que a maioria das espécies analisadas no trabalho de Pramuk (2006); (8) margem anterior da diapófise sacral possuindo uma angulação postero-lateral ao eixo longitudinal da vértebra; (9) glândula parotóide grande e distinta. Ainda de acordo com Pramuk (2004, 2006), o grupo *R. marina* possui uma única sinapomorfia distintiva das outras espécies do gênero: (10) o ponto de articulação entre o ramo medial do pterigóide e ala do paraesfenóide formado por uma sutura (Fig. 12).

Este grupo de sapos também tem sofrido mudanças em sua taxonomia. Segundo Lavilla (1992), *B. rufus* Garman, 1877 é um nome já ocupado por *B. rufus* Schneider, 1799 e este nome seria sinônimo júnior de *B. terrestris* (Bonaterre, 1789). Faivovich e Carrizo (1997) removeram *B. missionum* Berg, 1896 da sinonímia de *B. rufus* onde tinha sido colocada por Gallardo (1961). De acordo com a lista de sinônimos, “*B.* *rubescens* A. Lutz, 1925 é o nome válido atualmente (Lavilla e Cei, 2001). De acordo com Gallardo (1962), “*B.* *schneideri* Werner, 1894, seria sinônimo sênior de *B. paracnemis* A Lutz, 1925.

Este grupo de sapos de grande porte, conhecidos vulgarmente como sapos cururus, tem um histórico de grandes problemas taxonômicos (Duellman e Schulte, 1992; Frost *et al.*, 2006; Pramuk, 2006). Os primeiros estudos taxonômicos de espécies do grupo remontam à época de Linnaeus. Linnaeus (1758) descreve *Rana marina* com base em um desenho

encontrado em Seba (1734), atribuindo um nome específico “*marina*” de acordo com este autor que indica ter avistado o espécime no mar. Diversos outros naturalistas coletaram ou obtiveram material biológico da fauna do novo mundo (neotropical) publicando diversos trabalhos com exemplares de diversas localidades. Isso não ocorreu somente com a *Rana marina* de Linnaeus, mas com outras espécies do grupo, principalmente espécies descritas por Spix (e.g. *Bufo ictericus*), Hensel (e.g. *Bufo arenarum*) e Tschudi (e.g. *Bufo poeppigii*), dentre outros. A falta da troca de informações e a facilidade da obtenção destes espécimes pela sua ampla área de distribuição por estes naturalistas criou grandes problemas taxonômicos e listas de espécies em sinonímia, e mesmo problemas com homonímia. Os problemas na taxonomia deste grupo aumentaram ao longo do tempo, com a descrição de espécies sinônimas e o uso de nomes impróprios (inválidos).

Quatro novas espécies do grupo *R. marina* foram descritas nos últimos sete anos. Stevaux (2001) descreveu *R. jimi* que tem ocorrência no Nordeste Brasileiro. Maneyro, Arrieta e de Sá (2004) descreveram outra espécie do grupo do Uruguai chamada *R. achavali*, que recentemente tem registros para o Rio Grande do Sul (Di-Bernardo *et al.*, 2005; Kwet *et al.*, 2006). Além disso, duas novas espécies do grupo da região do Brasil Central, foram descritas durante o desenvolvimento desta tese (Brandão *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2007) (Figs. 9 e 10) (veja CAPÍTULO 1, Anexo 1 e 2).

De acordo com Cochran (1955), as espécies “*B*”. *arenarum* e “*B*”. *rufus*” são morfologicamente mais semelhantes quando comparadas ao restante das espécies do grupo “*B*”. *marinus*. Cei (1980) sugere a ocorrência de dois grupos dentro do grupo “*B*”. *marinus*, com base no desenvolvimento do crânio e formato da língua: 1) grupo “*B*”. *arenarum*, incluindo *B. rufus* (=“*B*”. *rubescens*) e “*B*”. *arenarum*, e 2) “*B*”. *ictericus*, “*B*”. *marinus* e *B. paracnemis* (=“*B*”. *schneideri*) mantidos no grupo “*B*”. *marinus*. No entanto, esta classificação, mesmo que fenética, não foi seguida por nenhum autor.

Recentemente, Stevaux (2001) desenvolveu trabalho sobre filogenia e biogeografia do grupo utilizando-se de dados morfológicos e outros retirados da literatura. De acordo com este trabalho, *B. paracnemis* (=“*B*”. *schneideri*) parece ser um complexo de espécies. As quatro subespécies de “*B*”. *arenarum* parecem ser também unidades independentes, assim

como “*B*”. *ictericus ictericus* e *B. ictericus mertensi*. Ainda de acordo com a mesma autora, *B. rufus* (=“*B*”. *rubescens*) mostra sinais de ser a espécie mais antiga do grupo. Estes dados revelam como é pobre o conhecimento do grupo *R. marina* e que uma revisão taxonômica ainda necessita ser feita.





Figura 1 *Rhinella marina*. Foto: Natan Maciel



Figura 2 *Rhinella arenarum*. Foto: Natan Maciel





Figura 3 *Rhinella icterica*. Foto: Natan Maciel



Figura 4 *Rhinella poeppigii*. Foto: Ignacio De La Riva



Figura 5 *Rhinella schneideri*. Foto: Antonio Sebben



Figura 6 *Rhinella rubescens*. Foto: Rubens Matsushita





Figura 7 *Rhinella jimi*. Foto: Maria Nazaré Stevaux



Figura 8 *Rhinella achavali*. Foto: Raül Maneyro





Figura 9 *Rhinella veredas*. Foto: Natan Maciel



Figura 10 *Rhinella cerradensis*. Foto: Natan Maciel

## JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre a sistemática (filogenia e taxonomia) e biogeografia do grupo *Rhinella marina*, já constitui a justificativa necessária para a realização deste projeto.

O trabalho de sistemática envolve a filogenia e a taxonomia. A filogenia fornece informações sobre as relações de parentesco entre as espécies e a taxonomia fundamenta-se principalmente na análise comparativa dos atributos das espécies (caracteres taxonômicos) (Papavero, 1994) para identificá-las e/ou classificá-las (apresentação de diagnoses diferenciais). Um ponto importante na sistemática atual sustenta que as relações de parentesco de um grupo de espécies devem se refletir na sua classificação. Ou seja, os agrupamentos de espécies (ou categorias taxonômicas) devem constituir grupos naturais (monofiléticos).

Um dos objetivos fundamentais da sistemática moderna é o uso de relações filogenéticas para ajudar a compreender padrões biogeográficos. Uma vez que uma filogenia bem elaborada é obtida, pode ser usada para se estimar tempos de divergência e encontrar hipóteses biogeográficas de tempo e espaço para um grupo taxonômico (Cox e Moore, 2005).

Como diversas espécies de anfíbios, os bufonídeos também são susceptíveis a extinções. “*B. periglenes*”, uma espécie da Costa Rica, tornou-se extinto 15 anos após ter sido descrita (Crump *et al.*, 1992). Outras espécies, como *Atelopus chiriquiensis*, encontram-se criticamente ameaçadas (Lips *et al.*, 2004). Diversas causas têm sido documentadas para o declínio populacional de anfíbios, como o fungo quitrídeo (Berger *et al.*, 1998), destruição de habitat, radiação ultravioleta e contaminação. A sistemática e biogeografia podem fornecer melhor entendimento sobre os padrões de extinção dos anfíbios. O grupo *Rhinella marina* tem ampla distribuição na América do Sul e provavelmente possui mais espécies do que as reconhecidas atualmente. Novas espécies têm sido descritas recentemente, outras ainda podem ser descobertas após trabalho criterioso de revisão. Com a definição dos táxons e as relações de parentesco podemos conhecer melhor o grupo e traçar estratégias adequadas para a conservação. Algumas populações de espécies como *R. marina* foram introduzidas

em diversas localidades no mundo (Slade e Moritz, 1998; Lever, 2001; Zug) para o controle de pragas como as da cana-de-açúcar. O entendimento das dinâmicas de distribuição das populações de *R. marina* é crítico para mitigar a ameaça a diversidade biológica nas áreas atingidas. Um estudo recente de Urban *et al.* (2007), usando métodos moleculares e critérios estatísticos, demonstram que na Austrália a espécie já poderia ter a habilidade de dispersão em uma área que quase dobra sua atual distribuição e que triplica as projeções baseadas em sua distribuição nativa. Os resultados da presente tese podem ser usados em políticas de controle de populações onde esta espécie se tornou um problema para o meio ambiente e para a economia local. O estudo da evolução e comportamento (avaliação de possíveis variações individuais, sazonais, sexuais) das moléculas da secreção cutânea destas espécies (*e.g.* aminas biogênicas) é fundamental para a melhor compreensão de seu uso e importância como caracteres para gerar filogenias.

## OBJETIVOS

### *Objetivos gerais:*

- Descrição de duas novas espécies do grupo *Rhinella marina* (capítulo 1);
- Análise filogenética das espécies do grupo *Rhinella marina* a partir de três conjuntos diferentes de caracteres (capítulo 2);
- Estimar tempos de divergência entre os clados do grupo de estudo e obter um cenário biogeográfico (capítulo 3).

### *Objetivos específicos:*

- Contribuir para o conhecimento sobre a taxonomia do grupo *R. marina* pela descrição de duas espécies novas (capítulo 1);
- Obtenção de matrizes de dados para a análise filogenética a partir da análise da composição da secreção das glândulas parotóides (indolalquilaminas), seqüenciamento do fragmento gênico mitocondrial (citocromo *b*) (Graybeal, 1993) e obtenção de dados morfológicos (sensu Pramuk, 2006) de exemplares de espécies do grupo *R. marina* (capítulo 2);
- Análise filogenética utilizando os métodos da parcimônia e Bayesiano com os caracteres obtidos (análises particionadas e combinadas) (capítulo 2);
- Testar o monofiletismo do grupo *R. marina* e a possível presença de mais de uma linhagem distinta (grupo monofiletico) dentro do grupo (como sugerido por Maciel *et al.*, 2007) (capítulo 2).
- Avaliação de possíveis variações populacionais, individuais, sexuais e sazonais na composição de indolalquilaminas presentes na secreção das glândulas parotóides de uma população de *R. schneideri* (capítulo 2);
- Obter dados sobre tempos de divergência entre os clados do grupo *R. marina* a partir do cladograma gerado pela inferência Bayesiana (evidência total) e a matriz de dados gerados pelo fragmento gênico mitocondrial (citocromo *b*), utilizando registros fósseis e estimativas

de tempos de divergência da literatura como pontos de calibração (capítulo 3).

- Obter uma hipótese biogeográfica (dispersão e/ou vicariância) para as espécies do grupo *R. marina* e prováveis áreas ancestrais (capítulo 3).



## APRESENTAÇÃO DA TESE

Este projeto de tese foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta a descrição de duas novas espécies do grupo *Rhinella marina*, com a distribuição atual conhecida no Cerrado Brasileiro.

O segundo capítulo apresenta uma hipótese filogenética do grupo *R. marina* baseada em caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos (basicamente osteologia). Foram usados os métodos de parcimônia e Bayesiano para gerar as relações de parentesco. No segundo capítulo ainda é abordada uma análise de variação populacional, individual, sexual e sazonal de *R. schneideri*. Este trabalho teve como objetivo compreender melhor a validade dos caracteres de secreção cutânea para gerar relações filogenéticas no que diz respeito a possível ocorrência de polimorfismos.

O terceiro capítulo versa sobre aspectos biogeográficos da distribuição atual e ancestral das espécies do grupo de estudo, baseado na datação molecular de eventos evolutivos utilizando-se métodos Bayesianos, registros fósseis e estimativas de tempos de divergência.

## CAPÍTULO 1

### Descrição de duas novas espécies do grupo *Rhinella marina*

A primeira espécie descrita, *Chaunus veredas* Brandão, Maciel e Sebben (2007) apresenta distribuição pelos Estados brasileiros de Minas Gerais, Piauí e Bahia. A introdução desta descrição aborda um histórico aprofundado sobre a taxonomia do grupo “*Bufo*” *marinus*. Esta espécie foi inicialmente alocada no gênero *Chaunus* seguindo o trabalho de Frost *et al.* (2006). Logo depois, dois trabalhos melhor embasados de Chaparro *et al.* (2007) e Pramuk *et al.* (2008) sugerem o uso do nome *Rhinella* para alocar a maioria das espécies do até então gênero *Bufo* sul-americanos (ver INTRODUÇÃO: Considerações gerais). A segunda espécie descrita, *Rhinella cerradensis* (Maciel, Brandão, Campos e Sebben, 2007), possui distribuição nos seguintes Estados brasileiros: Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal. Além da descrição do adulto, apresenta a descrição do girino e vocalização de anúncio desta espécie nova, assim como a comparação com os dados disponíveis na literatura. O trabalho ainda apresenta uma análise de componentes principais (PCA) feita a partir de dados morfométricos de exemplares do grupo *R. marina*. Os resultados das análises permitem novas discussões sobre o atual arranjo fenético do grupo. As análises de PCA sugerem a existência de dois subgrupos de espécies dentro do grupo *R. marina*. Um grupo formado pelas espécies *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, *R. icterica*, *R. jimi* e *R. cerradensis*. E outro formado pelas espécies *R. arenarum*, *R. rubescens*, *R. achavali* e *R. veredas*. O primeiro subgrupo é composto pelas espécies de maior porte, com cristas craniais marcadas e desenvolvidas, tímpanos relativamente menores, e membros mais curtos. O segundo subgrupo é formado pelas espécies de menor porte com cristas craniais menos desenvolvidas e glândulas parotóides relativamente mais longas. Este arranjo foi discutido em um contexto cladístico nos resultados das análises do CAPÍTULO 2 (RESULTADOS E DISCUSSÃO) para descobrir se estes subgrupos fenéticos poderiam constituir agrupamentos naturais (monofiléticos). Como as descrições das novas espécies já foram publicadas, os artigos encontram-se em anexo (Anexo 1 e 2).

## CAPÍTULO 2

### Filogenia das espécies do grupo *Rhinella marina*

#### 2.1) INTRODUÇÃO

##### 2.1.1) Filogenia de “*Bufo*” e do grupo *Rhinella marina*

Hipóteses filogenéticas são necessárias para a compreensão da história evolutiva de um grupo de organismos e ainda servem para determinar hipóteses biogeográficas alternativas (Felsenstein, 1985). Nos últimos 50 anos, diversos trabalhos têm proposto uma variedade de métodos fenéticos para investigar as relações entre “*Bufo*”. Muitos deles ocorreram antes do desenvolvimento de métodos filogenéticos modernos (baseados em inferências cladísticas) como é o caso da obra já citada “*Evolution in the Genus Bufo*” (Blair, 1972a). Apesar de uma grande obra, resulta em interpretações ambíguas sobre evolução e biogeografia de “*Bufo*”. Maxson (1981a, b; 1984) faz uso de dados imunológicos para investigar as relações entre espécies de “*Bufo*”. Graybeal (1997) produziu uma grande hipótese filogenética de Bufonidae combinando três regiões de genes mitocondriais (citocromo *b*, 12S e 16S), uma região nuclear (*c-mos*) e 73 caracteres morfológicos. Em sua análise, Graybeal sugere que “*Bufo*” não é monofilético, mas não consegue dados suficientes para testar o monofiletismo dos grupos fenéticos. Sua amostragem de espécies sul-americanas é baixa, resumindo-se a nove espécies, e há pouca correlação entre as áreas geográficas de distribuição das espécies e a filogenia. Além disso, muitas das seqüências de 16S foram criticadas por sua baixa qualidade (Harris, 2001). Pauly *et al.* (2004) provêm hipótese de filogenia e biogeografia das espécies de “*Bufo*” norte-americanas utilizando-se de genes mitocondriais e métodos de “bootstrapping” para testar hipóteses alternativas de biogeografia.

Atualmente, a hipótese filogenética mais completa de espécies de “*Bufo*” sul-americanas e de Bufonidae é a apresentada por Pramuk *et al.* (2008). Outro trabalho de Pramuk (2006) demonstra que seis dos oito grupos dos até então “*Bufo*” sul-americanos são monofiléticos, com exceção dos grupos *R. spinulosa* e *R. veraguensis*. Dessa forma demonstrando que, apesar da definição fenética, o agrupamento de espécies de *Bufo* sul-americanas parece não constituir grupos artificiais (não-monofiléticos).

Além desses trabalhos, as hipóteses limitam-se às hipóteses para alguns grupos fenéticos como *R. crucifer* (Baldissera Jr., 2001; Maciel *et al.*, 2006); *R. peltoccephala* (Pramuk, 2002), *R. marina* (Stevaux, 2001) e *R. margaritifera* (Fouquet *et al.*, 2007). Portanto, esforços têm sido feitos para testar o monofiletismo destes agrupamentos (Pramuk, 2006). De acordo com Duellman e Schulte (1992), não existe uma característica sinapomórfica que sustentaria o monofiletismo do grupo de *R. marina*. Já de acordo com o trabalho de Pramuk (2006), tanto caracteres morfológicos como moleculares suportam o monofiletismo deste grupo de espécies. Existe uma quantidade considerável de estudos sobre filogeografia de populações nativas e introduzidas de *R. marina* (*e.g.* Slade e Moritz, 1998; Estoup *et al.*, 2001; LeBlois *et al.*, 2000; Robertson, 2003; Mulcahy *et al.*, 2006). O trabalho de Slade e Moritz (1998) indica a presença de dois grupos geneticamente divergentes separados a Leste e Oeste dos Andes venezuelanos. Estes dois grupos poderiam constituir pelo menos duas espécies diferentes.

#### 2.1.2) Caracteres de secreção cutânea de anfíbios

Todos os anfíbios apresentam em sua pele pelo menos dois tipos de glândulas: granulares e mucosas. Glândulas granulares são responsáveis pela síntese de uma grande diversidade de compostos químicos que conferem proteção contra infecções por bactérias e fungos, bem como contra predadores. Durante a evolução dos anfíbios, esses mecanismos defensivos e as substâncias associadas a estes evoluíram independentemente em cada espécie, como um resultado da interação com o respectivo ambiente (Toledo e Jared, 1995).

De acordo com sua estrutura química, os tipos moleculares encontrados na pele de anfíbios são divididos em quatro categorias: aminas biogênicas, esteróides (bufogeninas e bufotoxinas), alcalóides e peptídeos (incluindo polipeptídeos e proteínas) (Daly *et al.*, 1987; Clarke, 1997; Erspamer, 1994). Recentemente Schwartz *et al.* (2007) apresentaram o panorama atual e perspectivas sobre o estudo com os princípios ativos encontrados na pele de anfíbios.

Segundo Cei *et al.* (1972), a pele dos bufonídeos é considerada um verdadeiro depósito natural de aminas, especificamente, indolalquilaminas. As indolalquilaminas são um

grupo de amins biogênicas derivadas do aminoácido triptofano por uma complexa cadeia enzimática. Estudos sobre relações de parentesco entre táxons foram feitos com o uso de esteróides (Low, 1972) e indolalquilaminas da secreção da pele (Ceil *et al.*, 1972) e glândula parotóide (Ceriotti *et al.*, 1989) ou com uma combinação de pele e glândula parotóide de bufonídeos (Maciel *et al.*, 2003). No entanto, apenas o último trabalho utiliza métodos cladísticos para estabelecer relações de parentesco.

Os caracteres de secreções cutâneas das glândulas parotóides (indolalquilaminas e proteínas) de espécies do grupo *R. crucifer* indicam as relações filogenéticas entre esses táxons (Maciel *et al.*, 2006). No entanto, pouco ainda se sabe sobre o real valor dos caracteres de secreção cutânea para a filogenia de anuros. A adoção de novas técnicas para a separação de moléculas e a caracterização química das moléculas não conhecidas pode ser usada para ajudar a determinar este valor. Além disso, possíveis variações populacionais, individuais, sazonais e sexuais devem ser analisadas. Variações quantitativas também podem ocorrer (Ceil *et al.*, 1972) e poderiam simular variações qualitativas. Esse tipo de variação poderia também estar correlacionado com tamanho do animal, condição (*e.g.* injúrias causadas por predadores) e/ou fatores abióticos como umidade, temperatura e precipitação pluviométrica. As moléculas das secreções cutâneas de anfíbios são ótimas candidatas, podendo constituir mais um caracter importante para gerar filogenias (Maciel *et al.*, 2003).

### 2.1.3) Caracteres moleculares para estudos filogenéticos

Grandes avanços na biologia molecular proporcionaram o estudo das relações evolutivas dos organismos por comparação de seu genoma. O uso de fragmentos gênicos para gerar filogenias tem algumas vantagens sobre os métodos clássicos nos quais caracteres morfológicos e até mesmo comportamentais são usados. O primeiro motivo é que o DNA consiste de quatro tipos de nucleotídeos, adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), podendo ser usado para comparar qualquer grupo de organismo, incluindo bactérias, plantas e animais. Utilizando-se os caracteres clássicos, isso é virtualmente impossível. O segundo motivo é que uma vez que as mudanças no DNA seguem um padrão mais ou menos regular, é possível usar modelos matemáticos para estabelecer a mudança e comparar o DNA de

organismos distantemente relacionados. Isso é extremamente complicado em se tratando de caracteres clássicos. O terceiro motivo é que os genomas de todos os organismos consistem de uma sequência longa de nucleotídeos e podem conter uma quantidade maior de informação filogenética do que os caracteres morfológicos, por exemplo. Por estas razões, espera-se que a filogenia utilizando-se caracteres moleculares esclareça muitos padrões de ramificação da árvore da vida que são difíceis de resolver por caracteres clássicos (Nei e Kumar, 2000).

A mudança evolutiva das sequências de DNA é mais complexa do que das sequências de proteínas, porque existem vários tipos de regiões de DNA tais como regiões que codificam proteínas, regiões não-codificantes, éxons, íntrons, regiões flangeadoras, sequências de DNA repetitivas e sequências de inserção. Portanto, é importante saber o tipo e função da região de DNA que está sendo investigada. As mudanças mutacionais do DNA variam muito com a região do DNA explorada. Mesmo se considerarmos somente regiões codificantes, os padrões de substituição do primeiro, segundo, terceiro códon não são os mesmos. Além disso, algumas regiões são sujeitas à seleção natural mais frequentemente que outras e isto contribui para a variação do padrão evolutivo entre diferentes regiões de DNA (Nei e Kumar, 2000). Quando duas sequências de DNA são derivadas de um ancestral comum, é esperado que as sequências descendentes gradualmente divirjam pela substituição de nucleotídeos. Desta forma, ocorrem substituições entre A, T, C e G. Sabe-se também que transições ocorrem mais frequentemente do que transversões.

Uma infinidade de trabalhos nos últimos anos tem usado sequências gênicas para a reconstrução da filogenia de anfíbios (*e.g.* Chek *et al.*, 2001; Read *et al.*, 2001; Dawood *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2002; Salducci *et al.*, 2002; Symula *et al.*, 2003; Larson, 2005). Trabalhos de filogenia molecular também têm sido feitos para elucidar relações de parentesco de sapos do até então gênero “*Bufo*” (Graybeal, 1997; Pramuk *et al.*, 2001; Pramuk, 2002; 2006). Fragmentos de genes mitocondriais (*e.g.* 12S, 16S e citocromo *b*), além de nucleares (*e.g.* rodopsina 1, *c-mos*) têm sido usados para investigar relações de parentesco não só de anfíbios, mas também de outros grupos de vertebrados e invertebrados (*e.g.* Bruvo-Madžarić *et al.*, 2005; Yokoyama e Goto, 2005; Giugliano *et al.*, 2007). Esses genes têm sido utilizados em vários níveis taxonômicos na filogenia de anuros, desde

relações intragenéricas (*e.g.* Pramuk, 2006) até entre famílias (*e.g.* Hay *et al.*, 1995). Os genes mitocondriais podem ser escolhidos pelas seguintes razões: (1) são herdados maternalmente (Avice, 1994) e, portanto, imunes à recombinação (Lansman *et al.*, 1983); (2) regiões do genoma mitocondrial são conservadas (Meyer e Wilson, 1990); (3) vários iniciadores para a amplificação e sequenciamento já estão descritos (*e.g.* Feller e Hedges 1998; Ruvinsky e Maxson, 1996); (4) genes não-codificantes como 12S e 16S contêm dobras e alças contendo diferentes taxas de mudanças evolutivas que promovem tanto sinais para divergências mais recentes como para intermediárias (Pramuk, 2006). O gene citocromo *b* de animais (DNA mitocondrial) é frequentemente usado para investigar relações evolutivas de grupos intimamente relacionadas, mas tem taxa de evolução lenta quando comparado com os genes NADH, por exemplo. Os genes nucleares (*e.g.* rodopsina 1) de forma geral são utilizados para resolver divergências mais antigas em anuros (Hoegg *et al.*, 2004).

Portanto, os caracteres moleculares são importantes já que podem fornecer grande quantidade de informação filogenética (Hillis, 1987), além de permitir a comparação com informações contidas em bancos de dados. Dados moleculares também têm a vantagem de que sua base genética é comumente conhecida, enquanto a base genética para os caracteres morfológicos é assumida. Embora as decisões de alinhamento e escolha do gene a ser sequenciado envolvem um pouco de subjetividade, o critério utilizado para a delimitação dos caracteres tipicamente são diretos e objetivos. Na sistemática morfológica o caracter deve ser descoberto e delimitado pelo sistemata (Hillis e Wiens, 2000), o que requer um grande conhecimento da taxonomia do grupo de estudo.

#### 2.1.4) Caracteres morfológicos para estudos filogenéticos

Caracteres morfológicos têm sido tradicionalmente usados para gerar filogenias. O desenvolvimento das técnicas moleculares para obter seqüências gênicas e dos métodos computacionais para gerar filogenias também provocaram um avanço no redescobrimento da importância do estudo de caracteres morfológicos. A descoberta de novos caracteres e reanálise dos caracteres já conhecidos (*e.g.* mapeamento e testes de homologia) têm avançado bastante nos últimos anos.

A grande vantagem dos caracteres morfológicos é a possibilidade de amostragem de táxons bem maior do que é possível com as análises moleculares. Amostragem de um grande número de táxons pode ser dificultada pelo custo do sequenciamento, a necessidade de material relativamente fresco, a raridade (ou extinção) da espécie, e a inacessibilidade das áreas onde certos táxons ocorrem. Espécimes de museus podem ser usados para, de uma forma mais barata e rápida, obter dados de caracteres morfológicos para um grande número de táxons. A análise morfológica é praticamente a única maneira dos fósseis serem analisados filogeneticamente. Espécies extintas não apenas representam uma grande proporção da biodiversidade do planeta, mas também são cruciais para a compreensão das relações entre os táxons viventes (Smith, 1998). Fósseis são importantes para estimar corretamente as relações entre os seres, pois eles fornecem pistas para muitos dos estados de caracteres ancestrais, e esta informação pode ser usada para subdividir ramos longos entre grupos distantemente relacionados (Gauthier *et al.*, 1998; Huelsenbeck, 1991). A informação temporal que os fósseis possibilitam (*e.g.* datas estimadas do aparecimento de um registro fóssil) também é importante para testar e enraizar árvores (*e.g.* Gauthier *et al.*, 1998). Outra vantagem das filogenias baseadas em morfologia é que cada caracter morfológico é provavelmente codificado por diferentes genes ou conjuntos diferentes de genes, enquanto que grupos de caracteres moleculares, muitos ou todos os caracteres de nucleotídeos incorporam informação do mesmo gene. Enfim, além da reconstrução filogenética, a morfologia continua tendo um papel crucial na taxonomia. Em quase todos os grupos de organismos, espécies são descritas e identificadas com base em dados morfológicos. Portanto, mesmo sistematas moleculares dependem da morfologia para determinar quais espécies estão amostrando.

Diversos trabalhos recentes utilizam-se de caracteres morfológicos com sucesso para inferir hipóteses filogenéticas em anuros (*e.g.* Faivovich, 2002; Hass, 2003; Pramuk, 2006; Wiens *et al.*, 2005) e outros grupos de vertebrados (*e.g.* Giugliano *et al.*, 2007).

#### 2.1.5) Análises combinadas com diferentes conjuntos de dados

As análises combinadas são preferíveis para estimar a filogenia dos táxons, porque o sinal filogenético pode prevalecer sobre a homoplasia em grandes conjuntos de dados,



resultando em filogenias mais suportadas (Huelsenbeck e Hillis, 1993). Além disso, pode-se evitar a decisão arbitrária na escolha de métodos de consenso em conjuntos de dados separados (Barret *et al.*, 1993). Evidentemente, diferentes conjuntos de dados podem gerar hipóteses filogenéticas diferentes e isso pode ser o resultado de diferentes processos evolutivos sofridos pelos diferentes caracteres. Segundo Hillis (1987), o conflito entre conjuntos de caracteres (como morfológicos e moleculares) pode ser real ou espúrio e as razões para este conflito incluem, além das diferenças nos processos evolutivos, diferentes métodos de análise. Hillis e Wiens (2000) acreditam que a causa mais comum de incongruência entre filogenias moleculares e morfológicas é simplesmente o fraco suporte para uma ou ambas as estimativas, devido à subamostragem dos caracteres e/ou táxons. Os resultados das análises combinadas devem ser comparados com os resultados das análises separadas (partições) (Hillis, 1995).

Quando os caracteres de diferentes naturezas (*e.g.* molecular e morfológico) suportam fortemente diferentes árvores, as análises combinadas podem ou não melhorar as estimativas (Bull *et al.*, 1993). Existem diversos métodos estatísticos para testar as incongruências entre diferentes grupos de dados. Quando conflito significativo é descoberto, é particularmente importante investigar as causas da discordância entre as partições (Bull *et al.*, 1993).

Neste capítulo pretendeu-se testar mais uma vez o monofiletismo de *R. marina*, agora com a amostragem de todas as espécies do grupo e caracteres de natureza diferentes. Além disso, uma possível presença de mais de uma linhagem distinta (grupo monofiletico) dentro do grupo foi avaliado como sugerido por Maciel *et al.* (2007).

## 2.2) MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1) Caracteres de secreção cutânea

Para o estudo filogenético utilizando caracteres de secreção cutânea (indolalquilaminas) foram coletados de 1 a 16 exemplares de populações de cada espécie do grupo *R. marina*, de acordo com a situação taxonômica atual das espécies, pela sua grande área de distribuição (Tabela 1). Infelizmente, não foi possível obter secreção cutânea de espécimes de *R. poeppigii*. Esta espécie não ocorre no Brasil, somente na região andina do Peru, Equador e Bolívia (Frost, 2007). Como grupos externos, foram utilizadas secreções cutâneas das seguintes espécies: *Rhinella crucifer*, *R. granulosa*, *Rhaebo guttatus*, *Rhinella* gr. *margaritifera* (sensu Fouquet *et al.*, 2007) e *Melanophryniscus fulvoguttatus* (Tabela 1). As coletas foram feitas com posse das licenças expedidas pelo IBAMA/RAN nºs 065/04; 086/05 (renovação) e 097/06 (renovação), processo 02010.000832/04-74. Após a retirada da secreção cutânea, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico (lidocaína a 1,5%). A mesma metodologia para a morte dos animais também foi utilizada para obtenção dos caracteres moleculares e morfológicos. Exemplares testemunho encontram-se depositados na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB) sob a curadoria do Dr. Guarino R. Colli (Tabela 1). A metodologia para a morte dos animais foi analisada e autorizada pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA).

A secreção cutânea foi obtida por compressão manual das glândulas parotóides e recolhida em placas de Petri. Após este procedimento, a secreção foi ressuspensa em água deionizada, estocada em tubos de plástico (Falcon) de 15 ou 50 ml, liofilizada e armazenada a - 20°C. A secreção seca foi ressuspensa em metanol na concentração de 20mg/ml, sendo diretamente aplicada nas placas de cromatografia de camada delgada (CCD) para separação.

As soluções padrão de indolalquilaminas foram a serotonina (5-HT), bufotenina (BTN), bufotenidina (BTD) e deidrobufotenina (DHB). Essas foram obtidas tanto comercialmente (5-HT - Sigma Chemical Company - St. Louis, MO, USA), como em laboratório. A BTN foi obtida a partir de sementes de *Anadenanthera macrocarpa* (Leguminosae), de acordo com

Stromberg (1954). A BTD foi obtida de acordo com Pereira *et al.* (1963) por metilação da bufotenina com iodeto de metila em metanol absoluto. A DHB foi obtida no laboratório a partir da secreção das glândulas parotóides de *Rhinella icterica*, de acordo Slottt e Neisser (1937). Além disso, utilizou-se a bufotionina (DHB-S) como padrão, adotando-se para efeito de identificação deste composto o método descrito por Deulofeu e Duprat (1944).

Foi utilizada a técnica de cromatografia ascendente e unidimensional (cromatografia em camada delgada-CCD) para a separação das moléculas. O adsorvente escolhido foi a sílica-gel H, em placas obtidas comercialmente da Sigma Company (Polyester Sílica Gel; 250 µm de espessura da camada; 2–25µm de tamanho médio da partícula). Como sistema eluente, foi utilizada uma mistura de acetato de etila, álcool isopropílico e hidróxido de amônio (25%), na proporção de 90:70:40 (v/v/v). As soluções padrões das indolalquilaminas e os extratos das glândulas parotóides foram aplicados nas placas de cromatografia através de microseringas de vidro (Hamilton, Reno, NV, USA). As cromatoplas foram colocadas, na posição vertical, em cubas cromatográficas de vidro, previamente saturadas com o sistema eluente utilizado. Após o desenvolvimento unidimensional ascendente, ou seja, quando a frente do solvente atingia o ponto final de corrida, a partir do ponto de aplicação das soluções, a placa era retirada da cuba cromatográfica e o eluente eliminado com o auxílio de jato de ar quente. Em seguida, foi feita a pulverização da cromatoplasca com o reativo de OPT, segundo Narasimhachari e Plaut (1971), que se constitui da seguinte mistura: *O*-ftaldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 50 mg; L-cisteína, 500 mg; metanol, 25 ml; e ácido clorídrico (36%), 25 ml. Após a pulverização, a placa foi aquecida em estufa a 110°C por 10 minutos. A visualização foi feita sob luz ultravioleta (375 nm), onde as placas foram documentadas (fotos) para posterior análise.

A análise qualitativa das indolalquilaminas foi realizada através dos respectivos Rf (fator de retenção), determinados através da seguinte expressão:

$$R_f = \frac{\text{distância (cm) percorrida pela amina}}{\text{distância (cm) percorrida pela frente do solvente}}$$

## **Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea** (uso da espécie *Rhinella schneideri* como modelo)

Com o objetivo de analisar possíveis variações (polimorfismos) nos caracteres de secreção cutânea e sua relevância para gerar relações de parentesco, a secreção da glândula parotóide de espécimes de *Rhinella schneideri* (Fig. 5) foi coletada quinzenalmente na Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE), no Distrito Federal. Foram analisadas possíveis diferenças individuais, sexuais, sazonais na composição de indolalquilaminas e, se caso tais diferenças fossem observadas, se fatores bióticos (tamanho, temperatura e peso do animal) e/ou fatores abióticos (temperatura do ar, tipo de ambiente, umidade e estação do ano) poderiam influenciar na composição deste grupo de moléculas.

As saídas de campo para captura dos animais e coleta da secreção cutânea se iniciaram em julho de 2006 e prosseguiram até setembro de 2007. No entanto, o material coletado é proveniente de coletas até fevereiro de 2007. As buscas pelos animais foram feitas no começo da noite (19:00h), visualmente com o auxílio de lanternas até que todo o transecto previsto tivesse sido vasculhado. Foram obtidos dados morfométricos dos indivíduos, como comprimento rostro cloacal (CRC), largura da cabeça (LC) e altura da cabeça (AC) com o auxílio de paquímetro (precisão de 0,01mm). Para a obtenção de peso utilizou-se uma balança (precisão de 5g). A determinação do sexo foi feita pela observação de características sexuais secundárias como a presença de queratinização nos dedos dos machos e vocalização. Dados abióticos (temperatura local e condições climáticas) foram obtidos da estação meteorológica do IBGE e com o uso de termômetro de mercúrio. Todos os indivíduos capturados foram marcados no campo com um “micro-chip” subcutâneo (“PIT tag”) inserido na parte dorsal, atrás da glândula parotóide (Ireland, 2003). Com essa marcação, puderam-se identificar os exemplares que já haviam sido capturados anteriormente e utilizar-se da secreção cutânea para a análise de variação individual. A identificação do local de coleta e dos animais é importante para confrontar os dados obtidos pelas análises e pela possibilidade da existência de ocorrer variações interpopulacionais na composição das diversas indolalquilaminas (Schwartz, 1993). A secreção foi obtida por meio de uma leve compressão manual de uma das glândulas parotóides do animal, sem esgotamento das mesmas. A secreção foi coletada em

placas de Petri e posteriormente liofilizada e armazenada a -20°C (metodologia já descrita). Placas para cromatografia em camada delgada (10x20cm) foram preparadas com sílica gel H (Sigma Chemical Company), 40g em solução aquosa a 10% de acetato de polivinila (PVA).

A secreção liofilizada foi aplicada nas placas de cromatografia em uma concentração de 1,2mg/ml em metanol com auxílio de uma microseringa de vidro (Hamilton). Foram utilizados os mesmos padrões de indolalquilaminas para a obtenção dos caracteres de secreção cutânea: serotonina (5-HT), bufotenina (BTN), bufotenidina (BTD), deidrobufotenina (DHB). Além disso, utilizou-se a bufotionina (DHB-S) como padrão, adotando-se para efeito de identificação deste composto método descrito por Deulofeu e Duprat (1944). O sistema de solvente e o reativo foram os mesmos utilizados para o fracionamento da secreção e obtenção da matriz de indolalquilaminas. As placas reveladas pelo reativo (Narasimhachari e Plaut, 1971) também foram devidamente documentadas (fotos). As análises qualitativas foram feitas por comparação com os padrões (BTD, DHB, DHB-S, 5-HT e BTN) através dos respectivos Rf's (metodologia já descrita).

#### 2.2.2) Caracteres moleculares

Para o estudo filogenético utilizando caracteres moleculares foram obtidos tecidos (músculo e/ou fígado) de 2 exemplares de populações de cada espécie do grupo *R. marina*, de acordo com o estado taxonômico atual das espécies, pela sua grande área de distribuição. Como grupos externos, foram utilizados tecidos de *Melanophryniscus fulvoguttatus*, *Rhaebo guttatus*, *Rhinella* gr. *margaritifera* (sensu Fouquet *et al.*, 2007), *Rhinella granulosa* e *Rhinella crucifer*.

Amostras de tecidos foram preservadas em etanol absoluto e/ou congeladas e estocadas a -80°C. Amostras estão depositadas na coleção de tecidos da Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB) sob a curadoria do Dr. Guarino R. Colli (Tabela 2). Autorização para o acesso ao patrimônio genético ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) está sob o número de protocolo: 21016.001071/2006-24.

Para a extração, primeiramente as amostras de tecido foram maceradas com uma lâmina limpa com base cortante. O DNA genômico foi extraído utilizando o “DNeasy

Tissue kit<sup>®</sup>) (Qiagen, InR., Chatsworth, CA). O tampão de extração ATL (“DNeasy Tissue kit<sup>®</sup>”) e proteinase K (concentração final de 1mg/ml) foram usados para a lise dos tecidos. Após a homogeneização, o DNA foi purificado com colunas de purificação (Qiagen, InR., Chatsworth, CA) e visualizados em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada com o intuito de amplificar o fragmento gênico usado para as análises (citocromo *b*). As condições da amplificação do fragmento citocromo *b* (mitocondrial) foram 35 ciclos de: 94°C (desnaturação) por 60 segundos, 52°C (anelamento) por 60 segundos e 72°C (extensão) por 60 segundos.

Os iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do fragmento citocromo *b* foram os mesmos utilizados por Graybeal (1993). Para se amplificar este fragmento os iniciadores foram os seguintes:

- MVZ43: (5' GAGTCTGCCTWATYGCYCARAT 3'),
- MVZ28: (5' CGAGGCSCCYGCAATRATAA 3').

Posteriormente o produto da PCR foi purificado com as enzimas “shrimp alkaline phosphatase” (SAP) e exonuclease I (EXO) (Biotech Pharmacon ASA), na proporção de 1 unidade/μl de SAP para 1 unidade/μl de EXO. Para cada 5μl de material amplificado foi utilizado de 1–2μl de EXOSAP, dependendo da quantidade de material amplificado na reação. O ciclo para a purificação constituiu-se de um primeiro passo a 37°C por 90 minutos e um segundo de 80°C por 20 minutos. Este segundo passo é utilizado para desnaturação das enzimas utilizadas.

Foram verificadas similaridades com bancos de dados (“GeneBank”), utilizando-se algoritmos de busca (“BLAST”) para confirmar se as seqüências obtidas eram realmente as de interesse. As seqüências foram obtidas pelo seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem). Previamente, foram analisadas visualmente pelo programa Bioedit (Hall, 2005). Posteriormente, estas foram analisadas e editadas no programa SeqScape v2.1<sup>®</sup>. Este programa analisa as condições das seqüências por critérios pré-estabelecidos. Se as seqüências não satisfazem as condições estabelecidas no programa ela não é aceita. Neste programa, as condições giram em torno de parâmetros como análise de eletroferogramas, sinal das seqüências, bem como sua pureza. Além disso, o programa cria seqüências

consenso por comparação das seqüências inseridas. Para alinhamento foi utilizado o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) já que o fragmento amplificado e sequenciado é codificante. Após um alinhamento prévio, foram analisados “gaps”, sítios duvidosos e erros das seqüências baseados em eletroferogramas e nas seqüências previamente alinhadas dos outros espécimes no SeqScape, principalmente no início e final das seqüências, onde o resultado apresentado pelo sequenciador é de pior qualidade. Após finalmente editadas, as seqüências foram alinhadas pela tradução de seus aminoácidos utilizando-se como referência seqüências obtidas no “GeneBank”. Com o objetivo de se obter o máximo possível de informação das seqüências, após o alinhamento, os “gaps” das extremidades das seqüências foram substituídas por “?”. Um total de 45 seqüências de citocromo *b* foram obtidas dos espécimes estudados (grupo interno e externo). No entanto, apenas 26 foram usadas para a filogenia molecular. Esta escolha das seqüências foi baseada principalmente na qualidade das seqüências utilizando-se o programa SeqScape. Das espécies *R. schneideri* (Brasília-DF), *R. schneideri* (Buritizeiro-MG), *R. cerradensis* (Cocos-BA), *R. veredas* (Buritizeiro-MG), *R. achavali* (Rivera-Uruguai), *R. jimi* (Arembepe-BA) e *R. granulosa* (Rio Branco-AC) foram obtidas boas seqüências de dois indivíduos. Foi então criada uma seqüência consenso entre os espécimes da mesma população para a filogenia utilizando-se o programa SeqScape. No final, foram geradas 14 seqüências que foram incluídas nas análises (quatro delas referentes a espécies do grupo externo). Infelizmente, não existe referência no “GeneBank” para seqüências de citocromo *b* de *Rhaebo guttatus*. Esta espécie, portanto, não pôde ser incluída como grupo externo. Para a relação dos espécimes e dados referentes a estes ver Tabela 2. Foram obtidas 451 bases alinhadas de citocromo *b* incluindo os “gaps”. Desta forma as seqüências (matriz), ficaram prontas para as análises filogenéticas de parcimônia e para a análise de modelo de evolução (Modeltest v. 3.06) e posteriores análises filogenéticas com os métodos Bayesianos. A relação dos espécimes e dados referentes a estes se encontram na Tabela 2. A porcentagem de variação dos nucleotídeos no 1º, 2º e 3ºs códons foi avaliado pelo programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 2.2.3) Caracteres morfológicos

Os caracteres morfológicos foram obtidos em parte do trabalho de Pramuk (2006), assim como pelo presente trabalho. Em sua hipótese filogenética dos até então “*Bufo*” sul-americanos, Pramuk (2006) utiliza caracteres moleculares e morfológicos. Foram utilizados 83 caracteres morfológicos de Pramuk (2006), que são em quase sua totalidade osteológicos. Pramuk (2006) utilizou nesta análise, caracteres de osteologia cranial e axial, descritos por Lynch (1971), Martin (1972a, b), Pregill (1981), Cannatella (1985), Morrison (1994), Mendelson (1997a) e Pramuk (2000, 2002). Além destes, alguns caracteres de anatomia das partes moles e do tegumento (*e.g.* morfologia da glândula parotóide) foram incluídos na análise de Pramuk (2006). Um caractere relacionado a corpos de gordura inguinal foi codificado da literatura (Da Silva e Mendelson, 1999). Para detalhes dos caracteres e os possíveis estados pode-se consultar o artigo de Jennifer Pramuk (Pramuk, 2006). Dentre os caracteres utilizados a maioria é binária e 13 multiestados. Pramuk (2006) preparou espécimes das seguintes espécies do grupo *Rhinella marina* para análise morfológica: *R. arenarum*, *R. marina*, *R. poeppigii* e *R. schneideri*. Com o intuito de completar a matriz de dados com as demais espécies do grupo *R. marina*, foram preparados espécimes das demais espécies do grupo, inclusive as espécies novas descritas durante o período desta presente tese: *R. achavali*, *R. cerradensis*, *R. icterica*, *R. jimi*, *R. rubescens* e *R. veredas*. Foram também utilizados espécimes do trabalho de Pramuk (2006) como grupos externos: *Melanophryniscus stelzneri*, *Rhaebo guttatus*, *Rhinella* gr. *margaritifera*, *R. granulosa* e *R. crucifer*. A espécie *Melanophryniscus stelzneri* não é a mesma utilizada nas análises de secreção cutânea e molecular. Nestas análises, foi utilizada a espécie *Melanophryniscus fulvoguttatus*. No entanto, as espécies de *Melanophryniscus* foram agrupadas na análise de evidência total, formada pelas três partições deste trabalho (caracteres de secreção cutânea, morfológicos e moleculares). As duas espécies de *Melanophryniscus* pertencem ao mesmo grupo fenético (grupo *Melanophryniscus stelzneri*) (Cruz e Caramaschi, 2003) e apesar da incerteza sobre sua relação de parentesco as espécies foram combinadas como sendo o mesmo táxon.

Para a obtenção dos dados foram diafanizados/macerados dois espécimens de cada



uma das seguintes espécies do grupo *R. marina*: *R. achavali*, *R. arenarum*, *R. cerradensis*, *R. icterica*, *R. jimi*, *R. rubescens* e *R. veredas*, com exceção de *R. achavali*, *R. arenarum* (um exemplar já havia sido preparado por Pramuk, 2006) e *R. jimi* no qual somente um espécime foi preparado. A Tabela 3 relata os espécimes preparados para a obtenção dos caracteres morfológicos por Pramuk (2006) e por este trabalho. Os espécimes diafanizados foram preparados utilizando-se o protocolo de Taylor e Van Dyke (1985) ou Hanken e Wassersug (1981). Os exemplares macerados foram preparados à mão e depois enterrados por um período de três meses para a obtenção do esqueleto. Observações da morfologia dos exemplares foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico. Os exemplares diafanizados e macerados encontram-se depositados na Coleção Antonio Sebben-Universidade de Brasília (ASUnB) e na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB) (Tabela 3).

Os caracteres foram obtidos diretamente dos espécimes. Em casos de estado de caracter não conhecido (*e.g.* por danos ou devido à falta de um elemento) ou por inconsistência lógica, os caracteres foram codificados como não-conhecidos (“?”). A polaridade de transformação foi determinada pela comparação com os grupos externos. Todos os caracteres foram considerados não-ordenados. A terminologia osteológica usada seguiu Trueb (1993).

#### 2.2.4) Análises filogenéticas

Para este trabalho foram conduzidas análises filogenéticas para as três partições obtidas: caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos. Além disso, análises combinadas com os diferentes conjuntos de dados foram feitas (parcimônia e Bayesiana). Os grupos externos foram escolhidos com base em sua relação com as espécies que compõem o grupo *Rhinella marina*. *Melanophryniscus* é considerado o gênero mais basal dentro da família Bufonidae (Hass, 2003; Frost *et al.*, 2006; Pramuk, 2006). *Rhaebo guttatus* é outra espécie basal dentro das linhagens de Bufonidae sul-americanas (Pramuk, 2006). *Rhinella* gr. *margaritifera*, *R. granulosa* e *R. crucifer*, são representantes de grupos fenéticos considerados monofiléticos e intimamente relacionados com as espécies de *R. marina* por Pramuk (2006) e Pramuk *et al.* (2008). A topologia não foi forçada em nenhuma das análises. As análises foram feitas em dois computadores Macintosh G3 e G4 (programas MacClade 4.0, PAUP

4.0b 10 e Modeltest v. 3.06) e em dois PC's AMD Sempron e Workstation com processador duplo (programa Mr. Bayes v 3.1).

O método da parcimônia produz filogenias com base no menor número de passos (mudanças evolutivas) possíveis. Apesar de amplamente usado, não é um método que permite a inclusão de parâmetros para avaliar a evolução de um grupo de dados e, além disso, não necessariamente a história de um grupo de organismos poderia ser explicada da maneira mais parcimoniosa possível. Nas análises de parcimônia, foram gerados dados para todas as partições e os conjuntos de dados combinados, como: lista de apomorfias, comprimento das árvores, índices de consistência, retenção e grau de suporte de “bootstrap” (Felsenstein, 1985; 1000 pseudoreplicações e cinco táxons aleatórios de adição de réplicas) (valores maiores que 75% considerados suportados) (Hillis e Bull, 1993). Além disso, também foi gerado o índice de Bremer (índices maiores ou iguais a quatro considerados para clados bem suportados) (Macey *et al.*, 1997), implementado pelos programas MacClade e PAUP. Foram também utilizadas as otimizações de mudanças de estado de carácter oferecidas pelo programa PAUP 4.0b 10 (ACCTRAN e DELTRAN). ACCTRAN (transformação acelerada) significa que o método interpreta a mudança no estado de carácter como acontecendo mais cedo na filogenia e favorece a visualização de reversões. Já DELTRAN (transformação tardia) é usado para interpretar as mudanças no estado de carácter quanto mais tarde na filogenia possível e favorece a visualização de convergências. As análises foram conduzidas de forma que o grupo externo fosse parafilético em relação ao grupo interno, considerado monofilético. Assim foi possível testar o monofiletismo do grupo interno, justificando assim também o uso de vários táxons como grupo externo. O método de “bootstrap” tem sido criticado por alguns autores na literatura (*e.g.* Kitching *et al.*, 1998; Grant e Kludge, 2003). Por isso, para se testar o grau de suporte dos clados, foi utilizado também o índice de Bremer.

Segundo Huelsenbeck *et al.* (2002), a probabilidade *a posteriori* gerada pela análise Bayesiana pode ser interpretada como a probabilidade de que a árvore (ou o clado) seja a correta. As análises Bayesianas foram conduzidas pelo programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) para todas as partições e os conjuntos de dados combinados. Análises foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e foram conduzidas de modo a atingir

1.000.000, 2.000.000 ou mesmo 4.000.000 de gerações dependendo da análise e grupo de dados (caracteres). As árvores foram coletadas a cada 100 gerações, resultando em 10.000, 20.000 ou 40.000 pontos de amostragem (ou árvores) dependendo da análise e grupo de dados (caracteres). Fez-se o uso de gráficos do valor do logaritmo de verossimilhança contra o número de gerações para a detecção da “estabilização” dos valores do logaritmo de verossimilhança. Qualquer ponto de amostragem antes da “estabilização” foi considerado como “amostras da fase de aquecimento” (“burning samples”). A “estabilização” indica a convergência dos valores de logaritmo da verossimilhança e todas as árvores (pontos de amostragem) obtidas após a “estabilização”. O programa PAUP 4.0b 10 foi usado para obter uma árvore de consenso da maioria (50%), onde, previamente às análises, foram retiradas as árvores (ou pontos de amostragem) provenientes da “fase de aquecimento”. Como padrão o programa MrBayes v. 3.1.2 gera duas análises (“runs”) com os dados da partição. A árvore de consenso foi feita a partir do consenso das duas “corridas”. Valores maiores do que 95 foram considerados significantes para um grupo bem suportado (*e.g.* monofiletismo corroborado) (Leaché e Reeder, 2002). Foram utilizados diferentes modelos para o cálculo das taxas de variação entre os caracteres, dependendo da natureza do conjunto de dados analisados.

Não há como precisar o melhor método de inferência para gerar uma hipótese filogenética de um grupo de organismos. É difícil comparar parcimônia e Bayesiana, pois partem de métodos totalmente diferentes. Portanto, nesta presente tese optou-se por obter os dados e discutir os resultados das diferentes inferências de forma igualitária.

#### 2.2.4.1) Caracteres de secreção cutânea

Para o conjunto de dados de secreção cutânea, foram implementadas análises de parcimônia e Bayesiana. De forma usual, os caracteres de secreção cutânea foram codificados como ausência (0) e presença (1) de cada uma das moléculas. Para isto utilizou-se o programa MacClade 4.0 (Maddison e Maddison, 1992). Para *R. poeppigii*, que não foi amostrado para este conjunto de dados os caracteres foram codificados como não-conhecidos ou “missing” (?). Na análise de parcimônia foi usado o método de busca heurística (devido ao grande número de terminais deste conjunto de dados=21).

Análises Bayesianas foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e foram conduzidas de modo a atingir 1.000.000 de gerações. As árvores foram coletadas a cada 100 gerações, resultando em 10.000 pontos de amostragem (ou árvores). Foi utilizado o modelo “taxas de distribuição gamma” para o cálculo das taxas de variação entre os caracteres. O uso deste parâmetro melhor se aproxima do modelo Markoviano necessário para estimar filogenias baseadas em dados morfológicos através de critérios de verossimilhança. Dada a inexistência de melhor critério para os caracteres de secreção cutânea optou-se por usar o mesmo parâmetro usado para os caracteres morfológicos já que foram codificados com presença e ausência de cada um dos caracteres.

#### 2.2.4.2) Caracteres moleculares

Análises de parcimônia e Bayesiana também foram executadas para o conjunto de dados moleculares. Para a construção e edição da matriz de seqüências de nucleotídeos (A, T, C e G) após o alinhamento foi utilizado o bloco de notas® (“Notepad®”) já exportado do programa BioEdit (Hall, 1999) como arquivo Nexus (nex). O programa ModelTest v. 3.06 (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para se avaliar o modelo de evolução de seqüência que melhor se adequou aos dados moleculares obtidos. Este programa fornece um total de 56 opções de modelos de evolução diferentes. “Gaps” das extremidades das seqüências não foram considerados como um quinto estado.

Análises de parcimônia também foram implementadas no programa PAUP 4.0b 10. Para esta análise utilizou-se o método de busca “branch-and-bound”.

Análises Bayesianas foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e foram conduzidas de modo a atingir 4.000.000 de gerações. As árvores foram coletadas a cada 100 gerações, resultando em 40.000 pontos de amostragem (ou árvores). A estabilização foi obtida após a 5.000ª geração. Foi utilizado o modelo de evolução escolhido pelos testes de razão hierárquica de verossimilhança implementados pelo programa ModelTest v. 3.06.

#### 2.2.4.3) Caracteres morfológicos

Os caracteres morfológicos foram codificadas como caracteres binários e multiestado

(Pramuk, 2006) diretamente dos exemplares e então analisados com os métodos de parcimônia e Bayesiana. Para a análise de parcimônia utilizou-se a procura “branch-and-bound”.

As análises Bayesianas foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e foram conduzidas de modo a atingir 1.000.000 de gerações. As árvores foram coletadas a cada 100 gerações, resultando em 10.000 pontos de amostragem (ou árvores). A estabilização foi obtida após a 2.500ª geração. Foi utilizado o modelo “taxas de distribuição gamma” para o cálculo das taxas de variação entre os caracteres. O uso deste parâmetro melhor se aproxima do modelo Markoviano necessário para estimar filogenias baseadas em dados morfológicos através de critérios de verossimilhança.

#### 2.2.4.4) Análises combinadas

As análises combinadas foram feitas com os caracteres moleculares, secreção cutânea e os morfológicos obtidos neste presente trabalho e por Pramuk (2006). Como os grupos de caracteres de secreção cutâneos e moleculares possuem mais de uma amostragem populacional para algumas espécies (Tabelas 1 e 2), nas análises combinadas e de evidência total foi feita uma combinação das populações das espécies das partições de forma que as localidades fossem as mais próximas geograficamente possíveis. Para a realização das análises de parcimônia e Bayesianas as partições foram combinadas como arquivo Nexus (nex), onde foram adicionados os comentários necessários para proceder às análises. As análises de parcimônia foram feitas com o método de busca “branch-and-bound”.

As análises Bayesianas foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e foram conduzidas de modo a atingir 4.000.000 de gerações. As árvores foram coletadas a cada 100 gerações, resultando em 40.000 pontos de amostragem (ou árvores). As estabilizações foram obtidas após a 5.000ª geração. Foi utilizado o modelo “taxas de distribuição gamma” para o cálculo das taxas de variação entre os caracteres de secreção cutâneos e morfológicos. Para os caracteres moleculares foi utilizado o modelo de evolução escolhido pelos testes de razão hierárquica de verossimilhança implementado pelo programa ModelTest v. 3.06.





## 2.3) RESULTADOS

### 2.3.1) Dados das espécies coletados para este estudo

Foram obtidas para este trabalho, matrizes com dados das espécies do grupo *R. marina*, além dos espécimes utilizados como grupos externos para a obtenção dos dados de caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos. Estes caracteres foram utilizados para gerar cladogramas com os dados das partições e combinados. Dados referentes a estes espécimes encontram-se em forma de tabelas (ver MATERIAL E MÉTODOS). Em todas as análises de parcimônia (partições e dados combinados) as árvores resultantes das análises por ACCTRAN e DELTRAN (consenso estrito ou a mais parcimoniosa) foram idênticas em relação à suas topologias, índices de consistência e retenção e semelhantes no índice de “bootstrap”. Optou-se por mostrar apenas os cladogramas resultantes das análises por ACCTRAN.

### 2.3.2) Caracteres de secreção cutânea

Cromatografias em camadas delgadas demonstram, como já observado previamente em outros táxons (Maciel *et al.*, 2003; 2006), uma clara variação na composição da secreção das glândulas parotóides (indolalquilaminas) de espécies do grupo *R. marina* (Figs. 13 e 14) e de espécies usadas como grupos externos. Um total de 16 caracteres de secreção cutânea (glândulas parotóides) foram obtidos. Os caracteres foram obtidos pelos Rf's, quando nitidamente eram consideradas moléculas diferentes, apesar de alguns com Rf's parecidos. Para esta amostragem da série de transformação e para a melhor visualização das moléculas (“spots”) mesmo que somente traços, foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS2®. As linhas de grade, na horizontal e vertical e as fotos em alta resolução, ajudaram na delimitação dos caracteres com a maior precisão possível dos caracteres. Além disso, a coloração dos “spots” também foi usada para a individualização dos caracteres. As indolalquilaminas apresentaram os seguintes Rf's: 0,053 para BTB; 0,273 para DHB; 0,366 para DHB-S; 0,593 para 5-HT; 0,780 para BTN. As demais 11 indolalquilaminas não identificadas apresentaram os seguintes Rf's: 0,820; 0,880; 0,440; 0,660; 0,093; 0,133; 0,313; 0,013; 0,860; 0,213;

0,626. A matriz com os dados de secreção cutânea está representada no Anexo 3. As análises filogenéticas com este grupo de caracteres não apresentaram uma boa resolução, por causa do baixo número de caracteres (16) em relação ao número de terminais (21).

Na matriz, existem duas populações das espécies *Rhinella cerradensis*, *R. icterica* (uma delas foi descrita como uma subespécie por Cochran, 1950) e *R. veredas*, além de cinco populações de *R. schneideri*. Esta amostragem foi feita com o intuito de se averiguar variações interpopulacionais nos caracteres de secreção cutânea nas espécies (Tabela 1), principalmente para *R. schneideri*, do qual o trabalho de variação individual, sexual e sazonal também foi feito. Foi observada variação entre os exemplares na composição dos caracteres de secreção cutânea das cinco populações de *R. schneideri* amostrada apenas no carácter 9 ( $Rf=0,133$ ). Nos exemplares de Botucatu (SP) e Prado (BA) foi observada a presença deste carácter, enquanto que em São Gonçalo do Pará (MG), Buritizeiro (MG) e Brasília (DF) este carácter não foi observado. Também ocorreu variação na composição das indolalquilaminas no carácter 9 ( $Rf=0,133$ ) da espécie *R. veredas*. Os espécimes de Cocos (BA) possuem este carácter enquanto nos de Buritizeiro (MG) não foi observado. Houve variação no carácter 12 ( $Rf=0,313$ ) na espécie *R. cerradensis*. Nos exemplares de Cocos (BA), foi observada a presença deste carácter, enquanto que nos de Brasília (DF) não foi observado. Finalmente, também ocorreu variação no carácter 11 (BTN) nas populações de *R. icterica*. Nos exemplares de Lebon Régis (SC) foi observada a presença do carácter enquanto que nos de Atibaia (SP) não foi observado.

Decidiu-se por não apresentar dados minuciosos da hipótese gerada apenas por caracteres da secreção cutânea e considerá-los como caracteres adicionais para a resolução da hipótese gerada conjuntamente por caracteres morfológicos e moleculares. A análise de parcimônia apresentou 70.508 árvores mais parcimoniosas. A árvore de consenso estrito é uma grande politomia e de 50% da regra da maioria apresentou uma melhor resolução, obviamente pelo método empregado. A árvore de consenso estrito mostra *Melanophryniscus* como espécie mais basal, um clado unindo *Rhaebo guttatus* e *Rhinella granulosa* e outro clado com os demais terminais (Fig. 15). A árvore de consenso de 50% da regra da maioria mostra mais uma vez *Melanophryniscus* como espécie mais basal e com relações entre os

táxons bastante improváveis, certamente pelo baixo número de caracteres (Fig. 16). Cada árvore apresentou 31 passos. A análise de “bootstrap” da árvore de 50% da regra da maioria apresentou o clado *Rhaebo guttatus* e *Rhinella granulosa* com um suporte de 66%. Apesar do baixo número de caracteres obtidos (16), apenas três não são informativos.

A análise Bayesiana também apresentou uma árvore com uma grande politomia com todos os táxons amostrados (cladograma não mostrado). O suporte também foi bem fraco. Decidiu-se por não mostrar o cladograma, pois, para este grupo de caracteres não foi encontrada uma fase de “estabilização”, mesmo que o número de gerações deste grupo de caracteres tenha sido aumentado para  $4,0 \times 10^6$  gerações (ver DISCUSSÃO).

#### **Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea** (uso da espécie *Rhinella schneideri* como modelo)

As cromatografias não mostraram diferenças qualitativas nestas cinco indolalquilaminas (BTD, DHB, DHB-S, 5-HT e BTN) presentes na secreção das glândulas parotóides de *Rhinella schneideri*. Estas cinco aminas indólicas foram evidenciadas em todas as amostras coletadas.

Os resultados obtidos da análise das indolalquilaminas presentes na secreção das glândulas parotóides dos animais recapturados ao longo dos meses de coleta mostraram que não existe diferença qualitativa individual e sazonal. As análises feitas comparando machos e fêmeas mostraram que também não existe diferença sexual qualitativa. Devido a ausência de variação, não foi possível estabelecer a influência de fatores bióticos e abióticos na composição destas cinco indolalquilaminas presentes na secreção das glândulas parotóides de *R. schneideri*.

#### 2.3.3) Caracteres moleculares

Como esperado, os iniciadores amplificaram as seqüências parciais dos genes citocromo *b*. O material amplificado quase nunca apresentou bandas inespecíficas, assim como contaminações. As enzimas EXO e SAP produziram boa purificação do material amplificado. As condições de amplificação variaram um pouco entre as espécies, o que é

comum em trabalhos de filogenia. Por volta de 100 conjuntos reações de PCR (entre quatro e 12 amostras cada uma) foram feitas.

Como esperado, a maioria das diferenças ocorrem no terceiro códon, seguido pelo segundo e depois o primeiro. Como encontrado por Graybeal (1993), há um déficit de “G” na terceira posição (dados não mostrados).

De um total de 451 caracteres, 268 são constantes, 91 são parcimoniosamente informativos e 92 parcimoniosamente não informativos. A matriz com os dados moleculares encontra-se no Anexo 5.

A análise de parcimônia apresentou 50 árvores mais parcimoniosas, cada uma com 344 passos. A árvore de consenso estrito (Fig. 17) apresentou um comprimento de 351 passos, índice de consistência de 0,706, índice de retenção de 0,576 e índice de consistência excluindo os caracteres não-informativos de 0,567. O cladograma apresentou baixa resolução, com uma politomia grande, além de uma aparentemente improvável relação de parentesco, principalmente do grupo externo em relação às espécies do grupo interno. *Rhinella crucifer* se apresenta como espécie mais basal, seguida de *R. granulosa* (*Melanophryniscus fulvoguttatus* + *R. gr. margaritifera*). *Rhinella rubescens* seria a espécie mais basal do grupo *R. marina* de acordo com este grupo de caracteres. Esta espécie é seguida de *R. achavali* + *R. icterica* (Atibaia-SP) + *R. icterica* (Lebon Régis-SC). Há então uma grande politomia entre as populações de *R. schneideri* amostradas + *R. cerradensis* + *R. poeppigii* + (*R. jimi* + *R. marina*). Esta grande politomia é seguida de *R. veredas* + *R. arenarum*. A árvore de 50% da regra da maioria não mostrou uma resolução muito melhor e é mostrada na figura 18.

Índices de “bootstrap” são mostrados nos nós da figura 17. O grupo *Rhinella marina* se mostra pouco suportado (valor de 58%). *R. rubescens* + *R. achavali* + *R. icterica* (Atibaia-SP) + *R. icterica* (Lebon Régis-SC) mostraram baixo suporte de 57%. A grande politomia: populações de *R. schneideri* amostradas + *R. cerradensis* + *R. poeppigii* + (*R. jimi* + *R. marina*) apresentaram alto suporte de 84%. Estas espécies com *R. veredas* apresentaram suporte de 78%.

O teste de razão de verossimilhança implementado no programa Modeltest favoreceu o modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G, 1985) (com sítios invariáveis e distribuição

gamma) que melhor explica o modelo de evolução das seqüências obtidas. As frequências de base inferidas também inferidas pelo teste de razão de verossimilhança, frequências de bases substituídas, a razão dos sítios invariáveis e parâmetros de distribuição gamma (*G*) inferidos pelo critério de informação “akaike” são mostrados na Tabela 4.

As análises Bayesianas com os dados de caracteres moleculares sob o modelo de evolução HKY+G apresentaram melhor resolução e alguns clados bem suportados (valores maiores que 95) do que a árvore de consenso estrito gerada pelas análises de parcimônia. No entanto, a relação de parentesco é ainda mais improvável (Fig. 19). As espécies *R. granulosa* e *R. gr. margaritifera* (grupo externo) ficam inseridas dentro do grupo *R. marina* fazendo deste um grupo parafilético. Os clados suportados são formados pelas espécies: *R. ictérica* (Atibaia-SP) + *R. achavali* + *R. rubescens* + *R. ictérica* (Lebon Régis-SC) (suporte de 98). *R. jimi* + *R. marina* (suporte de 97); as populações de *R. schneideri* amostradas + *R. cerradensis* + *R. poeppigii* + *R. jimi* + *R. marina* (suporte de 100).

#### 2.3.4) Caracteres morfológicos

De um total de 83 caracteres e 15 táxons, 12 caracteres se mostraram constantes, 27 são caracteres variáveis não-informativos e 44 se mostraram informativos. A matriz com os dados de caracteres morfológicos encontra-se no Anexo 4.

A análise de parcimônia apresentou uma árvore mais parcimoniosa (Fig. 20), com 132 passos. O índice de consistência foi de 0,727, o de retenção de 0,591 e o re-escalado 0,430. O índice de consistência excluindo os caracteres não-informativos foi 0,644. *Melanophryniscus* aparece na base da árvore, seguido de *Rhinella* gr. *margaritifera* e um clado formado por *Rhaebo guttatus* e *Rhinella crucifer*. Em seguida *Rhinella granulosa*, e depois uma pequena politomia (tricotomia) formada por *Rhinella marina*, *Rhinella poeppigii* e os táxons restantes. Estes estão colocados da seguinte forma na topologia: (*Rhinella schneideri* + ((*Rhinella ictérica* + *Rhinella jimi*) + (*Rhinella cerradensis* + ((*Rhinella achavali* + *Rhinella veredas*) + (*Rhinella arenarum* + *Rhinella rubescens*))))).

O grupo *Rhinella marina* de acordo com os caracteres morfológicos nas análises

de parcimônia é um grupo monofilético suportado pelos caracteres (sinapomorfias): 16 (em vista posterior, o ramo ventral do escamosal forma um ângulo ventrolateral), 31 (a articulação entre o ramo medial do pterigóide e a ala do paraesfenóide é formado por uma sutura – sinapormofia única e irreversível do grupo *R. marina* (Figs. 11 e 12; *R. cerradensis*) (sensu Pramuk, 2006)), 32 (a extensão anterior do processo cultriforme se estende além do forâmen orbitonasal), 34 (esfenoetmóide pouco ossificado, criando uma grande exposição triangular do plano da cartilagem anterorbital), 52 (o ângulo anterior da margem da diapófise sacral faz um ângulo posterior) e 70 (a forma do pterigóide em vista dorsal é relativamente delgada). Todos estes caracteres promoveram mudanças de estado não ambíguas. O carácter 48 (orientação posterolateral do processo transversal da vértebra pré-sacral VII) é sinapormofia das espécies do grupo interno com exceção de *R. marina* e *R. poeppigii* (mudança não ambígua). O clado das espécies *R. arenarum* + *R. rubescens* + *R. achavali* + *R. veredas* + *R. cerradensis* + *R. ictérica* + *R. jimi* é suportado pelo carácter 10 (a articulação do processo anterior do vômer se dá apenas pela maxila) (mudança não ambígua). O clado *R. ictérica* e *R. jimi* é suportado pelo carácter 55 (em vista lateral, o ângulo da margem anteroventral da sínfise do íleo é obtuso em relação ao eixo da cintura pélvica) (mudança não ambígua). O clado das espécies *R. arenarum* + *R. rubescens* + *R. achavali* + *R. veredas* + *R. cerradensis* é suportado pelo carácter 18 (o formato da columela é redondo) (mudança não ambígua). O clado das espécies *R. arenarum* + *R. rubescens* + *R. achavali* + *R. veredas* é suportado pelos caracteres 5 (em vista dorsal, a forma da margem posterior dos ossos nasais é relativamente “branda” e perpendicular ao eixo medial do crânio) (mudança ambígua) e 73 (a forma da glândula parotóide é ovóide ou triangular) (mudança não ambígua). O clado *R. achavali* + *R. veredas* é suportado pelos caracteres 10 (a articulação do processo anterior do vômer se dá pela pré-maxila somente) (mudança não ambígua) e 48 (os processos das vértebras V e VI têm o mesmo comprimento) (mudança não ambígua). E, finalmente, o clado *R. arenarum* + *R. rubescens* é suportado pelo carácter 37 (em vista ventral, a margem anterior do esfenoetmóide se estende anteriormente até a margem posterior do vômer) (mudança não ambígua).

A análise de “bootstrap” apresentou *Rhinella arenarum* + *Rhinella rubescens* com



um suporte de 62%. Um outro clado formado por estas duas espécies e *R. achavali*, *R. cerradensis*, *R. icterica*, *R. jimi*, *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri* e *R. veredas*, com um suporte de 80%. Todos os táxons já citados juntamente com *R. granulosa* formam um clado suportado em 75%. Todas as espécies acima formam com *Rhaebo guttatus* e *Rhinella crucifer* um grande clado suportado em 83%.

As análises Bayesianas com os dados de caracteres morfológicos não apresentaram boa resolução (Fig. 21). Nenhum clado possui valores superiores a 0,95. *Melanophryniscus* e *Rhinella* gr. *margaritifera* são basais na topologia, seguido por *Rhaebo guttatus* e *Rhinella crucifer*. Estas duas últimas espécies formam com os demais táxons um clado suportado pelo valor de 0,61. Aqui, diferentemente das análises de parcimônia, o grupo *Rhinella marina* não aparece como monofilético. Um clado suportado pelo valor de 0,84 é formado por *Rhinella granulosa* e as espécies do grupo de estudo. Dentro das espécies do grupo *Rhinella marina*, a topologia possui pouquíssima resolução. Somente as espécies *R. arenarum* e *R. rubescens* formam um clado suportado pelo valor de 0,86.

#### 2.3.5) Análise combinada dos caracteres

##### **Caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados**

De uma matriz de 15 táxons e 55 caracteres, essas duas partições combinadas forneceram um conjunto de 12 caracteres constantes, 30 caracteres variáveis não informativos e 57 caracteres parcimoniosamente informativos. A análise resultou em 10 árvores (cada árvore com o comprimento de 160 passos) mais parcimoniosas e a análise de consenso estrito é bem resolvida com a presença de apenas duas pequenas politomias (Fig. 22). Mais uma vez, *Rhinella granolusa* se mostra grupo irmão das espécies do grupo *R. marina*, diferentemente dos achados de Pramuk (2006), em que *R. crucifer* se mostra como irmão das espécies de *Rhinella* do grupo *marina* e estes com o grupo *R. granulosa*. Os achados de Pauly *et al.* (2004) também corroboram a relação íntima entre *R. marina* e *R. crucifer*. O grupo *R. marina* é monofilético de acordo com este conjunto de dados combinados. Possui uma pequena politomia entre *R. marina* e *R. poeppigii* (provavelmente pela falta dos caracteres de secreção cutânea amostrados para *R. poeppigii*). As espécies *R. achavali*,

*R. veredas*, *R. arenarum* e *R. rubescens* formam um clado. *R. cerradensis* + *R. icterica* formam um clado (morfologias externas semelhantes) (Maciel *et al.*, 2007). *R. schneideri* + *R. jimi* formam outro clado (morfologias externas semelhantes) (Stevaux, 2002). A árvore de consenso estrito possui comprimento de 162 passos, índice de consistência de 0,654 (0,566, excluindo os caracteres não informativos), de retenção de 0,517, e re-escalado de 0,338. O grupo *Rhinella marina* é suportado, além dos caracteres já mostrados com os caracteres morfológicos, somente por dois caracteres de secreção cutânea de fatores de retenção (Rf) igual a 0,820 (mudança ambígua) e Rf=0,860 (mudança não ambígua). O clado formado por *R. achavali*, *R. veredas*, *R. arenarum* e *R. rubescens* é suportado além dos caracteres 5 e 73 (já descritos nas análises com caracteres de morfologia), pelos caracteres 18 (o formato da columela é redondo) (mudança não ambígua), 48 (a orientação do processo transversal da vértebra pré-sacral VII é perpendicular) (mudança ambígua) e o carácter de secreção cutânea de Rf=0,820 (mudança ambígua). *R. arenarum* + *R. rubescens* é suportado pelos caracteres 10 (articulação entre o processo anterior do vômer somente com a maxila) (mudança não ambígua), 37 (em vista ventral, a margem anterior do esfenotmóide se estende anteriormente até a margem posterior do vômer) (mudança não ambígua), 48 (a orientação do processo transversal da vértebra pré-sacral VII é posterolateral) (mudança ambígua) e 95 (Rf=0,313) (mudança não ambígua). *R. cerradensis*, *R. icterica*, *R. jimi* e *R. schneideri* é suportado pelo carácter 48 (a orientação do processo transversal da vértebra pré-sacral VII é posterolateral). O clado *R. jimi* + *R. schneideri* é suportado pelos caracteres de secreção cutânea BTB (Rf=0,053) (mudança não ambígua) e o de Rf=0,313 (mudança não ambígua). *R. cerradensis* + *R. icterica* suportado pelo 10 (articulação entre o processo anterior do vômer somente com a maxila) (mudança não ambígua) e 28 (a face medial do corpo do paraesfenóide forma um par de sulcos que convergem medialmente) (mudança não ambígua). A árvore de 50% da regra da maioria pelo método empregado, é obviamente melhor resolvida e mostrada na Fig. 23. Fica resolvida a relação entre *R. marina* e *R. poeppigii*. As duas árvores de consenso sugerem dois subgrupos dentro do grupo *Rhinella marina* (sensu Maciel *et al.*, 2007).

Análise de “bootstrap” da árvore de consenso estrito suporta o clado do grupo *Rhinella marina* em 80%. A espécie *R. granulosa* fica como irmã do grupo de estudo (suportado em

63% pelo “bootstrap”). Estes clados, seguidos *Rhinella crucifer* e *Rhaebo guttatus*, formam um clado suportado por 84%. Como membros basais encontram-se *Melanophryniscus* e *Rhinella* gr. *margaritifera*. Um clado composto por *R. icterica* + *R. cerradensis* (similares em sua morfologia externa) é suportado em 59% e *R. arenarum* e *R. rubescens* em 71%.

O cladograma da análise Bayesiana com os caracteres de secreção cutânea e morfológicos é menos resolvido do que a análise de parcimônia com o mesmo conjunto de caracteres. No entanto, é mais resolvido do que a análise Bayesiana com os caracteres morfológicos somente. O gênero *Rhinella* (obviamente levando em consideração os pouquíssimos exemplares do gênero), forma um clado suportado em 0,91 (Fig. 24). A topologia não mostra o grupo *R. marina* como monofilético, e sim parafilético em relação a *R. granulosa* (suporte fraco de 0,68). Um ponto interessante são os clados *R. schneideri* + *R. jimi* (com morfologias externas semelhantes) (assim como na análise de parcimônia) (suporte 82) e *R. icterica* + *R. cerradensis* (com morfologias externas semelhantes) (assim como na análise de parcimônia) (suporte 0,91), e ainda um clado com um dos subgrupos sugerida por Maciel *et al.* (2007) composto por *R. arenarum*, *R. rubescens*, *R. achavali* e *R. veredas* (suportado pelo valor de 0,55). O único clado bem suportado é o formado por *R. arenarum* + *R. rubescens* (suportado pelo valor de 0,95).

### **Caracteres morfológicos e moleculares combinados**

Somente foram executadas análises de parcimônia para os caracteres moleculares e morfológicos combinados. De uma matriz de 14 táxons (quatro grupos externos) e um total de 534 caracteres, 298 caracteres se mostraram constantes, 116 parcimoniosamente informativos e 120 parcimoniosamente não-informativos. A análise resultou em três árvores mais parcimoniosas e o cladograma de consenso estrito é mostrado na figura 25. Cada árvore apresentou 427 passos. A árvore de consenso estrito também apresentou 427 passos. O índice de consistência é de 0,721, o de retenção é de 0,530 e o re-escalonado é 0,382. O índice de consistência excluindo os caracteres não informativos é de 0,581. Esta análise mostra uma boa resolução, com a presença de apenas uma politomia e uma relação de parentesco mais provável, evidenciando o grupo *Rhinella marina* como monofilético. *R. granulosa* se

mostra como irmão do grupo *R. marina*, diferentemente dos achados de Pauly *et al.* (2004) e Pramuk (2006). *R. icterica* e *R. achavali* formam um clado e estes formam outro com *R. rubescens*. As espécies supracitadas formam outro clado com *R. arenarum* e estes com *R. veredas*. Há um outro clado formado por *R. schneideri* + *R. cerradensis* + *R. jimi* + *R. marina* + *R. poeppigii*.

O grupo *R. marina* foi suportado em 88% (valor de “bootstrap”). O clado formado por *R. schneideri*, *R. cerradensis*, *R. jimi*, *R. marina* e *R. poeppigii* foi suportado em 83% (Fig. 25). O cladograma de 50% da regra da maioria é idêntico em sua topologia ao cladograma de consenso estrito (não mostrado).

### **Caracteres de secreção cutânea, morfológicos e moleculares combinados (evidência total)**

De uma matriz de 14 táxons (quatro grupos externos) e um total de 550 caracteres, 298 caracteres se mostraram constantes, 125 parcimoniosamente informativos e 127 parcimoniosamente não-informativos. A análise de parcimônia de evidência total resultou em cinco árvores mais parcimoniosas e o cladograma de consenso estrito é mostrado na figura 26. Cada árvore apresentou 459 passos. A árvore de consenso estrito também apresentou 459 passos. O índice de consistência é de 0,706, o de retenção é de 0,507 e o re-escalado é 0,358. Esta análise mostra uma resolução não tão boa como a gerada pelos caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados. Há a presença de uma politomia, mas o grupo *Rhinella marina* ainda é suportado como monofilético. *R. granulosa* mais uma vez se mostra como irmão do grupo *R. marina*. *R. icterica* e *R. achavali* formam um clado e estes formam outro com *R. rubescens*. As espécies supracitadas formam outro clado com *R. arenarum* e estes com *R. veredas*. Há um outro clado (local da politomia) formado por *R. schneideri* + *R. cerradensis* + *R. jimi* + *R. marina* + *R. poeppigii*.

O grupo *R. marina* foi suportado em 83% (valor de “bootstrap”). Valor menor do que a análise de parcimônia com os caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados. O clado formado por *R. schneideri*, *R. cerradensis*, *R. jimi*, *R. marina* e *R. poeppigii* foi suportado em 87% (Fig. 26). O cladograma de 50% da regra da maioria é um pouco mais

resolvido do que o cladograma de consenso estrito e é mostrado na figura 27.

Já as análises Bayesianas com todos os caracteres (evidência total) apresentaram melhor resolução (Fig. 28) do que a gerada pelo método da parcimônia (Fig. 26) e a topologia corrobora dados da literatura (*e.g.* Pramuk, 2006). Três clados são bem suportados. O grupo interno (*Rhinella marina*) forma com *R. crucifer* (grupo irmão nesta análise) um clado suportado com um valor de 0,97. *R. schneideri* + *R. cerradensis* + *R. poeppigii* + *R. jimi* + *R. marina* formam um clado suportado por um valor de 0,99, no entanto há uma pequena politomia. *R. schneideri* + *R. jimi* formam um clado suportado com um valor de 0,96. No entanto, os valores de suporte das probabilidades *a posteriori* não corroboram o monofiletismo do grupo interno (0,59).

## 2.4) DISCUSSÃO

### 2.4.1) Caracteres de secreção cutânea

Os caracteres de secreção cutânea obtidos das glândulas parotóides das espécies estudadas, não contribuíram fortemente para a resolução da filogenia. No entanto, parece ter sinal filogenético e contribuíram como caracter complementar na filogenia. Houve pequenas diferenças populacionais nos caracteres de secreção cutânea amostrados. Apenas um dentre 16 caracteres variaram dentre populações de *R. icterica*, *R. cerradensis*, *R. schneideri* e *R. veredas*. É difícil saber a origem desta variação. Esta variação poderia ser fruto de pequenas diferenças na composição entre populações, ou de limitações do método (cromatografia em camada delgada), ou mesmo de fenômenos de hibridação. Sabe-se que na região de Botucatu (SP) há hibridação entre *R. icterica* e *R. schneideri* (Marques, 2002). O espécime *R. icterica* de Lebon Régis (SC) foi descrito como uma subespécie (*Bufo ictericus mertensi*) por Cochran (1950).

Os caracteres de secreção cutânea constituem até o momento, um grupo de caracteres alternativos para o estabelecimento de relações de parentesco. Apesar de estes caracteres parecerem apresentar informação filogenética (Maciel *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006), muito ainda é necessário adicionar sobre o conhecimento da validade destes. Uma das questões fundamentais é a utilização dos perfis destes caracteres em uma série de transformações (codificação dos caracteres). Grant *et al.* (2006) consideram complexo o uso dos perfis de “alcalóides de dendrobatídeos” como caracteres pela sua origem na dieta (Daly *et al.*, 1994a). O que significa que a ocorrência de um alcalóide é determinada não pelo genótipo, mas pela disponibilidade no ambiente da fonte da dieta (fazendo deste grupo de caracteres uma característica não estabelecida por uma relação entre ancestralidade e descendência). Estes caracteres de secreção cutânea diferem das amins indólicas, usadas como caracteres na presente tese, pois são originárias do próprio metabolismo do animal. No entanto, apesar da dependência do ambiente dos “alcalóides de dendrobatídeos”, há também um aspecto que é claramente recebido por herança no sistema de captação destes alcalóides. Este sistema é capaz de sequestrar apenas um subgrupo de alcalóides ingeridos na dieta ou varia



drasticamente na eficiência da acumulação de diferentes classes de alcalóides (Daly *et al.*, 1994b, 2003; Garrafo *et al.*, 2001). Como todos os caracteres fenotípicos, a expressão dos caracteres de alcalóides é devida a uma combinação de genótipo e o ambiente. Assim, Grant *et al.* (2006) propõem uma hipótese de homologia, embora cautelosos, para os perfis de alcalóides.

As condições utilizadas para a realização de cromatografias em camada delgada dependem de uma série de variantes, como o tamanho da cuba, granulação da sílica da placa cromatográfica, qualidade e conservação dos solventes utilizados, tempo de exposição da fase móvel (saturação) dentro da cuba, dentre outros. Portanto, pode haver alguma variação nos Rf's entre cromatografias realizadas com a mesma amostra. No entanto, não existe uma variação significativa e aparentemente as homologias podem ser definidas com precisão.

#### **Estudo sobre a variação dos caracteres de secreção cutânea** (uso da espécie *Rhinella schneideri* como modelo)

As análises feitas por este trabalho não mostraram diferenças qualitativas no perfil de aminas indólicas presentes nas glândulas parotóides de exemplares de *R. schneideri* coletados na Estação Ecológica de Águas Emendadas no Distrito Federal. Não foi observada diferença qualitativa sexual. No entanto, foram coletadas amostras de poucas fêmeas, o que poderia influenciar os resultados. Uma análise de um número maior de amostras de exemplares de fêmeas poderá confirmar os atuais dados.

Schwartz (1993) realizou estudos qualitativos e quantitativos de indolalquilaminas de várias espécies de bufonídeos neotropicais e verificou uma variação quantitativa, incluindo amostras de *R. schneideri*. Pires Jr. (2002) observou diferenças quantitativas de tetrodotoxina e análogos (alcalóides polares presentes na secreção de certos grupos de anfíbios) em *Brachycephalus ephippium*, o que poderia influenciar na toxicidade dos animais. A análise dos resultados obtidos com os animais recapturados permitiu observar que não existe variação sazonal qualitativa das cinco aminas indólicas estudadas/identificadas (BTD, DHB, DHB-S, 5-HT e BTN) encontradas na secreção das glândulas parotóides de *R. schneideri*. Visualmente, pôde-se observar uma aparente variação quantitativa (Fig. 29). No entanto,

essa análise quantitativa é subjetiva e nada se pode afirmar sobre esta observação, pois ainda não foram feitas análises apropriadas de dosagem e estatísticas.

Como já descrito anteriormente, as indolalquilaminas presentes na secreção cutânea de anfíbios são produzidas pelo próprio metabolismo do animal e resultam da ação de enzimas específicas. As análises de dosagem feitas por Schwartz (1993) indicam que exemplares de diferentes localidades de *R. crucifer* coletados em São Paulo (SP) e em Belo Horizonte (MG) apresentaram grande diferença quantitativa das indolalquilaminas, mas, em análise qualitativa, o perfil de aminas indólicas foi idêntico. Atualmente, os espécimes destas localidades representam espécies distintas (Baldissera Jr. *et al.*, 2004). A variação quantitativa pode também estar relacionada à condição de cada animal, ou seja, questões como quantidade de reservas energéticas, estado reprodutivo, ou mesmo injúrias causadas por interações agonísticas, inter ou intra-específicas. Um estudo está sendo feito para avaliar as diferenças quantitativas e correlacioná-las a fatores bióticos e abióticos já obtidos. Como essas moléculas são provenientes de enzimas específicas, essa ausência de variação qualitativa das indolalquilaminas em *R. schneideri* poderia demonstrar que o conjunto (perfil de cada espécie) destas moléculas pode ser espécie-específica, ou seja, poderia ser usada como caracter para gerar filogenias (análises de parentesco a partir de um ancestral comum), ou mesmo na taxonomia, para a identificação de espécies.

#### 2.4.2) Caracteres moleculares:

O cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia (Fig. 17) difere marcadamente do cladograma mais parcimonioso gerado pelos caracteres morfológicos (Fig. 20). O possível subgrupo de espécies (*sensu* Maciel *et al.*, 2007) não é suportado por este grupo de caracteres moleculares. Como já discutido previamente, conjuntos de dados de naturezas diferentes podem gerar hipóteses filogenéticas diferentes. É indiscutível que ambas as partições fornecem uma boa quantidade de caracteres filogeneticamente informativos. Até o momento é difícil saber a causa desta incongruência nos conjuntos de dados. Testes de congruência podem ser feitos para tentar estabelecer a origem das diferenças.

O fragmento mitocondrial citocromo *b* tem sido usado amplamente na filogenia de

anuros (*e.g.* Graybeal, 1993; Fouquet *et al.*, 2007) e, com sucesso, tem resolvido as relações de parentesco entre diversos grupos. No presente trabalho, o fragmento amplificado provou fornecer uma grande quantidade de sítios informativos. Como premissa aos sinais filogenéticos gerados pelas diferentes partições, as discussões finais acerca das relações de parentesco do grupo *Rhinella marina* serão feitas com os dados gerados pelas análises de evidência total. Pramuk *et al.* (2008) geraram uma hipótese filogenética de Bufonidae baseados em diversos fragmentos gênicos, mas não utilizam citocromo *b*, o que dificulta as comparações. Além disso, há pouca amostragem dos táxons do grupo *R. marina* por Pramuk *et al.* (2008).

Inicialmente, antes da amplificação do fragmento gênico citocromo *b*, fragmentos dos genes 12S e 16S rRNA mitocondriais foram amplificados e seqüenciados para os seguintes espécimes: *R. gr. margaritifera* (Rondolândia-MT e Cacoal-RO), *R. granulosa* (Palmas-TO) e *R. icterica* (Lebon Régis-SC). No entanto, as seqüências tiveram pouquíssima variação, o que levou a mudança do uso dos fragmentos a serem amplificados para citocromo *b*. Dados sugerem que o fragmento citocromo *b* (assim como outros genes mitocondriais) possui rápida taxa de mudanças entre os sítios e que possui baixo desempenho para resolução de filogenias com divergências mais antigas (Graybeal, 1993). Hertwig *et al.* (2004) argumentam que embora os genes 12S e 16S pareçam carregar algum sinal filogenético para eventos de cladogênese mais antigos (Mesozóico), o sinal não é forte o suficiente para resolver consistentemente as relações entre os grandes clados de Anura. Infelizmente, não foi possível amplificar todas as seqüências necessárias dos espécimes para o fragmento gênico rodopsina 1 (fragmento gênico nuclear) para a defesa da presente tese. Diversos trabalhos têm se utilizado tanto de genes mitocondriais quanto nucleares para gerar filogenias, o que possibilita obtenção de informação em diferentes pontos de divergência entre os clados.

#### 2.4.3) Caracteres morfológicos:

Os caracteres morfológicos da análise de parcimônia apresentaram uma boa resolução na topologia, com apenas uma pequena politomia (Fig. 20). O trabalho de Pramuk (2006) apresentou baixa resolução e um total de 3.290 árvores mais parcimoniosas. Esta baixa resolução da hipótese de Pramuk (2006) se dá pela maior quantidade de táxons usados. Apesar

da boa resolução da hipótese filogenética obtida desta tese com os caracteres morfológicos, não há grande variação nos caracteres de osteologia de crânio (a grande maioria dos caracteres amostrados) entre as espécies que compõem o grupo *Rhinella marina*. O possível subgrupo de espécies dentro de *R. marina* (sensu Maciel *et al.*, 2007) é suportado pela análise de parcimônia com este grupo de caracteres. No entanto, os caracteres de crânio podem ser convergentes em “*Bufo*” (Pramuk, 2006) e qualquer inferência com o uso destes dados deve ser feita com cautela.

Alguns caracteres morfológicos de Pramuk (2006) merecem aqui alguma discussão, pois outras espécies de *Rhinella* foram amostradas, o que causou dúvidas na interpretação de alguns estados. Além disso, aparentemente houve erro na codificação de alguns estados por Pramuk (2006). O carácter 18 (formato da columela), de acordo com Pramuk (2006), na maioria dos anuros tem o formato redondo (estado 1), enquanto em alguns táxons (e.g. *Leptodactylus ocellatus*) é em formato de lâmina e comprimido anteroposteriormente (estado 0). Nos espécimes do grupo *R. marina*, assim como em diversos outros amostrados por Pramuk (2006) este carácter foi codificado com o estado “0” (matriz de caracteres, página 418 de Pramuk, 2006), sendo que no exemplo da descrição do carácter, páginas 447–448 de Pramuk (2006) há o exemplo do próprio *R. marina* como sendo estado “1”. Foram enviados para Pramuk fotos da columela (material diafanizado) de um espécime de *R. achavali* pelo correio eletrônico para a resolução desta questão. Na resposta, Pramuk considera cada uma das fotos do mesmo espécime enviado como um dos diferentes estados de carácter propostos. Parece então haver uma dificuldade de se atribuir o estado deste carácter. Pode até mesmo haver polimorfismos. Mais espécimes de cada espécie devem ser amostrados para rever os estados deste carácter e sua contribuição para a filogenia de Bufonidae e do grupo *R. marina*. O carácter 18 suporta alguns dos clados nas análises e por hora deve ser considerado com cautela. O carácter 73 (formato da glândula parotóide) apresenta quatro possíveis estados de acordo com Pramuk (2006). Glândulas parotóides ausentes (0); presente e mais longa do que larga (1); presente e ovóide ou triangular (2); presente e redonda (3). O problema aqui também gira em torno da interpretação do estado do carácter. Algumas espécies do grupo *R. marina* (e.g. *R. icterica* e *R. cerradensis*) possuem a glândula parotóide mais longa do que

larga (estado “1”) e também ovóide ou triangular (“2”). Poderia ser criado um outro estado de carácter para alocar estas espécies e, portanto, por enquanto, estes dados têm também que serem encarados com cautela. O carácter 68 (crista supraorbital) pode ter os seguintes estados de acordo com Pramuk (2006): ausente (0); presente e derivado do frontoparietal, que se desenvolve em uma inclinação medial, a orla da crista supraorbital (1); presente, orientado verticalmente do plano do frontoparietal (2). O espécime *R. jimi* amostrado possui um estado deste carácter diferente destes propostos por Pramuk (2006). A crista supraorbital é totalmente plana ao eixo medial do crânio, não sendo vertical e também não apresentando nenhuma inclinação. Outros espécimes devem ser analisados ou este poderia merecer um quarto estado de carácter.

A árvore de consenso estrito, gerada pelas análises de parcimônia de Pramuk (2006) com os dados de morfologia, só apresenta quatro espécies do grupo *Rhinella marina* e, mesmo assim existe uma politomia. Portanto, se torna difícil comparar os resultados de Pramuk (2006) com os desta tese. Assim como os dados obtidos por Pramuk (2006), a única sinapomorfia morfológica não reversível que sustenta o grupo *R. marina* por dados morfológicos é a articulação entre o ramo medial do pterigóide e a ala do paraesfenóide formada por uma sutura.

Pramuk (2006) discute a validade do uso da ordenação de caracteres multiestado para gerar filogenias. Pramuk (2006) testou a ordenação de nove caracteres multiestado ordenados (caracteres com números 6, 12, 14, 18, 25, 30, 32, 34 e 38). Muito tem sido discutido sobre os efeitos da ordenação de caracteres (Hauser e Presch, 1991; Mickevich e Weller, 1990). Ordenação de caracteres impõe um conjunto de custos (passos) para a transformação dos caracteres baseados em suposições sobre um modelo de evolução (Mickevich e Weller, 1990). Wilkinson (1992) argumenta que ordenamento de caracteres está logicamente ligado ao Princípio Auxiliar de Hennig. Cada estado de transformação de um carácter multiestado representa modificações de um carácter homólogo. Tratar os caracteres como não ordenados levaria *a priori*, a negar o Princípio Auxiliar de Hennig. No entanto, poucas suposições são feitas com caracteres não ordenados e, além disso, caracteres ordenados podem requerer e representar modelos não-realísticos de evolução de carácter e podem não melhorar a

resolução da topologia (Suter, 1994). Pela falta de dados ontogenéticos, Pramuk (2006) discute somente dados da filogenia baseada com os caracteres não ordenados. Assim, as análises filogenéticas com os caracteres morfológicos desta tese também foram feitas com os caracteres não ordenados.

A análise Bayesiana somente com os caracteres morfológicos coloca o grupo *Rhinella marina* como parafilético em relação a *R. granulosa*. De acordo com Pramuk (2006), *R. crucifer* é o grupo irmão do grupo *R. marina* seguido das espécies do grupo *R. granulosa*. Ainda, o possível subgrupo de espécies dentro de *R. marina* (sensu Maciel *et al.*, 2007) não é suportado. Apenas *R. arenarum* e *R. rubescens* formam um clado e, mesmo assim, pouco suportado (0,51).

#### 2.4.4) Caracteres combinados

Até o presente momento, esta filogenia é a mais completa feita para as espécies do grupo *Rhinella marina*. Tanto pela quantidade de táxons (principalmente devido às duas descrições de espécies novas), como também pela amostragem de conjuntos de caracteres de naturezas diferentes. Um total de 550 caracteres entre os de secreção cutânea, morfológicos e moleculares foi obtido.

#### **Caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados**

Os caracteres de secreção cutânea e morfológicos combinados apresentam uma árvore de consenso estrito e 50% da regra da maioria relativamente bem resolvida nas análises de parcimônia. Apesar da falta da amostragem dos caracteres de secreção cutânea para o táxon *Rhinella poeppigii*, há resolução na árvore de consenso 50% da maioria. Há pontos comuns e disparidades entre as análises de parcimônia e Bayesiana com este conjunto de dados. A disparidade mais importante diz respeito ao monofiletismo do grupo de estudo. Nas análises de parcimônia, o grupo *R. marina* é suportado em 80% (valor de “bootstrap” considerado como provendo forte suporte), enquanto nas análises Bayesianas, o grupo é considerado parafilético em relação a *R. granulosa*. Esta heterogeneidade poderia ser explicada pela diferenças nas premissas dos métodos empregados ou mesmo dos parâmetros empregados



para cada um deles. No entanto, há pontos em comum. Espécies com morfologia externa semelhantes formam clados mesmo que pouco suportados em ambas as análises (e.g. *R. rubescens* + *R. arenarum*). Os dados morfológicos de Pramuk (2006) (análise de parcimônia) também suportam o grupo *R. marina* como monofilético, apesar de apenas quatro espécies terem sido amostradas (*R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri* e *R. arenarum*).

### **Caracteres morfológicos e moleculares combinados**

Apesar do considerável conflito entre estes conjuntos de dados, as diferenças são fracamente suportadas. Portanto, os dados foram combinados e analisados conjuntamente seguindo o proposto por Wiens (1998). Existem diversas razões para incluir em análises combinadas, mesmo pequenos grupos de dados morfológicos. Mesmo a uma pequena proporção (<5%) de caracteres morfológicos, quando combinados à grande quantidade de dados moleculares podem significativamente influenciar os dados gerados pela análise combinada (Nylander *et al.*, 2004). É sempre bom enfatizar que a inclusão de caracteres morfológicos também é necessária para reconstruir as relações dos fósseis e táxons extintos recentemente que compõem mais de 99% de todas as espécies (Wiens, 2004) e ainda permitem a discussão da evolução dos caracteres morfológicos e obtenção de caracteres filogeneticamente diagnósticos para os grupos taxonômicos (de Queiroz e Gauthier, 1992). Na definição dos sapos de “crânios amplo e estreito”, baseados na largura do crânio para identificação das linhagens de “*Bufo*”, Blair (1972b) e Martin (1972a) em nenhum momento, explicam como quantificaram o “tipo” de crânio. De acordo com Pramuk (2006), os caracteres correlacionados com largura e quantidade de ossificação são altamente convergentes em “*Bufo*”. Portanto, os resultados provenientes das análises morfológicas devem ser analisados com cuidado.

As análises de parcimônia para os caracteres moleculares e morfológicos combinados se mostram relativamente bem resolvidas (análise de consenso estrito resultado de três árvores mais parcimoniosas) e como uma boa quantidade de caracteres filogeneticamente informativos. O grupo *Rhinella marina* de acordo com estas análises é monofilético (valor de “bootstrap” 88%). *R. granulosa* mais uma vez se mostra como irmão do grupo *R. marina*,

diferentemente de dados da literatura (Baldissera Jr., 2001; Pramuk, 2006) que consideram grupo *R. crucifer* como grupo irmão do grupo *R. marina*. Pelo contrário, nesta análise *R. crucifer* se mostra basal na topologia. Os subgrupos fenéticos sugeridos por Maciel *et al.* (2007) não são suportados. *R. icterica* forma um clado mal suportado com *R. achavali*, *R. rubescens*, *R. arenarum* e *R. veredas*. O outro clado do grupo interno formado pelas demais espécies: *R. schneideri*, *R. cerradensis*, *R. jimi*, *R. marina*, *R. poeppigii* tem melhor suporte.

### **Caracteres de secreção cutânea, morfológicos e moleculares combinados (evidência total)**

Ao comparar as topologias da análise de parcimônia de evidência total (consenso estrito) e da análise Bayesiana percebe-se que a análise do método probabilístico está melhor resolvida. As duas análises suportam o grupo *Rhinella marina* como monofilético, apesar do baixo suporte da análise Bayesiana (Figuras 26 e 28). No entanto, em todas as análises, com exceção da análise de evidência total com evidência Bayesiana, *R. granulosa* é irmão do grupo *R. marina*. A análise Bayesiana (evidência total) corrobora dados da literatura (*e.g.* Pauly *et al.*; Pramuk, 2006) evidenciando *R. crucifer* como irmão do grupo *R. marina*. Na topologia do grupo interno, a diferença entre parcimônia e Bayesiana está na resolução da politomia onde se encontra o clado que envolve *R. schneideri* + *R. cerradensis* + *R. jimi* + *R. marina* + *R. poeppigii*. Na análise de parcimônia, todas as espécies formam uma grande politomia (Figura 26). Na análise Bayesiana, *R. jimi* e *R. schneideri* formam um clado (espécies morfológicamente semelhantes, Stevaux (2002)) (Figura 28). Outra diferença do grupo interno, está na posição de *R. veredas* na topologia. Na análise de parcimônia, *R. veredas* forma um clado com *R. icterica* + *R. achavali* + *R. rubescens*. + *R. arenarum* e estes com *R. veredas* (Figura 26). Na análise Bayesiana, *R. veredas* é espécie basal do grupo *R. marina* e forma uma politomia com as demais espécies do grupo (Figura 28). Existe ainda uma diferença na posição na topologia das espécies do grupo externo. Na análise de parcimônia, *R. crucifer* é a espécie basal (Figura 26). Já na análise Bayesiana de evidência total, *Melanophryniscus* e *R. gr. margaritifera* são espécies basais. Na falta de maiores

evidências, e até a geração de outra relação de parentesco do grupo *R. marina* adicionando os dados de seqüências do fragmento gênico nuclear rodopsina 1, poderia ser feita uma escolha de filogenia do grupo *R. marina*, a análise de evidência total usando o método Bayesiano (Figura 28). Apesar do fraco suporte do grupo interno, apresenta melhor resolução, e a relação de parentesco melhor é fundamentada com as espécies do grupo externo.

Nos últimos anos, as análises de parcimônia e Bayesianas têm sido objeto de debate. Apesar de amplamente usado, o método da parcimônia não permite a inclusão de parâmetros para avaliar a evolução de um grupo de dados e, além disso, não necessariamente a história de um grupo de organismos pode ser explicada da maneira mais parcimoniosa possível (Kitching *et al.*, 1998). Empiricamente, tem-se observado na análise de diferentes genes em primatas do Novo Mundo, que os valores de credibilidade da análise Bayesiana são, em geral, muito superiores aos de “bootstrap”, tanto para as análises de parcimônia quanto de máxima verossimilhança. E isso não é algo trivial, porque grupos fracamente suportados por valores de “bootstrap” podem ser validados na análise Bayesiana. Alguns trabalhos têm demonstrado esta provável deficiência no método por simulação (Suzuki *et al.*, 2002; Cummings *et al.*, 2003). No entanto, isto não aconteceu com a maioria das análises filogenéticas desta presente tese. Os clados nas análises de parcimônia se mostraram mais suportados por valores de “bootstrap” (partições e análises combinadas), na maioria das análises, do que os valores com suporte considerados bons nas análises Bayesianas. Alfaro *et al.* (2003), por métodos de simulação, sugerem que os valores de suporte gerados pelas análises Bayesianas são de forma geral menos confiáveis do que os valores de “bootstrap” gerados tanto por análises de parcimônia quanto pelas análises de máxima verossimilhança. As probabilidades *a posteriori* nas análises Bayesianas são uma medida direta do grau de apoio dos clados formados na análise e possuem um significado diretamente associado ao grau de confiança daquele clado (Huelsenbeck e Rannala, 2004).

Além do método Bayesiano, outro método probabilístico, a máxima verossimilhança, também foi desenvolvido e pode acomodar múltiplos grupos de dados em uma análise filogenética. Nestes métodos, podem-se fazer suposições explícitas sobre os caracteres como mudanças de seqüências e permitem testes estatísticos de diferentes modelos um contra o

outro para achar o que melhor se encaixa nos dados observados (Felsenstein, 1981), assim como o método Bayesiano. O uso de modelos inapropriados pode atrapalhar as estimativas, portanto é importante empregar escolhas de métodos *a priori* para o modelo mais apropriado de evolução (Lemmon e Moriarty, 2004).

Não foi possível obter suportes de clados por índice de Bremer (“decay index”). Na rotina para a execução, utilizando os programas MacClade e PAUP, os índices se mostraram negativos em todas as análises. De acordo com o manual do MacClade, os programas MacClade e PAUP não são totalmente compatíveis. Existem pequenas diferenças nos “defaults” ou nos modos como certos cálculos são feitos, e, além disso, há diferenças nos formatos dos arquivos de dados usados nos dois programas. Neste caso, como os índices de Bremer se mostraram negativos, isso poderia representar um erro (“bug”) de um dos programas. O método de “bootstrap”, assim como o de “jackknife” são métodos estatísticos intensivos para avaliar estimativa de erro (Efron *et al.*, 1983). As discussões na literatura acerca do método de “bootstrap” (o fato de que suposições estatísticas poderiam não refletir um contexto filogenético), não fizeram com que o método deixasse de se tornar o mais popular dentre os métodos de suporte de clados usados. Muitos consideram “bootstrap” meramente como indicativos de suporte e não em um contexto de teste de hipóteses. Análises com o suporte de clados “jackknife” foi feito como os dados desta tese e mostraram resultados similares aos de “bootstrap” (dados não mostrados). O suporte de Bremer (“decay index”) já é uma medida de suporte de ramos que é totalmente diferente (DeBry, 2001), possui vantagens em muitos casos, mas também tem suas limitações (Bremer, 1994). A eficiência dos diferentes métodos foi testada por Müller (2005).

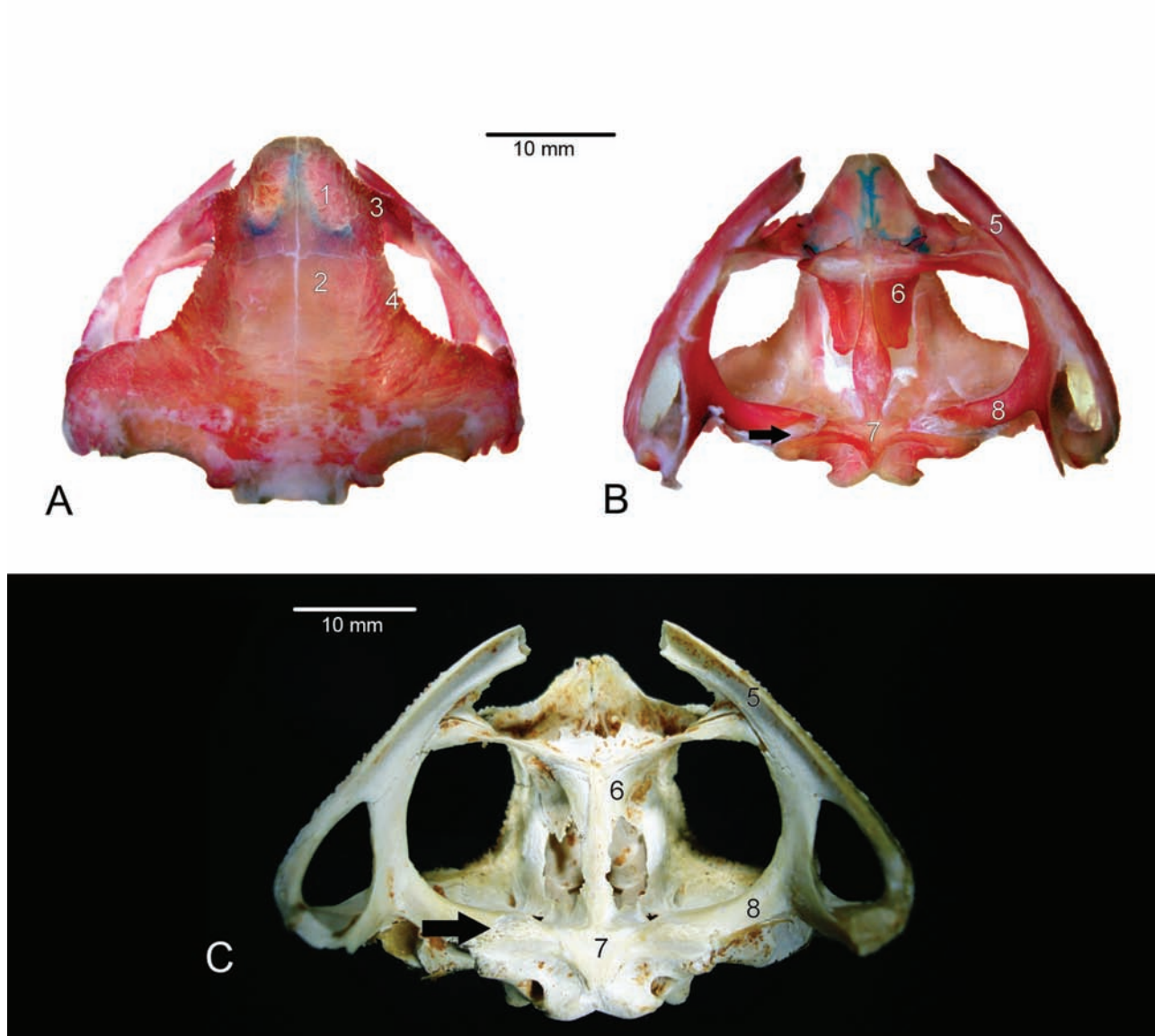
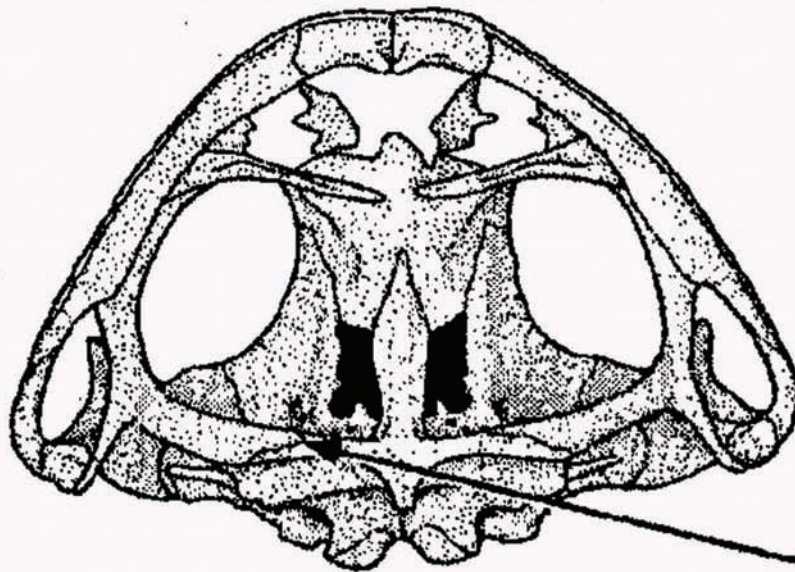


Figura 11 Crânio diafanizado de um exemplar de *Rhinella cerradensis* (ASUnB 2554). (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral. A área azul corada por Azul de Alcian é cartilagem. (C) Vista ventral do crânio de um exemplar macerado de *R. cerradensis* (ASUnB 2553). A seta indica a única sinapomorfia morfológica do grupo *R. marina*. Os números arábicos indicam características do crânio desta espécie (ver anexo na descrição de *Rhinella cerradensis*). As premaxilas foram perdidas durante a preparação.

***Bufo marinus* Group**



**Medial ramus of pterygoid broadly overlapping lateral edge of parasphenoid ala**

Figura 12 Desenho do crânio de um exemplar do grupo *Rhinella marina* mostrando com a seta a única sinapomorfia morfológica irreversível do grupo: a articulação entre o ramo medial do pterigóide e a ala do paraesfenóide formado por uma sutura (retirado de Pramuk, 2004)



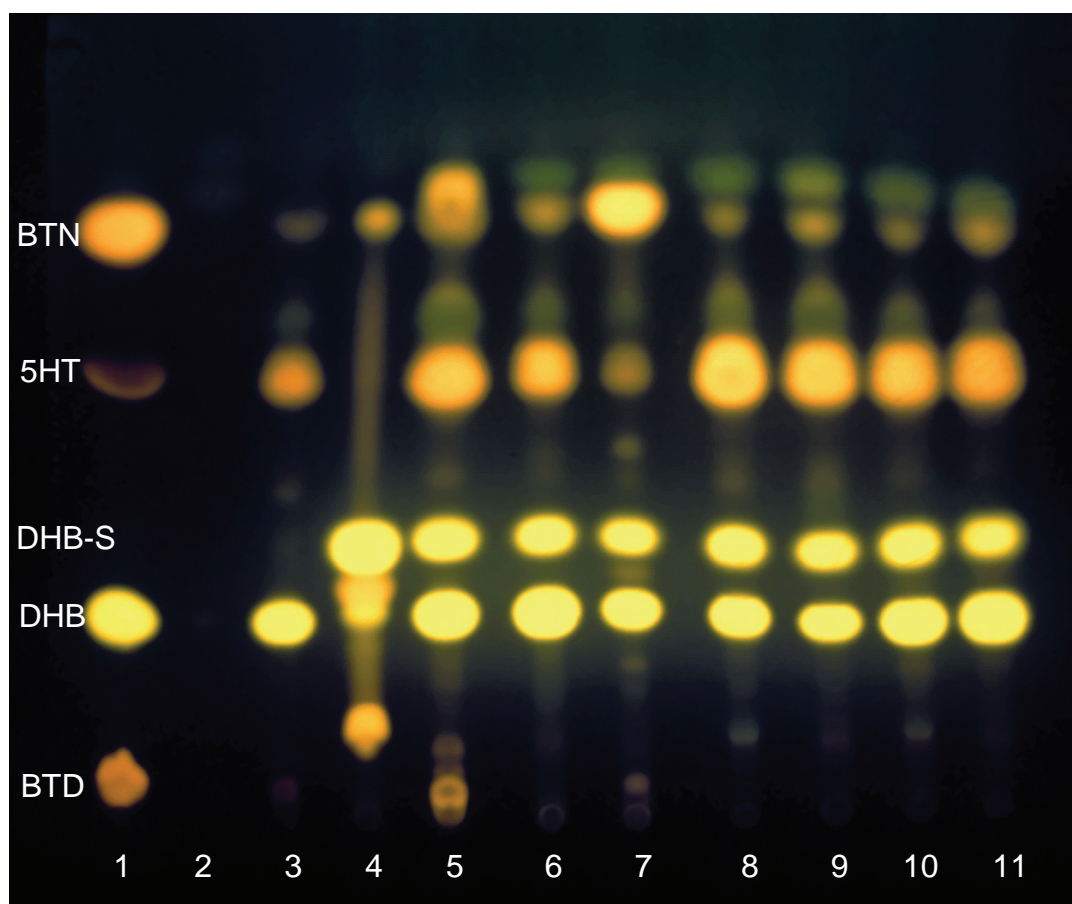


Fig. 13 Cromatografia em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTB, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cima. De 2 à 11: perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides das seguintes espécies: 2. *Melanophryniscus fulvoguttatus* (Bonito-MS); 3. *Rhaebo guttatus* (Rondolândia-MT); 4. *Rhinella* gr. *margaritifera* (Rondolândia-MT); 5. *Rhinella granulosa* (Cocos-BA); 6. *Rhinella crucifer* (Itacaré-BA); 7. *Rhinella arenarum* (Rio Grande-RS); 8. *Rhinella rubescens* (Brasília-DF); 9. *Rhinella achavali* (Riviera-Uruguaí); 10. *Rhinella veredas* (Cocos-BA); 11 *Rhinella veredas* (Buritizeiro-MG).

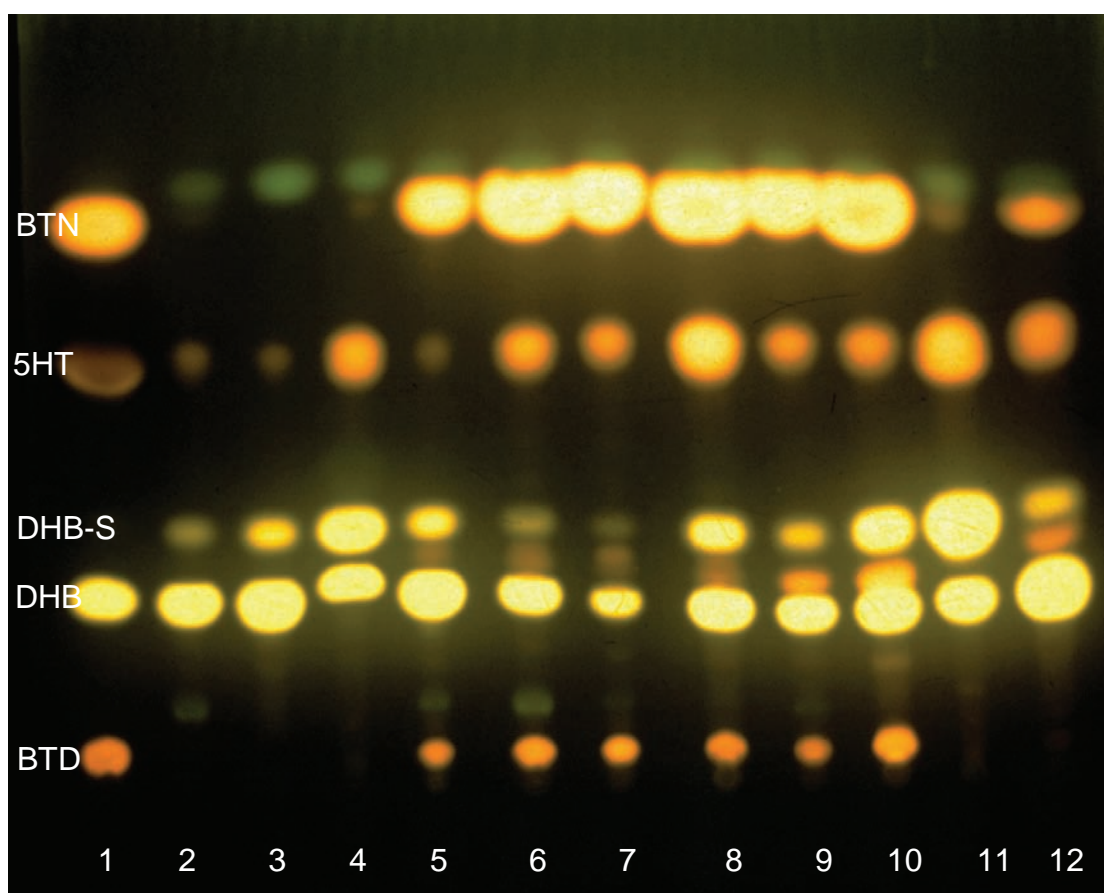


Fig. 14 Cromatografia em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTN, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cim. De 2 à 12: perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides das seguintes espécies: 2. *Rhinella marina* (Belém-PA); 3. *Rhinella icterica* (Atibaia-SP); 4. *Rhinella icterica* (Lebon Régis-SC); 5. *Rhinella schneideri* (Botucatu-SP); 6. *Rhinella schneideri* (Prado-BA); 7. *Rhinella schneideri* (São Gonçalo do Pará-MG); 8. *Rhinella schneideri* (Buritizeiro-MG); 9. *Rhinella schneideri* (Brasília-DF); 10. *Rhinella jimi* (Arembepe-BA); 11. *Rhinella cerradensis* (Brasília-DF); 12. *Rhinella cerradensis* (Cocos-BA).

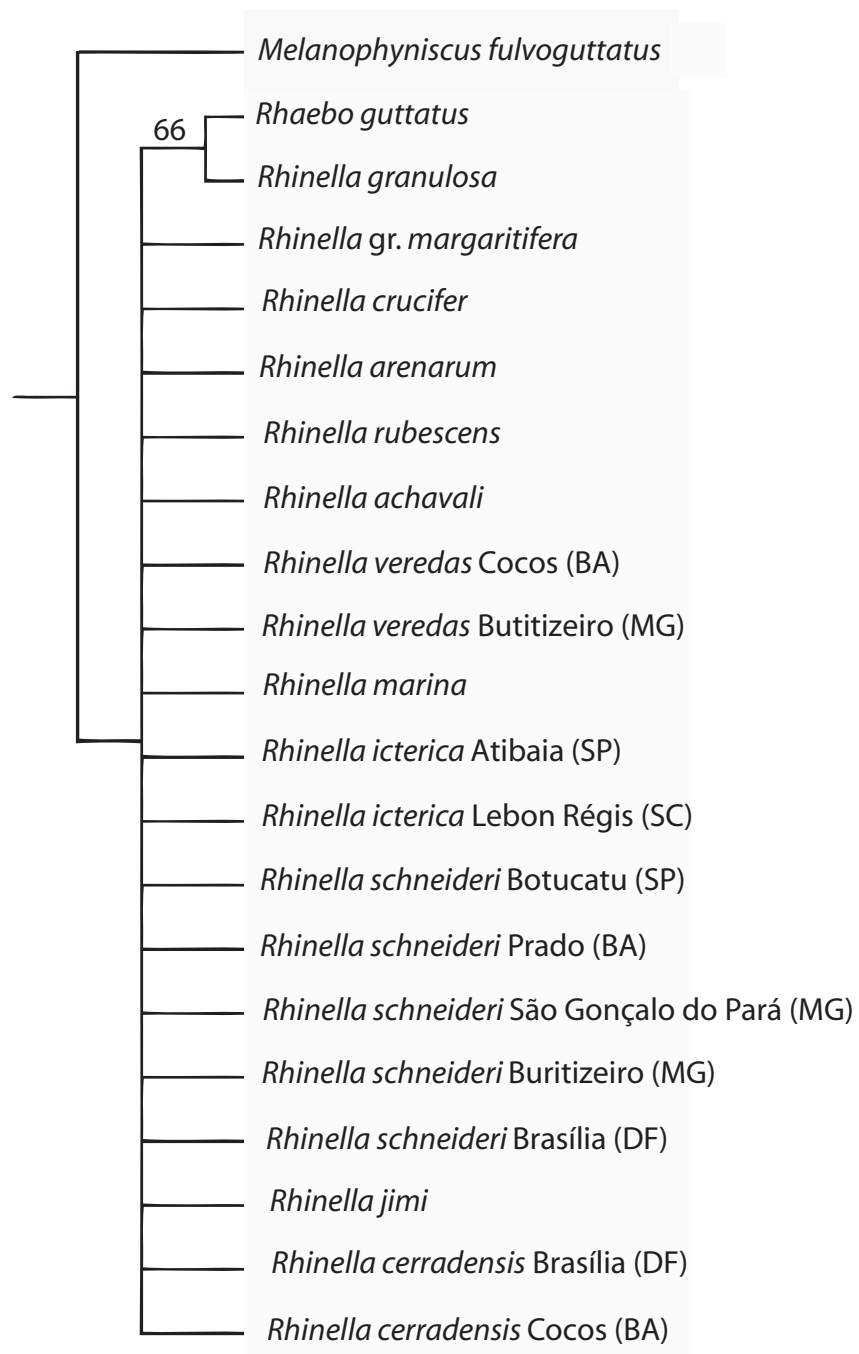


Figura 15 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia resultante da análise de 16 caracteres de indolalquilaminas (70508 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 51, CI = 0,313 e RI = 0,125). O número acima do nó indica valor de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações

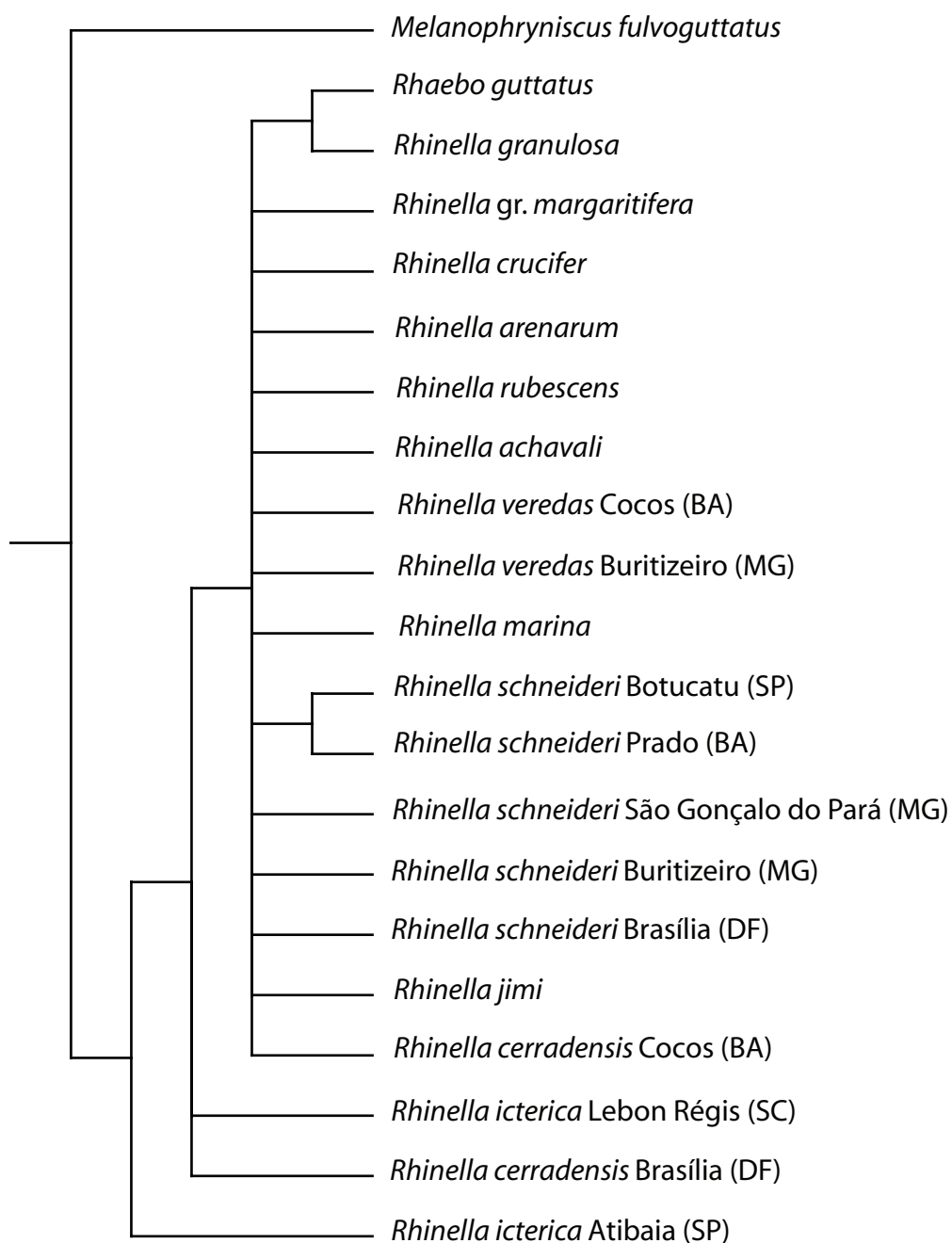


Figura 16 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia resultante da análise de 16 caracteres de indolalquilaminas (70508 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 45, CI = 0,356 e RI = 0,098)

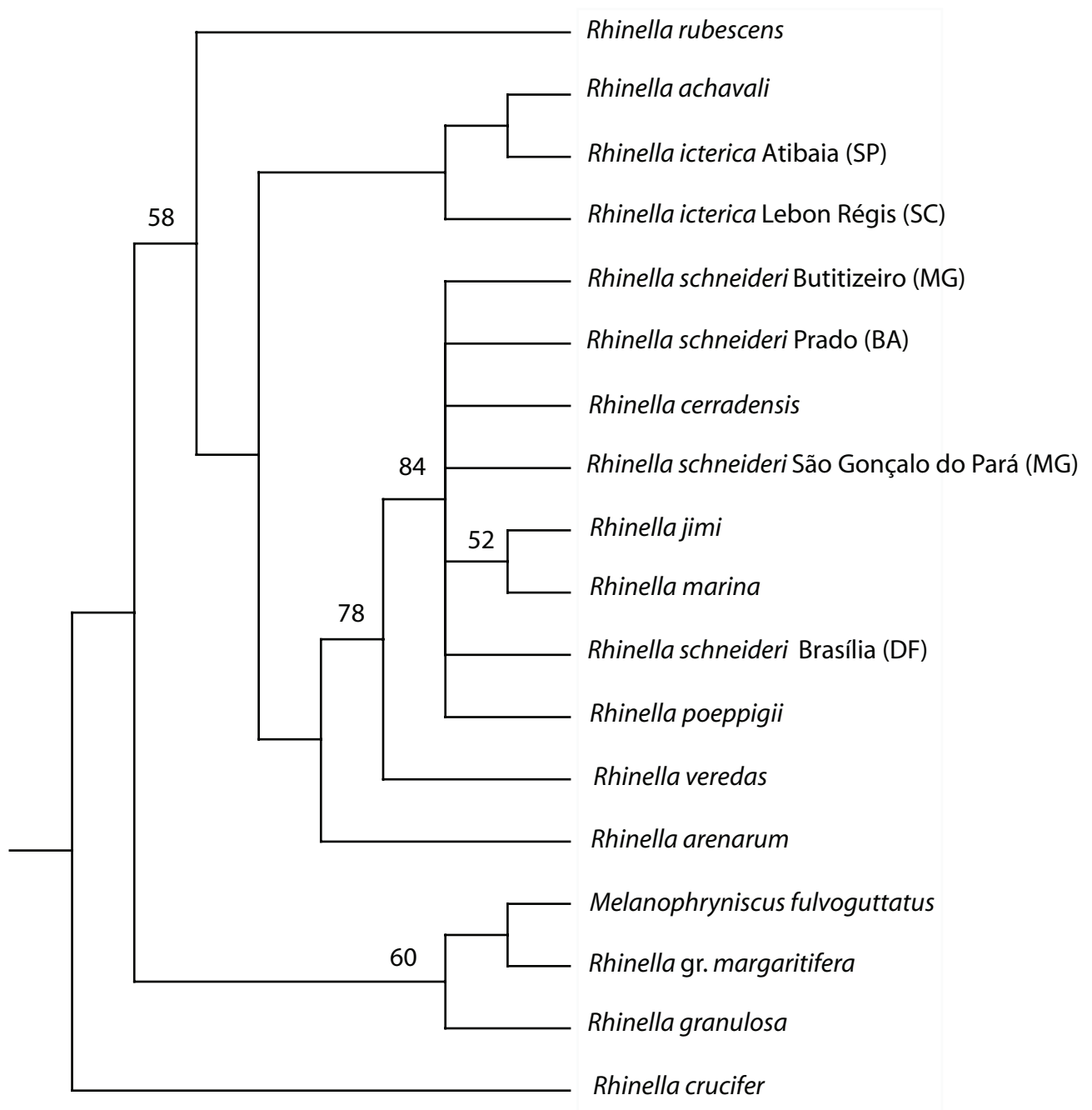


Figura 17 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 451 caracteres moleculares (50 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 344, CI = 0,706 e RI = 0,576). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações

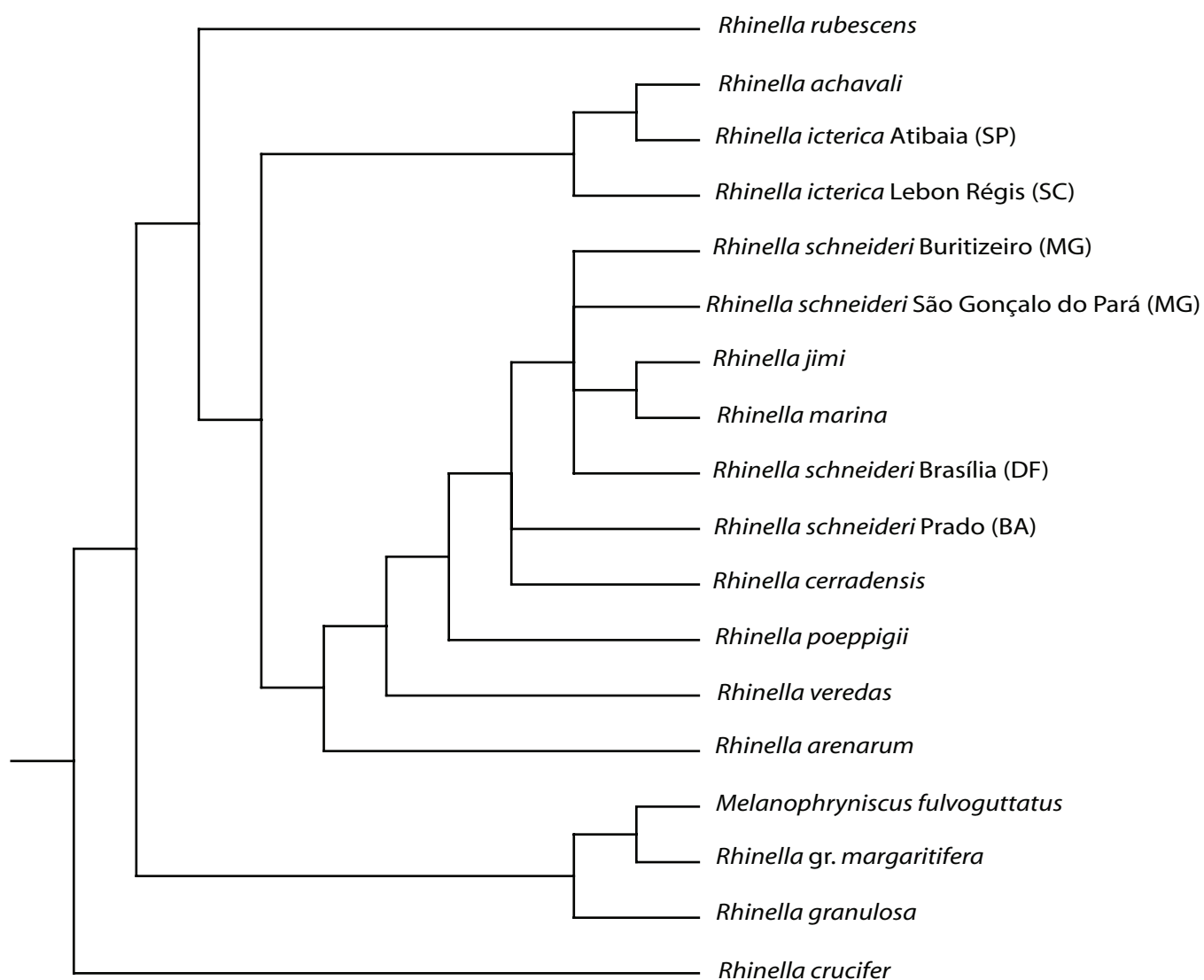


Figura 18 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia resultante da análise de 451 caracteres moleculares (50 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 344, CI = 0,721 e RI = 0,605)



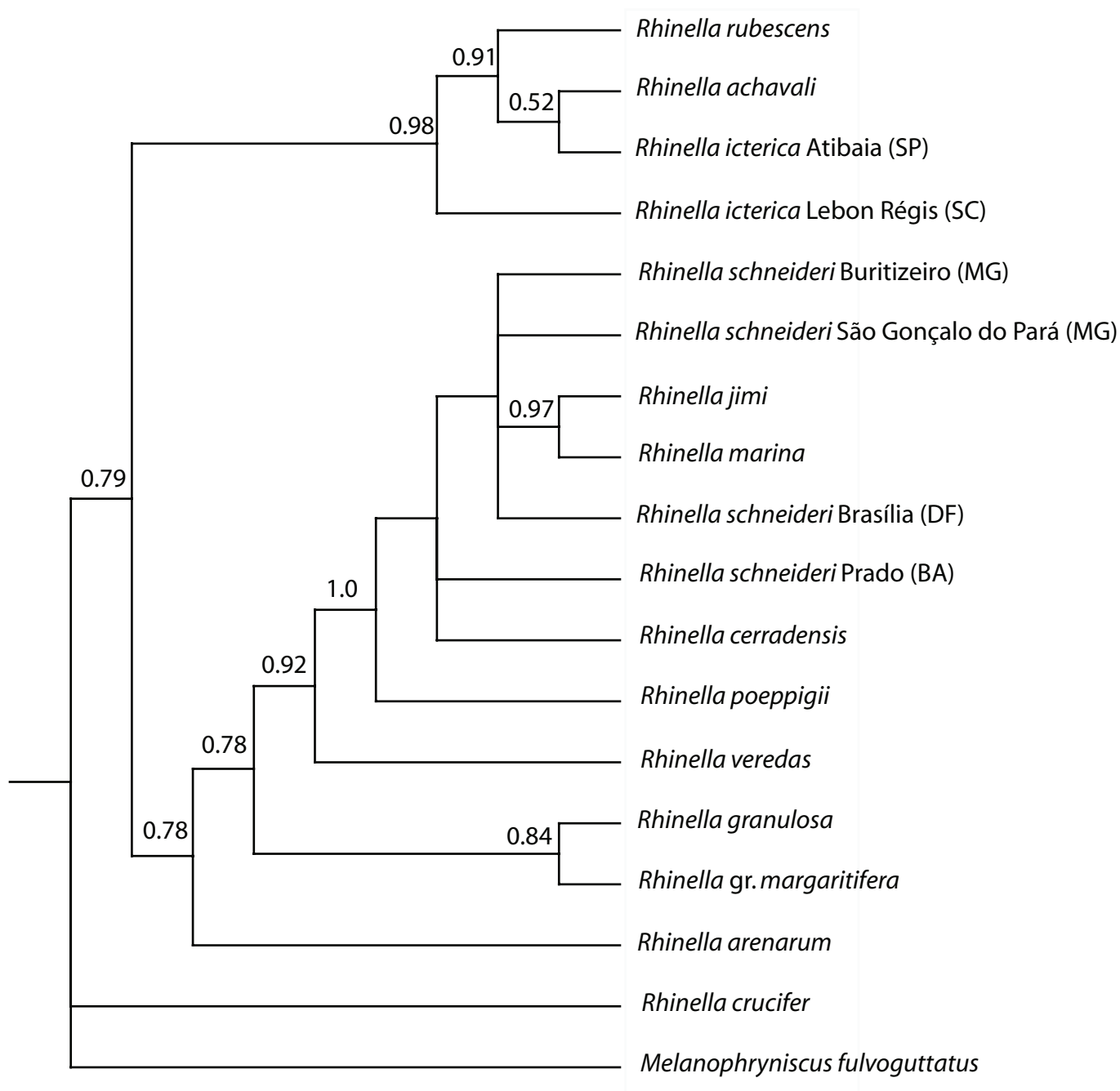


Figura 19 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 451 caracteres moleculares. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 4 milhões de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações

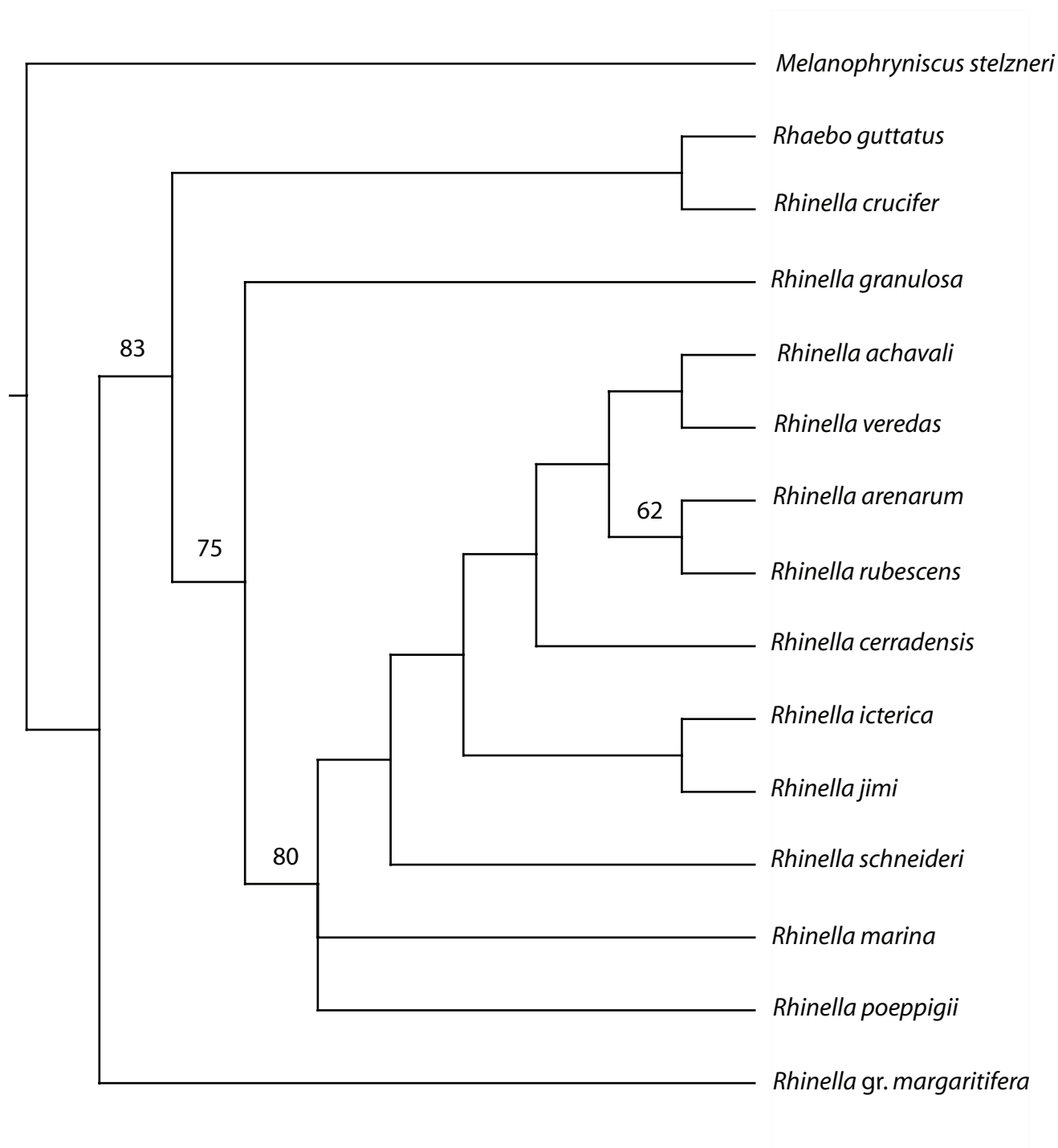


Figura 20 Cladograma mais parcimonioso da análise de parcimônia proveniente da análise de 83 caracteres morfológicos (Comprimento = 132, CI = 0,727 e RI = 0,591). Os números acima dos nós indicam valores de "bootstrap" provenientes de 1000 pseudoreplicações

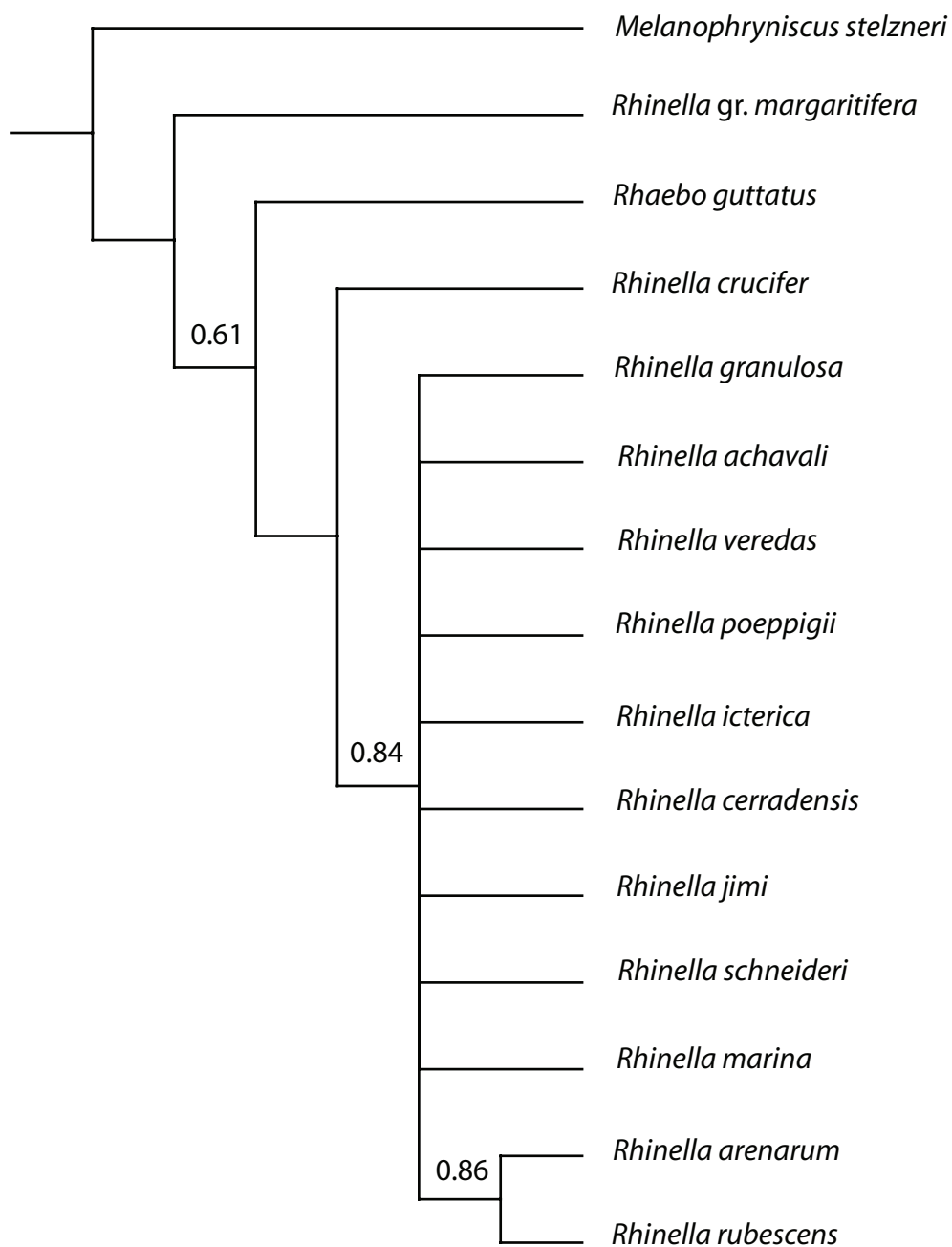


Figura 21 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 83 caracteres morfológicos. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 1 milhão de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações

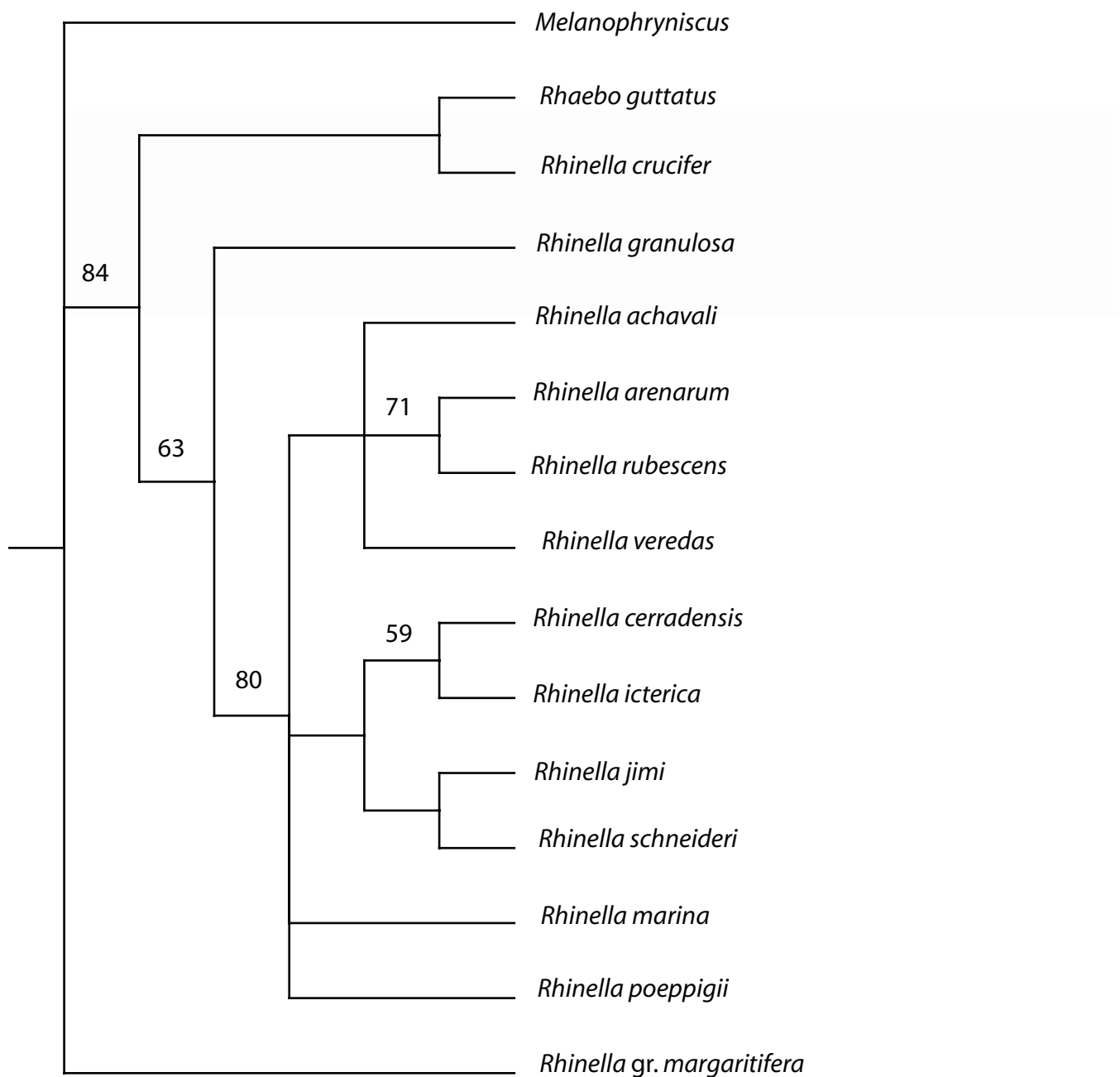


Figura 22 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados (10 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 162, CI = 0,654 e RI = 0,517). Os números acima dos nós indicam valores de "bootstrap" provenientes de 1000 pseudoreplicações

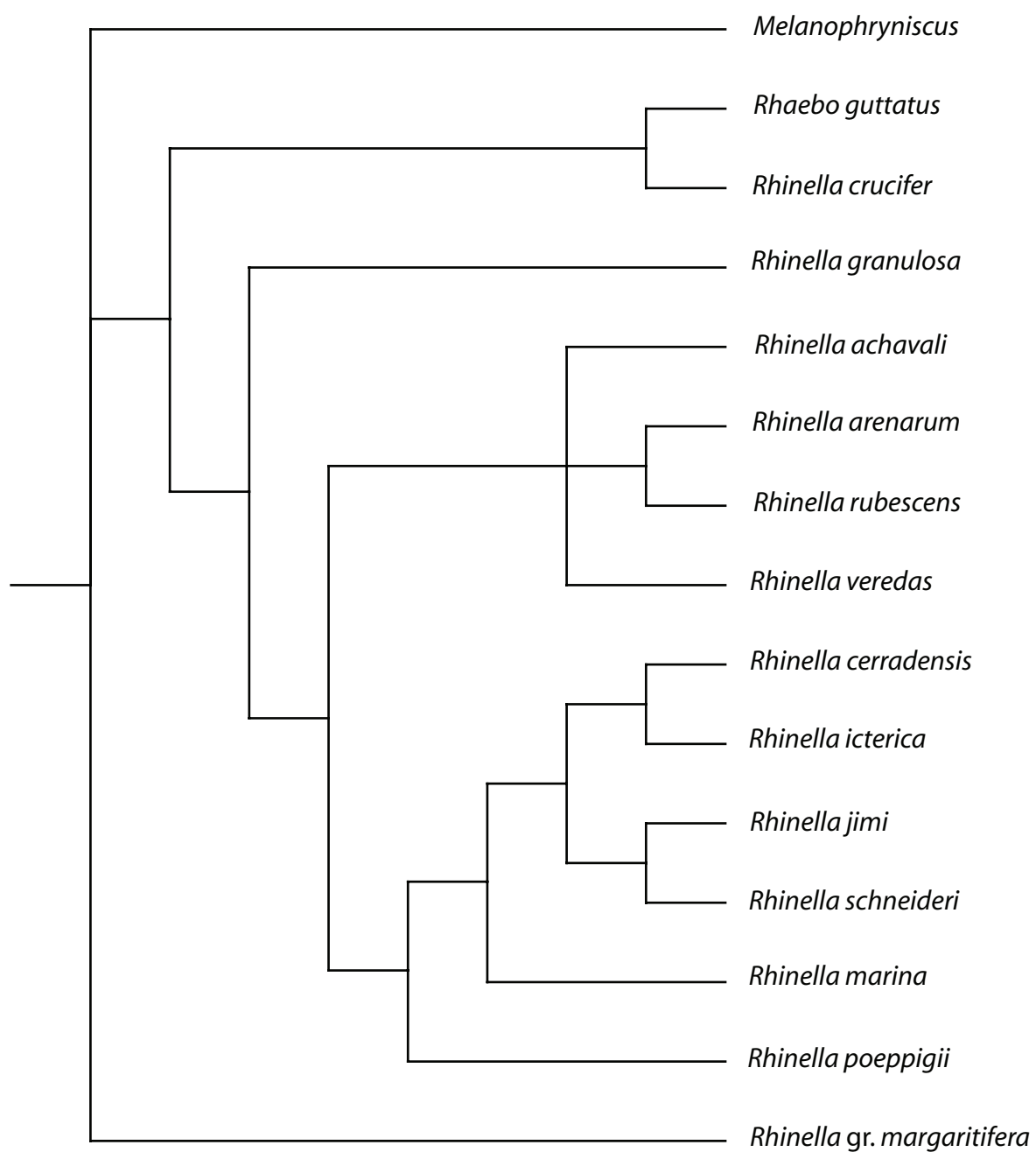


Figura 23 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia proveniente da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados (10 árvores mais parcimoniosas) (Comprimento = 161, CI = 0,658 e RI = 0,526)

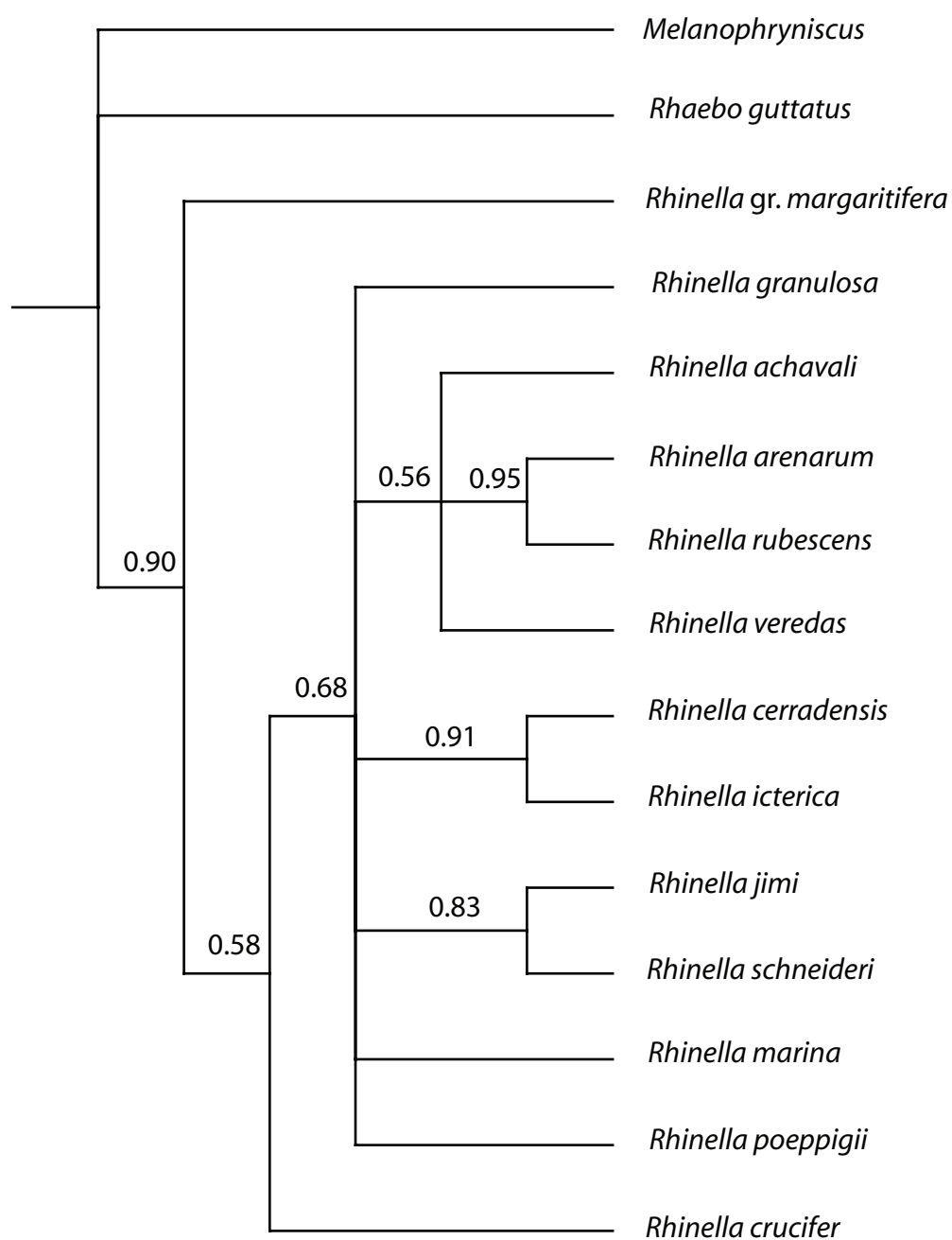


Figura 24 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 99 caracteres de indolalquilaminas e morfológicos combinados. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 1 milhão de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações

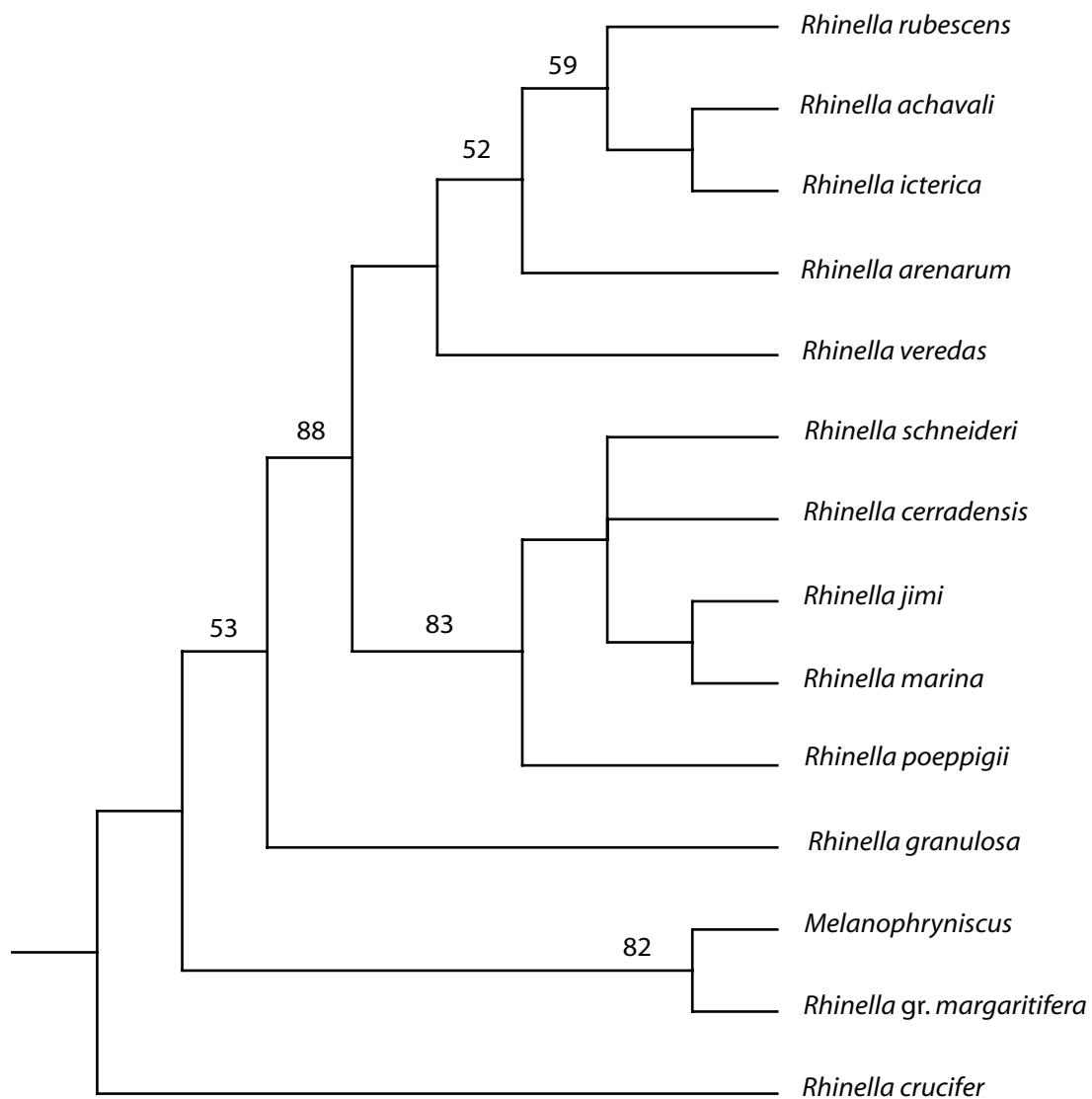


Figura 25 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 534 caracteres moleculares e morfológicos combinados (três árvores parcimoniosas) (Comprimento = 427, CI = 0,721 e RI = 0,530). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações



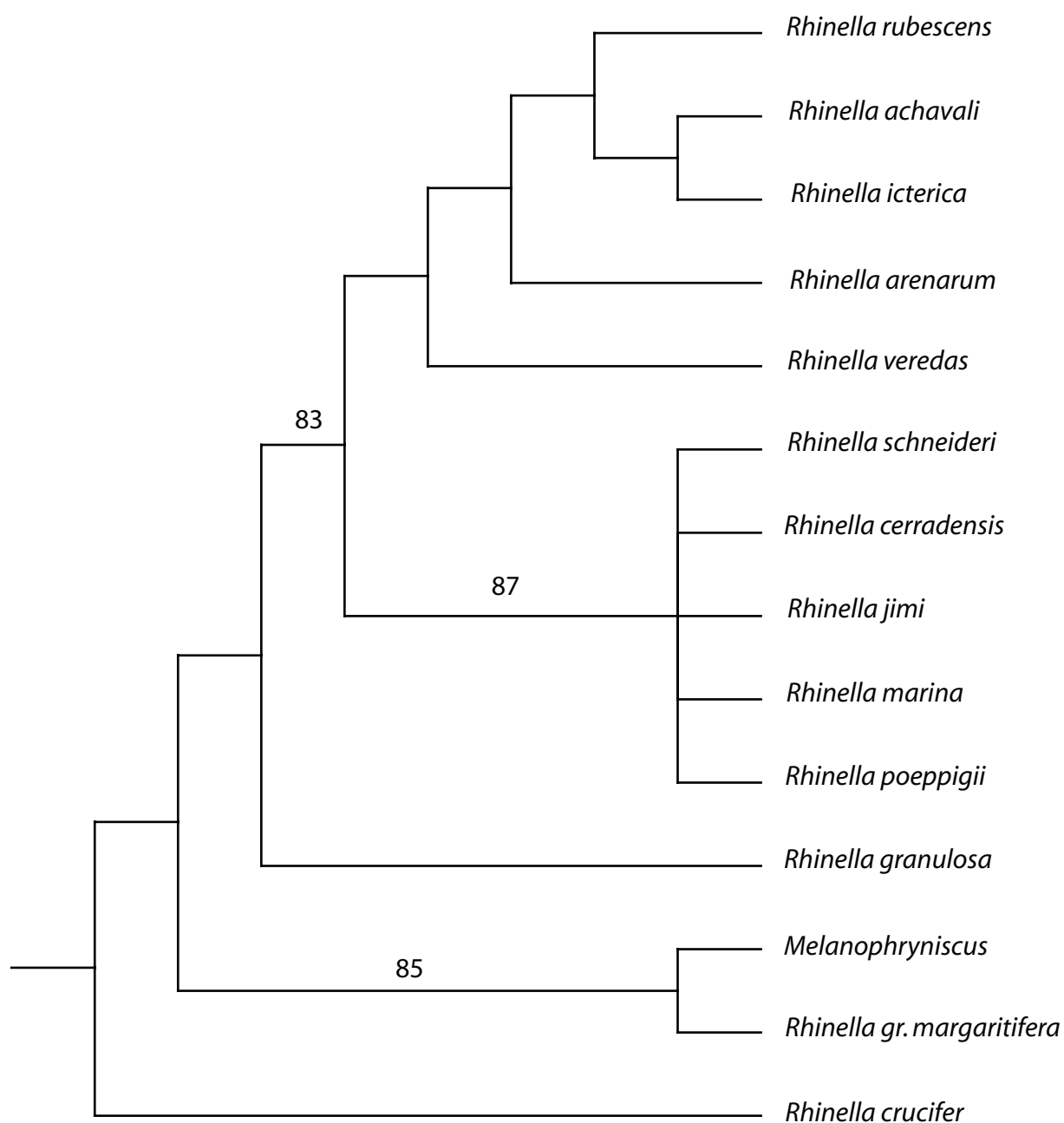


Figura 26 Cladograma de consenso estrito da análise de parcimônia proveniente da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados (cinco árvores parcimoniosas) (Comprimento = 459, CI = 0,706 e RI = 0,507). Os números acima dos nós indicam valores de “bootstrap” provenientes de 1000 pseudoreplicações

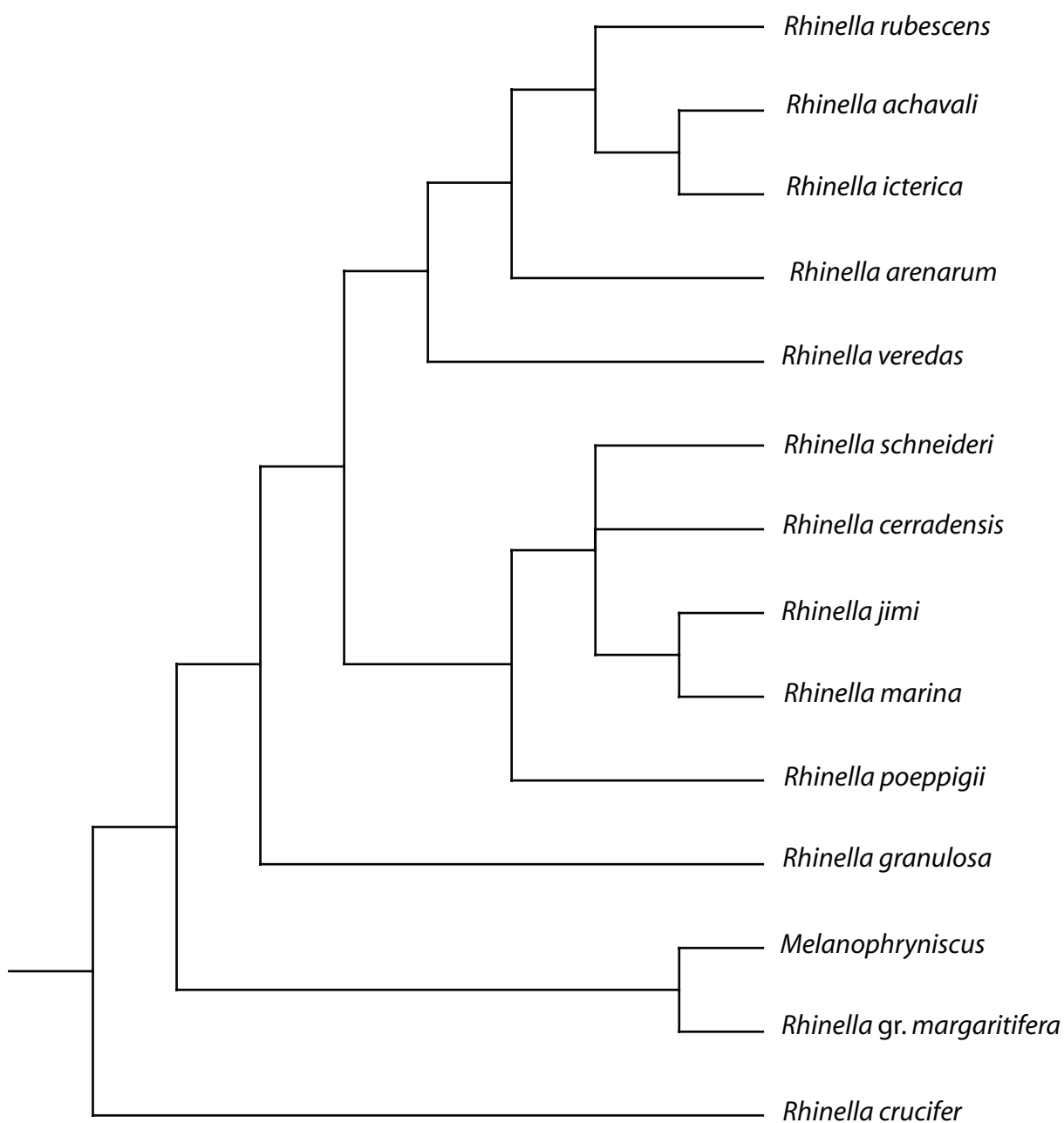


Figura 27 Cladograma de 50% da regra da maioria da análise de parcimônia proveniente da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados (cinco árvores parcimoniosas) (Comprimento = 476, CI = 0,681 e RI = 0,445)

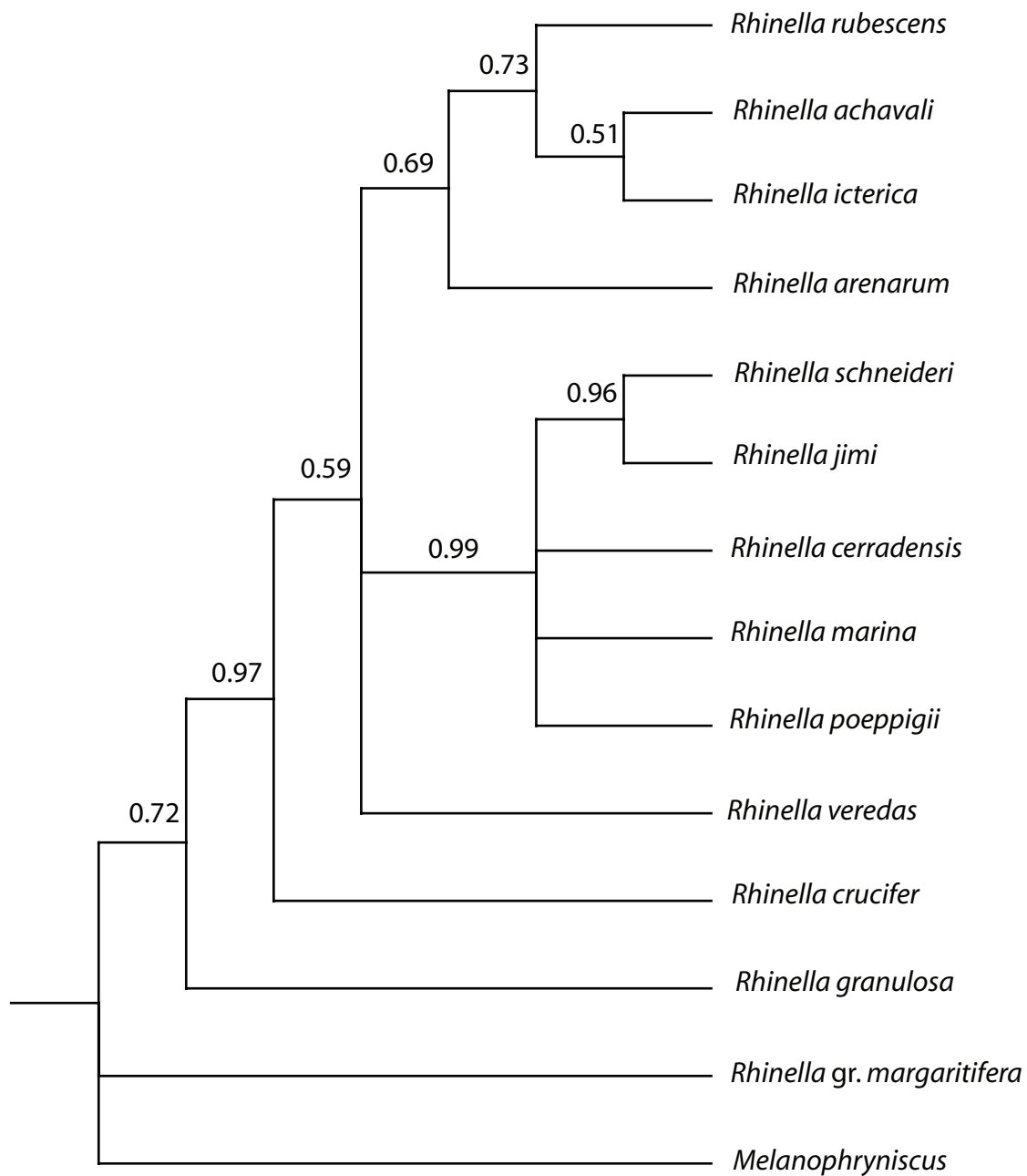


Figura 28 Cladograma da análise Bayesiana resultante da análise de 550 caracteres de secreção cutânea, moleculares e morfológicos combinados. Os números acima dos nós indicam valores de suporte após análise de 4 milhões de gerações. Árvores foram obtidas a cada 100 gerações

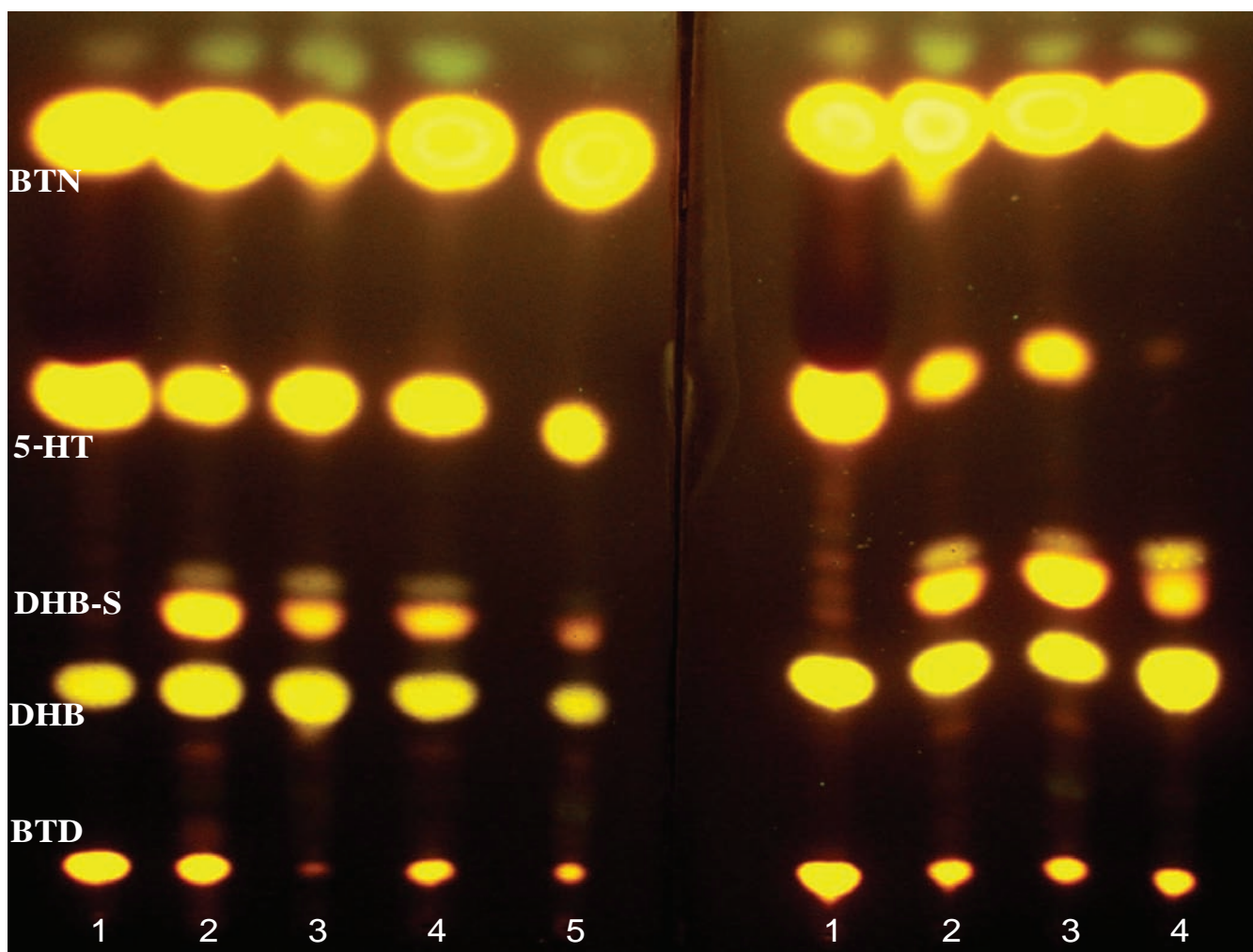


Figura 29 Cromatografias em Camada Delgada, sílica gel H. Sistema de Solventes: acetato de etila: isopropanol: amônia (9:7:4 v/v/v). Revelador: OPT/HCl/cisteína. Foto sob luz UV 375 nm. 1. Padrões de BTD, DHB, 5-HT e BTN, de baixo para cima. Placa 1 (de 2 à 5); e placa 2 (de 2 à 4): perfil do extrato metanólico da secreção das glândulas parotóides de diferentes espécimes de *Rhinella schneideri* coletados no mesmo dia demonstrando uma variação quantitativa.

Tabela 1. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres de secreção cutânea.

Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo*	Número de espécimes
<i>Melanophryniscus fulvoguttatus</i>	Brasil: Mato Grosso do Sul: Bonito/CHUNB 43326; 43636–37	8
<i>Rhaebo guttatus</i>	Brasil: Mato Grosso: Rondolândia/CHUNB 38823	1
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i>	Brasil: Mato Grosso: Rondolândia /CHUNB 39957	4
<i>Rhinella granulosa</i>	Brasil: Goiás: São João da Aliança/CHUNB 39959	9
<i>Rhinella crucifer</i>	Brasil: Bahia: Itacaré/CHUNB 39954	18
<i>Rhinella achavali</i>	Uruguai: Rivera: Rivera/CHUNB 48024–25	2
<i>Rhinella arenarum</i>	Brasil: Rio Grande do sul: Rio Grande/CHUNB 39951	4
<i>Rhinella cerradensis</i>	Brasil: Distrito Federal: Brasília/CHUNB 39953 e Bahia: Cocos/CHUNB 38670–71	5; 2Ψ
<i>Rhinella icterica</i>	Brasil: São Paulo: Atibaia/CHUNB 39960 e Brasil: Santa Catarina: Lebon Régis/CHUNB 40670; 43322–23	1; 4Ψ
<i>Rhinella jimi</i>	Brasil: Bahia: Arembepe/CHUNB 49570–71	4
<i>Rhinella marina</i>	Brasil: Pará: Belém/CHUNB 39967	3
<i>Rhinella rubescens</i>	Brasil: Distrito Federal: Brasília/CHUNB 39970	16

Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo*	Número de espécimes
<i>Rhinella schneideri</i>	Brasil: São Paulo: Botucatu/CHUNB 39976; Brasil: Minas Gerais: Buritizeiro/CHUNB 44601-03; Brasil: Minas Gerais: São Gonçalo do Pará/CHUNB 49564 e Brasil: Distrito Federal: Brasília/CHUNB 39971	5; 3; 1; 6Ψ
<i>Rhinella veredas</i>	Brasil: Bahia: Cocos/CHUNB 38654 e Brasil: Minas Gerais: Buritizeiro/CHUNB 43336-37	4; 5Ψ

\*Nota: nem todos os exemplares dos quais foram extraídas secreções das glândulas parotóides foram tombadas em coleções. Apenas alguns de cada espécie (população) foram depositados em coleções como espécies testemunho.

ΨNúmero de espécimes de cada localidade, respectivamente à (Localidade de coleta/Coleção e número de tombo).

Tabela 2. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres moleculares.

Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo*	Número de espécimes
<i>Melanophryniscus fulvoguttatus</i>	Brasil: Mato Grosso do Sul: Bonito/CHUNB 43636	1
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i>	Brasil: Rondônia: Cacoal /CHUNB 39958	1
<i>Rhinella granulosa</i>	Brasil: Acre: Rio Branco/CHUNB 49568–69	2
<i>Rhinella crucifer</i>	Brasil: Bahia: Itacaré/CHUNB 39954	1
<i>Rhinella achavali</i>	Uruguai: Rivera: Rivera/CHUNB 48024–25	2
<i>Rhinella arenarum</i>	Brasil: Rio Grande do Sul: Rio Grande/CHUNB 39950	1
<i>Rhinella cerradensis</i>	Brasil: Bahia: Cocos/CHUNB 38670–71	2
<i>Rhinella icterica</i>	Brasil: São Paulo: Atibaia/CHUNB 39960 e Brasil: Santa Catarina: Lebón Régis/CHUNB 40670; 43322 (exemplares analisados separadamente)	2
<i>Rhinella jimi</i>	Brasil: Bahia: Arembepe/CHUNB 49570–71	2
<i>Rhinella marina</i>	Brasil: Pará: Belém/CHUNB 39967	1
<i>Rhinella poeppigii</i>	Bolívia: Santa Cruz: Espejillos: Andrés Ibañez	1
<i>Rhinella rubescens</i>	Brasil: Distrito Federal: Brasília/CHUNB 39969	1



Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo*	Número de espécimes
<i>Rhinella schneideri</i>	Brasil: Minas Gerais: Buritizeiro/CHUNB 44601-02;; Brasil: Minas Gerais: São Gonçalo do Pará/CHUNB 49564, Brasil: Bahia: Prado/CHUNB 49565 e Brasil: Distrito Federal: Brasília/CHUNB 3997139975 (exemplares de localidades diferentes analisados como táxons separados)	4
<i>Rhinella veredas</i>	Brasil: Minas Gerais: Buritizeiro/CHUNB 44609-10	2

Tabela 3. Espécimes preparados para a obtenção dos caracteres morfológicos por Pramuk (2006)\* e por este trabalho Ψ.

Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo	Número de espécimes
<i>Melanophryniscus stelzneri</i> *	Argentina: San Luis/KU 93180	1
<i>Rhaebo guttatus</i> *	Venezuela: Bolívar/KU 167631	1
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i> *	Brasil: Amapá/KU 93138	1
<i>Rhinella granulosa</i> *Ψ	Colômbia: Meta/KU 110431, 169346, 110461, 110460 e Magdalena/KU 110462, KU 170090–92	8
<i>Rhinella crucifer</i> *	Brasil: Espírito Santo/KU 93112	1
<i>Rhinella achavali</i> Ψ	Uruguai: Rivera: Rivera/CHUNB 48025	1
<i>Rhinella arenarum</i> *Ψ	Uruguai: Artiga/KU 71161 e Brasil: Rio Grande do sul: Rio Grande/ASUnB 2585	2
<i>Rhinella cerradensis</i> Ψ	Brasil: Distrito Federal: Brasília ASUnB 2553, 2554	2
<i>Rhinella icterica</i> Ψ	Brasil: São Paulo: São Paulo/ASUnB 2586–87	2
<i>Rhinella jimi</i> Ψ	Brasil: Bahia: Arembepe/ASUnB 2588	1
<i>Rhinella marina</i> *	Nicarágua: Rivas KU 84935–37; Nicarágua: Manágua KU 42566; México: Alta Verapaz KU 69846; Equador: Napo KU 152914	6
<i>Rhinella poeppigii</i> *	Bolívia: La Paz KU 183234–35	2

Espécie	Localidade de coleta/Coleção e número de tombo	Número de espécimes
<i>Rhinella rubescens</i> Ψ	Brasil: Distrito Federal: Brasília/ASUnB 2070–71	2
<i>Rhinella schneideri</i> *Ψ	Argentina: Santiago del Estero/KU 160307	1
<i>Rhinella veredas</i> Ψ	Brasil: Minas Gerais: Buritizeiro/CHUNB 43336–37	2

Tabela 4. Parâmetros do modelo de substituição molecular encontrado pelo programa Modeltest para região do fragmento citocromo *b*.

Frequências das bases	Frequência de substituição	Distribuição Gamma (G)	Razão de sítios invariáveis
A=0.2570	A-C=2.7511	0.3479	1.8577
C=0.2822	A-G=6.3807		
G=0.1675	A-T=1.3625		
T=0.2933	C-G=1.9792		
	C-T=6.3807		
	G-T=1.0000		

## CAPÍTULO 3

### Biogeografia das espécies do grupo *Rhinella marina*

#### 3.1) INTRODUÇÃO

##### 3.1.1) Biogeografia e origem de Bufonidae e de “*Bufo*”

Existem diversas hipóteses de onde “*Bufo*” e os bufonídeos se originaram e de como explicar seu padrão de distribuição atual. A ampla distribuição e grande diversidade ecológica sugerem que “*Bufo*” seria antigo (Tihen, 1972), possivelmente do final do Cretáceo, antes da separação da Gondwana (Maxson, 1984). Com base na grande distribuição de “*Bufo*” e pelo movimento dos continentes, Savage (1973) especulou que a família Bufonidae dataria de 80–150 milhões de anos. Dados obtidos com albumina sugerem que os bufonídeos teriam se originado há aproximadamente 80 milhões de anos (Maxson, 1984). Estes e Reig (1973), Savage (1973), Estes e Baéz, 1985, e Baéz e Nicoli (2004) sugerem que a diversificação de “*Bufo*” em vários grupos de espécies é um evento relativamente antigo. Baéz e Nicoli (2004) registram fósseis de bufonídeos do final do Oligoceno na região de Salla na Bolívia. Baseados na morfologia de fragmentos do íleo, duas espécies parecem estar representadas em Salla e relacionadas a espécies do grupo *Rhinella marina*. Pramuk (2006) baseada em cladogramas de área derivados de dados moleculares sugere a origem dos bufonídeos durante a Gondwana. Entretanto, esta origem mais antiga da família tem sido encarada com ceticismo (Pauly *et al.*, 2004), principalmente pela falta de fósseis de bufonídeos antigos o bastante (nenhum com mais de 60 milhões de anos) para suportar uma origem pré-Gondwana. O fóssil mais antigo atribuído a “*Bufo*” data do final do Paleoceno de Itaboraí, Rio de Janeiro, Brasil (cerca de 55 milhões de anos; Baéz e Nicoli, 2004). O fóssil mais antigo de bufonídeo é um pouco mais antigo (cerca de 57 milhões de anos; Baéz e Gasparini, 1979).

Pramuk *et al.* (2008) empregaram métodos Bayesianos pela primeira vez para estimar tempos de divergência e investigar a história biogeográfica de Bufonidae. Foi utilizada uma hipótese filogenética baseada em 2.521 pares de bases de DNA (fragmentos gênicos mitocondriais e nucleares). Os resultados das estimativas foram usados para testar diversas hipóteses biogeográficas (dispersão e/ou vicariância) da família. Estimativas de tempos de divergência obtidas das análises de Pramuk *et al.* (2008) sugerem que Bufonidae é um grupo

pós-Gondwano [78,3–98,8; 88,2 milhões de anos (95% de intervalo de credibilidade e mediana, respectivamente)] (originado na América do Sul e mais cedo do que previamente sugerido), e que os clados dentro de Bufonidae são o resultado de diversificação no Paleoceno. A datação da diversificação está de acordo com algumas hipóteses prévias da idade de bufonídeos (*e.g.* San Mauro *et al.*, 2005). Os dados de Pramuk *et al.* (2008) não suportam a origem na Gondwana, pois estimam a origem da família depois da separação da América do Sul e África. De acordo Pramuk *et al.* (2008), os fósseis atribuídos ao grupo *R. marina* por Baéz e Nicoli (2004) foram descritos por porções incompletas do íleo esquerdo e só poderiam ser incorporados com confiança no clado *Rhinella*. Entretanto, os fósseis ainda são consideravelmente mais antigos do que as estimativas de Pramuk *et al.* (2008) para *Rhinella* (31–44 milhões de anos). Para complicar ainda mais Bufonidae é morfologicamente bem conservado (Pramuk, 2006). Assim, a datação destes fósseis é muito difícil e poderia estar sofrendo o efeito da pouca variação morfológica, dificultando a alocação taxonômica do material, o que é uma situação particularmente bem problemática quando lidamos com fragmentos fósseis. Outro ponto que dificulta a hipótese da origem na Gondwana é a ausência de fósseis de bufonídeos de Madagascar e Austrália-Nova Guiné. A continuidade das massas de terra com a América do Sul via Antártida no fim do Cretáceo (Madagascar) e Paleogeno (Austrália) é bem suportada por dados geológicos e biológicos (*e.g.* Sampson *et al.*, 1998; Hay *et al.*, 1999; Noonan e Chippindale, 2006). Entretanto, a enigmática ausência de grupos animais não é exclusiva de bufonídeos. Outros grupos com ampla distribuição ou “distribuição Gondwanica” tais como serpentes (Boinea), lagartos (Iguaninae), peixes (Ciclidae) e mamíferos “gondwanaterianos” também estão ausentes na Austrália (*e.g.* Sampson *et al.*, 1998; Vences *et al.*, 2001; Noonan e Chippindale, 2006). A ausência destes grupos Gondwanicos nesse continente poderia ser explicada por uma barreira impedindo a dispersão na Antártida (Janis, 1993). A ausência, em Madagascar, desses grupos da Gondwana é menos comum para estes táxons (*e.g.* répteis e mamíferos). No entanto, esses grupos têm maior tolerância do que os anuros a flutuações climáticas e salinidade que podem ser encontrados nesta conexão terrestre. A ausência de bufonídeos em Madagascar também poderia ser explicada simplesmente por um efeito do tempo. Todos os grupos da Gondwana (*e.g.* répteis e mamíferos) presentes nesta ilha estão

extintos ou persistem com baixos níveis de diversidade (de uma a três espécies).

Tihen (1962) postula que “*Bufo*” se originou nos trópicos do Velho Mundo, sugerindo que os ancestrais colonizaram o Paleártico, subsequentemente o Neártico e, depois, a América do Sul. Savage (1973) hipotetiza que os bufonídeos teriam se originado na América do Sul e depois se dispersado para a América do Norte e demais regiões. Maxson (1981a, b) conclui que a distribuição cosmopolita e relações entre os bufonídeos foram resultado de uma vicariância durante a Gondwana seguida por dispersão para a América do Sul, posteriormente para a América do Norte e depois da África para a Eurásia. Um dos aspectos marcantes nas recentes análises de filogenia de bufonídeos (Pauly *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2006; Pramuk, 2006) é o parafiletismo dos bufonídeos sul-americanos. De acordo com a recente classificação (Frost *et al.*, 2006; Pramuk *et al.*, 2008), os bufonídeos na América do Sul são compostos pelos gêneros “mais antigos”: *Melanophryniscus*, *Atelopus*, *Rhaebo*, *Nannophryne* e pelo mais recente *Rhinella*. Dado esse surpreendente padrão filogenético e a provável origem do grupo na América do Sul, a origem do gênero *Rhinella* (sul-americano) e seu grupo irmão (clados da América do Norte e Central, *Anaxyrus* e *Cranopsis*), sugerem uma segunda invasão dos bufonídeos no Novo Mundo. A idade pós-Gondwana e a posição filogenética dos bufonídeos do Velho Mundo sugerem uma dispersão da América no início do Paleogeno. A baixa tolerância dos bufonídeos à salinidade faz com que a dispersão dos bufonídeos do Novo Mundo para a África e Eurásia seja improvável, mas não impossível, já que a dispersão por água salina já foi proposta para explicar a dispersão de outros neobatrâquios (de Queiroz, 2005). A única rota por terra plausível para este grupo seria a dispersão em direção ao Norte da América do Sul, então para América Central, América do Norte, e finalmente para a Eurásia via Beringia. Proposta similar foi feita por Blair (1972). Apesar da amostra relativamente pobre de bufonídeos Asiáticos, o padrão filogenético de Pramuk *et al.* (2008), combinado com as presumíveis conexões terrestres, leva a crer o favorecimento da migração pela conexão via Beringia mais do que pelo Atlântico Norte. As estimativas posteriores de Pramuk *et al.* (2008) sugerem que o clado do Novo Mundo (*Rhinella* + *Cranopsis* + *Anaxyrus*) divergem dos seus parentes do Velho Mundo no Eoceno (43,3 milhões de anos, 36,6–50 milhões de anos; mediana e intervalo de credibilidade,



respectivamente).

Apesar desses recentes achados, ainda pouco se compreende sobre biogeografia de diversos grupos taxonômicos de Bufonidae. Esse também é o caso do grupo *Rhinella marina*. A datação molecular por meio de métodos de calibração como registros fósseis, análises de áreas ancestrais e métodos Bayesianos, podem ser usados para determinar os tempos de divergência e estabelecer os padrões biogeográficos (dispersão e/ou vicariância) que explicam a distribuição atual das espécies de um grupo. As espécies do grupo *R. marina* têm ampla distribuição nos neotrópicos. *R. arenarum* tem distribuição no Sul do Brasil, Uruguai, Bolívia, Argentina e Paraguai. *R. icterica* tem distribuição no Sudeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai. *R. marina* tem distribuição do Sul do Texas (EUA), passando pelo México até o Norte da América do Sul. *R. schneideri* se distribui por grande parte do Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai. *R. poeppigii* é encontrada no Equador, Peru e Bolívia. *R. rubescens* é encontrada nos Estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal. *R. jimi* é encontrada no Nordeste do Brasil, dos Estados do Maranhão até a Bahia. *R. achavali* é encontrada no Uruguai e no Sul do Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil. *R. veredas* é encontrada nos estados Brasileiros da Bahia, Piauí e Minas Gerais. *R. cerradensis* possui distribuição nos seguintes Estados Brasileiros: Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal (Frost, 2007; Maciel *et al.*, 2007).

Neste capítulo pretendeu-se obter uma hipótese biogeográfica do grupo *R. marina* possivelmente explicada mais por padrões históricos do que ecológicos. Isso se deve ao fato de que a morfologia e a ecologia do grupo de estudo são muito conservadas. Além disso, intencionou-se testar se a origem das espécies do grupo *R. marina* seria mesmo na América do Sul, mais do que na América Central ou do Norte, devido a distribuição atual das espécies.

### 3.2) MATERIAL E MÉTODOS

Os tempos de divergência foram estimados utilizando-se o relógio molecular relaxado com enfoque Bayesiano, usando o pacote de programas MULTIDISTRIBUTE (Kishino *et al.*, 2001; Thorne e Kishino, 2002; Thorne *et al.*, 1998). Este tipo de análise incorpora tanto informações moleculares quanto paleontológicas para estimar (calibrar) a variância do tempo de divergência.

Os tempos de calibração (calibradores) são unidades de tempo utilizadas para a obtenção das estimativas do tempo mínimo de divergência entre linhagens (clados) esperadas entre a base e o topo da topologia. Ou seja, os tempos de divergência são unidades de tempo inferidas para o ancestral de cada linhagem e o tempo atual em que vivemos. Nas análises, foi usado o cladograma de consenso encontrado pela análise Bayesiana (evidência total) (Figura 28) e como matriz de dados, as seqüências do fragmento gênico citocromo *b* desta tese (Anexo 5) (ver CAPÍTULO 2, RESULTADOS e DISCUSSÃO). Foram utilizados também registros fósseis e tempos de divergência para a calibração em quatro pontos na hipótese filogenética: (1) Bufonidae mais antigo, 57 milhões de anos no final do Paleoceno (Baéz e Gasparini, 1979); (2) “*Bufo*” mais antigo, 55 milhões de anos também do final do Paleoceno (Baez e Nicoli, 2004); (3) origem para *Rhinella* entre 31–44 milhões de anos (Pramuk *et al.*, 2007); (4) *Rhinella marina* mais antiga (11 milhões de anos, durante o Mioceno) (Estes e Wassersug, 1963; Sanchíz, 1998) (considerada neste trabalho para calibrar o grupo interno). Para a calibração do número máximo de unidades de tempo entre a base e o topo da topologia imaginado (“bigtime”), foi utilizado o dado obtido por Pramuk (2006) (105 milhões de anos para a origem de Bufonidae).

Análises de áreas ancestrais baseadas no método da parcimônia foram feitas utilizando-se o programa DIVA 1.1 (Ronquist, 1997). Este método emprega buscas por áreas ancestrais ótimas que minimizam eventos de dispersão e vicariância (Ronquist, 1997). Foram usadas cinco grandes áreas na América do Sul, Central e do Norte separadas por grandes eventos ou barreiras geológicas deste o final do Eoceno até o início do Quaternário, que desempenharam papel importante na diversificação de Bufonidae e principalmente *Rhinella*. Estas áreas foram

delimitadas pela distribuição atual e após os resultados obtidos dos tempos de divergência e proposta da hipótese biogeográfica para o grupo *R. marina* e estão a seguir: (1) América Central e do Norte (Istmo do Panamá), (2) escudo da Guiana, (3) escudo central brasileiro, (4) escudo da costa brasileira e (5) região meridional do continente Sul-americano.

As análises foram feitas em um computador Macintosh G3 (programa MacClade 4.0) e dois PC's AMD Sempron e Workstation com processador duplo (pacote de programas MULTIDISTRIBUTE e DIVA versão 1.1).

A partir dos dados de estimativas de tempo obtidos, com a filogenia de evidência total das análises Bayesianas desta tese (CAPÍTULO 2), o padrão de distribuição das espécies do grupo e o cenário de mudanças geológicas e climáticas, foi elaborada uma hipótese para explicar a distribuição atual das espécies do grupo *Rhinella marina*.

### 3.3) RESULTADOS

A análise de datação molecular indica que o grupo *Rhinella marina* se originou durante o Mioceno, especificamente durante o Tortoniano há cerca de 8,52 milhões de anos [desvio padrão 1,32; 5,59–10,62 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. Além disso, parece haver uma rápida irradiação das espécies dentro do grupo *R. marina*. Um subgrupo que é composto pelas espécies *R. arenarum*, *R. rubescens*, *R. achavali* e *R. icterica* se originando há cerca de 6,80 milhões de anos no Mioceno, especificamente no Messiniano [desvio padrão 1,56; 3,74–9,69 milhões de anos de intervalo de credibilidade] e outro subgrupo composto pelas espécies *R. cerradensis*, *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri* e *R. jimi* e que se origina há cerca de 3,69 milhões de anos durante o Pleioceno, especificamente no Zancleano [desvio padrão 1,59; 1,23–7,38 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. De acordo com os dados obtidos, a espécie mais antiga do grupo é *R. veredas* e as espécies mais recentes são *R. achavali* e *R. icterica* irradiando há cerca de 1,34 milhões de anos, já no Quaternário [desvio padrão 1,05; 0,73–9,98 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. *R. schneideri* e *R. jimi* se originaram há cerca de 2,78 milhões de anos, durante o Pleioceno, especificamente no Piacenziano [desvio padrão 1,44; 0,52–6,14 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. A análise das estimativas de tempos de divergência mostra também uma rápida irradiação desde a origem de *R. crucifer* há cerca de 10,05 milhões de anos, no Mioceno, especificamente durante o Tortoniano [desvio padrão 0,82; 7,92–10,97 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. Já *R. gr. margaritifera* e *R. granulosa* demoraram mais tempo para a irradiação. *R. gr. margaritifera* irradiou há cerca de 46,26 milhões de anos, ainda no Eoceno [desvio padrão 6,61; 35,56–61,06 milhões de anos de intervalo de credibilidade]. *R. granulosa* irradiou a cerca de 35,54 milhões de anos, também no Eoceno [desvio padrão 3,23; 31,14–42,81 milhões de anos de intervalo de credibilidade] (Figura 30).

Duas reconstruções mais parcimoniosas, com nove dispersões do grupo interno foram obtidas pelo programa DIVA (Fig. 31). A única diferença está relacionada à área ancestral do ancestral mais recente de *Rhinella achavali* e *R. icterica*. Em uma das reconstruções a área

ancestral destas espécies é a região meridional do Sul do continente (S) (Fig. 31A), enquanto na outra reconstrução da área ancestral deste clado é o escudo central brasileiro (EC) (Fig. 31B). Em ambos os cenários, a área ancestral do grupo *R. marina* é o escudo central brasileiro (EC) (Fig. 31A e B). A grande maioria dos padrões de distribuição é explicada por dispersão, com exceção do ancestral comum mais recente de *R. arenarum*, *R. achavali* e *R. icterica*, em que o padrão de distribuição é explicado por um evento vicariante.

### 3.4) DISCUSSÃO

Baseados na datação molecular (Figura 30), registros fósseis, tempos de divergência retirados da literatura (Estes e Wassersug, 1963; Baéz e Gasparini, 1979; Sanchíz, 1998; Baez e Nicoli, 2004; Pramuk, 2006; Pramuk *et al.*, 2008), na distribuição atual das espécies (Frost, 2007; Maciel *et al.*, 2007) e nas mudanças geológicas e climáticas durante o Mioceno, Plioceno e Quaternário é proposta uma hipótese biogeográfica para explicar a distribuição das espécies do grupo *Rhinella marina* no tempo e espaço.

Diversos trabalhos corroboram a hipótese de que as espécies do gênero *Melanophryniscus* são as mais antigas da família Bufonidae (*e.g.* Hass, 2003; Pramuk, 2006; Pramuk *et al.*, 2007). O fóssil mais antigo de Bufonidae data de 57 milhões de anos, no final do Paleoceno (Baéz e Gasparini, 1979). Esta data foi utilizada para “enraizar” a análises de datação molecular. As demais espécies amostradas (espécies de *Rhinella*) originam-se da provável segunda invasão dos neotrópicos pelos bufonídeos (*sensu* Pramuk *et al.*, 2008). Infelizmente, não foi possível sequenciar fragmento gênico de *Rhaebo guttatus*, considerado relacionado à primeira irradiação de Bufonidae nos neotrópicos (Pramuk *et al.*, 2008). A datação da linhagem (nó) de *Rhinella* gr. *margaritifera* possui alto desvio padrão (6,61), assim como intervalo de credibilidade (35,56–61,06 milhões de anos). É possível que a inclusão de seqüências de espécies como *Rhaebo guttatus* e/ou a obtenção dos dados gerados pelas seqüências do fragmento gênico rodopsina 1 (para a filogenia de evidência total), forneça novos dados sobre estimativas de tempo de divergência e a credibilidade da datação. O fragmento gênico nuclear rodopsina 1 pode possuir sinal para divergências mais antigas, além de ser o mais usado para gerar filogenia de anfíbios (Frost *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos de filogeografia apresentam hipóteses para explicar a grande distribuição de *Rhinella marina* (espécie do grupo com maior distribuição) (Slade e Moritz, 1998; Mulcahy e Mendelson III, 2000; Robertson, 2003; Mulcahy *et al.*, 2006). Esta espécie possui caracteres morfológicos conservados, o que dificulta a obtenção de diagnoses diferenciais, caso existam espécies crípticas. A hipótese mais aceita é que *R. marina* tenha se originado na América do Sul, já que todas as outras espécies do grupo *R. marina* ocorrem

no continente (e.g. Pauly *et al.*, 2004; Pramuk, 2006). Trabalhos de filogeografia (Slade e Moritz, 1998; Robertson, 2003), delimitam duas principais linhagens de *R. marina* separados a leste e a oeste dos Andes venezuelanos. Robertson (2003) também encontra um parafiletismo de populações de *R. marina* em relação à *R. schneideri*, assim como uma menor distância genética entre linhagens do México e EUA e linhagens da Costa Rica, Panamá e oeste venezuelano. Esta separação corresponde ao Cinturão Neovulcânico Trans-Mexicano (TMNB), que surgiu no Pleioceno. Recentemente, Mulcahy *et al.* (2006), utilizando datação molecular com os genes 16S e citocromo *b*, sugerem que a dispersão de *R. marina* pelo TMNB ocorreu subsequentemente à presença da barreira no Istmo de Tehuantepec. Ou seja, não suporta a hipótese de que a maior causa vicariante das populações de *R. marina* foi o soerguimento do TMNB. Pauly *et al.* (2004) encontram um parafiletismo entre populações de *R. marina* provenientes do Equador e Peru em relação a *R. crucifer*.

A configuração geográfica atual da América do Sul só foi alcançada no final do Mioceno. Antes desta configuração, a América do Sul passou por profundas mudanças na topografia, ambiente e padrões de drenagem dos rios (Lovejoy *et al.*, 1998). Durante o Mioceno, o rio Amazonas tinha mais de 500 quilômetros de largura entre as margens e uma conexão com o Caribe, que isolava o Noroeste do continente. Isso, com certeza seria uma grande barreira para os anuros. O soerguimento dos Andes manteve a conexão com o Caribe no final do Mioceno, isolando o noroeste do continente. O soerguimento final dos Andes coincide com o encerramento final do Istmo do Panamá, que ocorreu há aproximadamente três milhões de anos. Estes e Wassersug (1963) sugerem que *R. marina* estava presente durante a transgressão marinha no Mioceno. Cei (1972) sugere que a área de origem das espécies do grupo *R. marina* foi nas terras altas da Guiana e depois disso as espécies se irradiaram para sua distribuição atual. No entanto, Cei (1972) não diz explicitamente que dados o levaram a indicar a região da Guiana como local de origem do grupo *R. marina* e, aparentemente esta afirmação foi apenas assumida.

Hipóteses filogenéticas de peixes (Lovejoy *et al.*, 1998; Montoya-Burgos, 2003), aves (Grau *et al.*, 2005), répteis (Glor *et al.*, 2001) e mamíferos (da Silva e Patton, 1998; Smith e Patton, 1999) têm demonstrado que a grande diversificação da fauna atual da



América do Sul ocorreu do final do Mioceno ao início do Plioceno. Atualmente, tem-se dado atenção aos efeitos das transgressões marinhas e soerguimento dos escudos brasileiro e da Guiana (Lovejoy *et al.*, 1998; Aleixo, 2004; Grau *et al.*, 2005) para explicar os padrões de distribuição da fauna desta época. Transgressões marinhas implicaram no isolamento do escudo brasileiro durante o Mioceno, através da formação de uma passagem marinha conectando as bacias Amazônica e do Paraná (Webb, 1995). Diversos ciclos de aumento do nível do mar (Hallam, 1992), portanto, poderiam ter causado várias extinções de espécies terrestres e a posterior colonização de regiões por estas espécies de áreas isoladas. Os efeitos da recente transgressão marinha durante o Plioceno (entre 800.000 e cinco milhões de anos) (Haq *et al.*, 1987) poderiam ter extinguido espécies, que foi seguida por uma recente colonização por populações que ficaram isoladas nas terras mais altas.

De acordo com Colli (2005), a herpetofauna na América do Sul foi subdividida pela formação da Cordilheira dos Andes a partir do Oligoceno, resultando na divergência de elementos *cis versus* trans-Andinos. Isto está de acordo com a configuração dos grupos fenéticos de *Rhinella*, presentes a oeste e leste dos Andes (Frost, 2007). Os grupos de espécies de *Rhinella*: *crucifer*, *granulosa*, *margaritifera* e *marina* estão presentes a leste dos Andes e os grupos *spinulosus* e *veraguensis*, ocorrem a oeste dos Andes. O gênero *Rhinella* já teria se originado entre o final do Eoceno e início do Oligoceno, entre 31–44 milhões de anos (Pramuk *et al.*, 2008). Já durante o Mioceno a grande transgressão marinha na América do Sul, que separou o Escudo Central Brasileiro da porção meridional e setentrional do continente (Räsänen *et al.*, 1995; Webb, 1995), promoveu uma maior diferenciação da fauna do Planalto Central Brasileiro, em relação à região sul e norte do continente. Este acontecimento também poderia ser considerado um grande evento vicariante para muitos grupos.

De acordo com os dados obtidos (Figura 30), o ancestral do grupo *Rhinella marina* teria se originado por volta de 8,52 milhões (da metade para o final do Mioceno), e seria uma espécie mais parecida com *R. veredas*. O fóssil mais antigo de *R. marina* data de 11 milhões de anos da Colômbia (Sanchiz, 1998) e foi considerada nesta tese para calibrar a datação das espécies do grupo *R. marina* (considerado o fóssil mais antigo do grupo *R.*

*marina* nas análises). De acordo com a análise de datação molecular desta tese, o grupo *R. marina* teria se originado no final do Mioceno, no entanto com desvio padrão de 1,32; 5,59 até 10,62 milhões de anos de intervalo de credibilidade. *R. veredas*, está na base da politomia entre as três linhagens do grupo *R. marina* (Figura 28 e 30) e é encontrada atualmente na região central do Brasil, desde o Estado do Piauí até o Noroeste do Estado de Minas Gerais. Apesar dos poucos achados fósseis da herpetofauna do Brasil Central (Báez e Gasparini, 1979; Estes e Báez, 1985), os dados da presente tese indicam que o ancestral do grupo *R. marina* estaria presente na região central do continente sul-americano, mais especificamente no escudo brasileiro (diferentemente dos achados de Cei, 1972) e ainda isolado das terras da região meridional e setentrional do continente pela transgressão marinha do Mioceno. Além disso, concomitantemente, outras linhagens de *Rhinella*, presentes a leste e oeste do Andes poderiam ter se diferenciado e posteriormente se dispersado para o norte do continente já durante o Plioceno. No final do Mioceno houve o soerguimento do Planalto Central Brasileiro, que promoveu uma compartimentação adicional da paisagem, com a formação de amplas depressões entre platôs, como as do Guaporé, Pantanal, Araguaia e Tocantins (Brasil e Alvarenga, 1989; Del'Arco e Bezerra, 1989). Este soerguimento poderia ter promovido barreiras e rotas de dispersão. Hubert e Renno (2006) interpretaram padrões biogeográficos em peixes de água doce baseados nestas barreiras e rotas de dispersão. Além disso, a regressão das águas marinhas poderia ter distribuído sedimentos com uma composição geoquímica diferente da composição de sedimentos continentais. Isto não somente influenciou a distribuição da fauna, mas também a da flora. As florestas que crescem na formação semi-marinha de Pebas são claramente distintas das que crescem na Amazônia Peruana (Salovaara *et al.*, 2004). Portanto, os efeitos da transgressão marinha não cessaram quando as águas regrediram, pois permanentemente mudaram a composição do solo e as características dos rios e corpos d'água (Tuomisto, 2007). Esta nova configuração poderia ter facilitado uma irradiação de uma linhagem do grupo *R. marina* para o sul do continente. As espécies do grupo *R. marina*: *R. arenarum*, *R. icterica* e *R. achavali* (Figura 30) são conhecidas do sul do continente Americano. A outra espécie desta linhagem, *R. rubescens* (Figura 30), possui distribuição na região do Brasil Central, incluindo o Sudeste do Brasil. A irradiação desta

linhagem teria ocorrido há aproximadamente 6,80 milhões de anos no final do Mioceno de acordo com os dados obtidos pela datação molecular da presente tese. Com certeza, fatores vicariantes e ambientais são importantíssimos na distribuição de anuros, já que estes dependem em sua grande maioria de ambientes aquáticos ou pelo menos úmidos para sua reprodução (Duellman e Trueb, 1994). Apesar de morfologicamente e ecologicamente bem conservadas, as espécies do grupo *R. marina* apresentam algumas diferenciações. As espécies do agrupamento formado por *R. arenarum*, *R. icterica*, *R. rubescens* e *R. achavali* (Figura 30) possuem menor porte, têm cristas craniais menos desenvolvidas e glândulas parotóides relativamente mais longas (Maciel *et al.*, 2007), com exceção de *R. icterica*. No entanto, a morfologia externa, principalmente a do crânio, pode ser convergente (Pramuk, 2006) e a linhagem, incluindo *R. icterica*, poderia neste contexto ser considerada um agrupamento natural (monofilético). Além disso, todas estas espécies citadas têm a pele mais delgada e com pouca queratinização quando comparadas as demais linhagens do grupo *R. marina*. Já o grupo composto pelas espécies de maior porte (*R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis*) (Figuras 28 e 30), tem cristas craniais marcadas e desenvolvidas, tímpano relativamente menor e membros mais curtos (Maciel *et al.*, 2007). Pelo menos algumas das espécies da primeira linhagem citada como *R. icterica*, *R. achavali* e *R. rubescens*, podem se reproduzir em ambientes lóticos (Cochran, 1955; Kwet *et al.*, 2006; obs pessoal). Já a grande maioria das espécies de *Rhinella* se reproduz em ambientes lênticos (Duellman e Trueb, 1994). A linhagem das espécies composta por *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, *R. jimi* e *R. cerradensis* (Figura 30) poderia ter se irradiado há cerca de 3,69 milhões de anos, já durante o Plioceno, de acordo com os dados obtidos na presente tese. A nova configuração da paisagem com a maior elevação do Planalto Central Brasileiro e o contato com outros biomas como a Caatinga e a Floresta Amazônica, poderia ter fornecido rotas de dispersão e combinado com fatores ambientais, favorecido a irradiação das espécies que atualmente ocupam a região central do continente até o extremo sul da América do Norte. As espécies *R. cerradensis*, *R. schneideri* e *R. jimi* são tipicamente encontradas nos biomas Cerrado e Caatinga (Stevaux, 2002; Maciel *et al.*, 2007) e possuem elevada queratinização epidérmica. Já as espécies *R. marina* e *R. poeppigii* são típicas de áreas florestais (Brandão *et al.*, 2007)

e possuem pele mais delgada. De todas as espécies desta linhagem, *R. marina* continuou com franca dispersão do norte da América do Sul até o extremo sul da América do Norte (Mulcahy e Mendelson, 2006). Nesta época, há aproximadamente três milhões de anos, o Istmo do Panamá já existia (Lovejoy *et al.*, 1998), o que promoveria a dispersão mais ao norte da América Central e Sul até o extremo Sul da América do Norte. As espécies do grupo *R. marina* teriam continuado sua diferenciação até o Pleistoceno, já no Quaternário. A linhagem formada por *R. achavali* e *R. icterica* (Figura 30) teria se originado há cerca de 1,3 milhões de anos (dados obtidos pela datação molecular). Nesta época, ciclos climáticos (aridez e umidade) ou mesmo a “Hipótese dos Refúgios Pleistocênicos” poderiam ter influenciado esta especiação (Colli, 2005).

De acordo com os dados da análise de dispersão-vicariância obtidos pelo programa DIVA, a área ancestral do grupo *Rhinella marina* parece mesmo ter sido a região do escudo central brasileiro. Ainda de acordo com estas análises, uma das linhagens do grupo interno composto por *R. arenarum*, *R. rubescens*, *R. achavali* e *R. icterica* teria se dispersado primeiramente para o sul do continente, enquanto a outra linhagem formada pelas espécies *R. cerradensis*, *R. schneideri*, *R. jimi*, *R. poeppigii* e *R. marina* teria posteriormente se dispersado para o escudo da costa brasileira, escudo da Guiana e finalmente para a América Central e do Norte.

A distinção entre vicariância e padrões ambientais para a obtenção das causas para a explicação da distribuição de um grupo animal ou vegetal não é uma tarefa fácil. No entanto, é certo que padrões biogeográficos das espécies podem se diferenciar na mesma época e em um mesmo lugar, pois cada táxon demanda condições ambientais diferentes para sua evolução (mudança genética ou mesmo especiação) (Endler, 1982; Ackerly, 2003).

Possivelmente, uma combinação entre eventos geológicos, fatores ambientais e requerimentos fisiológicos criou o padrão de distribuição recente das espécies do grupo *Rhinella marina*. De acordo com os dados obtidos, o grupo *R. marina* é um grupo bem recente. Seu ancestral se originou no Mioceno há cerca de 8,5 milhões de anos. Sua irradiação ocorreu até o Quaternário. Esta diversificação do grupo *R. marina* contrasta com outros grupos de anuros neotropicais como as espécies de *Leptodactylus* do grupo *fuscus*. Heyer e Maxson

(1982), baseados em dados imunológicos, indicam que grande parte da diversificação deste grupo aconteceu durante o Eoceno.

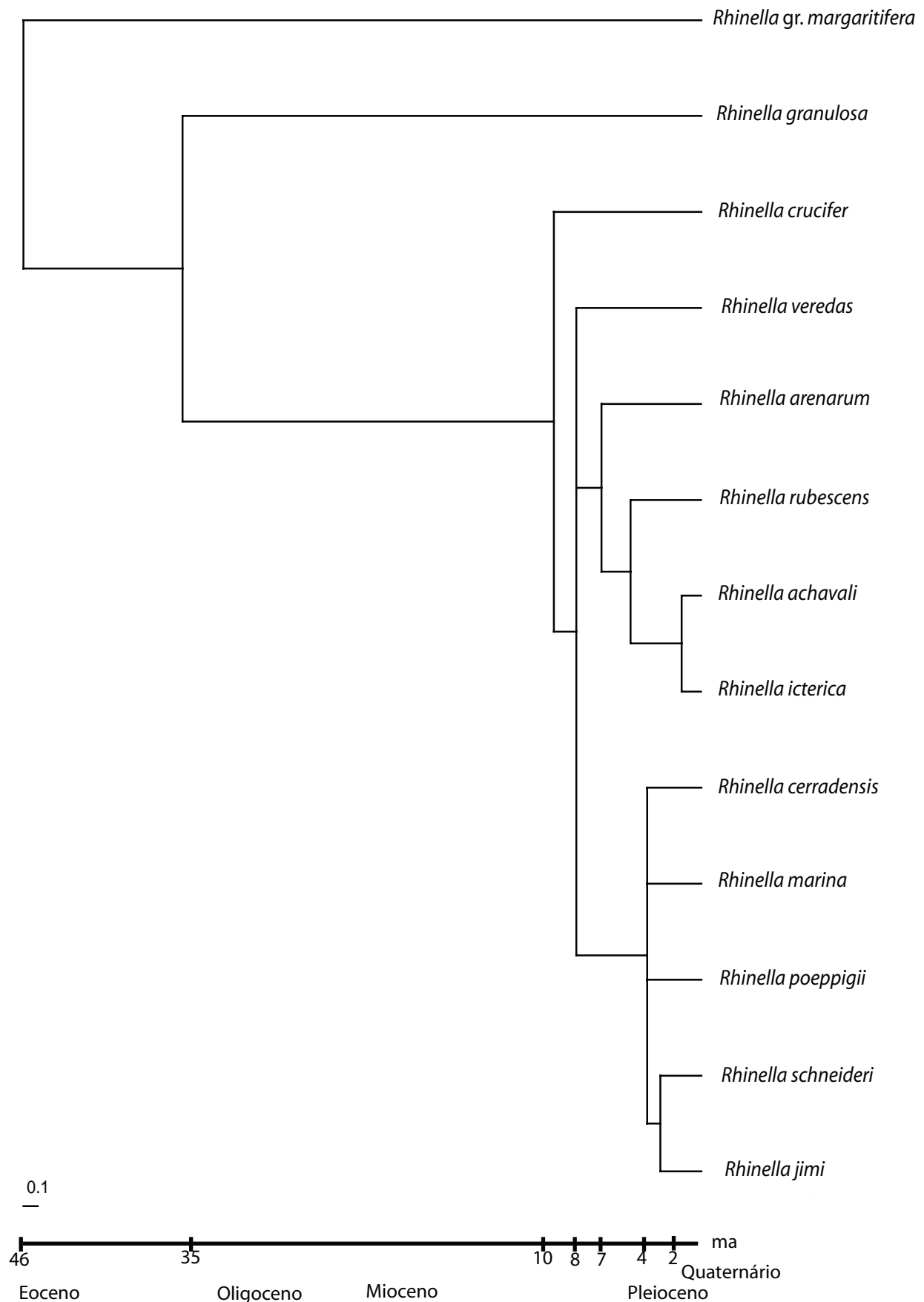


Figura 30. Filograma representando as linhagens do grupo *Rhinella marina* e outras espécies de *Rhinella* da análise de datação molecular usando métodos Bayesianos. Foram utilizados 451 nucleotídeos (fragmento mitocondrial citocromo *b*) de cada terminal e a análise foi enraizada com *Melanophryniscus* (não representado). A escala (0.1) representa unidades de tempo dos ramos referente a um milhão de anos (ma).

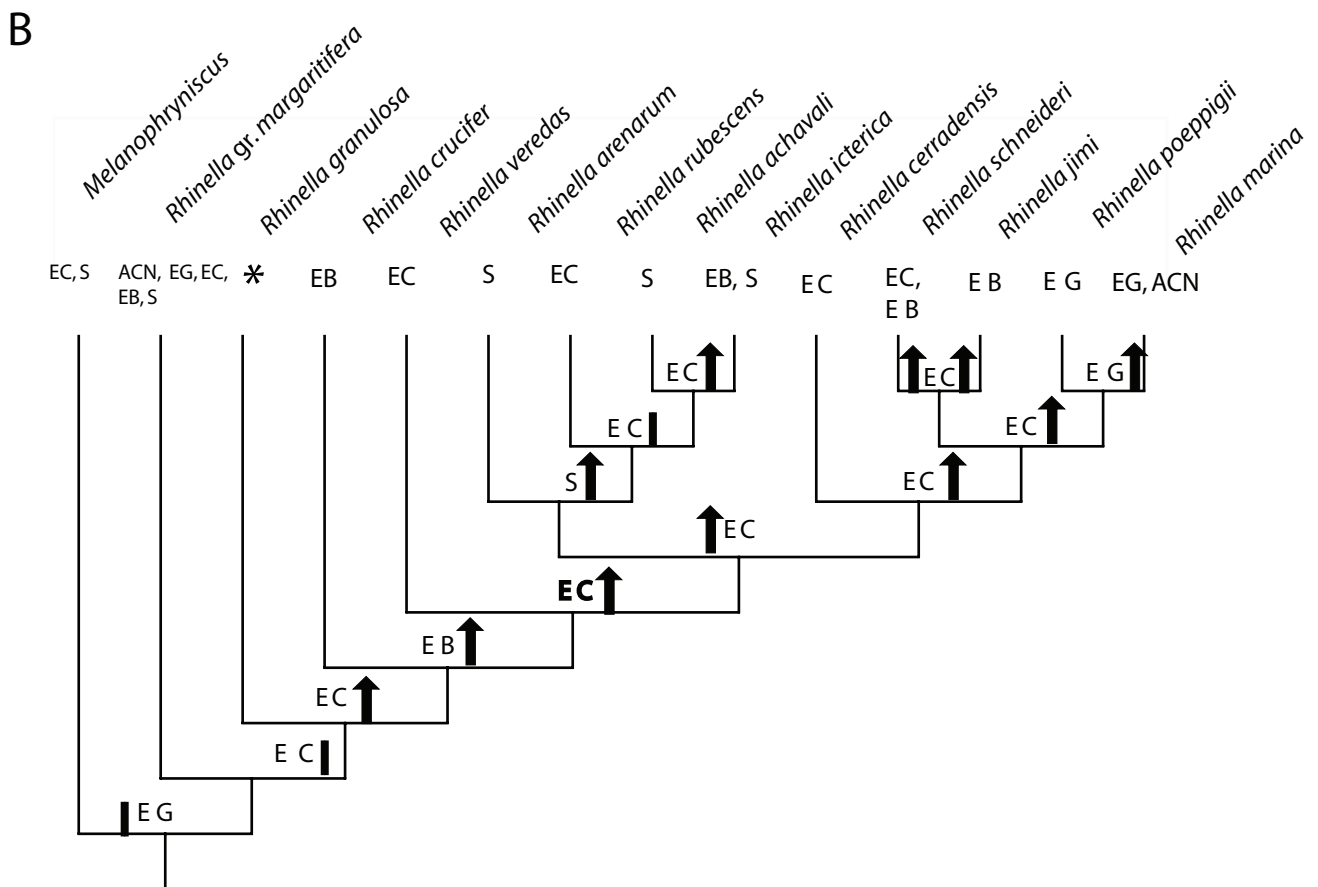
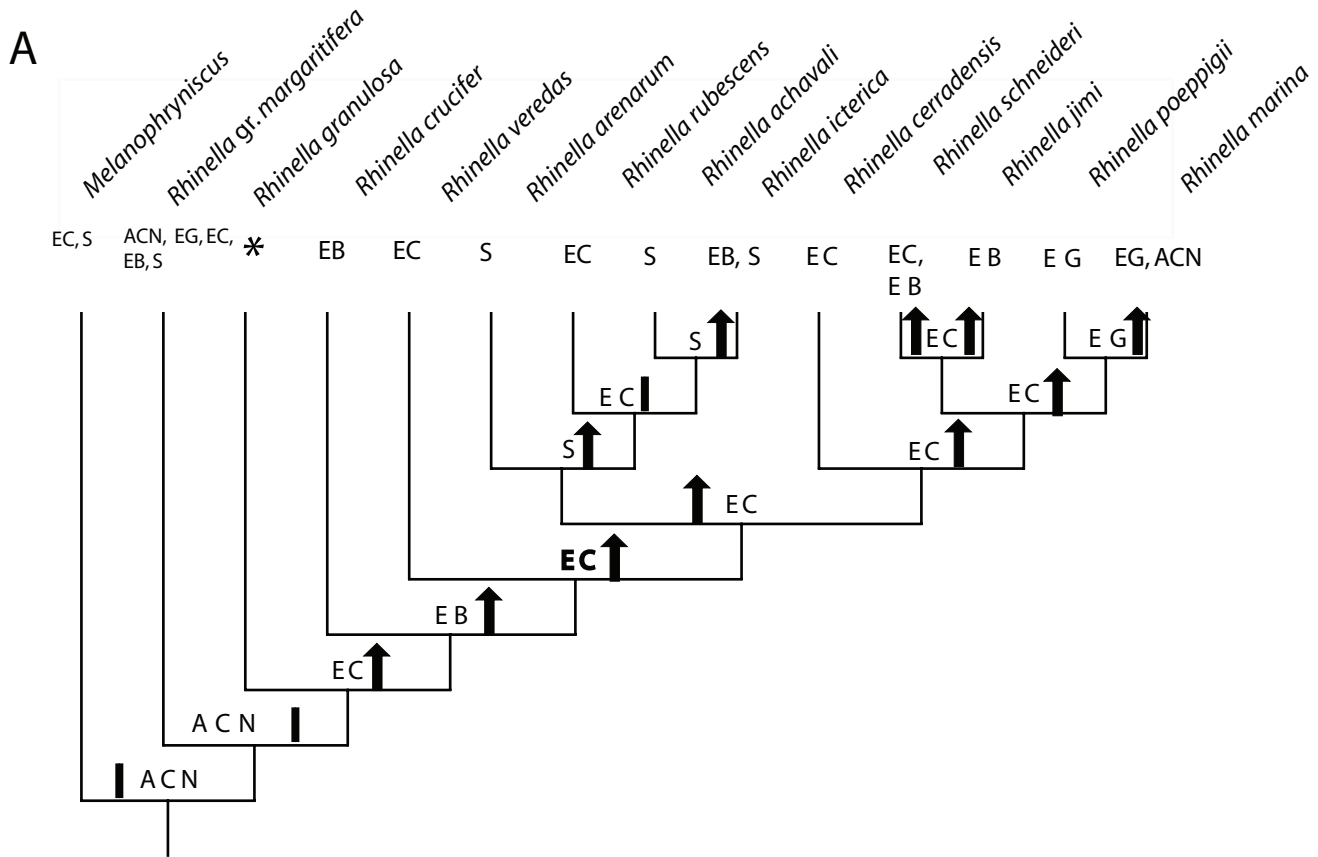


Figura 31. Cinco grandes áreas geográficas dos Neotrópicos usadas na análise de dispersão-vicariância. Reconstruções da distribuição ancestral para cada nó das duas soluções mais parcimoniosas obtidas. Setas indicam dispersões e barras indicam eventos vicariantes. ACN: América Central e do Norte, (EG): escudo da Guiana, (EC): escudo central brasileiro, (EB): escudo da costa brasileira, (S): região meridional do continente Sul-americano. \**Rhinella granulosa* presente em todas as localidades.



## CONCLUSÃO

O grupo de espécies *Rhinella marina*, de acordo com a análise de evidência total desta tese (análise Bayesiana), foi considerado monofilético, apesar do baixo suporte (sensu Pramuk, 2006) e grupo irmão de *R. crucifer*. Por enquanto, não há suporte para os dois subgrupos dentro do grupo *R. marina* (sensu Maciel *et al.*, 2007) e estes, até o momento, não parecem constituir grupos naturais.

Parece não haver variação individual, sexual ou sazonal (polimorfismos) nos caracteres de secreção cutânea das glândulas parotóides (estudo em *Rhinella schneideri*) e a grande maioria dos caracteres das espécies amostradas é parcimoniosamente informativa. Há pouquíssima variação inter-populacional. Isto faz destes caracteres bons candidatos para resolução de filogenias em, pelo menos, alguns grupos de anuros. Outros caracteres como os de ultra-estrutura de espermatozóide (Braz *et al.*, 2004), morfologia das partes moles (como proposto por Pramuk, 2004) e de vocalização também podem contribuir para futuras análises filogenéticas de Bufonidae. Apesar de sutis, foram achadas algumas diferenças nas características dos cantos de anúncio de espécies do grupo *Rhinella marina* (Maciel *et al.*, 2007).

As análises moleculares forneceram uma grande quantidade de caracteres filogeneticamente informativos. Como em outros trabalhos (*e.g.* Fouquet *et al.*, 2007), o citocromo *b* se mostrou eficaz para resolver a maioria dos eventos recentes de cladogênese (pela alta taxa de mutação), mas falhou na resolução de divergências antigas. As filogenias com os caracteres moleculares isolados (parcimônia e Bayesiana), forneceram informações ambíguas sobre as relações de parentesco do grupo *Rhinella marina* quando comparadas às filogenias com outras partições e combinadas. Espera-se que a adição de seqüências de outros fragmentos gênicos possa resolver as politomias resultantes da análise filogenética com as seqüências de citocromo *b* (*e.g.* rodopsina 1) e suportar o monofiletismo do grupo.

As análises morfológicas também forneceram uma boa quantidade de caracteres filogeneticamente informativos. Além disso, discussões foram feitas acerca da natureza de alguns caracteres importantes que suportam clados do grupo *Rhinella marina* (*e.g.* estados e

interpretação de caracteres e ambigüidades).

Análise de datação molecular com o uso de métodos Bayesianos de inferência indica que o grupo *Rhinella marina* se originou durante o Mioceno e possui uma alta taxa de irradiação de suas espécies, juntamente com *R. crucifer*. Em um período de aproximadamente 8,5 milhões de anos (do Mioceno até os dias atuais) todas as espécies do grupo haviam divergido. As análises de áreas ancestrais sugerem que o grupo *R. marina* teria se originado na região central do Brasil. Possivelmente, uma combinação entre eventos geológicos, fatores ambientais, e fatores fisiológicos criou o padrão de distribuição recente das espécies do grupo *R. marina*.

Recentemente, mudanças taxonômicas em grandes proporções têm ocorrido nos Lissamphibia (Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006). Isto se deve principalmente ao fato do desenvolvimento dos métodos moleculares e cladísticos, tanto na parte teórica, quanto na parte de desenvolvimento dos programas e tecnologias computacionais. Uma grande quantidade de informação pôde ser adquirida e está sendo usada para diferentes inferências como hipóteses filogenéticas, de evolução de caracteres, biogeografia, e também a proposta de mudanças de nomes científicos há muito tempo aceitos. Muito se têm discutido sobre a instabilidade taxonômica e apesar se ser amplamente aceito que a filogenia deveria governar a moderna classificação biológica, há uma tensão entre especialistas de qual ou quais achados refletiriam a “verdadeira” sistemática de um grupo de espécies (Wiens, 2007; Frost *et al.*, 2007). O grau (quantidade) de mudanças nomenclaturais é o que aparentemente preocupam os especialistas. Nestes trabalhos, os nomes utilizados, bem como os resultados obtidos, não refletem apenas um, ou mais pontos de vista, mas sim uma interpretação de tantos os que forem necessários para uma tomada de decisão. Em um momento em que a grande maioria tem se preocupado com a defesa de suas hipóteses, poucos têm se preocupado com a importância do resgate da taxonomia como ciência básica e fundamental para o conhecimento da biodiversidade (*e.g.* Evenhuis, 2007, Padial e De La Riva, 2007).

Outra grande discussão acerca da taxonomia gira em torno dos códigos vigentes para a atribuição de nomes (nomenclatura). O Código Internacional de Nomenclatura Zoológica

(ICZN) usa o conceito de espécie-tipo para fixar os nomes dos táxons em uma hierarquia nomenclatural. O “PhyloCode”, por sua vez, é uma proposta que usa definições filogenéticas para táxons supraespecíficos em qualquer nível hierárquico dentro da árvore da vida. Pesquisadores que desenvolvem classificações têm utilizado um dos códigos, argumentando que são incompatíveis (Dubois, 2006) ou tentam associar os dois (Hillis e Wilcox, 2005).

Durante a execução desta tese, houve duas mudanças genéricas do grupo de estudo. Inicialmente o grupo era chamado *Bufo marinus* (sensu Martin, 1972). Nos últimos dois anos houve mudanças de Frost *et al.* (2006) (grupo *Chaunus marinus*) e Pramuk *et al.* (2008) (grupo *Rhinella marina*). Isto demonstra as grandes mudanças nomenclaturais fruto da melhor amostragem de táxons e caracteres e do desenvolvimento de métodos de análise filogenética.

## TRABALHOS FUTUROS

### Revisão Taxonômica

O estágio de doutorado no exterior (CAPES, Sanduíche – PDEE, processo número 5141-060), foi realizado no National Museum of Natural History (NMNH), Smithsonian Institution, em Washington, DC, EUA, durante o período de três meses (30/05 a 29/08/07). O supervisor (orientador) no exterior foi o Dr. Roy W. McDiarmid. Os objetivos do estágio no exterior foram a obtenção de dados morfométricos e dados sobre os espécimes-tipo, inclusive os em sinonímia para a revisão taxonômica do grupo *Rhinella marina* (dados não mostrados), bem como acessar bibliografia relevante para o trabalho de doutorado. O NMNH possui a maior coleção de espécies e espécimes do grupo de sapos em estudo, assim como o maior número de tipos das espécies. A instituição teve ainda infra-estrutura necessária para a obtenção de empréstimos das espécies-tipos (para a obtenção de fotos e medidas) tombadas em outras coleções/museus, principalmente da Europa (dados não mostrados). Foram obtidos dados de aproximadamente 600 espécimes, pela ampla área de distribuição natural do grupo (dentre estes, a grande maioria dos tipos das espécies). Até então, já havia sido obtido dados de espécimes provenientes de museus/coleções brasileiras: Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB), Museu Nacional (MNRJ), Coleção Jorge Jim (JJ), e o Museu de Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCT) (por volta de 400 espécimes) (dados não mostrados) perfazendo cerca de 1000 espécimes analisados até o momento. Foram realizadas medidas morfométricas e dados sobre variação morfológica foram obtidos. Estes dados serão tratados em análises estatísticas multivariadas e servirão como base para o estabelecimento do real “status” taxonômico das espécies em estudo. Além da obtenção dos dados dos espécimes, a bibliografia relevante para a revisão taxonômica foi acessada, como a descrições originais das espécies.

A proposta inicial do projeto de doutorado envolveu, além da filogenia e biogeografia, uma revisão taxonômica das espécies do grupo de estudo. No entanto, o trabalho de revisão taxonômica ainda não foi completamente desenvolvido para a defesa desta tese,

principalmente pela dificuldade inicial de se obter os tipos das espécies a serem analisados (a maioria em museus e coleções do exterior) e por carência de financiamentos para viagens, apesar de tentativas junto a órgãos de fomento feitas. Foram enviadas mensagens eletrônicas com o pedido formal de empréstimos aos curadores das diversas coleções onde existem os tipos. No entanto, os poucos retornos que existiram foram indeferidos. Parece existir um “embargo” aos empréstimos de espécimes para o Brasil por vários motivos, sobretudo os tipos das coleções. A proposta agora é a continuação da obtenção de mais alguns dados de espécimes relevantes do grupo *Rhinella marina* em coleções/museus ainda não amostrados. Depois de estudada a variação morfológica das formas do grupo e determinada suas “unidades evolutivas”, poderemos apresentar diagnoses diferenciais e descrições para as formas reconhecidas, compreendendo melhor o padrão de distribuição geográfica das espécies do grupo. A literatura será revista cronologicamente para a atribuição de nomes aos táxons reconhecidos. Tipos deverão ser eleitos e mesmo espécies revalidadas e/ou novas descritas. Os agrupamentos de populações diagnosticáveis, coincidentes ou não com subespécies anteriormente descritas poderão ser elevadas à categoria de espécie. Os dados provenientes do trabalho de filogenia e biogeografia desta tese também servirão de base para a revisão taxonômica.

### **Caracterização Química das Indolalquilaminas**

Durante o desenvolvimento do presente trabalho de tese foram iniciadas metodologias de espectrometria de massa (MS)/electrospray e a ressonância magnética nuclear afim de caracterizar quimicamente as indolalquilaminas não identificadas. Uma das moléculas da secreção cutânea ainda desconhecida/não-identificada ( $R_f=0,313$ ) foi isolada e encontra-se em fase caracterização. Esta caracterização é importante, já que além de podermos nomear e ter a certeza sobre a homologia dos caracteres de secreção cutânea (esta molécula de  $R_f=0,313$  parece contribuir para o suporte de alguns clados nas análises desta tese – ver CAPÍTULO 2), os mesmos podem constituir novos princípios ativos de potencial relevância para a indústria farmacêutica.

### **Sequenciamento de um segundo fragmento gênico (nuclear)**

Os iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do fragmento rodopsina 1 já foram obtidos (Bossuyt and Milinkovitch, 2000) e até o presente momento obtiveram-se seqüências de boa qualidade para seis das 10 espécies do grupo *R. marina* e para uma do grupo externo. Para o manuscrito a ser submetido para a publicação com os dados de filogenia os dados com as seqüências do fragmento gênico rodopsina 1 serão incorporados depois da obtenção dos dados restantes. Espera-se que estas seqüências possam fornecer informações adicionais, suportando as análises (resolução de politomias e suporte de clados). Dados adicionais sobre a natureza da incongruência entre conjuntos de dados também podem ser obtidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerly, D. D. 2003. Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. *International Journal of Plant Sciences*. 164: S165–S184.
- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: A phylogeographic perspective on the role of divergent hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58: 1303–1317.
- Alfaro, M. E., S. Zoller, and F. Lutzoni. 2003. Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Mol. Biol. Evol.* 20: 255–266.
- Amphibiaweb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2008. Berkeley, California: AmphibiaWeb. <http://amphibiaweb.org/>.
- Avise, J. 1994. *Molecular Markers: Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.
- Báez, A. M., and L. Nicoli. 2004. Bufonid toads from the Late Oligocene beds of Salla Bolivia. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 24: 73–79.
- Baéz, A. M., and Z. B. Gasparini. 1979. The South American herpetofauna: An evaluation of the fossil record. Pages 29–54 in: *The South American herpetofauna* (W. E. Duellman, ed.). University of Kansas Museum of Natural History Monographs 7, Lawrence.
- Baldissera Jr, F. A., U. Caramaschi, and C. F. B. Haddad. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Arq. Mus. Nac.* 62: 255–282.
- Baldissera Jr., F. A. 2001. *Taxonomia e Filogenia do Grupo de Bufo crucifer Wied-Neuwied, 1821 (Anura, Bufonidae)*. Doctorate dissertation. Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro.
- Barret, M., M. J., Donoghue, and E. Sober. 1993. Crusade? A reply to Nelson. *Syst. Biol.* 22:216–217.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, R. L. Goggin, R. Slocombe,



- M. A. Ragan, A. D. Hyatt, K. R. McDonald, H. B. Hines, K. R. Lips, G. Marantelli, and H. PARKES. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 9031–9036.
- Blair, W. F. 1972a. *Evolution in the Genus Bufo*. University of Texas Press, Austin and London.
- Blair, W. F. 1972b. Introduction. Pages 3–7 in *Evolution in the Genus Bufo* (W. F. Blair ed.). University of Texas Press, Austin and London.
- Bossuyt, F., and M. C. Milinkovitch. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 6585–6590.
- Brandão, R.A., N. M. Maciel, and A. Sebben. 2007. A new species of *Chaunus* from Central Brazil (Anura; Bufonidae). *Journal of Herpetology*. 41: 304–311.
- Brasil, A. E., and S. M. Alvarenga. 1989. Relevô. In A. C. Duarte (Ed.). *Geografia do Brasil. Região Centro-Oeste*. p. 53-72. FIBGE-Diretoria de Geociências, Rio de Janeiro.
- Braz, S. V., Fernandes, A. P., and S. N. Bão. 2004. An ultrastructural study of sperm of the genus *Bufo* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36: 257–262.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*. 10: 295–304.
- Bruvo-Madarić, B., B. A. Huber, A. Steinacher, and G. Pass. 2005. Phylogeny of pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): Combined analysis using morphology and molecules. *Mol. Phylog. Evol.* 37: 661–673.
- Bull, J.J., J. Huelsenbeck, C.W. Cunningham, D.L. Swofford, and P. Waddell. 1993. Partitioning and Combining Data in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*. 42: 384–3979.
- Cannatella, D. 1985. A phylogeny of primitive frogs (Archaeobatrachians). Ph.D. Dissertation. University Kansas, Lawrence.
- Caramaschi, U., and J. P. Pombal Jr. A new species of *Rhinella* Fitzinger, 1826 from the Atlantic Forest, Eastern Brazil (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*. 46: 251–259.

- Cei, J. M. 1972. *Bufo* of South America. Pages 82–92 in *Evolution in the Genus Bufo*. (W. F. Blair, ed.). University of Texas Press, Austin and London.
- Cei, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. ed. *Monit. Zool. Ital.* (N.S.). 609p.
- Cei, J. M., V. Ersparmer, and M. Roseghini. 1972. Biogenic Amines. Pages 233–243 in *Evolution in the Genus Bufo*. (W. F. Blair, ed.). University of Texas Press, Austin and London.
- Cerioti, G., P. Cardellini, P. Marian, and M. Sala. 1989. Chromatographic study of toad venoms for taxonomic purposes. *Bull. Zool.* 56: 357–360.
- Chek, A. A., S. R. Loughheed, J. P. Bogart, and P. T. Boag. 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). *Mol. Phylog. Evol.* 18: 370–385.
- Clarke, B. T. 1997. The natural history of the amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev.* 72: 365–379.
- Cochran, D. M. 1950. A new subspecies of toad from Santa Catarina, Brazil. *J. Washington Acad. Sci.* 40: 238–239.
- Cochran, D. M. 1955. Frogs of southeastern Brazil. United States National Museum Bulletin. 206: 1–423.
- Colli, G. R. 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. Pp. 247–264 In Scariot, A., Souza-Silva, J. C., and Felfili, J. M. (eds.), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente.
- Cox, C. B., and Moore, P. D. 2005. *Biogeography: and ecological and evolutionary approach*. The Bath Press, Oxford, United Kingdom.
- Crump, M. L., F. R. Hensley, and K. L. Clark. 1992. Apparent Decline of the Golden Toad Underground or Extinct? *Copeia*. 1992: 413–420.
- Cruz, C. A. G., and U. Caramaschi. 2003. Taxonomic status of *Melanophryniscus stelzneri dorsalis* (Mertens, 1933) and *Melanophryniscus stelzneri fulvoguttatus* (Mertens, 1937) (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Boletim do Museu Nacional*. 500: 1–11.
- Cummings, M.P., S. A. Handley, D. S. Myers, D. L. Reed, A. Rokas, and K. Winka. 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. *Systematic*

- Biology. 52: 477–487.
- da Silva H, and J. R. M. Mendelson III. 1999. A new organ and sternal morphology in toads (Anura: Bufonidae): descriptions, taxonomic distribution, and evolution. *Herpetologica* 55: 114–126.
- da Silva, M. N. F., and J. L. Patton. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Mol. Ecol.* 7: 475–486.
- Daly, J.W., H. M. Garrafo, T. F. Spande, C. Jaramilo, and A. S. Rand. 1994a. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? *Journal of Chemical Ecology*. 20: 943–955.
- Daly, J.W., H. M. Garrafo, T. F. Spande, V. C. Clark, J. Ma, H. Ziffer, and J. F. Cover Jr. 2003. Evidence for an enantioselective pumilio-toxin 7-hydroxylase in dendrobatid poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 100: 11092–11097.
- Daly, J.W., R. W. Myers, and N. Whittaker. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic noxious substances in the amphibia. *Toxicon*. 7: 103–108.
- Daly, J.W., S. I. Secunda, H. M. Garrafo, T. F. Spande, A. Wisnieski, J. F. Cover Jr. 1994b. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). *Toxicon*. 32: 657–663.
- Dawood, A., A. Channing, and J. P. Bogart. 2002. A molecular phylogeny of frogs Genus *Tomopterna* in Southern Africa: examining species boundaries with mitochondrial 12S rRNA sequences data. *Mol. Phylog. Evol.* 22: 407–413.
- de Queiroz, A. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology & Evolution*. 20: 68–73.
- de Queiroz, K., and J. Gauthier. 1992. Phylogenetic taxonomy. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 23: 449–480.
- DeBry, R. W. 2001. Improving interpretation of the decay index for DNA sequence data. *Syst. Biol.* 50: 742–752.
- Del’Arco, J. O., and P. E. L. Bezerra. 1989. Geologia. In *Fundação Instituto Brasileiro de*

- Geografia e Estatística (Ed.). *Geografia do Brasil*. Região Centro-Oeste. Volume 1. p. 35-51. IBGE, Rio de Janeiro.
- Deulofeu, V., and E. Duprat. 1944. The basic constituents of the venom of some South American toads. *J. Biol. Chem.* 153: 459–463.
- Di-Bernardo, M., A. Kwet, and R. Maneyro. 2005. First record of *Bufo achavali* (Anura: Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with notes on its natural history and directions for the identification of the species in the *Bufo marinus* group. *In* II Congresso Brasileiro de Herpetologia (Sociedade Brasileira de Herpetologia, ed.). Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Dubois, A. 2006. Naming taxa from cladograms: a cautionary tale. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42: 317–330.
- Duellman, W. E. 1970. The hylid frogs of Middle America. *Monogr. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, Lawrence.
- Duellman, W. E., and Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians* The Johns Hopkins University Press.
- Duellman, W. E., R. Schulte. 1972. Description of a new species of *Bufo* from northern Peru with comments on phenetic groups of South America toads (Anura: Bufonidae). *Copeia*. 1992: 162–172.
- Easteal, S. 1981. The history of introductions of *Bufo marinus* (Amphibia: Anura); a natural experiment in evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*. 16: 93–113.
- Easteal, S. 1988. Range Expansion and its Genetic Consequences in Populations of the Giant Toad, *Bufo marinus*. Pages 49–84 *in* *Evolutionary Biology* (M. K., Hecht, and B. Wallace, eds.). New York: Plenum Press, New York.
- Efron, B., and G. Gong. 1983. A leisurely look at the Bootstrap, the Jackknife, and cross-validation. *The American Statistician*. 37: 36–48.
- Endler, J. A. 1982. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *American Zoologist*. 22: 441–452.
- Erspermer, V. 1994. Bioactive Secretions of the Amphibian Integument. Pages 179–186 *in* *Amphibian Biology* (H. Heatwole, G. T. Barthalmus, and A. Y. Heatwole, eds.). Surrey

Beatty and Sons.

- Estes, R. and A. Báez. 1985. Herpetofaunas of North and South America during the late Cretaceous and Cenozoic: evidence for interchange? Pages 139–197 *In* The Great American Biotic Interchange. (F. G. Stehli, and S. D. Webb (eds.)). Plenum Press, New York.
- Estes, R., and O. A. Reig. 1973. The early fossil record of frogs: a review of the evidence. Pages 11–63 *in* Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems. (J. L. Vial ed.), University of Missouri Press, Columbia.
- Estes, R., and R. Wassersug. 1963. A Miocene toad from Colombia, South America – *Breviora*, Museum Comparative Zoology. 193: 1–13.
- Estoup, A., I. J. Wilson, C. Sullivan, J. Cornuet, and C. Moritz C. 2001. Inferring population history from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics*. 159: 1671–1687.
- Evenhuis, R. W. 2007. Comments on “Helping Solve the ‘Other’ Taxonomic Impediment: Completing the Eight Steps to Total Enlightenment and Taxonomic Nirvana”. *Zootaxa*. 1494: 67–68.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*. 18: 367–393.
- Faivovich, J., and G. R. Carrizo. 1997. La identidad de *Bufo missionum* Berg, 1896. (Anura: Bufonidae). *Cuad. herpetol.* 11: 81–82.
- Feller, A. E., and S. B. Hedges. 1998. Molecular evidence for the early history of living amphibians. *Mol. Phylog. Evol.* 9: 509–516.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368–376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.
- Fouquet, A., M. Vences, M. D. Salducci, A. Meyer, C. Marty, M. Blanc, and A. Gilles. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Mol. Phylogenet. Evol.*

43: 567–582.

- Frost, D. R. 2004. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D. R. 2006. *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>. (accessed 01 September 2006).
- Frost, D. R. 2007. *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>. (accessed 12 October 2007).
- Frost, D., T. Grant, J. Faivovich, R. Bain, A. Haas, C. F. B. Haddad, R. O. De Sá, A. Channing, M. Wilkinson, S. C. Donnellan, C. J. Raxworthy, J. A. Campbell, B. L. Blotto, P. Moler, R. C. Drewes, R. A. Nussbaum, J. D. Lynch, D. M. Green, and W. C. Wheeler. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 297: 1–1370.
- Frost, D., T. Grant, J. Faivovich, R. Bain, A. Haas, C. F. B. Haddad, R. O. De Sá, A. Channing, M. Wilkinson, S. C. Donnellan, C. J. Raxworthy, J. A. Campbell, B. L. Blotto, P. Moler, R. C. Drewes, R. A. Nussbaum, J. D. Lynch, D. M. Green, and W. C. Wheeler. 2007 Is The Amphibian Tree of Life really fatally flawed? *Cladistics*. OnlineEarly Articles
- Gallardo, J. M. 1961. Anfibios anuros de Misiones con la descripción de una nueva especie de *Crossodactylus*. *Neotropica*. 7: 33–38.
- Gallardo, J. M. 1962. A propósito de *Bufo variegatus* (Günther), sapo del Bosque Húmedo Antartánico, y las otras especies de *Bufo* neotropicales. *Physis*. 23: 93–102.
- Garrafo, H. M., P. Jain, T. F. Spande, J. W. Daly, H. B. Jones, L. J. Smith, and V. E. Zottig. 2001. Structure of alkaloid 275A, a novel 1-azabicyclo[5.3.0]decane from a dendrobatid frog, *Dendrobates lehmanni*: synthesis of the tetrahydrodiastereomers. *Journal of Natural Products*. 64: 421–427.
- Gauthier, J., A. G. Kluge, and T. Rowe. 1998. Amniote phylogeny and the importance of

- fossils. *Cladistics*. 4: 105–209.
- Giugliano, L.G., R. G. Collevatti, and G. R. Colli 2007. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45: 168–179.
- Glor, R. E., L. J. Vitt, and A. Larson. 2001. A molecular phylogenetic analysis of diversification in amazonian *Anolis* lizards. *Mol. Ecol.* 10: 2661–2668.
- Grant, T., and A. G. Kludge. 2003. Data exploration in phylogenetic inference: scientific, heuristic, or neither. *Cladistics*. 19: 379–418.
- Grant, T., D. R. Frost, J. P. Caldwell, R. Gagliardo, C. F. B. Haddad, P. J. R. Kok, D. Bruce Means, B. P. Noonan, W. E. Schargel, W. C. Wheeler. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 299: 1–262.
- Grau, E. T., S. L. Pereira, L. F. Silveira, E. Höffing, and A. Wajntal. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical piping guans (Aves: Galliformes): *Pipile* Bonaparte, 1856 is synonym of *Aburria* Reichenbach, 1853. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 637–645.
- Graybeal, A. 1993. The phylogenetic utility of cytochrome *b*: lessons from bufonid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2: 256–269.
- Graybeal, A. 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zool. J. Linn. Soc.* 119: 297–338.
- Haas, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics*. 19: 23–89.
- Hall, T. 2005. BioEdit v7.0.5 last update 5/31/2005. Tom Hall Ibis Therapeutics.
- Hallam, A. 1992. Phanerozoic Sea-Level Changes. Columbia University Press, New York.
- Hanken, J., and R. J. Wassersug. 1981. The visible skeleton. A new double-stain technique reveals the native of the “hard” tissues. *Functional Photography*. 16: 22–26.
- Haq, B. U., J. Hardenbol, and P. R. Vail. 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*. 235: 1156–1167.



- Harris, D.J. 2001. Reevaluation of 16S ribosomal RNA variation in *Bufo* (Anura: Amphibia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19: 326–329.
- Hasegawa, M., K. Kishino, and T. Yano. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160–174.
- Hauser, D., and W. Presch. 1991. The effects of ordered characters on phylogenetic reconstruction. *Cladistics* 7: 243–265.
- Hay, J. M., I. Ruvinsky, S. B. Hedges, and L. Maxson. 1995. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 12: 928–937.
- Hay, W. W., R. M. DeConto, C. N. Wold, K. M. Wilson, S. Voigt, M. Schulz, A. R. Wold, W. Dullo, A. B. Ronov, A. N. Balukhovsky, and E. Söding. 1999. Alternative global Cretaceous paleogeography. Pages 1–47 in *Evolution of the Cretaceous ocean–climate system* (E. Barrera, and C. Johnson eds.). Geological Society of America Special Paper, Geological Society of America, Boulder, CO.
- Hedges, S. B., R. A. Nussbaum, L. R. Maxson. 1993. Caecilian phylogeny and biogeography inferred from mitochondrial DNA sequences of the 12S rRNA and 16S rRNA genes (Amphibia: Gymnophiona). *Herpetol. Monogr.* 7: 64–76.
- Hertwig, S., R. O. de Sá, and A. Haas. 2004. Phylogenetic signal and the utility of 12S and 16S mtDNA in frog phylogeny. *J. Zool. Syst. Evol. Research*. 42: 2–18.
- Heyer, W. R. 1984. Variation, systematics, and zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and closely related species (Amphibia: Anura: *Leptodactylus*). *Smithsonian Contributions to Zoology*. 402: 1–42.
- Heyer, W. R. and L. R. Maxson. 1982. Distributions, relationships, and zoogeography of lowland frogs- the *Leptodactylus* complex in South America, with special reference to Amazonia. In G. T. Prance (Ed.). *Biological Differentiation in the Tropics*.
- Heyer, W. R., A. S. Rand, C. A. G. Cruz, O. L. Peixoto, R. E. Nelson. 1990. Frogs of Boracéia. *Arq. Zool.* 31: 231–410.
- Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23–42.

- Hillis, D. M. 1995. Approaches for assessing phylogenetic accuracy. *Systematic Biology*. 44: 3–16.
- Hillis, D. M., and J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 3–8.
- Hillis, D. M., and J. J. Wiens. 2000. Molecular versus morphology: systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. Pages 1–19 in *Phylogenetic analyses of morphological data* (J. J. Wiens ed.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Hillis, D. M., and T. P. Wilcox. 2005. Phylogeny of the New World true frogs. (*Rana*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 299–314.
- Hoegg, S., M. Vences, H. Brinkmann, and A. Meyer. 2004. Phylogeny and comparative substitutions rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*. 21: 1188–1200.
- Hoogmoed, M. S. 1990. Biosystematics of South American Bufonidae, with special reference to the *Bufo typhonius* group. Pages 113–123 in *Vertebrates in the tropics* (G. Peters, and R. Hutterer eds.). Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Hubert, N., and J. F. Renno. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*. 33: 1414–1436.
- Huelsenbeck, J. P. 1991. When are fossils better than extant taxa in phylogenetic analysis? *Systematic Zoology*. 40: 458–469.
- Huelsenbeck, J. P., and D. M. Hillis. 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxa case. *Systematic Biology*. 42: 247–264.
- Huelsenbeck, J. P., B. Larget, R. E. Miller, and F. Ronquist. 2002. Potential applications and pitfalls of bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology*. 51: 673–688.
- Huelsenbeck, J.P., and B. Rannala. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex models. *Syst. Biol.* 53: 904–913.
- Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17: 754–755.
- International Commission Of Zoological Nomenclature. 1999. International code of zoological

- nomenclature, 4<sup>th</sup> ed. London: International Trust for Zoological Nomenclature.
- Ireland, D., N. Osbourne, and M. Berrill. 2003. Marking medium to large-sized anurans with Passive Integrated Transponder (PIT) tags. *Herpetological Review*. 34: 218–220.
- Janis, C. M. 1993. Tertiary mammal evolution in the context of changing climates, vegetation, and tectonic events. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 24: 467–500.
- Kishino, H., J. L. Thorne, and W. J. Bruno. 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biological and Evolution*. 18: 352–361.
- Kitching, I. J., P. L. Forey, R. J. Humphries, and D. M. Williams. 1998. *Cladistics - The theory and practice of parsimony analysis*. Oxford University Press, Oxford.
- Kocher, T. D. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequences with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 6196–6200.
- Kwet, A., M. Di-Bernardo, and R. Maneyro. 2006. First record of *Chaunus achavali* (Anura, Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for the identification of the species in the *Chaunus marinus* group. *Iheringia, Série Zoológica*. 96: 479–485.
- Lansman, R.A., J. R. Avise, R. F. Aquadro, J. F. Shapira, and S. W. Daniel. 1983. Extreme genetic variation in mitochondrial DNAs among geographic populations of the deer mouse *Peromyscus maniculatus*. *Evolution*. 37: 1–16.
- Larson, P. M. 2005. Ontogeny, phylogeny, and morphology in anuran larvae: morphometric analysis of cranial development and evolution in *Rana* tadpoles (Anura: Ranidae) J. *Morphol.* 264: 34–52.
- Lavilla, E. O. 1992. Tipos portadores de nombre y localidades tipo de anfibios de Argentina *Acta Zool. Lilloana*. 42: 61–100.
- Lavilla, E. O., and J. M. Cei. 2001. *Amphibians of Argentina. A second update, 1987–2000*. 28. Monogr. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino (Italia), Torino.
- Leaché, A. D., and T. W. Reeder. 2002. Molecular systematics of the Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Syst. Biol.* 51: 44–68.
- Leblois, R., F. Rousset, D. Tikel, C. Moritz, and A. Estoup. 2000. Absence of evidence for

- isolation by distance in an expanding cane toad (*Bufo marinus*) population: an individual-based analysis of microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*. 9: 1905–1909.
- Lemmon, A. R., and E. C. Moriarty. 2004. The importance of proper model assumption in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 53: 265–277.
- Lever, C. 2001. The cane toad: the history and ecology of a successful colonist. Westbury Academic and Scientific Publishing, Yorkshire.
- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*. 50: 913–925.
- Lips, K., R. Ibáñez, F. Bolaños, G. Chaves, F. Solís, J. Savage, C. Jaramillo, Q. Fuenmayor, and A. Castillo. 2004. *Atelopus chiriquiensis*. in IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 08 October 2007.
- Lovejoy, N. R., E. Bermingham, and A. P. Martin. 1998. Marine incursion into South America. *Nature*. 396: 421–422.
- Low, B. S. 1968. Venom polymorphism in *Bufo regularis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 247–257.
- Lutz, A. 1934. Notas sobre as espécies brasileiras do gênero *Bufo*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 28: 111–133.
- Lynch, J. D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactylid frogs. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publications. 53: 1–238.
- Macey, J. R., A. Larson, N. B. Ananjeva, and T. J. Papenfuss. 1997. Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards. *J. Mol. Evol.* 44: 660–674.
- Maciel, N. M. 2003. Indolalquilaminas e proteínas do veneno das glândulas granulares na filogenia do grupo *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821 (Anura: Bufonidae). Master Thesis. Universidade de Brasília at Brasília, Distrito Federal.
- Maciel, N. M., C. A. Schwartz, O. R. Pires Jr., A. Sebben, M. S. Castro, M. V. Sousa, W. Fontes, and E. N. F. Schwartz. 2003. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic

- implications. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 134: 641–649.
- Maciel, N. M., R. A. Brandão, L. A. Campos, and A. Sebben. 2007. A large new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Cerrado of Brazil. *Zootaxa*. 1627: 23–39.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 1992. *McClade: analysis of phylogeny and character evolution*, Version 4.02. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Mahan, J. T., and R. Biggers. 1997. Electrophoretic investigations of blood and parotoid venom proteins in *Bufo americanus americanus* and *Bufo woodhousei fowleri*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 57: 121–126.
- Maneyro, R., D. Arrieta, and R. O. De Sá. 2004 A new toad (Anura: Bufonidae) from Uruguay. *J. Herpetol.* 38: 161–165.
- Marques, R. A. 2002. Hibridação Natural entre *Bufo ictericus* Spix, 1824 e *Bufo paracnemis* A. Lutz, 1925 na Região de Botucatu, Estado de São Paulo (Amphibia, Anura, Bufonidae). Doctorate Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- Martin, R. F. 1972a. Evidence from osteology. Pages 37–70 in *Evolution in the genus Bufo* (W. F. Blair, ed.). University of Texas Press, Austin, Texas.
- Martin, R.F. 1972b. Osteology of North American *Bufo*: the *americanus*, *cognatus*, and *boreas* species groups. *Herpetologica*. 29: 375–387.
- Masta, S. E., B. K. Sullivan, T. L. Lamb, and E. J. Routman. 2002. Molecular systematics, hybridization, and phylogeography of the *Bufo americanus* complex in Eastern North America. *Mol. Phylog. Evolution*. 24: 302–314.
- Maxson L. R. 1981a. Albumin evolution and its phylogenetic implications in African toads of the genus *Bufo*. *Herpetologica*. 37: 96–104.
- Maxson L. R. 1981b. Albumin evolution and its phylogenetic implications in toads of the genus *Bufo*. II. Relationships among Eurasian *Bufo*. *Copeia*. 1981: 579–583.
- Maxson L. R. 1984. Molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus *Bufo*. *Molecular Biology and Evolution* 1: 324–356.
- Mendelson III, J. R. M. 1997a. The systematics of the *Bufo valliceps* group (Anura: Bufonidae) of middle America. PhD Dissertation, University of Kansas at Lawrence, Kansas.
- Meyer, A. and A. R. Wilson. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial

- DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.* 31: 359–364.
- Mickevich, M.F., and S. J. Weller. 1990. Evolutionary character analysis: tracing character change on a cladogram. *Cladistics* 6: 137–170.
- Montoya-Burgos, J. I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* 12: 1855–1867.
- Morrison, M. 1994. A phylogenetic analysis of the *Bufo spinulosus* group (Anura: Bufonidae). PhD Dissertation. University of Kansas, Lawrence, Kansas.
- Mulcahy, D. G., and J. R. Mendelson, III. 2000. Phylogeography and Speciation of the Morphologically Variable, Widespread Species *Bufo valliceps* Based on Molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 173–189.
- Mulcahy, D. G., B. H. Morril, and J. R. Mendelson III. 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the trans-Mexican neovolcanic belt and the isthmus of Tehuantepec. *J. Biogeogr.* 33: 1–15.
- Müller, K. F. 2005. The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, bootstrap, and Bremer support. *BMC Evolutionary Biology*. 5: 1–10.
- Narasimhachari, N., and J. Plaut. 1971. The use of o-phthalaldehyde as a spray reagent for the thin-layer chromatography identification and quantitation of bufotenin and 5-methoxy-N: N-dimethyltryptamine. *J. Chromatogr.* 57: 433–437.
- Narvaes, P. 2003. Revisão taxonômica das espécies de *Bufo* do complexo *granulosus* (Amphibia, Anura, Bufonidae). Doctorate Dissertation. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.
- Nei, M., and S. K. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Noonan, B. P., and P. T. Chippindale. 2006. Vicariant origin of Malagasy reptiles supports Late Cretaceous Antarctic landbridge. *The American Naturalist*. 168: 730–741.
- Nylander, J. A. A., F. Ronquist, J. P. Huelsenbeck, and J. Luis Nieves-Aldrey. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*. 53: 47–67.
- Padial, J. M., and I. De la Riva. 2007. Taxonomy, the Cinderella of science, hidden by its

- evolutionary stepsister. *Zootaxa* 1577: 1–2.
- Papavero, N. 1994. Fundamentos práticos de taxonomia zoológica. Coleções, Bibliografia, Nomenclatura. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Pauly, G. B., D. M. Hillis, and D. C. Cannatella. 2004. The history of a nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the nearctic toads (*Bufo*). *Evolution* 58: 2517–2535.
- Pereira, N. A., I. R. Marins, and H. Moussatchë. 1963. Some pharmacological studies on bufotenine and bufotenidine. *Rev. Bras. Biol.* 23: 211–222.
- Pires Jr., O. R. 2002. Ocorrência de tetrodotoxina e derivados em três espécies de *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). Doctorate Dissertation. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817–818.
- Pramuk, J. B. 2000. Prenasal bones and snout morphology in West Indian bufonids and the *Bufo granulosus* species group. *Journal of Herpetology* 2: 334–340.
- Pramuk, J. B. 2002. Combined evidence and cladistic relationships of west indian toads (Anura: Bufonidae). *Herpetol. Monog.* 16: 121–151.
- Pramuk, J. B. 2004. The Systematics of South American Toads (Anura: Bufonidae). PhD dissertation. University of Kansas, Lawrence, Kansas.
- Pramuk, J. B. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 146: 407–452.
- Pramuk, J. B., R. A. Hass, and S. B. Hedges. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of west indian toads (Anura: Bufonidae). *Mol. Phylog. Evol.* 20: 294–301.
- Pramuk, J. B., T. Robertson, J. Sites, and B. Noonan. 2008. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography*. 17:72–83.
- Pregill, G. 1981. Cranial morphology and the evolution of West Indian toads (Salientia: Bufonidae): resurrection of the genus *Peltophryne* Fitzinger. *Copeia* 1981: 273–285.
- Räsänen, M. E., A. M. Linna, J. C. R. Santos, and F. R. Negri. 1995. Late Miocene tidal



- deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*. 269: 386–390.
- Robertson, A. 2003. Marine incursion or mountain uplift: the effect of continental change on the evolutionary history of *Bufo marinus*. Master Thesis. University of Guelph, Guelph.
- Ronquist, F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst. Biol.* 46: 195–203.
- Ruvinsky, I., and L. R. Maxson. 1996. Phylogenetics relationships among bufonoids frogs (Anura: Bufonidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylog. Evol.* 5: 533–547.
- Salducci, M.D., R. Marty, R. Chappaz, and A. Gilles. 2002. Molecular phylogeny of French Guiana Hylineae: implications for the systematic and biodiversity of the neotropical frogs. *C. R. Biologies*. 325: 141–153.
- Salovaara, K. J., G. G. Cardenas, and H. Tuomisto, H. 2004. Forest classification in an Amazonian rainforest landscape using pteridophytes as indicator species. *Ecography*. 27: 689–700.
- Sampson, S. D., L. M. Witmer, C. A. Forster, D. W. Krause, P. M. O'Connor, P. Dodson, and F. Ravoavy. 1998. Predatory dinosaur remains from Madagascar: implications for the Cretaceous biogeography of Gondwana. *Science*. 280: 1048–1051.
- San Mauro, D., M. Vences, M. Alcobendas, R. Zardoya, and A. Meyer. 2005. Initial diversification of living amphibians predated the breakup of Pangea. *The American Naturalist*. 165: 590–599.
- Sanchíz, B. 1998. Salientia. Pages 1–275 in *Handbuch der Paläoherpetologie Part 4* (P. Wellnhofer ed.). Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munich.
- Sanderson, M. J. and M. J. Donoghue. 1989. Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution*. 43: 1781–1795.
- Savage, J. M. 1973. The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. Pages 351–446 in *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems* (J. Vial ed.). University of Missouri Press, Columbia, Missouri.
- SBH. 2007. Brazilian amphibians–List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on 20 January 2008.



- Schwartz, C. A. 1993. Composição e dosagem de indolalquilaminas da secreção cutânea do *Bufo rufus* Garman, 1877 (Amphibia, Salientia, Bufonidae): Comparação com outros seis bufonídeos brasileiros. Doctorate Dissertation. Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.
- Schwartz, C.A., M. S. Castro, O. R. Pires Jr., N. M. Maciel, E. N. F. Schwartz, and A. Sebben. 2007. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. Pages 146–168 in *Herpetologia no Brasil II*. (L. B. Nascimento, and M. E. Oliveira eds.). Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Seba, A. 1734. *Locupletissimi rerum naturalium thesauri accurata descriptio, et iconibus artificiosissimis expressio, per universam physices historiam. Opus, cui, in hoc rerum genere, nullum par exstitit. Ex toto terrarum orbe collegit, digessit, et depingendum curavit. Tomus I.* - pp. [1-32], 1-178, pl. 1-111. Amstelaedami. (Wetstenium, Smith & Janssonio-Waesbergios).
- Slade, R., and C. Moritz. 1998. Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced range. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 265: 769–777.
- Slottha, R.H. and R. Neisser. 1937. Composição do veneno de *Bufo marinus*. *Mem. Inst. Butantan*. 11: 89–99.
- Smith, A. B. 1998. What does paleontology contribute to systematics in a molecular world? *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9: 437–447.
- Smith, M. F., and J. L. Patton. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome *b*. *J. Mamm. Evol.* 6: 89–127.
- Stevaux, M. N. 2001. Análise Filogenética e Biogeográfica do grupo-*marinus* do gênero *Bufo* (Anura: Bufonidae). Doctorate Dissertation. Universidade Estadual Paulista, Campus, Botucatu, São Paulo.
- Stevaux, M. N. 2002. A new species of *Bufo* Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 19: 235–242.
- Stromberg, V. L. 1954. The isolation of bufotenin from *Piptadenia peregrina*. *J. Am. Soc.* 76: 1707.

- Suter, S. J. 1994. Cladistic analysis of the living cassiduloids (Echinoidea), and the effects of character ordering and successive approximations weighting. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 112: 363–387.
- Suzuki, Y., G. V. Glazco, and M. Nei. 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by bayesian phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 16138–16143.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP\*. Phylogenetic Analyses Using Parsimony (\*and other methods). Version 4. Sunderland, Sinauer Associates.
- Symula, R., R. Schulte, and K. Summers. 2003. Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Mol. Phylog. Evol.* 26: 452–475.
- Tamura K, J. Dudley, N. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Taylor, W.R., and G. C. Van Dyke. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*. 9: 107–119.
- Thompson, J.D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876–4882.
- Thorne, J. L., and H. Kishino. 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Syst. Biol.* 51: 689–702.
- Thorne, J. L., H. Kishino, and I. S. Painter. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1647–1657.
- Tihen, J. A. 1972. The fossil record. Pages 8–13. *in* Evolution in the genus *Bufo* (W.F. Blair, ed.) University of Texas Press, Texas, Austin.
- Toledo, R.R. and R. Jared. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 111: 1–29.
- Trueb, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. Pages 255–343 *in* The skull, volume 2: Patterns of structural and systematic diversity (J. Hanken, and B. K. Hall eds.). University of Chicago Press, Chicago.

- Tuomisto, H. 2007. Interpreting the biogeography of South America *Journal of Biogeography*. 34: 1294–1295
- Urban, M.C., B. L. Phillips, D. K. Skelly, and R. Shine. The cane toad's (*Chaunus* [*Bufo*] *marinus*) increasing ability to invade Australia is revealed by a dynamically updated range model. *Proceedings of the Royal Society B*. 274: 1413–1419.
- Vences, M., J. Freyhof, R. Sonnenberg, J. Kosuch, and M. Veith. 2001. Reconciling fossils and molecules: Cenozoic divergence of cichlid fishes and the biogeography of Madagascar. *Journal of Biogeography*. 28: 1091–1099.
- Wagler, J. 1828 Auszüge aus seinem Systema Amphibiorum. *Isis, von Oken*. 21: 740–744.
- Webb, S. D. 1995. Biological implications of the middle Miocene Amazon seaway. *Science* 269: 361–362.
- Wiens, J. J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology*. 47: 568–581.
- Wiens, J. J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology*. 53: 653–661.
- Wiens, J. J. 2007. New biological books. *The Quarterly Review of Biology*. 82: 55–56.
- Wiens, J. J., and Penkrot, T. A. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Syst. Biol.* 51: 69–91.
- Wiens, J. J., J. W. Fetzner, C. L. Parkinson, and T. W. Reeder. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology*. 54: 719–748.
- Wilkinson, M., J. A. Seps, O. V. Oommen, and B. L. Cohen. 2002. Phylogenetic relationships of Indian caecilians (Amphibia: Gymnophiona) inferred from mitochondrial rRNA gene sequences. *Mol. Phylog. Evol.* 23: 401–407.
- Yokoyama, R., and A. Goto. 2005. Evolutionary history of freshwater sculpins, genus *Cottus* (Teleostei; Cottidae) and related taxa, as inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol. Phylog. Evol.* 36: 654–668.
- Zug, G.R., P. B. Zug. 1979. The Marine Toad, *Bufo marinus*: A natural history resume of native populations. *Smithsonian Contributions in Zoology*. 284: 1–58.

## **ANEXO 1**

*Rhinella* (= *Chaunus*) *veredas* sp. nov. (artigo publicado no periódico Journal of Herpetology 41(2): 304–311, 2007);

## A New Species of *Chaunus* from Central Brazil (Anura; Bufonidae)

REUBER A. BRANDÃO,<sup>1,2</sup> NATAN M. MACIEL,<sup>3</sup> AND ANTONIO SEBEN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Florestal (EFL), Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Toxinologia (LTx), Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Instituto de Ciências Biológicas (IB), Universidade de Brasília (UnB), ICC-Sul, Módulo 5, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Instituto de Ciências Biológicas (IB), Universidade de Brasília (UnB), ICC-Sul, Módulo 5, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

**ABSTRACT.**—A new species of *Chaunus*, apparently related to *Chaunus arenarum*, *Chaunus rubescens*, and *Chaunus achavali* is described. The new species occupies Cerrado habitats in southwestern Piauí and Bahia states and in northwestern Minas Gerais state, Brazil. The species is characterized by anterior interruption of the supraocular crest; weakly developed cranial crests; short and robust limbs; several pointed spiculae on dorsum, head, and limbs; male coloration; small to medium size; and by the short and narrow head.

Until recently, the genus *Bufo* was interpreted as a large paraphyletic assemblage (Graybeal and Cannatella, 1995; Pramuk, 2006), composed of more than 250 species distributed through all continents, except for Arctic, Antarctic, Madagascar, New Guinea, Australia, and oceanic islands. Some species, such as *Bufo marinus*, were introduced in many places of the world (D. R. Frost, Amphibian Species of the World, version 3.0, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, 2004; Slade and Moritz, 1998).

The large number of species and the complex evolutionary history of the South American species of *Bufo* led to several attempts to classify and group them (Gallardo, 1962; Tihen, 1962; Cei, 1972, 1980; Martin, 1972; Duellman and Schulte, 1992; Frost et al., 2006; Pramuk, 2006).

Based on osteological features, Tihen (1962) proposed the so-called South American section, consisting of *Bufo arenarum*; *Bufo blombergi*; *Bufo chilensis* (= *Bufo arunco*); *Bufo crucifer*; *Bufo ictericus*; *Bufo m. marinus* (= *Bufo marinus*); *Bufo m. horribilis* (= *Bufo marinus*); and *Bufo paracnemis* (= *Bufo schneideri*).

Gallardo (1962) was the first author to define the *B. marinus* group to refer to a subgroup of Neotropical *Bufo* species having the parotoid gland behind the eye, passing over the eardrum, and by the skin that covers these glands, which has a different aspect from the rest of the body, because of the large pores. Gallardo (1962) included in his *B. marinus* group almost all South American *Bufo*: *Bufo arenarum*; *Bufo blombergi*; *Bufo caeruleostictus*; *Bufo ceratophrys*; *Bufo crucifer*; *B.*

*Bufo dapsilis*; *Bufo fissipes*; *Bufo glaberrimus*; *Bufo guttatus*; *Bufo haematiticus*; *Bufo ictericus*; *Bufo inca*; *Bufo intermedius*; *Bufo leptocelis* (misspelling of *Bufo leptoscelis* (= *B. veraguensis*)); *Bufo manicorensis* (= *Bufo granulosus*); *Bufo marinus*; *Bufo ocellatus*; *Bufo ockendeni* (= *Bufo veraguensis*); *Bufo paracnemis* (= *Bufo schneideri*); *Bufo pithecodactylus* (= *Bufo marinus*); *Bufo poeppigii*; *Bufo quechua*; *Bufo rostratus* (= *Rhombophryne rostrata*); *Bufo rubropunctatus*; *Bufo rufus* (= *Bufo rubescens*); *Bufo schneideri* (considered by Gallardo 1962 as a possible synonym of *Bufo paracnemis*); *Bufo spinulosus*; and *Bufo typhonius* (= *Bufo margaritifera*). Gallardo (1962) suggested that *Bufo schneideri* was a senior synonym of *Bufo paracnemis*. However, in the original description, *Bufo schneideri* is considered most closely related to *B. sternosignatus*, a species of the former *Bufo valliceps* group (D. R. Frost, Amphibian Species of the World, version 3.0, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, 2004). The holotype of *Bufo schneideri* is a small female (SVL = 69.7 mm) with evident tibial glands, confirming Gallardo's (1962) interpretation (pers. obs.).

Martin (1972) defined the *B. marinus* species group based on the following morphological characters: skull short and broad; broad frontoparietals with lateral edges forming prominent supraorbital crests that extend anteriorly onto the nasals and bifurcate to form prominent canthal and preorbital crests; supraorbital crests joined in a smooth arc by the postorbital crests, which in turn are joined laterally by the tympanic and supratympanic crests; frontoparietal-nasal nearly transverse; dermal roofing bones heavily ornamented; absence of distinct parietal crests, but the area they usually occupy is elevated by parallel ridges of bones; post-

<sup>2</sup>Corresponding Author. E-mail: reuberbrandao@yahoo.com.br

orbital shelf extensive and trapezoidal in shape; otic plate of the squamosal large; frontoparietals fused to the prootics; occipital canal closed; braincase moderately depressed to slightly elevated; rami of the squamosal of average or less than average length; medial rami of the pterygoids overlap the wings of the parasphenoid over half their length; suprapterygoid fenestra nearly occluded by flanges from the squamosal and the medial arm of the pterygoid. Martin (1972) included *B. schneideri*, *B. ictericus*, *B. marinus*, and *B. arenarum* in the group.

Cei (1972) recognized two major radiations of South American *Bufo*, delimited by the Andean Cordillera. The Broad-Skulled Toads are represented by the *B. marinus*, *B. granulatus*, *B. margaritifera*, and *B. guttatus* groups and occur east of the Andes. The Narrow-Skulled Toads are represented by the *B. spinulosus* group, found on the western versant of the Andes. Cei (1972) reviewed the *B. marinus* group and included *B. marinus*, *B. poeppigii*, *B. arenarum*, *B. rubescens*, *B. ictericus*, and *B. schneideri*. Cei (1980) split the *B. marinus* group, allocating *B. arenarum* and *B. rubescens* to a separate group, based mostly on medium to small size, weak development of cranial crests, and tongue shape.

Lavilla (1992) noted that *B. rufus* is a name already occupied by *B. rufus*, a junior synonym of *Bufo terrestris*. Faivovich and Carrizo (1997) removed *Bufo missionum* from the synonymy of *B. rufus* where it had been placed by Gallardo (1961). According to D. R. Frost (Amphibian Species of the World, version 3.0, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, 2004) *B. rubescens* is the valid and current name for the species. This species is found in the states of Minas Gerais and Goiás, Brazil (Cochran, 1955; D. R. Frost, Amphibian Species of the World, version 3.0, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, 2004), and it is common in Central Brazil, especially in the highlands of Goiás and Distrito Federal (Eterovick and Sazima, 1999; Brandão and Araujo, 2002; D. R. Frost, Amphibian Species of the World, version 3.0, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>, 2004).

Duellman and Schulte (1992) redefined the *B. marinus* group to include *B. arenarum*, *B. ictericus*, *B. marinus*, *B. poeppigii*, *B. rubescens*, and *B. schneideri*. These species share broad frontoparietals fused with prootics; completely roofed occipital canal; pronounced exostosing of dermal roofing bones; presence of all cranial crests, elevated, keratinized or not; presence of large and small tubercles on the dorsal skin; absence of a lateral row of enlarged tubercles; parotoid glands large, ovoid or elongate; tympanum distinct; snout round in dorsal view, truncate

in profile; and first finger longer than second. Later, *Bufo jimi* and *Bufo achavalii* were described and included in the group (Stevaux, 2002; Maneyro et al., 2004).

Pramuk (2006) provided morphological synapomorphies to diagnose the recognized species groups of South American *Bufo* but did not propose any taxonomic changes. According to her, the so-called *B. marinus* group presents a unique and unreversed synapomorphy, a jagged or "scalloped" suture between the articulation of the medial ramus of the pterygoid and the parasphenoid alae.

Frost et al. (2006) suggested that the genus *Chaunus* must be revalidated for a clade supported by molecular characters, grouping 43 Neotropical *Bufo* species. Despite recent changes in Bufonidae taxonomy (Frost et al., 2006), the composition of the phenetic groups remains unchanged.

The *Chaunus marinus* group is composed so far by eight species: *Chaunus achavalii*, *Chaunus arenarum*, *Chaunus ictericus*, *Chaunus jimi*, *Chaunus marinus*, *Chaunus poeppigii*, *Chaunus rubescens*, and *Chaunus schneideri*. All species of *C. marinus* species group occurs in Brazil, except *C. poeppigii* (D. R. Frost, Amphibian Species of the World, version 4, available online at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>, 2006; M. Di-Bernardo, A. Kwet, and R. Maneyro, pers. comm.). Herein we describe a new species of the *C. marinus* group from the Brazilian Cerrado morphologically similar to *C. arenarum*, *C. rubescens*, and *Chaunus achavalii*.

#### MATERIALS AND METHODS

Specimens used for description and comparisons are deposited in Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB), Museu Nacional (MNRJ), Adolpho Lutz collection (AL, housed at MNRJ), Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Naturhistorisches Museum (NHMB), and Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Measurements were taken using a digital caliper (to nearest 0.1 mm). For measurements, we follow Heyer et al. (1990) and Maneyro and Arrieta (2000). We took the following 20 measurements: snout-vent length (SVL), head length (HEL), head height (HH), head width (HW), maximum length of parotoid gland (PGL), maximum width of parotoid gland (PGW), tympanum diameter (TD), eye diameter (ED), eye to nostril distance (END), interocular distance (IOC), interorbital distance (IOD), internostril distance (IND), snout to nostril distance (SND), hand length (HAL), forearm length (FAR), upper arm length (UAR), tibia length (TIL), thigh length



(TL), tarsus length (TL), and foot length (FL). The webbing formulae follow Heyer et al. (1990). Sex was determined by the observation of secondary sexual characters, such as the presence of keratinous pointed spicules on dorsum, keratinization of fingers and arms, and vocal sacs. We confirmed these features as characteristics of mature males by examination of the gonads of male and female specimens.

#### RESULTS

##### *Chaunus veredas* sp. nov.

Figures 1–3

**Holotype.**—Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB 40282), adult male collected at Trijunção Farm (currently Parque Nacional Grande Sertão Veredas), Cocos Municipality, Bahia State, Brazil (14°49'S; 45°58'W) in October 2000, by R. A. Brandão, G. J. Zerbini, M. A. Bagno, and J. B. Pereira.

**Paratypes.**—CHUNB 37437–37438 (two adult females), collected along with the holotype; CHUNB 34106–34109, 34112–34114 (two adult males, two adult females, and three juveniles), collected at Serra das Araras State Park, Serra da Araras Municipality, Minas Gerais State; CHUNB 38652–38654 (three adult males) collected at Trijunção Farm, Cocos Municipality, Bahia State; MZUSP 128285A–128293A (four adult males, four adult females, and a juvenile) collected at Grande Sertão Veredas National Park, Chapada Gaúcha Municipality, Minas Gerais State; CHUNB (43327–43333; four adult females and three adult males) collected at Buritizeiro Municipality, Minas Gerais State; MNRJ 1387 (an adult male) collected at Pirapora Municipality, Minas Gerais State; MNRJ 39014–39017 (an adult male and three adult females) collected at Pirapora Municipality; MNRJ 39035 (an adult male) collected at Corrente Farm, Várzea da Palma Municipality, Minas Gerais State; MNRJ (39051–39052; two adult males) collected at Pirapora Municipality, Minas Gerais State; MNRJ (39050; an adult male) collected at Estação Ecológica Uruçuí-Una, Uruçuí-Una Municipality, Piauí State.

**Diagnosis and comparisons with other species.**—The new species belongs to the *C. marinus* species group mostly by the size, rough skin, parotoid gland shape, distinct tympanum, and first finger longer than second (Duellman and Schulte, 1992). *Chaunus veredas* has the following unique combination of characters within the *C. marinus* group: anterior portion of the supraocular crest bearing a distinct interruption (Fig. 1A); supranasal crests slightly developed; cranial crests poorly developed; high density of keratinous pointed spicules in dorsal glands;

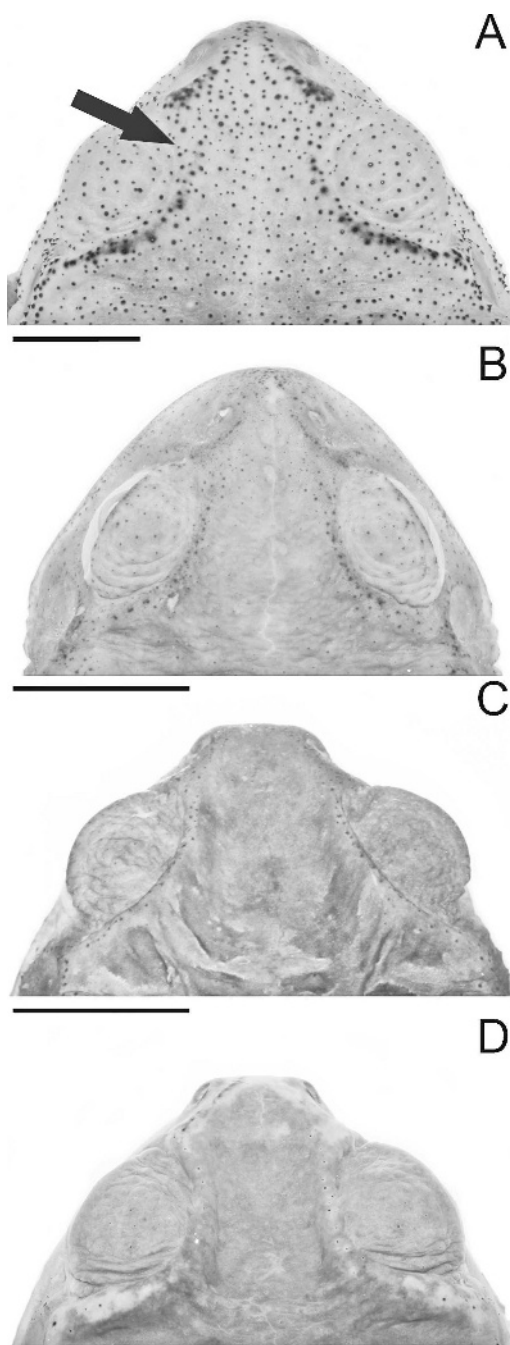


FIG. 1. Dorsal view of the head of *Chaunus veredas* (A), showing the anterior interruption of the supraocular crest; *Chaunus rubescens* (B); *Chaunus achavalii* (C); and *Chaunus arenarum* (D). Scale bars: 10mm. Photos by Natan Maciel.



FIG. 2. Adult male of *Chaunus veredas* from Cocos, Bahia State, Brazil. Photo by Natan Maciel.

limbs short and robust; fingers short and robust; males commonly have a yellow dorsum and venter immaculate white; females larger, robust, with dorsum marmoreal brownish and green-bluish, resembling coloration of *C. arenarum*; very short head, head wider than long; small to medium size (males 87.0–110.7 mm; females 82.8–117.8 mm), foot webbing formula I 1–2 II 2–3 III 3–3 IV 3–2 V; parotoid gland elongated and narrow; absence of tibial gland. The new species is most similar to *C. rubescens*, *C. arenarum*, and *C. achavali* based on the weak development of cranial crests, shape of the parotoid gland, and relatively short fingers and toes. The new species can be distinguished from *C. rubescens* by anterior interruption of the supraocular cranial crest (complete in *C. rubescens*) (Fig. 1B); short and rounded parotoid gland (long and narrow in *C. rubescens*); distinct glandular ridges, extending from the posterior end of the parotoid gland, to the groin (absent in *C. rubescens*); larger size (males 87–110.7 mm,  $N = 20$ , in *C. veredas*, males 74.3–103.4 mm,  $N = 14$ , in *C. rubescens*); dorsal yellow coloration in males (males tan, brown or gray, but never yellow in *C. rubescens*); foot webbing formula (I 1–1 II 2–1 III 2– $\frac{1}{2}$  IV  $\frac{1}{2}$ –2 V in *C. rubescens*); head wider than long; rounded snout in lateral view (obtuse in *C. rubescens*); presence of keratinous spiculae on body glands. From *C. achavali*, the new species can be distinguished by dorsal yellow male coloration (tan or gray-brown in *C. achavali*); anterior interruption of the supraocular crest (complete in *C. achavali*; Fig. 1C); pointed spiculae on body glands; rough skin (smooth in *C. achavali*); foot webbing formula; and pale yellow parotoid glands (reddish-brown in *C. achavali*). From *C. arenarum*, the new species can be distinguished by

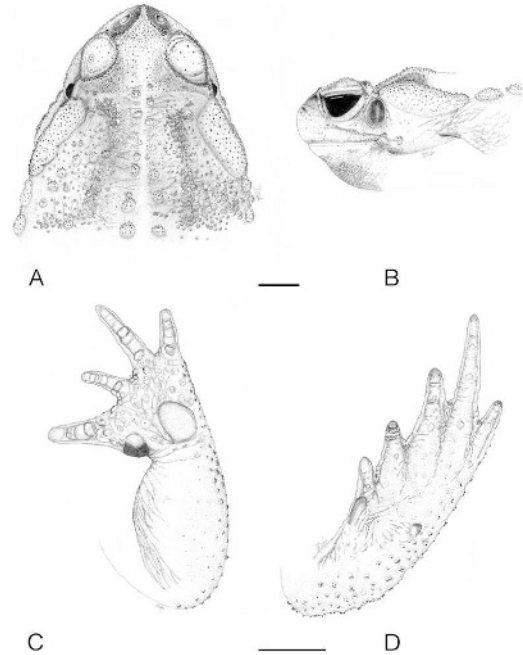


FIG. 3. *Chaunus veredas*, CHUNB 40282 (holotype) adult male, (A) dorsal view of head, (B) lateral view of head, (C) palmar view, (D) plantar view. Scale: 10 mm. Drawings by Daniel Sifuentes.

the anterior interruption of the supraocular crest (complete in *C. arenarum*; Fig. 1D); larger size (males 70.2–100.8,  $N = 16$ , in *C. arenarum*); rough skin (smooth in *C. arenarum*); foot webbing formula (I 2–2 II 3–1 III 2– $\frac{1}{2}$  IV  $\frac{1}{2}$ –2 V in *C. arenarum*); rounded snout in lateral view (truncated in *C. arenarum*); abundance of keratinous pointed spiculae in all dorsal glands; yellow dorsal male coloration (males marbled with light blue and ochre in *C. arenarum*); and a narrow and long tongue (short and rounded in *C. arenarum*). From *C. ictericus*, *C. schneideri*, *C. marinus*, and *C. jimi* by its anterior interruption of the supraocular cranial crest, weak development of cranial crests, smaller size, shorter and robust limbs, shape of parotoid gland, and lack of tibial glands.

*Description of the holotype.*—General aspect robust (Fig. 2). Head wider than long; SVL approximately  $3\times$  the head width; snout rounded in dorsal and in lateral views (Fig. 3A and 3B); loreal region smooth; large nostrils, with dorsally elliptic opening; interorbital distance approximately  $2\times$  the eye diameter; tympanum developed, oval; eye diameter about  $1.25\times$  the tympanum diameter; cranial crests present, weakly developed; pretympenic and rostral crests slightly developed; supraocular crest indistinct anteriorly but evident from the medial part of the ocular globe until its



posterior end; supranasal crest evident, slightly developed; postocular crest developed, short, in contact with the parotoid gland; cranial crests keratinized, more pigmented in the thicker areas; dorsum of the head plane, with small rounded spiculae; large eyelid, with or without small keratinous spicules (Fig. 1A). Parotoid gland evident, ellipsoid, with keratinous spicules; parotoid length about  $3\times$  in its width. Tongue wider than long, pear shaped, smooth, without folds, free in its posterior end; posterior tongue margin broad and rounded, anterior margin narrow, attached to jaw; vomerine teeth absent; vocal sac under the tongue; vocal sac slits rounded, located next to the mandible commissure; choanae elliptic. Fingers developed (Fig. 3C); forearm and arm robust and short; relative finger length  $II < IV < I < III$ ; fingers without webbing, but with slightly developed fringes; tips of fingers keratinized and dark in dorsal view; subarticular tubercles at the base of all fingers; subarticular tubercle present between phalanges II and III of finger III; outer palmar tubercle large and rounded; inner palmar tubercle at base of finger I, rounded, with posterior edge pigmented and keratinized. Nuptial pads evident, dorsally visible on fingers I and II. Snout-vent length about  $2.4\times$  the thigh length; toe-tips keratinized and dark, relative length of toes  $I < II < V < III < IV$ ; small subarticular tubercles proximally on toes; subarticular tubercles between phalanges II and III on toes III, IV and V. Foot web present, weakly developed; foot webbing formula  $I\ 1-2\ II\ 2-3\ III\ 3-3\ IV\ 3-2\ V$ ; outer metatarsal tubercle small, rounded; inner metatarsal tubercle elongated, weakly keratinized. Metatarsal fold present, from the tip of toe I to the base of the shank; plantar surface with small callosities, weakly developed and conical. Dorsal skin rough; dorsum covered by rounded glands, of similar size; all glands with black and pointed keratinized spiculae; spiculae number changes with gland size; glands are smaller and less dense in the anterior and posterior limbs. An evident dorsolateral glandular ridge extends from the posterior edge of the parotoid gland to the groin, separating the dorsal and ventral body surfaces; ventral surface smooth.

*Measurements of the holotype (in millimeters).—*SVL 106.0; HEL 29.7; HH 23.8; HW 435.9; PGL 23.4; PGW 9.7; TD 6.7; ED 11.6; END 4.7; IOC 13.4; IOD 11.3; IND 7.4; FN/DFN 3.3; HAL 23.7; FAR 24.0; UAR 15.7; TIL 37.4; TL 44.7; TL 21.6; and FL 40.9.

*Variation.*—The individuals showed little variation in the head ridges and overall morphology, but males are more elongated than females. Some males have dorsum light gray, similar to the substratum color. Keratinous spiculae are

more developed in males than in females. Species measurements are provided in Table 1.

*Coloration.*—Sexual dimorphism well marked in coloration. In life, most males show a bright yellow dorsum, with dark points corresponding to the keratinous spiculae and a white immaculate venter. Females show a complex pattern of greenish and ochre on the dorsum, and a white immaculate venter. Newly metamorphosed individuals show large black and white spots in belly and chest, and the vent is orange. Preserved males become buff, with white venters; females with grayish and pale brown dorsum. The spiculae remain dark or brown.

*Etymology.*—"Vereda" is a typical kind of cerrado vegetation, characterized by the occurrence of buriti palms (*Mauritia flexuosa*), that develop along small rivers and water courses. The name is derivative from the old Portuguese language and means pathway, in contrast to the "cerrado" that means dense or closed, and is used as a noun in apposition. The region of the type locality of *Chaunus veredas* was the setting of "Grande Sertão: Veredas," by João Guimarães Rosa, one of the greatest Brazilian writers. This novel was the inspiration for the name of the Grande Sertão Veredas National Park, one of the most important remnants of Cerrado, with about 231,000 ha. The specific epithet is in homage to Guimarães Rosa, to Grande Sertão Veredas National Park, and to the vereda vegetation.

*Distribution.*—*Chaunus veredas* was recorded in sandy ground chapadas (plane highlands) in the southwestern States of Piauí (Uruçuí-Una Ecological Station) and Bahia (Cocos Municipality) and northeastern Minas Gerais (Formoso, Serra das Araras, Chapada Gaúcha, Pirapora, Várzea da Palma and Buritizeiro municipalities; Fig. 4).

*Natural history notes.*—Although we carried out continuing studies at Trijunção Farm region since 1998, *C. veredas* was observed only a few times, always at the beginning of the rainy season (October/November). Individuals were found in open areas (cerrado, campo cerrado, veredas, and campo sujo). We never observed reproductive activity or found tadpoles. However, in December we found toadlets close to wet areas, but no adults were observed. *Leptodactylus troglodytes*, *Pleurodema diplolistris*, and *Physalaemus centralis* are found in the same habitats as *C. veredas*.

## DISCUSSION

*Chaunus veredas* is endemic to the Brazilian Cerrado biome, and it is easily distinguishable from other species in the *Chaunus marinus* group.

TABLE 1. Measurements (in millimeters) for the type series of *Chaunus veredas*. Mean followed by standard deviation (SD) and ranges.

Variables	Males (N = 20)		Females (N = 14)	
	Mean ( $\pm$ SD)	Ranges	Mean ( $\pm$ SD)	Ranges
Snout-vent length	98.3 ( $\pm$ 7.1)	87.0–110.7	101.9 ( $\pm$ 9.7)	82.8–117.8
Head length	27.5 ( $\pm$ 1.5)	25.0–29.7	28.0 ( $\pm$ 2.5)	21.0–31.1
Head height	19.5 ( $\pm$ 3.1)	14.2–24.2	19.7 ( $\pm$ 2.6)	14.5–24.8
Head width	33.9 ( $\pm$ 1.9)	30.2–36.7	34.2 ( $\pm$ 2.5)	29.0–37.2
Max. length of parotoid gland	22.2 ( $\pm$ 1.9)	18.8–26.4	23.5 ( $\pm$ 2.2)	19.3–26.9
Max. width of parotoid gland	10.3 ( $\pm$ 1.6)	7.9–14.7	11.0 ( $\pm$ 1.8)	8.7–14.0
Tympanum diameter	7.1 ( $\pm$ 0.5)	6.4–8.1	7.3 ( $\pm$ 0.7)	6.2–8.4
Eye diameter	10.9 ( $\pm$ 0.8)	8.9–12.1	10.7 ( $\pm$ 1.2)	8.8–12.7
Eye to nostril distance	5.0 ( $\pm$ 0.9)	3.6–6.7	5.2 ( $\pm$ 1.0)	3.5–7.3
Interocular distance	12.6 ( $\pm$ 0.9)	11.4–14.2	12.8 ( $\pm$ 0.9)	11.2–14.1
Interorbital distance	10.6 ( $\pm$ 0.8)	8.0–12.6	10.8 ( $\pm$ 0.8)	8.9–12.7
Inter-nostril distance	6.7 ( $\pm$ 0.7)	5.6–7.5	6.9 ( $\pm$ 0.9)	5.5–8.7
Snout to nostril distance	3.6 ( $\pm$ 0.6)	2.4–4.8	3.8 ( $\pm$ 0.5)	3.1–4.7
Hand length	20.9 ( $\pm$ 4.7)	1.6–24.0	21.6 ( $\pm$ 2.1)	17.5–24.8
Forearm length	21.5 ( $\pm$ 2.5)	16.3–25.3	21.9 ( $\pm$ 3.2)	15.7–26.1
Upper arm length	15.3 ( $\pm$ 1.8)	12.6–19.1	14.1 ( $\pm$ 2.0)	10.2–17.6
Tibia length	21.5 ( $\pm$ 2.2)	30.6–37.9	21.9 ( $\pm$ 2.5)	30.0–38.3
Thigh length	39.3 ( $\pm$ 3.6)	29.0–44.7	39.8 ( $\pm$ 4.0)	32.1–46.0
Tarsus length	19.5 ( $\pm$ 2.5)	12.1–23.4	20.4 ( $\pm$ 2.1)	16.0–23.5
Foot length	34.6 ( $\pm$ 3.0)	29.5–40.9	34.8 ( $\pm$ 3.7)	26.5–39.4

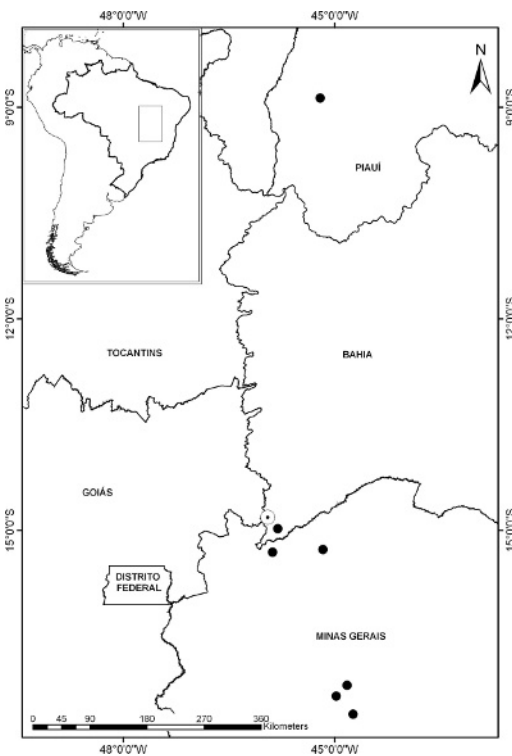


FIG. 4. Distribution of *Chaunus veredas*. The inset map shows the Central region of Brazil. The dot-center circle represents the type locality for the species. Map by Ana Paula Medeiros.

*Chaunus veredas* resembles *C. arenarum*, *C. rubescens*, and *C. achavali* in size, weak development of the cranial crests, short fingers, and shape of parotoid gland. According to Cei (1972), *C. rubescens* is most closely related to *C. arenarum*, a species with a wide distribution, and many regional forms. According to Maneyro et al. (2004) *C. achavali* also clusters with *C. arenarum*, and *C. rubescens*.

Currently, considering the *C. marinus* species group, only *C. schneideri*, *C. rubescens*, and *C. jimi* are known to occur in the Cerrado biome (Colli et al., 2002; Brandão and Araújo, 2002; Stevaux, 2002). However, the richness of species belonging to the genus *Chaunus* in Cerrado is underestimated, and more species remain to be described.

**Acknowledgments.**—We thank M. Bagno (*in memoriam*), G. Zerbini, J. Brito, R. Matsushita, A. Teixeira Jr., D. Sifuentes, A. Crema, and G. Fajardo for field help. We also thank T. Machado and N. dos Santos (Trijunção Farm) for support and the opportunity to work in southwestern Bahia. We thank G. Colli and M. Zatz for the specimens collected in Buritizeiro municipality and the facilities for work at CHUNB. We thank C. Nogueira for loan the species deposited in MZUSP and M. Di Bernardo (*in memoriam*) for the species deposited in MCP. J. P. Pombal Jr. gave us access to Museu Nacional/UFRJ. We also would like to thank C. A. da Cruz, B. Pimenta, R. Pinto, D. Nascimento, and C. Ferreira for assistance at MNRJ. A. Garda provided some bibliography. L.

Campos and A. P. Medeiros helped with the figures. We thank W. R. Heyer and R. de Sá for the helpful suggestions in the manuscript and for English improvements. To T. M. Doan (Associate Editor), E. La Marca, and two anonymous reviewers for revising the manuscript. We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process 142324/2004-3) for fellowship to NMM.

## LITERATURE CITED

- BRANDÃO, R. A., AND A. F. B. ARAÚJO. 2002. A herpetofauna associada às matas de galeria no Distrito Federal. In J. F. Ribeiro, C. E. L. Fonseca, and J. C. Sousa-Silva (eds.), *Cerrado: Caracterização e Recuperação de Matas de Galeria*, pp. 560–604. Embrapa, Planaltina, Distrito Federal, Brazil.
- CEI, J. M. 1972. *Bufo* of South America. In W. F. Blair (ed.), *Evolution in the Genus Bufo*, pp. 82–92. University of Texas Press, Austin.
- . 1980. The amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, New Series Monografia*, Firenze 2:1–609.
- COCHRAN, D. M. 1955. Frogs of Southeastern Brazil. *United States National Museum Bulletin* 206:1–423.
- COLLI, G. R., R. P. BASTOS, AND A. F. B. ARAÚJO. 2002. The character and dynamics of the Cerrado Herpetofauna. In P. S. Marquis and R. J. Oliveira (eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, pp. 223–241. Columbia University Press, New York.
- DUELLMAN, W. E., AND R. SCHULTE. 1992. Description of a new species of *Bufo* from northern Peru with comments on phenetic groups of South America toads (Anura: Bufonidae). *Copeia* 1992:162–72.
- ETEROVICK, P. C., AND I. SAZIMA. 1999. Description of the tadpole of *Bufo rufus* with notes on aggregative behavior. *Journal of Herpetology* 33:711–713.
- FAIVOVICH, J., AND G. R. CARRIZO. 1997. La identidad de *Bufo missionum* Berg, 1896 (Anura, Bufonidae). *Cuadernos de Herpetologia* 11:81–82.
- FROST, D., T. GRANT, J. FAIVOVICH, R. BAIN, A. HAAS, C. B. HADDAD, R. O. DE SÁ, A. CHANNING, M. WILKINSON, S. C. DONNELLAN, C. J. RAXWORTHY, J. A. CAMPBELL, B. L. BLOTTO, P. MOLER, R. C. DREWES, R. A. NUSSBAUM, J. D. LYNCH, D. M. GREEN, AND W. C. WHEELER. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:1–370.
- GALLARDO, J. M. 1961. Anfibios anuros de Misiones con la descripción de una nueva especie de *Crossodactylus*. *Neotropica* 7:33–38.
- . 1962. A propósito de *Bufo variegatus* (Günther), sapo del Bosque Húmedo Antártico, y las otras especies de *Bufo* neotropicales. *Physis* 23:93–102.
- GRAYBEAL, A., AND D. C. CANNATELLA. 1995. A new taxon of Bufonidae from Peru, with descriptions of two new species and a review of phylogenetic status of supraspecific bufonid taxa. *Herpetologica* 51:105–131.
- HEYER, W. R., A. S. RAND, C. A. G. CRUZ, O. L. PEIXOTO, AND C. E. NELSON. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia São Paulo* 31:231–410.
- LAVILLA, E. O. 1992. Tipos portadores de nombre y localidades tipo de anfibios de Argentina. *Acta Zoologica Lilloana* 42:61–100.
- MANEYRO, R., AND D. ARRIETA. 2000. Reporte de variaciones morfológicas en ejemplares de *Bufo arenarum* Hensel 1867, con comentarios sobre el grupo *marinus*. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 12:1–13.
- MANEYRO, R., D. ARRIETA, AND R. O. DE SÁ. 2004. A new toad (Anura: Bufonidae) from Uruguay. *Journal of Herpetology* 38:161–165.
- MARTIN, R. F. 1972. Evidence from osteology. In W. F. Blair (ed.), *Evolution in the Genus Bufo*, pp. 37–70. University of Texas Press, Austin.
- PRAMUK, J. B. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 146:407–452.
- SLADE, R. W., AND C. MORITZ. 1998. Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced ranges. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265:769–777.
- STEVAUX, M. N. 2002. A new species of *Bufo* Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 19:235–242.
- TIHEN, J. A. 1962. Osteological observations on New World *Bufo*. *American Midland Naturalist* 67: 57–183.

Accepted: 30 January 2007.

## APPENDIX 1

## Specimens Examined

*Chaunus achavali*: Brazil: Rio Grande do Sul State, Candiota Municipality, MCP 3937–3940, MCP 4374.

*Chaunus arenarum*: Argentina: Mendoza, MNRJ 14510–14513, MNRJ 34769. Baía Blanca, Buenos Aires, MNRJ 3871. BRAZIL: Rio Grande do Sul State, Rio Grande Municipality, CHUNB 39950–39952, Torres Municipality, MNRJ 725, MNRJ 5846, MNRJ 9351–9352, MNRJ 1746, MNRJ 9349, MNRJ 9346, MNRJ 9354. Ozório Municipality, MNRJ 38996–38997. “Praia da Cidreira” MNRJ 38976–38978, MNRJ 38982–38987. Paraná State, Ribeirão Claro Municipality, MNRJ 3883.

*Chaunus ictericus*: Brazil: São Paulo State, Atibaia Municipality, CHUNB 39960, Botucatu Municipality, CHUNB 39961–39966, 39978. Paraná State, Palma Municipality, MNRJ without number. Rio de Janeiro State, Nova Friburgo Municipality, MNRJ 32232–32238. Miguel Pereira Municipality, MNRJ 31739–31741. Restinga de Maricá, MNRJ 38989–38995. Santa Catarina State, Canoinhas Municipality, MNRJ 10451–10452, MNRJ 1975. São Paulo State, Campos do Jordão Municipality, MNRJ 28446–28456. Minas Gerais State, Além Paraíba Municipality, MNRJ 3105. Poços de Caldas Municipality, MNRJ 38988. Rio Grande do Sul State, Palmeira das Missões Municipality, MNRJ 3845.

*Chaunus jimi*: Brazil: Bahia State, Vitória da Conquista Municipality, MNRJ 16168–16170, MNRJ 2625. Juazeiro Municipality, MNRJ 1323. Pernambuco State, Caruaru Municipality, MNRJ 38622–38623. Rio Grande do Norte State, Mossoró Municipality, MNRJ 38588.

*Chaunus marinus*: Brazil: Amazonas State, Benjamin Constant Municipality, MNRJ 2575, MNRJ 11839–11841. Amapá State, Macapá Municipality, MNRJ 15440, MNRJ 4157. Roraima State, Pacaraima Municipality, MNRJ 38998–39001. Pará State, Obidos Municipality, MNRJ 20116. Belém Municipality MNRJ 32203. Maranhão State, Pindaré-Mirim Municipality, MNRJ 10367–10371, MNRJ 1930. Venezuela: Zulia State, Lago Maracaibo, MNRJ 37281.

*Chaunus schneideri*: Brazil: Distrito Federal, Brasília, CHUNB 39975. São Paulo State, CHUNB 39972–39974, 39976. Espírito Santo State, Conceição da Barra Municipality, MNRJ 20950–20951. Bahia State, Barreirinhas Municipality, MNRJ 1319–1321. Mato Grosso do Sul State, Bonito Municipality, MNRJ 39018–39019. Goiás State, Mambai Municipality, MNRJ 27893. Minas Gerais State, Lagoa Santa Municipality, MNRJ 1339, MNRJ 37003–37004. Belo Horizonte Municipality, AL 253–254 (paratypes of *Chaunus paracnemis*). Pernambuco State, Dormentes Municipality, MNRJ 30022–30023. PARAGUAY: NHMB 1916 (holotype of *C. schneideri*).

*Chaunus* sp. Brazil: Rio Grande do Norte State, Mossoró Municipality, MNRJ 38597.

*Chaunus rubescens*: Brazil: Distrito Federal, Brasília, CHUNB 39969–39960. Minas Gerais State, Belo Horizonte Municipality, AL 993 (paratype of *Chaunus rufus*). Presidente Olegário Municipality, MNRJ 34766, MNRJ 22470. Pirapora Municipality, AL 2414. João Pinheiro Municipality, MNRJ 3884–3845. Lagoa Santa Municipality MNRJ 1409.

*Chaunus veredas*: Brazil: Bahia State, Cocos Municipality CHUNB 40282, CHUNB 37437–37438, CHUNB 38652–38654, Minas Gerais State, Grande Sertão Veredas National Park, Chapada Gaúcha Municipality, MZUSP 128285A–128293A, Serra das Araras State Park, Serra da Araras Municipality, CHUNB 34106–34109, 34112–34114, Buritizeiro Municipality, CHUNB 43327–43333, Pirapora Municipality, MNRJ 1387, MNRJ 39014–39017, MNRJ 39051–39052, Corrente Farm, Várzea da Palma Municipality, MNRJ 39035, Piauí State, Estação Ecológica Uruçuí-Una, Uruçuí-Una Municipality, MNRJ 39050.

## **ANEXO 2**

*Rhinella cerradensis* sp. nov. (artigo publicado no periódico Zootaxa 1627: 23–39, 2007).



## A large new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Cerrado of Brazil

NATAN M. MACIEL<sup>1,3</sup>, REUBER A. BRANDÃO<sup>2</sup>, LEANDRO A. CAMPOS<sup>3</sup>, & ANTONIO SEBBEN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Toxinologia (LTx), Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Instituto de Ciências Biológicas (IB), Universidade de Brasília (UnB), ICC-Sul, Módulo 5, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

E-mail: nmaciел@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Florestal (EFL), Faculdade de Tecnologia (FT), Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Instituto de Ciências Biológicas (IB), Universidade de Brasília (UnB), ICC-Sul, Módulo 5, Campus Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

### Abstract

A new toad, *Rhinella cerradensis*, is described, including its tadpole and the advertisement call. The new species occupies Cerrado habitats in the Brazilian states of Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais, and Distrito Federal. The species is characterized by its large size; absence of tibial glands; well developed cranial crests; short hands; sexually dimorphic coloration; and by the absence of a spiracle tube of the tadpole. The new species is included in the *Rhinella marina* group by the presence of a jagged suture formed by the articulation between the pterygoid medial ramus and the parasphenoid alae, as well as other shared morphological features. Morphological characters and statistical analyses inferred by morphometric feature suggest the existence of two subgroups of species within *R. marina* group. However, taxonomic rearrangements are not made here and await phylogenetic analysis.

**Key words:** *Rhinella cerradensis* sp. nov., *Rhinella marina* group, Brazilian Cerrado, tadpole, advertisement call, osteology, morphological analyses

### Resumo

Uma nova espécie de sapo, *Rhinella cerradensis*, é descrita, incluindo o girino e o canto de anúncio. A nova espécie possui sua distribuição no Cerrado Brasileiro, nos estados do Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal. A espécie se caracteriza pelo grande porte; ausência de glândulas tibiais; cristas craniais bem desenvolvidas; mãos curtas; coloração distinta entre machos e fêmeas; e pela ausência no girino do tubo do espiráculo. A nova espécie deve ser incluída no grupo *Rhinella marina* pela presença de uma sutura formada pela articulação entre o ramo medial do pterigóide e a ala do paraesfenóide, além de outras características compartilhadas. Atributos morfológicos e análises estatísticas inferidas por dados morfométricos sugerem a existência de dois subgrupos dentre as espécies do grupo *Rhinella marina*. Entretanto qualquer arranjo taxonômico somente poderá ser feito quando suportado por uma análise filogenética.

**Palavras-chave:** *Rhinella cerradensis* sp. nov., grupo *Rhinella marina*, Cerrado Brasileiro, girino, canto de anúncio, osteologia, análise morfológica

### Introduction

The genus *Rhinella* Fitzinger, 1826 comprises 73 species distributed in North, Central and South America (Chaparro *et al.*, 2007; Frost, 2007). Despite recent changes in Bufonidae taxonomy (e.g., Frost *et al.*, 2006;



Pramuk *et al.*, 2007), the composition of the phenetic groups remains unchanged, including the *Rhinella marina* group which currently consists of nine species: *R. marina* (Linnaeus); *R. icterica* (Spix); *R. poeppigii* (Tschudi); *R. arenarum* (Hensel); *R. schneideri* (Werner); *R. rubescens* (A. Lutz); *R. jimi* (Stevaux); *R. achavali* (Maneyro, Arrieta and de Sá); and *R. veredas* (Brandão, Maciel and Sebben) (Frost, 2007).

Herein, we describe a new species of the *R. marina* group from Brazilian Cerrado that is morphologically similar to *R. icterica*, *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, and *R. jimi*. We assign the new species to the *R. marina* group based on the presence of a jagged or “scalloped” suture formed by the articulation between the medial ramus of the pterygoid and the parasphenoid alae (Pramuk, 2006), as well as other shared characters (Duellman & Schulte, 1992; Pramuk, 2006). We also provide descriptions of the tadpole and advertisement call. Morphological and morphometric comparisons with other species of the *R. marina* group provide insights concerning its present phenetic arrangement.

## Material and methods

Specimens used for the description and comparisons are deposited in Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB), Coleção Antonio Sebben-Universidade de Brasília (ASUnB), Museu Nacional (MNRJ), Adolpho Lutz collection (AL, housed at MNRJ), Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Naturhistorisches Museum (NHMB), and Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Measurements were made using digital calipers (to nearest 0.1 mm). Measurements of adults follow Brandão *et al.* (2007) and include the following twenty measurements: snout-vent length (SVL), head length (HL), head height (HH), head width (HW), maximum length of parotoid gland (PGL), maximum width of parotoid gland (PGW), tympanum diameter (TD), eye diameter (ED), eye to nostril distance (END), interocular distance (IOC) (distance between the canthal and preocular crests of each head side), interorbital distance (IOD) (minimum distance between the supraocular crests), internostril distance (IND), snout to nostril distance (SND), hand length (HAL), forearm length (FAR), upper arm length (UAR), tibia length (TIL), thigh length (THL), tarsus length (TL), and foot length (FL). The webbing formulae follow Heyer *et al.* (1990). Sex was determined by direct observation of secondary sexual characters including the presence of keratinous pointed spicules on dorsum, keratinized fingers and arms, and vocal sacs.

A principal component analysis (Marcus, 1990) was used to summarize morphometric differences among the species of the *R. marina* group. We log-transformed each measurement prior to the analysis, including a total of 294 specimens of all recognized species in the *R. marina* group with the exception of *R. poeppigii*. We measured the following number of specimens of each species: *R. marina* (n=103); *R. icterica* (n=29); *R. arenarum* (n=25); *R. schneideri* (n=27); *R. rubescens* (n=49); *R. jimi* (n=9); *R. achavali* (n=5); *R. veredas* (n=29), and *R. cerradensis* sp. nov. (n=18). The PCA was applied to the correlation matrix obtained from eleven log<sub>10</sub>-transformed measurements. We analyzed the following log<sub>10</sub>-transformed measurements: snout-vent length; head height; head length; head width; maximum length of parotoid gland; maximum width of parotoid gland; tympanum diameter; hand length; hand, forearm, and upper arm length (for the PCA we used a measurement formed by a combination of the last three measurements); foot length; and thigh, tibia, tarsus, and foot length (for the PCA we used a measurement formed by a combination of the last four measurements).

Measurements of the tadpoles and terminology followed Altig and McDiarmid (1999). The following eight measurements were taken: body length (BL), internarial distance (IND), interorbital distance (IOD), maximum tail height (MTH), tail length (TAL), total length (TL), tail muscle height (TMH), tail muscle width (TMW). The developmental stages follow Gosner (1960). Tadpoles were collected in a temporary pond in an open area (Campo Sujo, open grassland with scattered bushes and small trees) at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília (CIAB), Brasília municipality, Distrito Federal, Brazil. We found pairing adults of the new species in this area on the date the tadpoles were collected. The new species was also found breeding in a



permanent pond. The tadpoles were compared with descriptions of other species of the *R. marina* group (Rosa, 1951; Savage, 1960; Rosa, 1965; Cei, 1980; Heyer *et al.*, 1990; Eterovick & Sazima, 1999). Specimens used in descriptions are deposited in Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB).

Osteological features were taken from dry (n=1) and double-cleared and stained (n=2) specimens. Specimens were cleared and stained following the protocols of Taylor & Van Dyke (1985), and Hanken & Wassersug (1981). For osteological descriptions we used mainly the cranial features presented by Pramuk (2006). Morphological observations and photographs were made with digital cameras. Specimens are housed in Coleção Antonio Sebben (ASUnB), Universidade de Brasília.

The advertisement call was recorded with a digital Gama Power model IC Recorder GP 8DR. A total of four calls were recorded. The audiospectrograms were prepared in Soundruler software (Gridi-Papp, 2004). FFT at 2048 points was used to analyze the call. The sample rate was set at 22050Hz and frequency resolution at 21.5Hz with 16 bit resolution. The results were compared to the advertisement calls of sympatric species of *R. marina* group, *R. schneideri* (Köhler *et al.*, 1997) and *R. rubescens* (Haddad *et al.*, 1988; present work). The advertisement call of the new species was also compared to others in the literature (Martin, 1972; Heyer *et al.*, 1990; Straneck *et al.*, 1993; De La Riva *et al.*, 1996; Crocroft *et al.*, 2001). We re-analyzed the advertisement call of *R. icterica* provided by Heyer *et al.* (1990). The call of *R. arenarum* (provided by Straneck *et al.* 1993) was digitalized with Adobe Audition Software (sample rate 22Hz, 16 bits resolution) and analyzed. We also analyzed five advertisement calls of *R. marina* from Tambopata, Peru (Crocroft *et al.*, 2001), and 13 advertisement calls of *R. rubescens* from Brasília municipality, Distrito Federal, Brazil, using FFT at 512 points. The terminology used for the description and comparisons of advertisement calls typically followed Heyer *et al.* (1990).

## Results

### *Rhinella cerradensis* sp. nov.

(Figs. 1–3)

**Holotype:** Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília (CHUNB 49573), adult male collected at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil (14°49'S; 45°58'W) in November 2002, by N.M. Maciel, R.H. Matsushita, A.Q. Teixeira Jr., and B. A. Duar.

**Paratypes:** CHUNB 40276, 40277, 40280, 49281 (males), 40278, 40279 (females), collected along with the holotype; CHUNB 40273–40275 (females), collected at Rio Pratudão Farm, Correntina Municipality, Bahia State, in October 1996 by R.A. Brandão; CHUNB 13790–13791 (females), collected at Emas National Park, Mineiros Municipality, Goiás State, in November 1998 by R.A. Brandão; CHUNB 38669 (male), collected at Jardim Botânico, Brasília, Distrito Federal, in January 2001 by B.A. Duar; CHUNB 25043 (female), collected at Brasília, Distrito Federal, in September 2001 by O. R. Pires Jr.; CHUNB 38655, 38656 (females), 38658 (juvenile), collected at Trijunção Farm, Cocos Municipality, Bahia State, in October 2001, by R.A. Brandão; CHUNB 29386 (male), collected at Brasília, Distrito Federal, in August 2002 by D.S. Diniz; CHUNB 39979–39980 (females), collected at Trijunção Farm, Cocos Municipality, Bahia State, (data not recorded) by R.A. Brandão; CHUNB 39953 (female), collected at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília, Brasília, Distrito Federal, in January 2003, by N.M. Maciel; CHUNB 38668 (male), collected at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília, Brasília, Distrito Federal, in August, 2003, by N.M. Maciel, R.H. Matsushita, and R.A. Brandão (advertisement call recorded); CHUNB 38667 (female), 38670–38671 (males), collected at Trijunção Farm, Cocos Municipality, Bahia State, in October 2004, by R.A. Brandão, N.M. Maciel and A. Sebben; CHUNB 43864 (female), collected at São Domingos Municipality, Goiás State, in November 2004. Species measurements are provided in Table 1.

**TABLE 1.** Means, Standard Deviation (SD), and ranges of *Rhinella cerradensis* (n = 11 males and n = 15 females).

Variables	Males (n=11)		Females (n=15)	
	Mean ( $\pm$ SD)	Ranges	Mean ( $\pm$ SD)	Ranges
Snout-vent length	120.4 ( $\pm$ 13.4)	103.3–147.1	114.5 ( $\pm$ 20.1)	82.0–143.0
Head length	35.8 ( $\pm$ 3.2)	32.9–41.8	33.3 ( $\pm$ 5.4)	24.5–40.3
Head height	23.7 ( $\pm$ 3.3)	19.4–29.3	23.5 ( $\pm$ 3.7)	18.3–30.3
Head width	43.3 ( $\pm$ 4.9)	38.5–52.9	41.4 ( $\pm$ 6.2)	32.7–50.9
Max. length of parotoid gland	29.1 ( $\pm$ 5.7)	22.4–42.7	26.8 ( $\pm$ 6.1)	17.1–37.8
Max. width of parotoid gland	14.5 ( $\pm$ 3.9)	10.8–23.2	14.7 ( $\pm$ 2.8)	11.3–20.0
Tympanum diameter	9.0 ( $\pm$ 0.8)	8.0–10.4	7.9 ( $\pm$ 0.9)	6.3–9.6
Eye diameter	13.2 ( $\pm$ 1.2)	11.4–16.0	12.7 ( $\pm$ 2.0)	9.5–16.2
Eye to nostril distance	6.6 ( $\pm$ 1.2)	4.8–8.3	5.9 ( $\pm$ 0.8)	4.5–7.3
Interocular distance	16.0 ( $\pm$ 2.0)	13.7–19.6	15.4 ( $\pm$ 2.0)	12.0–18.3
Interorbital distance	16.6 ( $\pm$ 1.8)	13.3–18.9	15.2 ( $\pm$ 2.5)	12.3–20.2
Inter-nostril distance	8.0 ( $\pm$ 1.0)	7.0–9.9	7.8 ( $\pm$ 1.3)	6.0–9.8
Snout to nostril distance	4.5 ( $\pm$ 0.8)	3.5–6.4	4.2 ( $\pm$ 0.8)	3.2–5.7
Hand length	28.3 ( $\pm$ 3.4)	23.9–34.5	25.1 ( $\pm$ 4.0)	19.5–32.0
Forearm length	30.0 ( $\pm$ 3.3)	26.0–36.1	25.8 ( $\pm$ 4.5)	16.6–33.5
Upper arm length	23.2 ( $\pm$ 4.3)	16.6–29.8	17.3 ( $\pm$ 4.4)	9.8–24.4
Tibia length	47.8 ( $\pm$ 5.4)	40.4–58.5	41.6 ( $\pm$ 7.5)	29.9–52.1
Thigh length	52.0 ( $\pm$ 7.1)	43.8–65.9	45.1 ( $\pm$ 8.6)	31.6–60.0
Tarsus length	29.4 ( $\pm$ 4.9)	24.4–40.3	24.7 ( $\pm$ 4.5)	16.3–30.1
Foot length	47.8 ( $\pm$ 4.9)	41.0–54.9	40.7 ( $\pm$ 7.0)	27.8–52.7

**Diagnosis and comparisons with other species:** A medium to large sized species, similar to *R. icterica*, *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, and *R. jimi* mostly by the well developed cranial crests, long and broad parotoid gland, head wider than long, and morphometric features (see morphometric analysis section). *Rhinella cerradensis* has the following unique combination of features within the *R. marina* group: medium to large size, (males 120.4 ( $\pm$ 13.4) mm, ranging 103.3–147.1 mm and females 114.5 ( $\pm$ 20.1) mm, ranging 82.1–139.8 mm); head wider than long; well developed cranial crests, with evident spicules; snout in dorsal view mucronate to truncate and obtuse in lateral view; a medium sized parotoid gland, parotoid gland elliptical, yellowish, with a high density of keratinous pointed spicules; pointed spicules present on dorsal glands, fore, and hind limbs; tibial gland absent; dorsum uniform brownish to dark green and venter brownish white in males; females with brownish green dorsum, but with black coloration in many areas (sometimes also in hind limbs), resembling *R. icterica* female coloration; a jagged or “scalloped” suture formed by the articulation between the medial ramus of the pterygoid and the parasphenoid alae. The new species can be quickly distinguished from *R. schneideri* and *R. jimi* by the smaller body and parotoid gland size and by the absent of tibial gland (PGL in *R. schneideri* 28.9 ( $\pm$ 9.8) mm (n=27), *R. jimi* 34.8 ( $\pm$ 11.8) mm (n=9), and *R. cerradensis* 27.5 ( $\pm$ 7.7) mm (n=18)). From *R. icterica* the new species can be distinguished by size of parotoid gland (larger and rounded in *R. icterica*, PGL=29.7 ( $\pm$ 9.6) mm (n=29)); by a less developed preocular crest; by narrow head (wide in *R. icterica*); by tympanum without folded skin (present in *R. icterica*); and by smaller hand (HAL in *R. cerradensis* 25.7 ( $\pm$ 6.0) mm (n=18) and in *R. icterica* 26.7 ( $\pm$ 6.1) mm (n=29)). From *R. marina*, *R. cerradensis* can be distinguished by shape of parotoid gland (almost rounded in *R. marina*); by narrower and longer head (wider in *R. marina*). From *R. veredas*, it can be easily distinguished by complete supraocular crest and by dorsal coloration of the male. From *R. rubescens*, it can be distinguished by its larger size

(SVL=115.5 ( $\pm 26.4$ ) mm (n=18) in *R. cerradensis* and 69.1 ( $\pm 23.4$ ) mm in *R. rubescens* (n=49)); shape of parotoid gland (long and narrow in *R. rubescens*); wider head (LC=23.2 ( $\pm 7.4$ ) mm in *R. rubescens* (n=49)); snout profile (sub-elliptical in dorsal view in *R. rubescens*), cranial crests developed (weakly developed in *R. rubescens*); and dorsal glands with keratinous spicules on body (smooth in *R. rubescens*). From *R. arenarum*, it can be distinguished by larger size (SVL= 87.3 ( $\pm 11.0$ ) mm in *R. arenarum* (n=25)); parotoid gland shape (long and narrow in *R. arenarum*), by more developed cranial crests (weakly developed in *R. arenarum*); tongue long and narrow (rounded and short in *R. arenarum*); and by dorsal male coloration. From *R. achavali* it can be distinguished by larger size (SVL= 95.4 ( $\pm 6.2$ ) mm in *R. achavali* (n=5)), shape of parotoid glands (long and narrow in *R. achavali*); by dorsal male coloration; by pointed spiculae on body glands; and by the rough skin.



FIGURE 1. Adult male of *Rhinella cerradensis* from Brasília, DF, Brazil. Photo by Natan Maciel.

**Description of the holotype:** General aspect robust (Fig. 1A). Head wider than long; SVL approximately 2.7 $\times$  head width; snout mucronate to truncate in dorsal view and obtuse in lateral view (Figs. 3A and 3B); almost all cranial crests present and developed, parietal crest absent; pre-tympanic and rostral crests well developed; supranasal crest evident with rugosities, produced by cranial striations; supratympanic crest developed, in contact with the parotoid gland; cranial crests keratinized, especially the supraocular crest; loreal region smooth; nostrils large, with lateral elliptic openings directed upward; interorbital distance and eye diameter equal in length; eye diameter about 1.5 $\times$  tympanum diameter; eyelid large, with small keratinous spicules; tympanum visible, well developed, rounded; dorsum of head flat, with small rounded spicules. Parotoid gland evident, elliptical, with keratinous spicules; parotoid length about 2.6 $\times$  its width. Tongue longer than wide, smooth, with one single superficial central fold, free in its posterior end, attached to jaw; vomerine teeth absent; choanae elliptical. Fingers thin and developed (Fig. 3C); forearm and arm robust; relative finger length II < IV < I < III; fingers without webbing; tips of fingers keratinized and dark in dorsal view; subartic-



ular tubercles at base of all fingers; subarticular tubercles present between phalanges II and III of finger III, subarticular tubercles on phalange III of finger III; outer palmar tubercle large and rounded; inner palmar tubercle rounded at base of finger I. Nuptial pads evident, dorsally visible on fingers I and II. Toes with broad lateral fringes, toe tips keratinized and dark, relative toe lengths  $I < V < II < III < IV$ ; small subarticular tubercles present on toes, between phalanges II and III on toes III, IV and V. Foot webbing present and well developed; foot webbing formula I 2-2/2 II 1-3 III 2-3/2 IV 3/2-2 V; outer metatarsal tubercle small oval; inner metatarsal tubercle well developed and elongate, weakly keratinized. Metatarsal fringe present, beginning at tip of toe I, covering 2/3 of metatarsal length (the fringe is interrupted by inner metatarsal tubercle); plantar surface with small, conical callosities. Dorsal skin rough; dorsum covered by rounded and oval glands of different sizes; all glands with black and pointed keratinized spicules; spicule number varies with gland size; glands are smaller and more dense on anterior and posterior limbs. Measurements of holotype (in mm): SVL 109.9; HL 32.8; HH 21.0; HW 40.6; PGL 28.9; PGW 10.8; TD 8.8; ED 13.3; END 4.9; IOC 14.1; IOD 15.0; IND 7.5; FN/DFN 4.1; HAL 26.6; FAR 20.5; UAR 17.3; TIL 47.5; THL 49.8; TL 27.7; and FL 50.2.



**FIGURE 2.** An amplexant pair of *Rhinella cerradensis* from Brasília, DF, Brazil. Photo by Rubens Hisanari Matsushita.

**Morphometric analyses:** The PCA suggests the presence of two morphological subgroups in species of *R. marina* group (Fig. 4). A subgroup of species represented by the white symbols, composed by *R. marina*, *R. icterica*, *R. schneideri*, *R. jimi*, and *R. cerradensis* and another represented by the black symbols, consisting of *R. arenarum*, *R. rubescens*, *R. achavali*, and *R. veredas*. The first two scores account for a total of 94.8% of the variance. The first component accounts for 88.4% of the variance and showed high and positive scores. The second component accounts for 6.4% of the variance and showed positive higher values for tympanum diameter and foot and leg lengths, and negative values for parotoid gland length (Table 2). Examination of factor loadings suggested the formation of two subgroups. The first subgroup (white symbols) is composed of the larger sized species, with developed and marked cranial crests, relatively smaller tympanum, and shorter

limb length. The second subgroup (black symbols) is formed by the smaller species with less developed cranial crests and relatively longer parotoid glands (Fig. 4).

**TABLE 2.** PCA Scores for the first two factors with logarithmized body measurements and percentage of variation explained, for nine species of *Rhinella marina* species group (n=294).

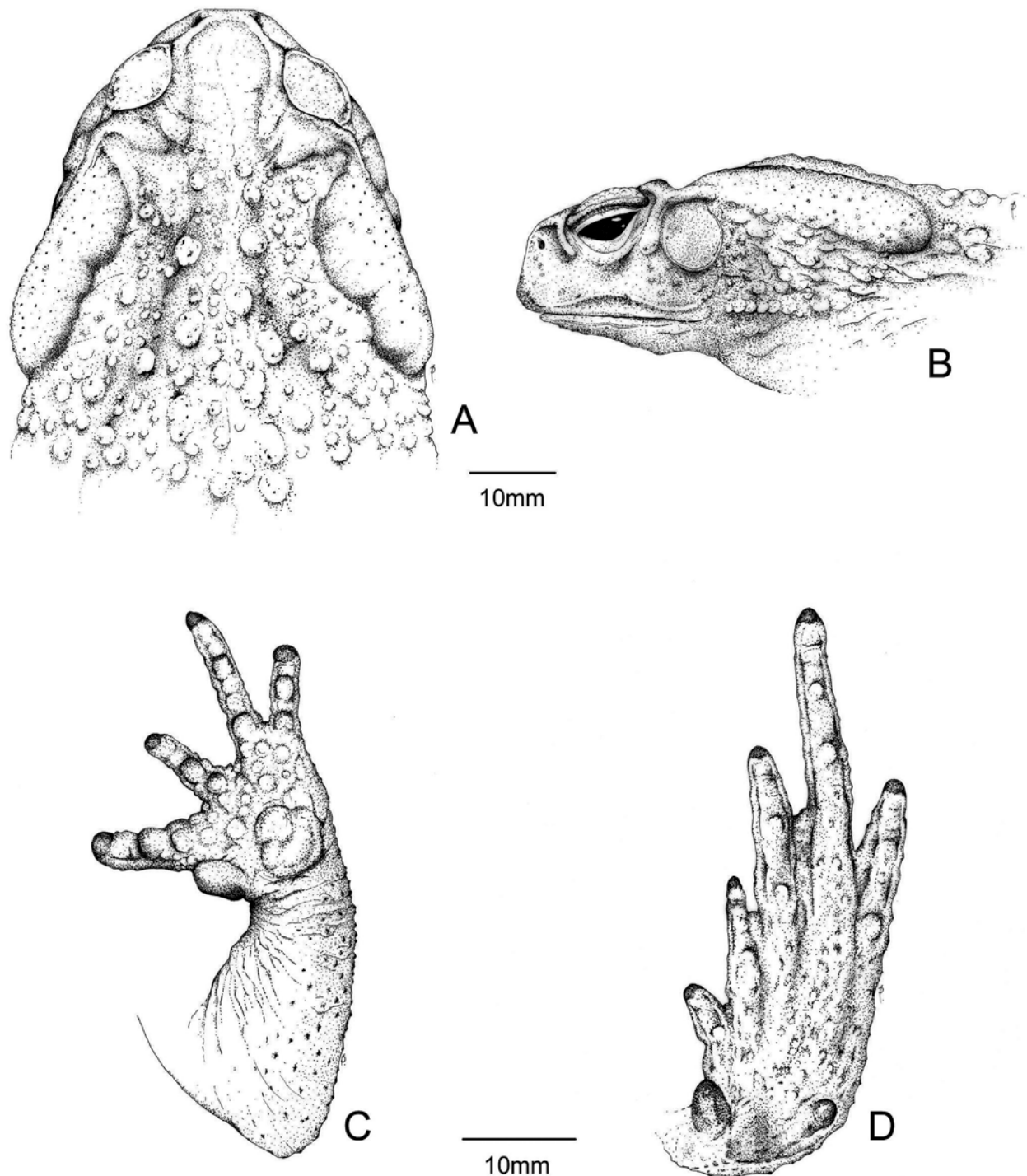
Variables	Score 1	Score 2
Snout-vent length	0.561	0.881
Head height	0.511	0.431
Head length	0.556	0.653
Head width	0.595	0.620
Max. length of parotoid gland	0.706	0.326
Max. width of parotoid gland	0.820	−6.549
Tympanum diameter	0.507	2.897
Hand length	0.597	0.635
Hand, fore arm, and upper arm length	0.592	0.700
Foot length	0.596	1.255
Thigh, tibia, tarsus, and foot length	0.613	1.111
Variance explained	88.39%	6.38%

**Coloration:** Sexual dimorphism is well marked in coloration (Fig. 2). In life, males have a brownish green dorsum (sometimes a dark green dorsum) and a brownish white venter. Females have the same brownish green dorsum and brownish white venter of the male, but show black coloration in many areas of dorsum (sometimes also on hind limbs). In this respect, the females of this species resemble *R. icterica* females. The coloration of preserved specimens resembles the coloration of males and females in life, but the parotoid glands turn yellowish.

**Description of the tadpole:** Descriptions are based on a tadpole series (CHUNB 49574) collected at Estação Rádio, Centro de Instrução e Adestramento de Brasília, Brasília Municipality, Distrito Federal on 31 August 2002, by N.M. Maciel and R.H. Matsushita. Tadpole series measurements are provided in Table 3. Measurements of the specimen used for description (Fig. 5) (in mm): BL 9.72; IND 1.30; IOD 2.90; MTH 4.30; TAL 12.64; TL 21.76; TMH 1.50; TMW 1.65. The specimen used for description is in stage 40 (Gosner, 1960) (Fig. 5). Body elliptical in lateral (Fig. 5A) and dorsal views (Fig. 5B). Body 76% of tail length and 45% of total length; body wider than deep; snout rounded in lateral and dorsal views; eyes dorsal, directed laterally; distance between eyes 2.2× the distance between nostrils; nostril opening kidney shape; spiracle sinistral, near to midbody axis, opening in the body wall, without external tube. Vent tube medial (easily visible in tadpoles in early stages). Tail musculature gradually tapering to rounded tip. Caudal fin fusiform; dorsal fin about same height as ventral fin. Color in preservative uniform, dark brown. Oral disc anteroventral, and emarginated laterally in lower and upper jaw. LTRF 2(2)/3(1); A2 slightly longer than A1, P1 slightly shorter than A1 and longer than P2 and P3. Lower jaw serrate and shallowly V-shaped. The majority of tadpole specimens are in stages 40–42. The tadpoles in stage 42 differed from those in stage 40 mainly by the development of hindlimbs, presence of emerged forelimbs, more rounded snout, and shorter body.

The tadpoles described from species of the *R. marina* group and those of the new species are similar in general shape (Rosa, 1951; Savage, 1960; Rosa, 1965; Cei, 1980; Heyer *et al.*, 1990; Eterovick & Sazima, 1999). According to Eterovick & Sazima (1999) the tadpoles of *R. rubescens* are more similar to those of *R. schneideri* in body proportions and spiracle position, while the tadpoles of *R. arenarum* more closely resemble those of *R. icterica*. The tadpoles of the new species resemble *R. rubescens* and *R. schneideri* in body proportions and spiracle position.





**FIGURE 3.** *Rhinella cerradensis*, CHUNB 49573 (holotype) adult male (A) dorsal view of head, (B) lateral view of head, (C) palmar view of manus, (D) plantar view of pes. Drawings by Pedro Aquino.

The tadpole of *R. cerradensis* can be diagnosed by body proportions, spiracle position, and the absence of an external spiracular tube, with the opening in the body wall (Fig. 5A). The absence of an external tube is unique among the tadpoles described of the *R. marina* group.

**Osteological features:** Skull with the robust general aspect of the species of *Rhinella marina* group (*sensu* Pramuk, 2006). The specimens analyzed have extremely well-ossified and exostosed crania that are ornamented with deep striations, pits, and rugosities. The cranium is wider than long, with the greatest width at the level of the quadratojugals, as it is characteristic of other species of the group. All cranial crests present,

with the exception of the parietal crest (Fig. 6). The Arabic numbers between quotations marks in the text indicate skull features of the new species (see Fig. 6). A detailed description of cranial features follows. Alary process of premaxilla postero-laterally positioned; premaxillary bones are miss in the figure, frequently split during osteological bufonid preparations; vertical process of maxilla flattened laterally but dilated medially, maxillary crest well developed (5) (Fig. 6B and C); nasals in contact medially (1), anterior tips of nasals ventrally projected, ornamentations along edges forming the canthal (3) and supraorbital crests (4) (Fig. 6A); vertical arm of nasals robust on top and flattened on bottom; anterior portion of frontoparietal with rectangular shape, posterior portion projected at posterior end of skull, composing apical part of *foramen magnum* (2); frontoparietal not contacting prootic process (2) (Fig. 6A); medial area of frontoparietal large, with a portion that does not compound cranial box; this lateral portion bends in a plane approximately 90° relative to roof of skull, forming supraorbital crests; in this configuration there is no ventral groove for occipital artery. Supraorbital crests ornamented, composing a continuum with canthal crest; squamosal with a great mosaic of planes and processes, formed mainly by dorsal, vertical, and medial planes, medial plane blade-shaped, poorly developed, and projected to maxillary bone, horizontally oriented and poorly developed posteriorly; a large medial projection (otic plate) on top of squamosal; exoccipitals not fused one with another; a well developed prootic process that does not touch frontoparietal; a jagged or “scalloped” suture formed by articulation between pterygoid medial ramus (8) and the parasphenoid alae (7) (Fig. 6B and 6C; *sensu* Pramuk, 2006); neopalatine bone bearing a blade-like projection (Fig. 6B and 6C); dorsal surface of sphenethmoid covered completely by medial articulation of nasals and frontoparietals (6); nasals not expanded dorsolaterally (as they are in *R. granulosa* species group), and forming a transverse suture with frontoparietals; jaw articulation lies posterior to level of the *fenestra ovalis*; and with a complete temporal arcade (*sensu* Pramuk, 2006).

**TABLE 3.** Measurements (in millimetres) of 19 tadpoles of *Rhinella cerradensis* (stages 32–42). The developmental stages follow Gosner (1960).

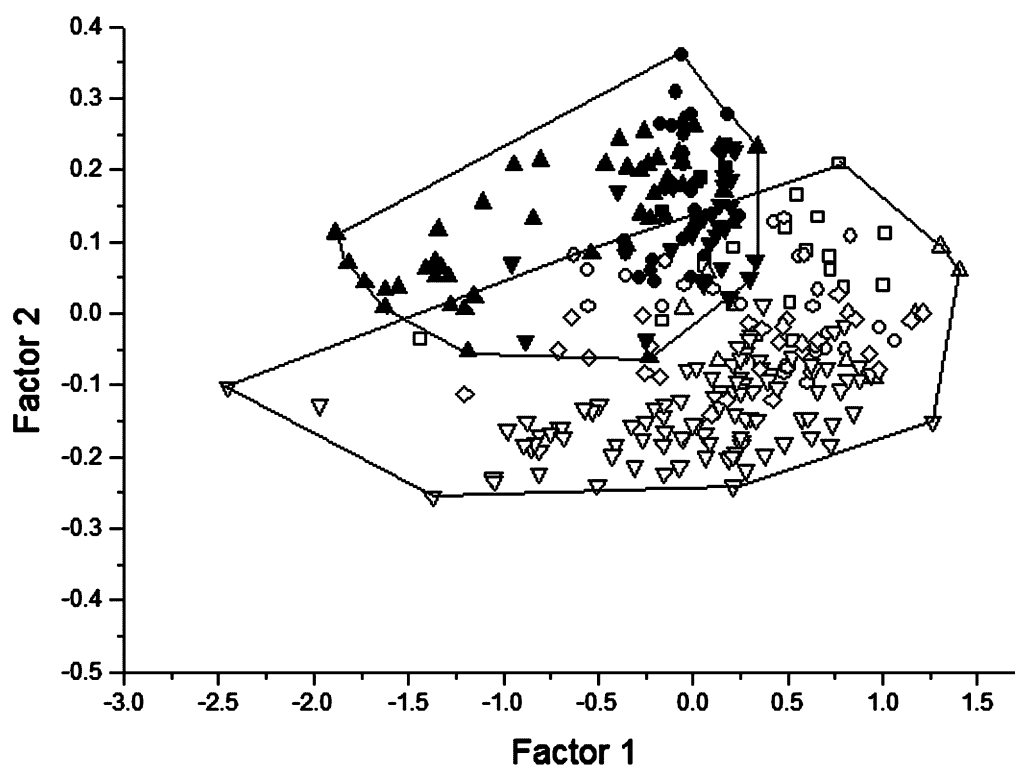
Variables	Mean ( $\pm$ SD)	Ranges
Body length (BL)	8.93 ( $\pm$ 0.63)	8.03–10.02
Internarial distance (IND)	1.26 ( $\pm$ 0.15)	1.00–1.55
Interorbital distance (IOD)	2.78 ( $\pm$ 0.20)	2.40–3.00
Maximum tail height (MTH)	3.60 ( $\pm$ 0.41)	2.95–4.30
Tail length (TAL)	11.65 ( $\pm$ 1.46)	9.66–13.92
Total length (TL)	20.08 ( $\pm$ 1.68)	17.76–22.91
Tail muscle height (TMH)	1.51 ( $\pm$ 0.15)	1.30–1.75
Tail muscle width (TMW)	1.21 ( $\pm$ 0.23)	0.90–1.75

**Advertisement call:** The recording was made at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília, Brasília, Distrito Federal in August 15 2003, 22:30h. The air temperature was 17.1°C, with 73% relative humidity. The specimen has SVL=117.7 mm. The advertisement call graphics are shown in Figure 7. The calls were variable in duration (1.9–12.4 s). Mean call rate was  $9.8 \pm 0.6$  notes per second. (19–129 notes per call). Note rate and note interval were based on the means of 10 notes of the calls. The mean note rate was  $44.7 (\pm 2.41)$  ms and the interval among note average  $66.5 (\pm 2.17)$  ms; each note was formed by three pulses (Fig. 7B). Dominant and fundamental frequencies were also determined from five notes from various parts of the calls. Mean dominant and fundamental frequencies were  $839.0 (\pm 8.9)$  Hz and  $421.0 (\pm 3.3)$  Hz, respectively.

The advertisement call of *R. cerradensis* resembles that of other species in the *R. marina* group. Although the calls of the *Rhinella marina* species group are conservative, they present some differences. The notes per advertisement call of *R. cerradensis* is more variable than *R. schneideri* (33–40; Köhler *et al.*, 1997), *R. icterica* (4–20; Heyer *et al.*, 1990), *R. poeppigii* (10–45; De La Riva *et al.*, 1996), *R. arenarum* (61–107; Straneck

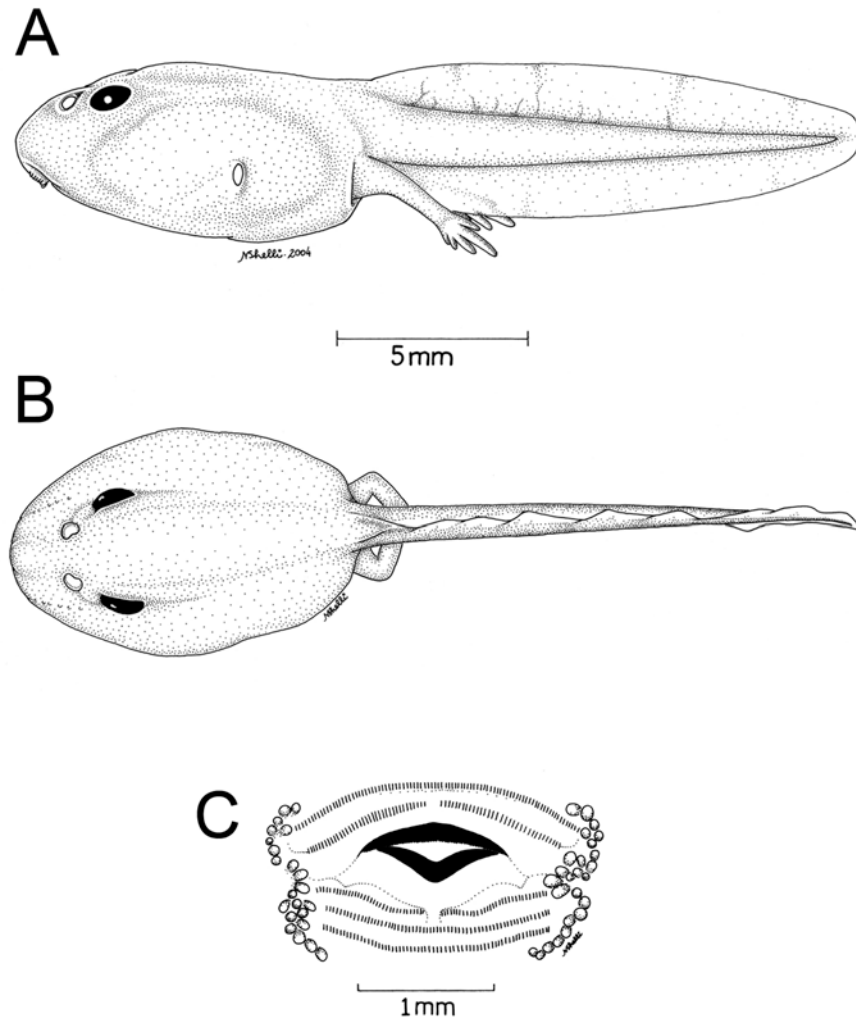


*et al.*, 1993), *R. marina* (19–25; Crocroft *et al.*, 2001), and *R. rubescens* (5–25) (present work). The number of pulses per note of the new species (three) is equal to those of *R. schneideri* (Köhler *et al.*, 1997), and *R. arenarum* (Straneck *et al.*, 1993), while in *R. icterica* they range from one to three (Heyer *et al.*, 1990), three to five in *R. poeppigii* (De La Riva *et al.*, 1996), five pulses in *R. marina* (Crocroft *et al.*, 2001), and two pulses in *R. rubescens* (present work). The advertisement call of *R. schneideri* has a second power peak of 2100 Hz above the dominant frequency (Köhler *et al.*, 1997). *Rhinella icterica* (Heyer *et al.*, 1990), *R. rubescens* (Haddad *et al.*, 1988), *R. marina* (Crocroft *et al.*, 2001), *R. poeppigii* (De La Riva *et al.*, 1996), *R. arenarum* (Straneck *et al.*, 1993), and the new species lack the second power peak. However, the spectrogram of *R. arenarum* provided by Martin (1972) showed a second power peak above the dominant frequency. The re-analyzed call of *R. icterica* (Heyer *et al.*, 1990) presented a lower fundamental and dominant frequencies of 324.9 ( $\pm 4.5$ ) and 646.0 ( $\pm 0.2$ ) Hz than *R. cerradensis* 421.0 ( $\pm 3.3$ ) and 839.0 ( $\pm 8.9$ ) Hz. Conversely, *R. marina* (Crocroft *et al.*, 2001) showed higher fundamental and dominant frequencies of 559.9 and 1119.7 Hz (with no frequency variation among notes) among these three species (*R. icterica*, *R. cerradensis*, and *R. marina*). The advertisement call of *R. arenarum* (Straneck *et al.*, 1993) presented a dominant frequency of 1348 ( $\pm 18.3$ ) Hz, similar to *R. rubescens*, dominant frequency of 1015.6 ( $\pm 41.1$ ) Hz.



**FIGURE 4.** Distribution of the species of *Rhinella marina* group in the two first principal components. The PCA suggested the presence of two morphological subgroups within the *R. marina* group indicated by the white and black symbols.

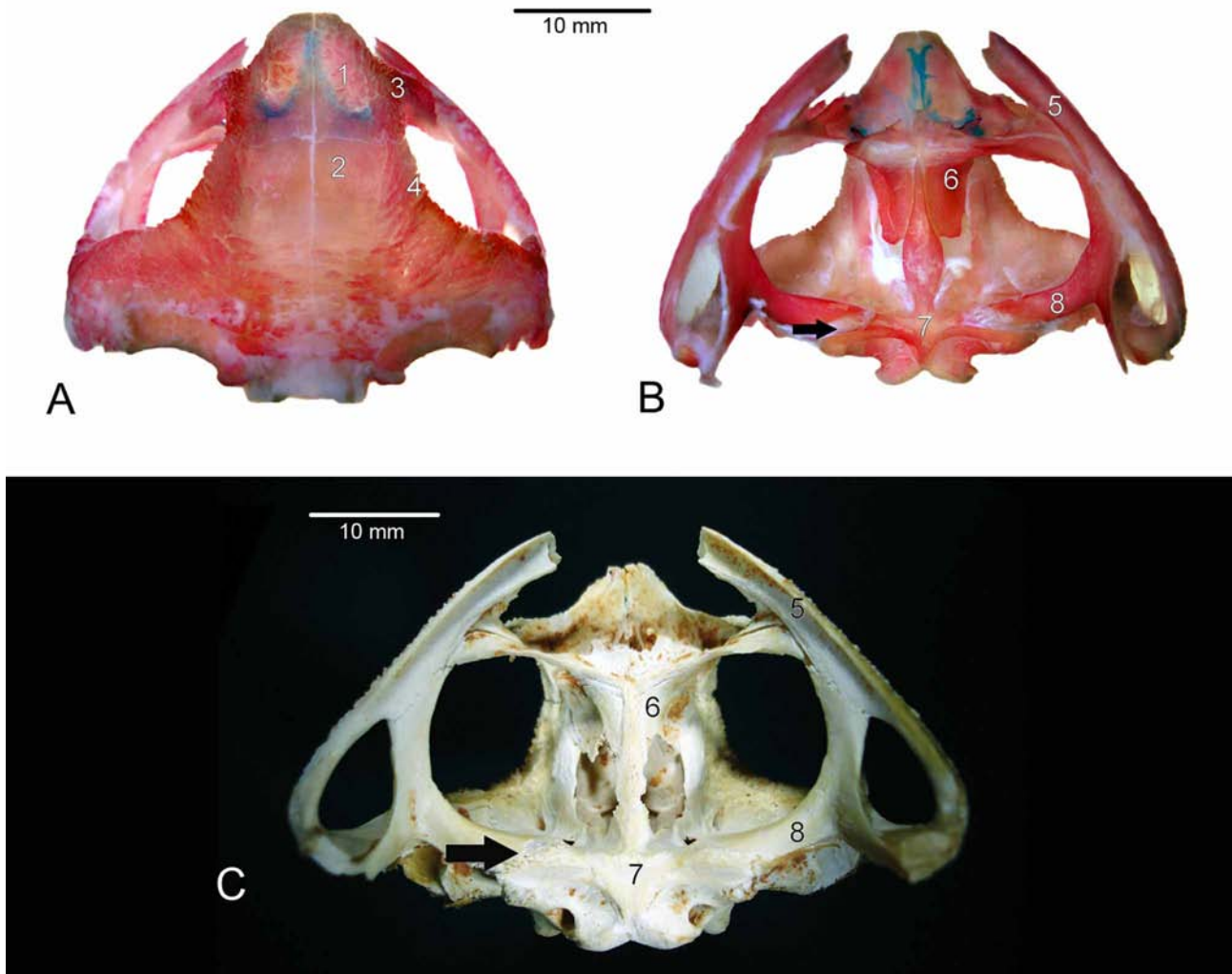
**Etymology:** “Cerrado” is the second largest South American biome and nearly restricted to Brazil. It can be characterized as a complex mosaic landscape composed of savanna, grassland and forest physiognomies, determined by soil fertility, natural fires, and water availability (Ribeiro & Walter, 2001). Despite the great number of endemic and rare species, the Cerrado is severely threatened by increasing deforestation, charcoal production, and large hydroelectric dams. As a result the Cerrado was recognized as one of the world’s biodiversity hotspots (Myers *et al.*, 2000). The known distribution of *R. cerradensis* is restricted to the Brazilian Cerrado biome. So, the specific name is in recognition of this important, poorly known and endangered biome; it is used as a noun in apposition.



**FIGURE 5.** Tadpole of *Rhinella cerradensis*, (A) lateral view, (B) dorsal profile, (C) oral disc. Stage 40 of Gosner (1960). Drawings by Núbia Shelly.

**Distribution:** *Rhinella cerradensis* has a large distribution in the Cerrado, occurring in the Brazilian states of Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais, and Distrito Federal (Fig. 8).

**Natural history notes:** Field observations were made in the states of Distrito Federal, Bahia, and Goiás. We have carried out studies at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília (CIAB) since 2001. *Rhinella cerradensis* was observed in March (end of the rainy season), and August to October of 2002 (from dry season to just before the beginning of the rainy season), when periodical visits were made to the area. Adults were always found in open Cerrado physiognomies (Cerrado and Campo Sujo; see Ribeiro & Walter 2001 for an account of the Cerrado physiognomies). We observed the reproductive activity, recorded the advertisement call, and collected tadpoles. We found a carcass of an adult male of *R. cerradensis* completely eviscerated with untouched secretory parotoid glands. *R. schneideri* and *R. rubescens* were also found breeding in the same permanent pond at Brasília. In Emas National Park we recorded a *Conepatus striatus* (Mammalia: Mustelidae) feeding upon an adult *R. cerradensis*. The new species is sympatric with *R. schneideri* and *R. veredas* in western Bahia and Piauí states, and with *R. schneideri*, and *R. rubescens* in the states of Distrito Federal and Goiás. Until now few observations on the natural history of the new species exist, and only four advertisement calls have been recorded. The elongate and well developed inner metatarsal tubercle suggests that *C. cerradensis* might bury itself during the dry Cerrado season as do other Neotropical species (e.g., *Eupemphix nattereri*, *Pleurodema diplolistris*, and *Odontophrynus cultripes*).



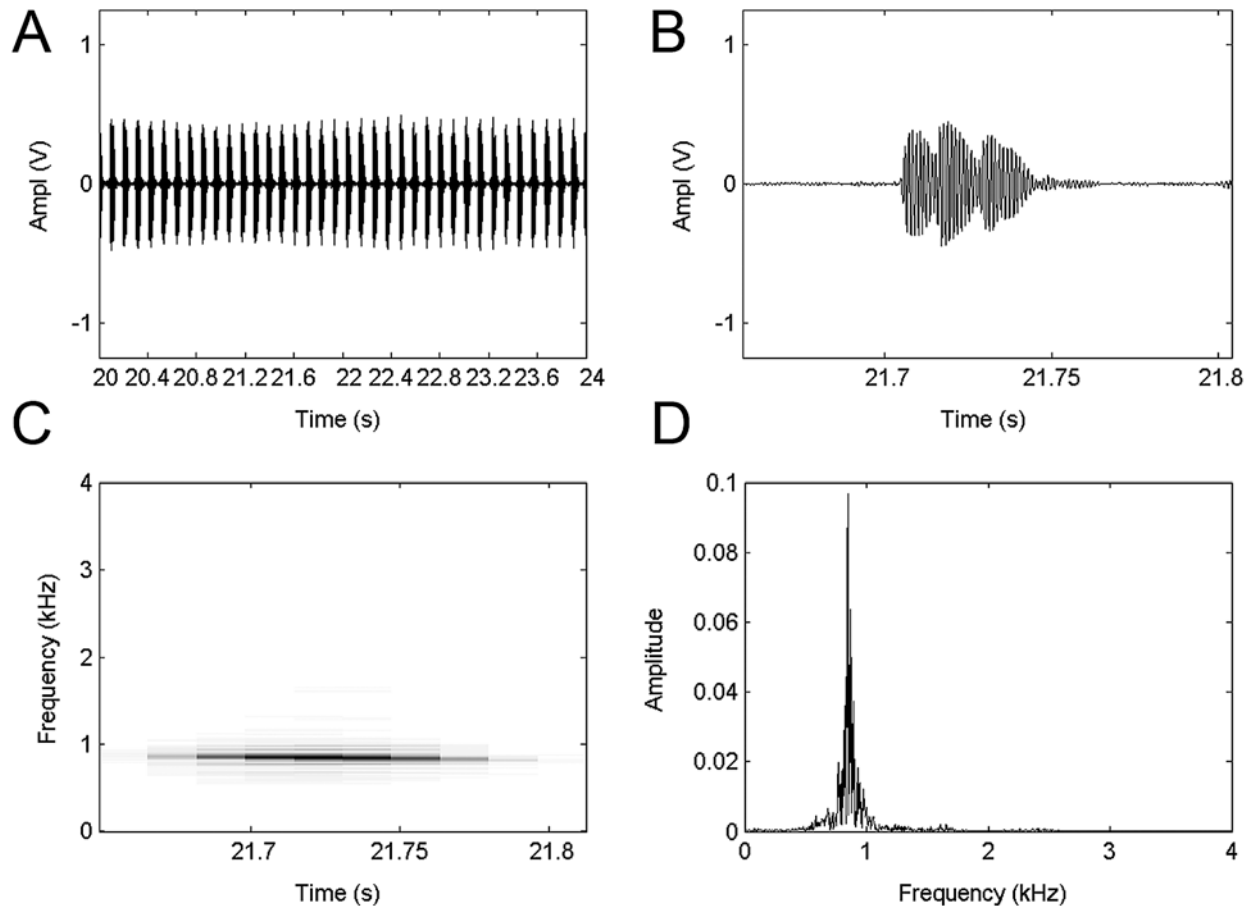
**FIGURE 6.** Double-cleared and stained skull of *Rhinella cerradensis* (male, ASUnB 2554). (A) Dorsal view, and (B) ventral view. The blue area stained by alcian blue is cartilage. (C) Ventral view of the macerated skull of *Rhinella cerradensis* (male, ASUnB 2553). The arrows indicate the unique morphological synapomorphy of the *Rhinella marina* group. The Arabic numbers indicate skull features of the new species (see details in the text). The premaxillae are missed in the figure. Photos by Patrícia Wanderley and Leandro Campos.

## Discussion

Recently Pramuk *et al.* (2007) published a phylogenetic hypothesis of Bufonidae based on the analysis of 2521 bp of DNA (including mitochondrial and nuclear genes). Their phylogeny differ markedly from those of Frost *et al.* (2006) and Pauly *et al.* (2004) mainly by the placement of the *Rhinella margaritifera* and *Rhamphophryne* nested within the large South American clade of the former *Bufo* (*Chaunus*, *fide* Frost *et al.*, 2006). We agree with Pramuk *et al.* (2007) that the phylogenetic placement recovered by Frost *et al.* (2006) could be an artefact of poor taxon and character sampling within the *Rhinella* and *Rhamphophryne* clades. As stated by Frost *et al.* (2006) '[if] *Rhinella* Fitzinger, 1826, [is] found to be nested within *Chaunus* Wagler, 1828, the name *Rhinella* will take precedence for the inclusive group'. In accordance with Frost *et al.* (2006) and based on the results of Pramuk *et al.* (2007) we tentatively assign the new species to *Rhinella* genus.

*Rhinella cerradensis* is endemic to the Brazilian Cerrado biome and distinguishable from other species in the *Rhinella marina* group mainly by its large size, absence of tibial glands, high density of pointed keratinous

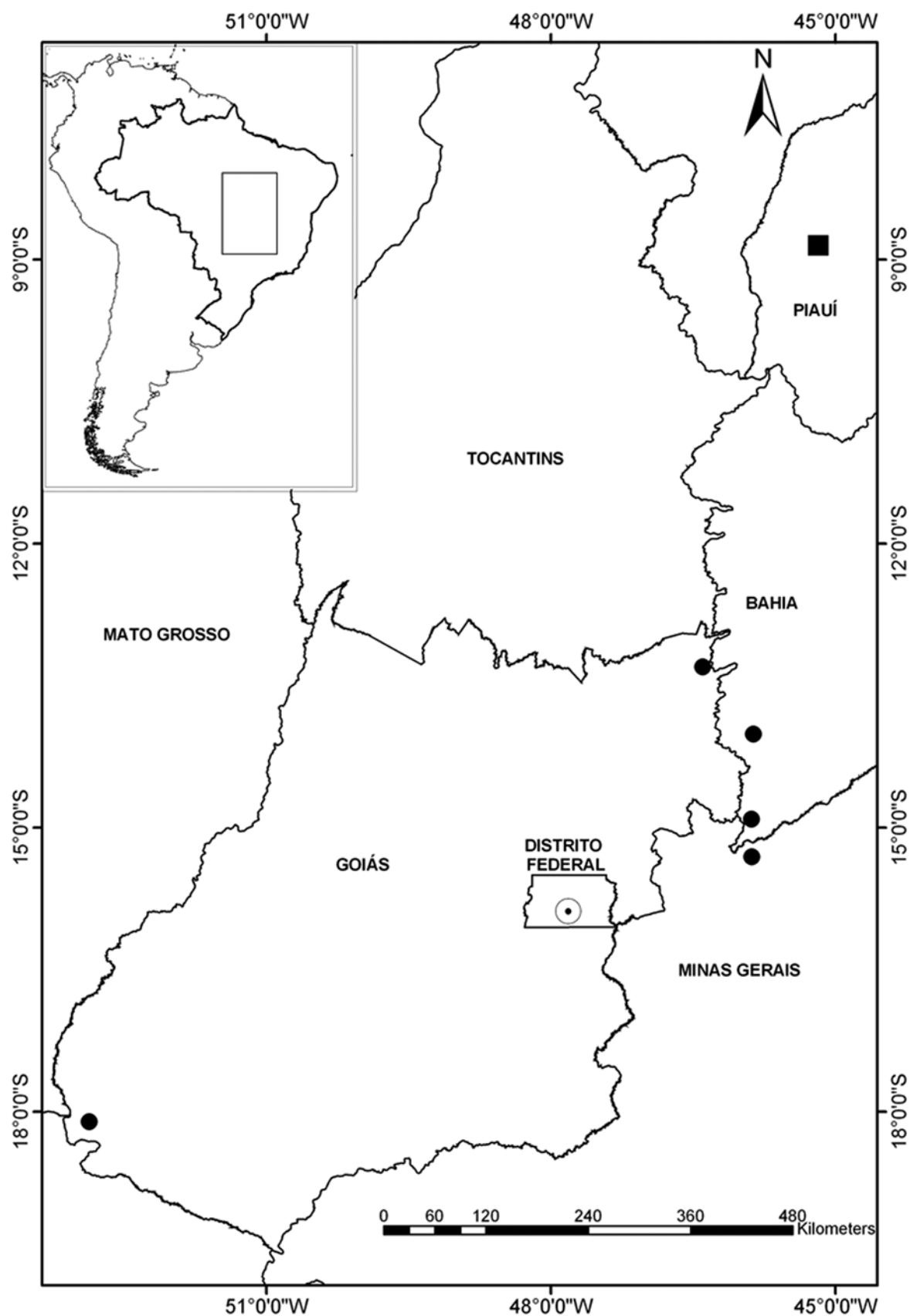
spicules on males, adult coloration, relatively smaller hands, and tadpoles without an external spiracle tube (Figs. 1–3, 5). Previously, the new species likely was misidentified with others toads such as *R. icterica* (Souza *et al.*, 2001).



**FIGURE 7.** Oscillogram of the section (A) and of the call (B); spectrogram (C) and power spectrum (D) of the advertisement call of *Rhinella cerradensis*. Recording file: *Rhinella cerradensis* **sp. nov.** Bsb. (CHUNB 38668).

*Rhinella cerradensis* resembles *R. icterica*, *R. marina*, *R. poeppigii*, *R. schneideri*, and *R. jimi* by the well developed cranial crests and size and shape of parotoid glands. By its build and general appearance Cochran (1955) stated that *R. rubescens* ‘appears to be closer’ to *R. arenarum* than the other bufonids occurring in southeastern South America. According to Ceí (1980), *R. rubescens* and *R. arenarum* form a distinct group of species, which he called the *R. arenarum* group, while the remaining species were maintained in the *R. marina* group. According to Maneyro *et al.* (2004) and Brandão *et al.* (2007), *R. achavali* and *R. veredas* are also similar to *R. arenarum* and *R. rubescens*, sharing traits such as the weakly developed cranial crests, ratio between length and cranial width, elongate shape of parotoid gland, smaller size, and relatively larger hind limbs and tympanum. However, this arrangement may not reflect phylogenetic relationships. A phylogenetic study is necessary to test the hypothesis that the *R. marina* group includes two distinct lineages.

Unfortunately, we did not have access to specimens of *R. poeppigii*. However, we are confident that our results will not change significantly with the inclusion of this species. Recently, Kwet *et al.* (2006) designated a lectotype and paralectotypes of *R. arenarum* and provided an identification key to the species of *R. marina* group. Currently, *R. marina* species group is considered to contain 10 species, five of which are found in the Cerrado biome: *R. schneideri*, *R. rubescens*, *R. jimi*, *R. veredas*, and *R. cerradensis*. Given the recent findings regarding taxonomy and phylogeny of the species currently assigned to the *R. marina* group a taxonomic revision is needed.



**FIGURE 8.** Distribution of *Rhinella cerradensis*. The circled dot represents the type locality for the species and the black circles represent other localities where the species were found. The square represents the specimen identified by the photo sent by Cristiano Nogueira.



## Specimens examined

*Rhinella achavali*: BRAZIL: Rio Grande do Sul State: Candiota Municipality, MCP 3937–3940; MCP 4374.

*Rhinella arenarum*: ARGENTINA: Mendoza, MNRJ 14510–14513; MNRJ 34769. Baía Branca: Buenos Aires, MNRJ 3871. BRAZIL: Rio Grande do Sul state: Rio Grande Municipality, CHUNB39950–39952. Torres Municipality, MNRJ 725; MNRJ 5846; MNRJ 9351–9352; MNRJ 1746; MNRJ 9349; MNRJ 9346; MNRJ 9354. Ozório Municipality, MNRJ 38996–38997. “Praia da Cidreira” MNRJ 38976–38978; MNRJ 38982–38987. Paraná state: Ribeirão Claro Municipality, MNRJ 3883.

*Rhinella cerradensis*: BRAZIL: Distrito Federal: Brasília Municipality, CHUNB 49573 (holotype); CHUNB 40276–40281; CHUNB 38669; CHUNB 25043; CHUNB 29386; CHUNB 39953; CHUNB 38668; CHUNB 49574 (tadpole series); ASUnB 2553 (macerated specimen); ASUnB 2554 (double-cleared and stained specimen). Bahia state: Correntina Municipality, CHUNB 40273–40275. Cocos Municipality, CHUNB 38655; 38656; 38658; CHUNB 39979–39980; CHUNB 38667; 38670; 38671. Goiás state: Mineiros Municipality, CHUNB 13790–13791. São Domingos Municipality, CHUNB 43864.

*Rhinella jimi*: BRAZIL: Bahia state: Vitória da Conquista Municipality, MNRJ 16168–16170; MNRJ 2625. Juazeiro Municipality, MNRJ 1323. Pernambuco state: Caruaru Municipality, MNRJ 38622–38623. Rio Grande do Norte state: Mossoró Municipality, MNRJ 38588.

*Rhinella* sp. (*marina* group): BRAZIL: Rio Grande do Norte state: Mossoró Municipality, MNRJ 38597.

*Rhinella marina*: BRAZIL: Amazonas state: Benjamin Constant Municipality, MNRJ 2575; MNRJ 11839–11841. Amapá State: Macapá Municipality, MNRJ 15440; MNRJ 4157. Roraima state: Pacaraima Municipality, MNRJ 38998–39001. Pará State: Óbidos Municipality, MNRJ 20116. Belém Municipality MNRJ 32203. Maranhão state: Pindaré-Mirim Municipality, MNRJ 10367–10371; MNRJ 1930. VENEZUELA: Zulia state: Lago Maracaibo, MNRJ 37281.

*Rhinella icterica*: BRAZIL: São Paulo state: Atibaia Municipality, CHUNB 39960, Botucatu Municipality, CHUNB 39961–39966; 39978. Paraná state: Palma Municipality, MNRJ without number. Rio de Janeiro state: Nova Friburgo Municipality, MNRJ 32232–32238. Miguel Pereira Municipality, MNRJ 31739–31741. Restinga de Maricá, MNRJ 38989–38995. Santa Catarina state: Canoinhas Municipality, MNRJ 10451–10452; MNRJ 1975. São Paulo state: Campos do Jordão Municipality, MNRJ 26239. Ribeirão Grande Municipality, MNRJ 28446–28456. Minas Gerais state: Além Paraíba Municipality, MNRJ 3105. Poços de Caldas Municipality, MNRJ 38988. Rio Grande do Sul state: Palmeira das Missões Municipality, MNRJ 3845.

*Rhinella schneideri*: BRAZIL: Distrito Federal: Brasília, CHUNB 39975. São Paulo state: CHUNB 39972–39974; 39976. Espírito Santo state: Conceição da Barra Municipality, MNRJ 20950–20951. Bahia state: Barreirinhas Municipality, MNRJ 1319–1321. Mato Grosso do Sul state: Bonito Municipality, MNRJ 39018–39019. Goiás State: Mambai Municipality, MNRJ 27893. Minas Gerais state: Lagoa Santa Municipality, MNRJ 1339; MNRJ 37003–37004. Belo Horizonte Municipality, AL 253–254 (paratypes of *B. paracnemis*). Pernambuco state: Dormentes Municipality, MNRJ 30022–30023. PARAGUAY: NHMB 1916 (Holotype of *C. schneideri*)

*Rhinella rubescens*: BRAZIL: Distrito Federal: Brasília, CHUNB 39969–39960. Minas Gerais state: Belo Horizonte Municipality, AL 993 (paratype of *B. rufus*). Presidente Olegário Municipality, MNRJ 34766; MNRJ 22470. Pirapora Municipality, AL 2414. João Pinheiro Municipality, MNRJ 3884–3885. Lagoa Santa Municipality MNRJ 1409.

*Rhinella veredas*: BRAZIL: Bahia state: Cocos Municipality CHUNB 40282 (holotype); CHUNB 37437–37438; CHUNB 38652–38654. Minas Gerais state: Chapada Gaúcha Municipality, MZUSP 128285A–128293A. Serra da Araras Municipality, CHUNB 34106–34109; 34112–34114. Buritizeiro Municipality, CHUNB 43327–43333. Pirapora Municipality, MNRJ 1387; MNRJ 39014–39017; MNRJ 39051–39052. Corrente Farm, Várzea da Palma Municipality, MNRJ 39035. Piauí state: Estação Ecológica Uruçuí-Una, Uruçuí-Una Municipality, MNRJ 39050 (paratypes).

## Acknowledgments

We thank Rubens Hisanari Matsushita, Armando Teixeira Jr., Daniel Sifuentes, Allan Crema, and Guilherme Fajardo for field help. We also thank Teodoro Machado, José Roberto Marinho, and Neuber dos Santos (Trijunção Farm) for support and the opportunity to work in southwestern Bahia, and to the Brazilian Navy for permission to sentence work at Centro de Instrução e Adestramento de Brasília (CIAB). We thank Guarino Colli, Mariana Zatz, Gustavo Vieira, and Fernanda Werneck for the facilities at CHUNB, and Daniel Mesquita for help with the statistical analyses. Ana Paula Medeiros helped with the distribution map. Marcelo Kokubum, Guilherme Fajardo, and Carlos Araújo helped with the call analyses. We thank Marcos Di Bernardo (*in memoriam*) for access to the species deposited in MCP (*Rhinella achavali*). José P. Pombal Jr. gave us access to Museu Nacional/UFRJ. We also would like to thank Carlos Alberto da Cruz, Bruno Pimenta, Roberta Pinto, Denise Nascimento, and Carolina Ferreira for assistance at MNRJ. Adrian Garda provided hard-to-find references. Ludmila Franco helped with the specimens measurements. Cristiano Nogueira sent a photo of the new species from Piauí State. We thank Roy W. McDiarmid for useful comments, corrections, and for English improvements. Jennifer B. Pramuk kindly revised the manuscript. We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the fellowship to NMM and LAC.

## Literature cited

- Altig, R. & McDiarmid, R.W. (1999) Body Plan: Development and Morphology. In: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (Eds.), *Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 24–51.
- Brandão, R.A., Maciel, N.M. & Sebben A. (2007) A new species of *Chaunus* from Central Brazil (Anura; Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 41, 304–311.
- Cei, J.M. (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)*, *Monografia*, 2, 1–609.
- Chaparro, J.C., Pramuk, J.B. & Gluesenkamp, A.G. (2007) A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica*, 63, 203–212.
- Cochran, D.M. Frogs of southeastern Brazil. *United States National Museum Bulletin*, 206, 1–423.
- Crocroft, R., Morales, V.R. & McDiarmid, R.W. (2001) *Frogs of Tambopata, Peru (CD)*. Cornell Lab of Ornithology, Macaulay Library of Natural Sounds.
- De La Riva, I., Bosch, J. & Marquez, R. (1996) Advertisement calls of two Bolivian toads (Anura: Bufonidae: *Bufo*). *Herpetological Journal*, 6, 59–61.
- Duellman, W.E & Schulte, R. (1992) Description of a New Species of *Bufo* from Northern Peru with Comments on Phenetic Groups of South American Toads (Anura: Bufonidae). *Copeia*, 1992, 162–172.
- Eterovick, P.C. & Sazima, I. (1999) Description of the tadpole of *Bufo rufus* with notes on aggregative behavior. *Journal of Herpetology*, 33, 711–713.
- Fitzinger, L.J.F.J. (1826) Neue Classification der Reptilien nach ihren natürlichen Verwandtschaften nebst einer Verwandtschafts-Tafel und einem Verzeichnisse der Reptilien-Sammlung des k.k. zoologisch Museum's zu Wien. Wien: J.G. Heubner.
- Frost, D., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., 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. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370.
- Frost, D.R. (2006) *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>. (accessed 01 September 2006).
- Gosner, K.L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes in identification. *Herpetologica*, 16, 183–190.
- Gridi-Papp, M. (2004) Sound Ruler. V0941. <http://soundruler.sourceforge.net>. (accessed 09 July 2006).
- Haddad, C.F.B., Andrade, G.V. & Cardoso, A.J. (1988) Anfíbios anuros no parque nacional da Serra da Canastra, Estado de Minas Gerais. *Brasil Florestal*, 64, 9–20.
- Hanken, J. & Wassersug, R.J. (1981) The visible skeleton. A new double-stain technique reveals the native of the "hard" tissues. *Functional Photography*, 16, 22–26.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990) Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*, 31, 231–410.



- Köhler, J., Reichle, S. & Peters, G. (1997) Advertisement calls of three species of *Bufo* (Amphibia: Anura: Bufonidae) from lowland Bolivia. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A (Biologie)*, 562, 1–8.
- Kwet, A., Di-Bernardo, M. & Maneyro, R. (2006) First record of *Chaunus achavali* (Anura, Bufonidae) from Rio Grande do Sul, Brazil, with a key for the identification of the species in the *Chaunus marinus* group. *Iheringia, Série Zoológica*, 96, 479–485.
- Maneyro, R., Arrieta, D. & De Sá, R.O. (2004) A new toad (Anura: Bufonidae) from Uruguay. *Journal of Herpetology*, 38, 161–165.
- Marcus, L.F. (1990) Traditional Morphometrics. In: Rohlf, F.J. & Bookstein, F. (Eds.), *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Ann Arbor, The University of Michigan Museum of Zoology, pp.77–120.
- Martin, W.F. (1972) Evolution of vocalization in the Genus *Bufo*. In: Blair, W.F. (Ed.), *Evolution in the Genus Bufo*. Austin and London, University of Texas Press, pp.279–309.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Pauly, G.B., Hillis, D.M. & Cannatella, D.C. (2004) The history of a Nearctic colonization: Molecular phylogenetics and biogeography of the Nearctic toads (*Bufo*). *Evolution*, 58, 2517–2535.
- Pramuk, J.B. (2006) Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146, 407–452.
- Pramuk, J.B., Robertson, T., Sites Jr., J.W., Noonan, B.P. (2007) Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography*, 16, 1–12.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. (2001) Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, S.M. & Almeida, S.P. (Eds.), *Cerrado: Ambiente e Flora*. Brasília, Embrapa, pp. 87–166.
- Rosa, C.N. (1951) Notas sobre o desenvolvimento larval de um sapo (*Bufo ictericus* L.). *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (Zoologia)*, 16, 281–287.
- Rosa, C.N. (1965) Sistemática e biologia de alguns girinos do estado de São Paulo. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (Zoologia)*, 25, 467–487.
- Savage, J.M. (1960) Geographic variation in the tadpole of the toad, *Bufo marinus*. *Copeia*, 1960, 233–236.
- Souza, I.F., Vaz-Silva, W., Silva, H.L.R. & Silva Jr., N.J. (2001) *Bufo ictericus* –Geographic Distribution, *Herpetological Review*, 32, 269.
- Straneck, R., Olmedo, E.V., Carrizo, G.R. (1993) *Catalogo de voces de anfibios argentinos*, parte 1, L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina, 127pp.
- Taylor, W.R., & Van Dyke, G.C. (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9, 107–119.
- Wagler, J. (1828) Auszüge aus seinem Systema Amphibiorum. *Isis, von Oken*, 21, 740–744.

**TERM OF USE**

This pdf is provided by Magnolia Press for private/research use.

Commercial sale or deposition in a public library or website site is prohibited.

# ANEXO 3

Tabela mostrando os estados de 16 caracteres de indolalquilaminas entre os 21 táxons terminais de espécies de bufonídeos usados nesta partição.

Táxons	Caracteres															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Melanophryniscus fulvoguttatus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhaebo guttatus</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Rhinella granulosa</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>Rhinella crucifer</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella arenarum</i>	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
<i>Rhinella rubescens</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella achavali</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella veredas</i> 1*	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella veredas</i> 2*	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella marina</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella icterica</i> 1*	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella icterica</i> 2*	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> 1*	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> 2*	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> 3*	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> 4*	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> 5*	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Rhinella jimi</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
<i>Rhinella cerradensis</i> 1*	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Rhinella cerradensis</i> 2*	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0

Os caracteres foram codificados como ausência (0) e presença (1) de cada uma das indolalquilaminas das secreções das glândulas parotóides. Lista de caracteres: 1 (BTD), 2 (<sup>W</sup>0,820), 3 (<sup>W</sup>0,880), 4 (<sup>W</sup>0,440), 5 (DHB), 6 (<sup>W</sup>0,660), 7 (DHB-S), 8 (<sup>W</sup>0,093), 9 (<sup>W</sup>0,133), 10 (5-HT), 11 (BTN), 12 (<sup>W</sup>0,313), 13 (<sup>W</sup>0,013), 14 (<sup>W</sup>0,860), 15 (<sup>W</sup>0,213) e 16 (<sup>W</sup>0,626). <sup>W</sup>Fatores de Retenção (Rf's) das indolalquilaminas não identificadas. Diferentes populações das espécies representadas por (\*).

## ANEXO 4

Tabela mostrando os estados de 83 caracteres morfológicos entre os 15 táxons terminais de bufonídeos usados nesta partição.

Taxons	Caracteres																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>Melanophryniscus stelzneri</i> Ψ	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	?	0	0	0	0
<i>Rhaebo guttatus</i> Ψ	0	1	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	2	1	0	0	1	1	0	1
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i> Ψ	0	2	0	1	2	0	1	1	2	2	0	2	1	0	2	1	0	0	1	0	1	1
<i>Rhinella granulosa</i> Ψ	0	2	0	0	0	3	1	1	2	2	0	2	0	1	2	1	0	0	2	0	?	1
<i>Rhinella crucifer</i> Ψ	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella achavali</i> *	0	1	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	2	2	0	0	1	2	0	0	1
<i>Rhinella arenarium</i> Ψ*	0	2	0	0	1	0	0	1	2	1	1	2	0	0	2	0	0	0/1	2	0	0	1
<i>Rhinella cerradensis</i> *	0	2	0	0	0	1	0	1	2	1	0	2	0	0	2	0	0	1	2	0	0	1
<i>Rhinella ictérica</i> *	0	2	0	0	0	1	0	1	2	1	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella jimi</i> *	0	2	0	0	0	1	0	1	2	?	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella marina</i> Ψ	0	2	0	0	0	1	0	1	2	2	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella poeppigii</i> Ψ	0	2	0	0	0	1	0	1	1	2	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella rubescens</i> *	0	1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	2	0	0	2	0	0	0/1	2	0	0	1
<i>Rhinella schneideri</i> *	0	2	0	0	0	1	0	1	2	2	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1
<i>Rhinella veredas</i> *	0	2	0	0	1	1	0	1	2	2	0	2	0	0	2	0	0	1	2	0	0	1

Os caracteres 1 à 83 desta partição foram codificados de acordo com Pramuk (2006). \* (espécies amostradas neste estudo); Ψ (espécies amostradas por Pramuk, 2006).

Tabela mostrando os estados de 83 caracteres morfológicos entre os 15 táxons terminais de bufonídeos usados nesta partição.

Táxons	Caracteres																					
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
<i>Melanophryniscus stelzneri</i> Ψ	0	1	2	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhaebo guttatus</i> Ψ	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i> Ψ	0	1	0	2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	2	0
<i>Rhinella granulosa</i> Ψ	0	?	2	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
<i>Rhinella crucifer</i> Ψ	0	0	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella achavali</i> *	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella arenarum</i> Ψ*	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella cerradensis</i> *	0	0	0	0	1	1	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella icterica</i> *	0	0	0	0	1	1	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella jimi</i> *	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella marina</i> Ψ	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella poeppigii</i> Ψ	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella rubescens</i> *	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Rhinella schneideri</i> *	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Rhinella veredas</i> *	0	0	0	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0

Os caracteres 1 à 83 desta partição foram codificados de acordo com Pramuk (2006). \* (espécies amostradas neste estudo); Ψ (espécies amostradas por Pramuk, 2006).



Tabela mostrando os estados de 83 caracteres morfológicos entre os 15 táxons terminais de bufonídeos usados nesta partição.

Táxons	Caracteres																
	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
<i>Melanophryniscus stelnzeri</i> Ψ	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Rhaebo guttatus</i> Ψ	0	0	1	0	0	0	2	1	?	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Rhinella</i> gr. <i>margaritifera</i> Ψ	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Rhinella granulosa</i> Ψ	1	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Rhinella crucifer</i> Ψ	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Rhinella achavali</i> *	1	1	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Rhinella arenarium</i> Ψ*	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella cerradensis</i> *	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella icterica</i> *	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella jimi</i> *	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella marina</i> Ψ	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella poeppigii</i> Ψ	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0/1	0	0/1	0	0
<i>Rhinella rubescens</i> *	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella schneideri</i> *	1	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Rhinella veredas</i> *	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Os caracteres 1 à 83 desta partição foram codificados de acordo com Pramuk (2006). \* (espécies amostradas neste estudo); Ψ (espécies amostradas por Pramuk, 2006).



## ANEXO 5

Sequências de 451 nucleotídeos do fragmento citocromo *b* das 18 populações de espécies de bufonídeos usados na partição com os dados moleculares.

### *R. rubescens*

??TTGTGAGATGACTGATGAGGTGATGGAGCTATAGTGCTGATACGTCAATAGCTTTCTGTCTGTAGCCCATATTCGCCGAGACGTAAATAACGGATG  
ATTACTTCGCAACCTTCATGCAACGGAGCCTCATTTCTTTCATCTGCATCTATCTCCACATTTGGACGAGGAATATACTACGGCTCCTACCTTTTAAAGAAA  
CTTGAAATATTGGAGTAGTTCTCCTCTTCTGTTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTCCCATGAGGACAAATGTCTTCTGAGGCGCAACAGTAATC  
ACGAACCTCCTTTCTGCTGCCCCATACATTGGAACCGAACTTGTTCAAGTGAATTTGAGGAGGCCCTTTTCAGTAGACCACGCCACCCCTTACTCGTTT?????  
????????????????????

### *R. achavali*

????????????????????TGACACATCAATAGCTTTCTCGTCTGTAGCCCATATTTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTTCGCAATCT  
TCATGCAAAACGGAGCCCTCATTTCTTCTTCATCTGCATCTATCTCCACATTTGACGAGGAATGTACTACGGCTCCTACCTTTTAAAGAAAACCTGAAATATTGGA  
GTAGTTCTCCTCTTCTTCTTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTCCCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGCGCAACAGTAATCACAAAACCTCCTTTTC  
TGCTGCCCCATACATTGGGACCGAACTTGTTTCAGTGAAATTT????????????????????????????????????

### *R. ictérica1*

????GAGCTGGATTATGTTGAGATCGACCTGCTATACTGCTGACAAATCAATAGCTTTCTCGTCTGTAGCCCATATTTGCCGAGACGTAAATAACGGATGAT  
TACTTCGCAATCTTCAATGCAACGGAGCCTCATTTCTTCTCATCTGCATCTATCTCCACATTTGGACGAGGAATGTACTACGGCTCCTACCTTTTAAAGAAACC  
TGAAATATCGGAGTAGTTCTCCTCTTCTGTTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTCCCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGCGCAACAGTAATCA  
CAAACTCCTTTCTGCTGCCCCATACATTGGAACCGAACTTGTTTCAGTGAAATTTGAGGAAAGCCCTTTTCAGTAGACAAACGCCACCCCTAACACGATTTTGCTCTTT  
TCACTTTATTCTTCCAAATGCTCT????????

### *R. ictérica2*

????????????????????CGCTATACTGCTGACACATCAATAGCTTTCTCGTCTGTAGCCCATATTTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTTCGCA  
ATCTTCATGCAACGGAGCCTCATTTCTTCTTCAATCTGCATCTATCTCCACATTTGGACGAGGAATGTACTACGGCTCCTACCTTTTAAAGAAACCTGAAATATT  
GGAGTAGTTCTCCTCTTCTTGTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTCCCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGCGCAACAGTAATCACAAACCTCC  
TTTCTGCTGCCCCATACATTGGAAACCGAACTTGTTCAATGAATTTGAGGAGGCCCTTTTCAGTAGACAAACGCCACCCCTAACACGATTTTTCACCTTTTCA????  
????????????????

### *R. crucifer*

????????????????ATAGTGCCGACACATCTATAGCCTTCTCATCTGTAGCCCATATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGACTACTTTCGCAAC  
CTTTCATGCAAAATGGAGCCTCGTTCTTTTATTGTGATCTACCTCCACATTTGGACGGGGATGTACTACGGCTCTTACCTTTTCAAAGAAACCTGAAACATTGGCGTGATTCTCCT  
CTTCTCGTTATAGCCACAGCATTCGTAGGCTACGTCTCCCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGCGCAACAGTAATTACAAACCTCCTCTCCGCTGCCCATACATTGGAAACCG  
AACTTGTTCAATGAATCTGGGGTGGACTTCTCAGTAGACAAACGCTACCCCTGACACGATTTTTTAACTTTT????????



*R. schneideri* 1

????????????????TCTAGCGATG?CACTATACGTCTGATACATCTATAGCTTTTTCATCTGTAGCCACATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTTC  
GCAATCTTCATGCAAAACGGAGCCTCATCTTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGATATACTACGGCTCATACCTTTTAAAGAAACCTGAAA  
TATCGGGTAATTCTCCTTTTCCCTGTTATAGCTACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTTCCATGGGACAAATGTCTTCTGAGGCGCAACAGTTATCACAACC  
TCCTCTCTGCCGCCCATACATTGGAACCGAACTAGTTCAA?TTAATTGAGGAGGCTTTTTCAGTAGACAACGCCACCTAACACGATTTTTCACACT  
TTATTCCTCCCATTAATC??????????

*R. marina*

????????????????????????????????AATCTGCTGATACATCCATAGCTTTTTCATCTGTAGCCACATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTTCGCAAT  
CTTCATGCAAAACGGAGCCTCATCTTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGATATACTACGGTTCATACCTTTTAAAGAAACCTGAAATATCG  
GGTAATTCTCCTTTTCCCTTGTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTCTTCCATGGGACAAATGTCTTCTGAGGCGCAACAGTTATCACAAAACCTCCTC  
TCTGCCGCCCATACATTGGAAACCGAACTTGTTCAAATGAATTTGAGGAGGCTTTTTCAGTAGACAACGCCACCTAACACGATTTTTCACACTTTATTC  
TCCCATTTATATC??????????

*R. veredas*

????????????????????????????????TAGCCCCACATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTTCGCAATCTTCATGCAA  
ACGGAGCCTCATCTCTTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGAATATACTACGGCTCCTACCTTTTAAAGAAACCTGAAATATCGGAGTAATTCT  
CCTCTCTCTGTTATAGCCACAGCATTTGTAGGCTATGTTCTTCCATGAGGACAAATGTCTTCTGAGGCGCAACAGTAATCACAACCTCCTCTCTGCCGCC  
CATACTTGGAACCGAACTTGTTCAAATGAATTTGAGGAGGCTTTTTCAAATACAAAACGCCACCTGAAAACGATTTTTCACTTTATCTCCTCCCATTTAT  
C??????????

*R. poeppigii*

?????GAGTTGCCTTATCGTTGAGATGACTCCGCTACTTATCATAGAAATGACCCGGATTTAAATCAGTAGCCCCACATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGAT  
TACTTCGCAATCTTCATGCAAAACGGAGCCTCATCTCTCTCATCTGCATCTACCTTCACATTGGACGAGGATATACTACGGATCATACCTTTTAAAGAAACCT  
TGAAATATCGGGTAATCTCCTTTTCTGTTATAGCTACAGCATTTGTAGGCTATGTCTTCCATGGGACAAATATCCTTCTGAGGGGCAACAGTTATCAC  
AAACCTCCTCTCTGCCGCCCGGTACATTGGAAACCGAACTTGTTCAAATGAATTTGAGGAGGCTTTTTCAGTAGACAACGCCACCTAACACGATTTTTCACTTT  
CACTTTATCTCCTCCCATTTATCT??????????

*R. arenarum*

????????????????????????????AATCTGCTGACACATCAATAGCTTTTTCATCTGTAGCCACATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGGTTGCTTCGTAA  
TCTTCATGCAAAACGGAGCCTCATCTTCATCTGCATCTATCTTCACATTGGACGAGGAATATACTACGGTTCCTACCTTTTAAAGAAACCTTGAAAATATG  
GAGTAGTTCTCCTTTTCCCTGTTATGCCCACAGCATTTGTAGGCTATGTCTCCTCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGCGCAACAGTAATCACAACCTCCT  
TCTGCTGCCCATACATTGGAAACCGAACTTGTTCAA?TGAACTGAGGGGGCTTTTTCAGTAGATAACGCCACCTAACACGATTTTTCACACTTTATTT  
CTCCCCTTAATC??????????

*M. fulvoguttatus*

? ? ? ? ? ? ? ? ? ?GGCTGATGCTCGAGATGAGCACGCTACAGGGCTGATAACTCAATAGGCTTAGCTTCTGTAGCTCATATCTGCCGAGATGTAATAATGGTTGACTCTTACGTAAAC  
CTCCATGCCAAACGGAGCATCTCTCTTATCTGTATCTATCTTCATATTGGACGAGGATGTACTATGGATCTTTTATTTTCAAAGAGACCTGAAATATCGGAGTTATCCTTCT  
TTTTCTAGTAATAGCCACAGCATTTGTAGGTTATGTACTCCCATGAGGCCAAATATCATTTTGGAGGCAACAGTAATTACTAACCTGTTATCTGCAGCCCTGACATTGGCACTG  
AACTGGTTCAATGAATCTGAGGTGGATTTCTCCGTAGATAATGCCACCTTAACACGATTTTGTACCTTTTTCACTT? ?

*R. granulosa*

????????????????????????????????ACACTGCTGATACATCAATAGCTTTTTCATCCGTGGCCCATATCTGCCGAGACGTAAATAACGGATGATTACTACGAAA  
TCTCCATGCAAAACGGAGCCTCATTTTCTTTCATCTGCATTTATCTTCACATCGGACGAGGCATATATTATGGCTCGTATCTCTTTAAAGAAAACCTGAAAAACATCG  
GCGTTGTTCTTCTCTCTGTAATAGCAACAGCAATTTGTGGCTACGTTCTCCATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGCGCAACAGTAAATTACTAATCTCCCTC  
TCTGCCGCCCATACATCGGAACCTGTTCCAAATGAATCTGAGGAGGCCTTTTTCAGTAGATAACGCCACCCCTAACCCGATTTTTTACATTT??????????

*R. gt. margaritifera*

????????????????????????????????CAGACGCCTCAACCGCCTTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAAATTATGGCTGAATCATCCGCTACC  
TTCACGCCAACGGAGCCTCATTTATTTCTTTATCTGCAATTTACCTGCACATCGGACGAGGCATATACTACGGATCATACCTTTTTTAAGAAACCTGAACATCGG  
CATTTGCTTTTATTCTTGTTCATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTTCTCCCATGGGACAAATATCATTTTGAGGTGCAACAGTAAATTACTAACCTTCTCT  
CTGCCGCCCATATATTGGAACTTGTAATGAATTTGAGGGGACTTTTTCAGTAGATAACGCCACCCCTGACCCGATTTTTTACATTTTCACTTTCATCCT  
TCCATTATCT??????????

OBS: Caracteres representados por “?” são considerados não-conhecidos (“missing”)  
Os números de algumas espécies representam populações diferentes:

- R. ictérica* 1 (Atibaia-SP)
- R. ictérica* 2 (Lebon Régis-SC)
- R. schneideri* 1 (Brasília-DF)
- R. schneideri* 2 (Buritizeiro-MG)
- R. schneideri* 3 (Prado-BA)
- R. schneideri* 4 (São Gonçalo do Pará-MG)

