

DIEGO JOSÉ SANTANA SILVA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MORFOMÉTRICA EM POPULAÇÕES DE
Rhinella pombali (BALDISSERA JR., CARAMASCHI E HADDAD, 2004) E
Rhinella crucifer (WIED-NEUWIED, 1821) (ANURA, BUFONIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

DIEGO JOSÉ SANTANA SILVA

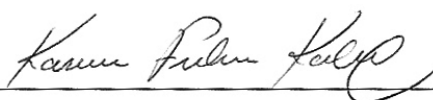
**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MORFOMÉTRICA EM POPULAÇÕES DE
Rhinella pombali (BALDISSERA JR., CARAMASCHI E HADDAD, 2004) E
Rhinella crucifer (WIED-NEUWIED, 1821) (ANURA, BUFONIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

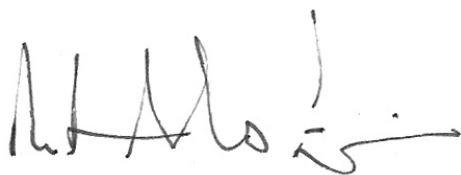
APROVADA: 22 de fevereiro de 2010



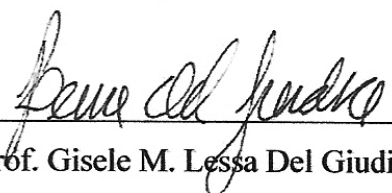
Prof. Rubens Pazza



Prof. Karine F. Kavalco



Prof. Renato Neves Feio
(Co-orientador)



Prof. Gisele M. Lessa Del Giudice



Prof. Jorge A. Dergam dos Santos

O Diego não passa batido, passa batendo

(Ana Paula Motta)

Tem horas que a gente se pergunta

Por que é que não se junta tudo numa coisa só?

(Fernando Anitelli)

A vida é um picadeiro, e se não formos os palhaços

seremos sempre meros espectadores...

Ao Mário e à Carmen. Por mais que **HERÓIS**, serem **PAIS!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que apesar de ter muitos nomes, de uma forma única, sei que foi uma força presente sempre na minha vida, e que de certa forma mostrou uma direção em meio ao caos, colocando tudo ao seu devido tempo, mesmo quando eu achava que não.

À minha família! Razão principal da minha vontade de vencer e querer mais. Aos meus pais, Mário & Carmen, que NUNCA deixaram seu girino perdido à deriva, e SEMPRE me apoiaram nas minhas decisões (mesmo quando loucas), pois acreditam o quanto grande posso ser. E aos meus irmãos, Christiane e Mário Lucas, 2/3 meus, os outros dois mosqueteiros, e principalmente, meus amigos com os quais eu sei que vou poder sempre contar.

Ao Jorge Dergam, por aceitar me orientar (que desafio hein!), mas por realmente estar presente sentadinho na sua cadeira podendo sempre que possível ouvir meus pedidos de socorro e puxando minha orelha nos momentos certos.

Ao Renato Feio, além de co-orientador, amigo e parceiro de boteco nas horas vagas, por tantas conversas enriquecedoras, e por me acolher quando graduando ao Museu e me apresentar ao mundo das pesquisas com anfíbios.

À Gisele Lessa, além de professora, ter se tornado uma pessoa tão jóia na minha vida acadêmica e uma “mãezona” no museu, atendendo também muitas das minhas “pentelhações”.

Aos membros da banca, pela gentileza de participar com a árdua tarefa de contribuir com a temida “arguição”.

Ao Rubens Pazza e ao Pierre por cederem seu laboratório e seu tempo para tirar algumas fotos de cromossomos.

Aos curadores Antônio J. S. Argolo (UESC), Luisa M. Sarmento-Soares (MBML), Rose Mary (CHUFJF), Guarino R. Colli (UnB), Luciana B. Nascimento (MCNAN-PUC) pelo empréstimo de material aos seus cuidados; e a José P. Pombal Júnior (MNRJ) pela recepção no Museu Nacional quando fui analisar a série tipo de *R. pombali*.

Aos Professores Mirco Solé (UESC) e Natan M. Maciel (UFG) pelo envio de alíquotas de tecidos.

Agradeço especialmente também à Priscila S. Hote, pela ajuda inestimável com a morfometria dos espécimes, mesmo quando solicitada para me acompanhar ao Rio de Janeiro pra analisar a série tipo. Pri, sei que você é gostosa, sexy, inteligente e, não menos importante, humilde. Mesmo assim, aumentando um pouquinho seu ego: MUITO OBRIGADO!

Ao Mário R. Moura, pela ajuda inestimável com as análises estatísticas e sempre me atendendo, mesmo que por e-mail ou por um telefonema apressado pedindo socorro.

À Sarah, que mesmo na minha fase final do mestrado, me ajudou tanto via online, cumprindo compromissos meus, me apaziguando, ouvindo muito minhas “encheções” e não menos importante, trazendo sempre um sorriso no rosto deixando meu dia melhor.

A toda FAMÍLIA do Museu de Zoologia João Moojen, que me acompanharam nos desesperos, pindaibas, alegrias, festas, bebedeiras, choros... amigos sempre presentes (herpetólogos ou não): Manú, Henriqueta, São-Pedro, Finin, Eliana, Jussa, Mário, Zé, Johny, Sarah, Larissa, Ana Paula, Robertão, Renatinha, Ana Bárbara, Joãozinho, Vitim, Maria Clara, Rodolfo, Renato, Gisele, Rômulo.

Ao Henrique e ao Emanuel (Manú) pela amizade sincera, pelo companheirismo e por tornarem-se verdadeiros irmãos dentro do museu.

À Patrícia da Silva Santos (Patricinha) pela ajuda gigantesca na coleta dos espécimes de Caratinga e região, e por sua amizade tão valiosa para mim e por colaborar tanto para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Roberto Dantas pelo incrível auxílio no Espírito Santo, indo ao Museu Mello Leitão por um excelente concerto de Heavy Metal em Vitória. Muito Obrigado Robertão, ajuda fundamental neste trabalho.

Ao pessoal do “Beagle” (Laboratório de Sistemática Molecular), do presente e do passado, amigos e parceiros pra tempo bom ou ruim, sempre se esquivando do maluco desastrado aqui, agradeço muito ao Hilton, Néia, Jacobina, Lucioni, Fred, Udson, Gisele, Ana Paula, Lucas.

À todos que me ajudaram nas coletas, ou coletaram, ou do nada aparecia uma sacola com um sapo dentro com meu nome de manhã cedinho no museu. São tantas pessoas que não lembro o nome de todos, muito obrigado.

Aos meus eternos amigos do G.H.A.E. pela paciência, pelo apoio, pela “zoação”, pela “chapação” também, pelos reveillons, músicas, alegrias e loucuras.

À República “Os Largado”, por tantas festas e farras, e terminando minha estadia, sei que tenho mais uma família que posso contar sempre. Hoje grandes amigos e amiga.

Tenho certeza que me esqueci de mencionar muuuuuuuuuuuitas pessoas, que com certeza contribuíram para a conclusão desta dissertação. A estes, perdoem essa cabeça esquecida, mesmo assim, meu muito obrigado.

Aos tantos sapos, que sem os quais não teria o “por que” dessa pesquisa e um motivo real pela qual estar fazendo pesquisa.

À UFV e ao Programa de Biologia Animal pelo aprendizado e a oportunidade.

BIOGRAFIA

Diego José Santana Silva, 2º filho de Mário José Pereira da Silva e Carmen Côrtes Santana Silva, nasceu em Muriaé, Minas Gerais, em 18 de junho de 1985.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2003, na Escola Estadual Dr. Olavo Tostes em Muriaé, Minas Gerais. Em fevereiro de 2004 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras “Santa Marcelina” também em Muriaé. Durante a graduação foi estagiário no Museu de Zoologia João Moojen e do Beagle - Laboratório de Sistemática Molecular da UFV. Em 15 de Dezembro de 2007 graduou-se Licenciado em Ciências Biológicas. Em fevereiro de 2008 ingressou no curso de Mestrado em Biologia Animal, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em março de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	07
Santana, D.J. & Dergam, J.A. Citogenética de <i>Rhinella crucifer</i> (Wied-Neuwied, 1821) e <i>R. pombali</i> (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) (Anura, Bufonidae) no sudeste do Brasil.....	08
Santana, D.J.; Hote, P.S.; Feio, R.N. & Dergam, J.A. Análise morfométrica de populações de <i>Rhinella pombali</i> (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004).....	29
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	53

RESUMO

SILVA, Diego José Santana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Análise citogenética e morfométrica em populações de *Rhinella pombali* (Baldissera Jr., Caramaschi e Haddad, 2004) e *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae).** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Orientadores: Renato Neves Feio e Gisele Mendes Lessa Del Giudice.

Separada recentemente de *R. crucifer*, *R. pombali* é uma espécie restrita ao Estado de Minas Gerais. Embora uma revisão sistemática tenha sido feita há pouco tempo, algumas inconsistências taxonômicas e geográficas seriam esperadas devido à grande variação morfológica das espécies do grupo de *R. crucifer*. Neste trabalho descrevemos o cariótipo, assim como os padrões Banda C e Ag-NOR de *Rhinella crucifer* e *R. pombali*. Ambas espécies pertencentes ao grupo de *R. crucifer*, que não possuíam cariótipo nem padrões de bandeamento descritos, particularmente porque o cariótipo descrito de *R. crucifer* em outros trabalhos trata-se na verdade de *R. ornata*. As espécies analisadas apresentaram número diplóide $2n=22$, comum à família Bufonidae, com os blocos de heterocromatina constitutiva localizadas na região centromérica dos cromossomos podendo ocorrer uma marcação intersticial em alguns pares. As regiões organizadoras de nucléolo encontraram-se nos braços curtos do sétimo par cromossômico, assim como observado para *R. ornata* e outras espécies de *Rhinella* na América do Sul. Não foram encontrados padrões espécie-específico para os indivíduos analisados. Para os estudos morfométricos, baseamos nosso trabalho no estudo da morfologia externa e em 25 caracteres morfométricos de 10 unidades taxonômicas operacionais para verificar o nível de variação interpopulacional destas taxa e definir possíveis variações em gradientes geográficos. Apresentamos também dados de dimorfismo sexual para a espécie. Analisando aspectos regionais de simpatria de *R. pombali* com outras espécies do grupo nos estados do Espírito Santo e do Rio de

Janeiro, percebemos algumas inconsistências quanto ao registro geográfico nesses locais. Vemos que a espécie apresenta acentuado dimorfismo morfométrico e algumas diferenças morfológicas separando machos e fêmeas. Nas análises populacionais entre as 10 UTOs, foi verificado que não há separação significativa entre elas, não apresentando também tendências de separação.

ABSTRACT

SILVA, Diego José Santana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010.
Cytogenetic and morphometric analysis in populations of *Rhinella pombali* (Baldissera Jr., Caramaschi e Haddad, 2004) and *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Co-Advisers: Renato Neves Feio and Gisele Mendes Lessa Del Giudice.

Rhinella pombali is a species recently separated from *R. crucifer*, and considered restricted to the state of Minas Gerais, in southeastern Brazil. Although their systematics was recently revised, it remains some taxonomic and geographical inconsistencies, due mainly to morphological variation of the *R. crucifer* group. We described the karyotypes (conventional staining, C and NOR-banding of *Rhinella crucifer* and *R. pombali*, two species of the *R. crucifer* group. Both species had diploid number $2n=22$, characteristic of the family Bufonidae. Blocks of constitutive heterochromatin were centromeric, and occasional interstitial C-bands were observed in some chromosomes. NORs were located in the short arm of chromosome seven, as observed in *R. ornata* and other South American species of *Rhinella*. For the morphometric study, we analyzed the external morphology and 25 morphometrical characters of specimens of *R. pombali*, distributed in 10 operational taxonomic units (OTUs) to verify the interpopulational variation of this species and detect possible variations along geographical gradients. Sexually dimorphic traits were also included. The analysis of regional aspects of sympatry between *R. pombali* and other species of the *R. crucifer* group in Espírito Santo and Rio de Janeiro states, led to some inconsistencies for the expected geographical distribution of taxonomic characters. The results indicate the existence of high level of morphometrical sexual dimorphism and some morphological differences between males and females. The analyses of the 10 OTUs showed absence of significant levels of differentiation among them.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Anura é composta por mais de 5.679 espécies distribuídas em 59 famílias, presentes em todo globo, exceto na Antártida e em algumas ilhas oceânicas (Frost et al. 2009). A família Bufonidae composta por 46 gêneros e 528 espécies (Frost, 2009), tem distribuição ampla ocorrendo em quase todos os continentes, com exceção da Austrália, Nova Guiné e Madagascar, onde *Rhinella marina* foi recentemente introduzida (Narvaes, 2003; Frost, 2009). Bufonidae forma um grupo monofilético corroborado pelas seguintes sinapomofias: órgão de Bidder, glândulas paratóides, cintura peitoral arcífera ou firmisterna modificada, ausência de dentes, presença de esterno e vômer e de diapófises sacrais bastante dilatadas (McDiarmid, 1971; Pough et al. 1998; Frost et al. 2006).

Recentemente, os anfíbios atuais têm sido objeto de estudos filogenéticos, os quais resultaram em grandes mudanças taxonômicas dentro de todos os grupos (e.g. Faivovich et al. 2005; Frost et al. 2006; Grant et al. 2006; Hedges et al. 2008; Guayasamin et al. 2009). O nome *Bufo*, até pouco tempo apresentava cerca de mais de 200 espécies distribuídas em aproximadamente 40 grupos fenéticos, com ocorrência cosmopolita (Frost, 1985), embora fosse um gênero reconhecidamente parafilético (Duellman & Trueb, 1994).

Em 2006, Frost et al. sugeriram uma primeira proposta evolutiva para toda a classe Amphibia, baseada principalmente em dados moleculares. Em sua hipótese filogenética, o gênero *Bufo* foi desmembrado em diferentes gêneros, sendo as espécies restritas à América do Sul distribuídas principalmente entre os gêneros *Chaunus* Wagler, 1828, *Rhaebo* Cope, 1862 e *Rhinella* Fitzinger, 1826. Assim, o gênero *Bufo* tem sua distribuição atual na região temperada da Eurásia e do sul do Japão ao Norte da

África, no oriente médio, nordeste de Mianmar e no norte do Vietnã. Grant et al. (2006), forneceram uma outra grande revisão, e apresentaram outra proposta filogenética para Amphibia. Porém, Bufonidae se mantém como proposto por Frost et al. (2006). No entanto, Chaparro et al. (2007), descrevendo uma espécie arbórea de bufonídeo do Peru (*Rhinella manu*), propõem uma análise filogenética baseada principalmente em caracteres moleculares, e em uma curta discussão, apresentam uma nova hipótese filogenética para a família alocando as espécies chamadas de *Chaunus* (Frost et al. 2006) como pertencentes ao gênero *Rhinella*.

O grupo de *Rhinella crucifer* (*sensu* Baldissera-Jr et al. 2004) é composto por *R. abei* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004), *R. crucifer* (Wied-Neuwied, 1821), *R. henseli* (A. Lutz, 1934), *R. ornata* (Spix, 1824) e *R. pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004). O grupo é diagnosticado pelos seguintes caracteres: 1. frontoparietais alargados fusionados aos proóticos; 2. canal occipital parcialmente recoberto; 3. ossos no teto da cabeça com exostose dermal moderada; 4. linha ou grupo de tubérculos queratinizados partindo da comissura bucal em direção posterior; 5. ausência da crista craniana pré-ocular, parcialmente nas espécies menores, sempre presente e fortemente elevada nas espécies maiores; 6. linha de tubérculos glandulares na lateral do corpo sempre presente, com a primeira glândula podendo ser unida ou não à paratóide; 7. glândula paratóide de tamanho moderado a pequeno, triangular, elíptica ou alongada; 8. tímpano sempre visível, às vezes recoberto por uma dobra de tegumento na região posterior; 9. focinho variando de truncado a mucronado ou sub-elíptico a arredondado em vista dorsal; 10. primeiro dedo nem sempre mais longo que o segundo; 11. tegumento bastante variável, de extremamente granuloso até um aveludado macio (Duellman & Schulte, 1992; Baldissera, 2001; Baldissera et al. 2004).

A espécie *Rhinella pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) (Figura 1), pertence ao grupo de *R. crucifer* (Wied-Neuwied, 1821), o qual foi recentemente revisado por Baldissera-Jr *et al.* (2004). Esta espécie foi separada de *R. crucifer*, sendo *R. pombali* restrita ao estado de Minas Gerais, com sua distribuição geográfica através da Mata Atlântica brasileira e áreas de transição com o cerrado no Estado (Baldissera-Jr *et al.* 2004).



Figura 1. Holótipo (MNRJ 22311) de *Rhinella pombali* (CRC 84.10). Proveniente de São Gonçalo do Rio Abaixo, MG.

Como todas as espécies do grupo, *R. pombali* é bastante adaptada a ambientes antropizados, sendo muito comum em parques ou jardins (Santana *et al.* 2010). *Rhinella pombali* apresenta o corpo recoberto por glândulas que conferem à sua pele um aspecto bastante rugoso. É uma espécie de tamanho relativamente grande para o grupo (CRA

54,5 - 92,7 mm nos machos; 74,9 – 118,7 mm nas fêmeas), cabeça mais larga que longa, com uma subdivisão claramente observada entre a cabeça e o corpo em vista dorsal; focinho arredondado em vista dorsal; cristas craniais conspícuas; glândulas paratóides ovóides, não subdivididas, mais largas na porção anterior, e em vista lateral pendendo sobre a lateral do corpo; primeiro tubérculo da fileira lateral sempre em contato com a glândula paratóide; padrão geral cinza escuro nos membros, variando para um padrão único de coloração mais clara; em vida, as marcas amarelas aproximam da cloaca e na superfície posterior das coxas pode ocorrer uma linha de tubérculos na superfície ventral da parte posterior do esqueleto, formando uma franja em indivíduos grandes (Baldissera-Jr *et al.* 2004).

Embora uma revisão sistemática tenha sido feita há pouco tempo (Baldissera-Jr *et al.* 2004), algumas inconsistências poderiam ser encontradas devido à grande variação morfológica das espécies e à inclusão de espécimes de novas áreas. É possível que os limites específicos sejam um pouco mais amplos que os determinados por Baldissera-Jr *et al.* (2004).

REFERÊNCIAS CITADAS

- Baldissera-Jr, F.A. 2001. **Taxonomia e filogenia do grupo de *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821 (Anura, Bufonidae)**. Tese de DoUGrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Baldissera-Jr, F.; Caramaschi, U. & Haddad, C.F.B. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with description of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Arquivos do Museu Nacional**. 62(3): 255-282.

- 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(2): 203-212.
- Duellman, W.E. & Schulte, R. 1992. Description of a new species of *Bufo* from northern Peru with comments on phonetic groups of South American toads (Anura: Bufonidae). **Copeia** 1992: 162-172.
- Duellmann, W.E. & Trueb, L. 1994. **Biology of amphibians**. Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. 294: 1-239.
- Frost, D.R. 1985. **Amphibian Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference**. Lawrence: Allen Press, Inc. e The Association of Systematic Collections. 732p.
- Frost, D.R. 2009. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Electronic Database Accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.
- Frost, D. R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; De Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. & Wheeler, W.C. 2006. The Amphibian tree of life. **Bulletin of The American Museum of Natural History**. 297: 1-370.

- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of American Museum of Natural History**. 299: 1-262.
- Guayasamin, J.M.; Castroviejo-Fisher, S.; Trueb, L.; Ayarzagüena, J.; Rada, M.; & Vilà, C. 2009. Phylogenetic systematics of glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon *Allophryne ruthveni*. **Zootaxa** 2100: 1-97.
- Hedges, S.B.; Duellman, W.E.; & Heinicke, M. P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography and conservation. **Zootaxa** 1737: 1-182.
- McDiarmid, R.W. 1971. Comparative morphology and evolution of frogs of the neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *oreophrynella*. **Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History**. 12: 1-66.
- Narvaes, P. 2003. **Revisão taxonômica das espécies de *Bufo* do complexo *granulosus* (Amphibia, Anura, Bufonidae)**. Tese de DoUGrado. Universidade de São Paulo.
- Pough, F.H.; Janis, C.H. & Heiser, J.B. 2003. **Vida dos vertebrados**. 3 ed. São Paulo, 699p.
- Santana, D.J.; São-Pedro, V.A.; Hote, P.S.; Roberti, H.M.; Sant'Anna, A.C.; Figueiredo-de-Andrade, C.A. & Feio, R.N. 2010. Anurans in the region of the High Muriaé River, state of Minas Gerais, Brazil. **Herpetology Notes**. 3: 1-10.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

- I – Santana, D.J. & Dergam, J.A. Citogenética de *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) e *R. pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) (Anura, Bufonidae) no sudeste do Brasil.
- II – Santana, D.J.; Hote, P.S.; Feio, R.N. & Dergam, J.A. Análise morfométrica de populações de *Rhinella pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004).

2.1. Santana, D.J. & Dergam, J.A. Citogenética de *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) e *R. pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) (Anura, Bufonidae) no sudeste do Brasil.

Citogenética de *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) e *R. pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) (Anura, Bufonidae) no sudeste do Brasil.

Diego J. Santana* & Jorge A. Dergam

*Departamento de Biologia Animal, Beagle – Laboratório de Sistemática Molecular,
Universidade Federal de Viçosa. CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.*

* *santana_herpeto@yahoo.com.br*

Abstract

We described the karyotypes (conventional staining, C and NOR-banding of *Rhinella crucifer* and *R. pombali*, two species of the *R. crucifer* group. Both species had diploid number $2n=22$, characteristic of the family Bufonidae. Blocks of constitutive heterochromatin were centromeric, and occasional interstitial C-bands were observed in some chromosomes. NORs were located in the short arm of chromosome seven, as observed in *R. ornata* and other South American species of *Rhinella*. Both species showed karyotypes that were typical for the genus *Rhinella*.

Resumo

Neste trabalho descrevemos o cariótipo, assim como os padrões Banda C e Ag-NOR de *Rhinella crucifer* e *R. pombali*, espécies pertencentes ao grupo de *R. crucifer*, que não possuíam cariótipo nem padrões de bandeamento descritos, particularmente porque o cariótipo descrito de *R. crucifer* em outros trabalhos trata-se na verdade de *R. ornata*. As espécies analisadas apresentaram número diplóide $2n=22$, comum à família

Bufonidae, com os blocos de heterocromatina constitutiva localizadas na região centromérica dos cromossomos podendo ocorrer uma marcação intersticial em alguns cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolo encontraram-se nos braços curtos do sétimo par cromossômico, assim como observado para *R. ornata* e outras espécies de *Rhinella* na América do Sul. Não foram encontrados padrões espécie-específico para nenhuma espécie analisada.

Introdução

A família Bufonidae Gray, 1825 é composta por 46 gêneros e 528 espécies (Frost, 2009), tem distribuição ampla ocorrendo em quase todos os continentes, com exceção da Austrália, Nova Guiné e Madagascar, onde *Rhinella marina* foi recentemente introduzida (Pough et al. 1998, Narvaes, 2009). Bufonidae forma um grupo monofilético definido por várias sinapomorfias morfológicas como a presença do órgão de Bidder, de glândulas paratóides, cintura peitoral arcífera ou firmisterna modificada, ausência de dentes, presença de esterno e vômer, presença de esterno e de diapófises sacrais bastante dilatadas (Pough et al. 1998; McDiarmid, 1971; Frost et al. 2006).

O gênero *Rhinella* Fitzinger, 1826 foi recentemente associado a diversas espécies de bufonídeos das Américas (Chaparro et al., 2007) desde o baixo vale do Rio Grande no sul do Texas (EUA) e sul de Sonora, pelo México tropical e América Central, ocorrendo até o sul da América do Sul. *Rhinella marina* foi introduzida amplamente nas ilhas das Antilhas, Havaí, Fiji, Filipinas, Taiwan, Ryukyu e em Nova Guiné, Austrália e muitas ilhas do Pacífico (Frost, 2009).

Rhinella pombali (Baldissera-Jr., Caramaschi & Haddad, 2004), pertence ao grupo de *R. crucifer* (Baldissera-Jr et al., 2004). *Rhinella pombali* foi separada de *R. crucifer*, sendo *R. pombali* restrita ao estado de Minas Gerais, onde ocorre na Mata

Atlântica e em áreas de transição com o cerrado no estado (Baldissera-Jr et al., 2004), e *R. crucifer* encontra-se com distribuição ao longo da Floresta Atlântica e áreas adjacentes, do Estado do Ceará ao sul do Estado do Espírito Santo e no nordeste do Estado de Minas Gerais (Baldissera-Jr et al. 2004).

Até a década de 80, os estudos citogenéticos em Anura eram desenvolvidos com técnicas simples de coloração visando à caracterização do número e da morfologia dos cromossomos, especialmente com Giemsa. Esses estudos iniciais permitiram detectar a ocorrência de certa variabilidade citogenética entre anuros, em especial em gêneros, como *Eleutherodactylus* (Bogart, 1970 e 1972; Bogart & Hedges, 1995) e pouca variabilidade em outros, como em *Bufo* (Bogart, 1973). Porém, outras espécies de morfologia semelhante (e que poderiam ser consideradas como uma única espécie) apresentaram diferenças no número de e/ou na morfologia cromossômica, conforme foi observado em *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) ($2n=34$) e *Osteopilus septentrionalis* (Duméril & Bibron, 1841) ($2n=24$) (Cole, 1974); em *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus sanborni* ($2n=30$) (Medeiros et al. 2003), em *Physalaemus petersi* (Lourenço et al. 1998), em *Paratelmatobius cardosoi* e *Paratelmatobius sp.* (aff. *cardosoi*) ($2n=24$) (Lourenço et al. 2003). O último grupo de espécies confirma que a sistemática e a evolução dos anfíbios podem ser analisados com técnicas citogenéticas refinadas como bandamento C, bandamento de replicação tardia, bandamentos com enzimas de restrição, método de impregnação pela prata, coloração com fluorocromos e a hibridação “*in situ*” com corantes fluorescentes. Dentre as espécies de *Rhinella* (= *Bufo*) analisadas por Baldissera-Jr. et al. (1999), que apresentaram grande semelhança em sua morfologia cromossômica, o grupo de espécies *Rhinella granulosa* apresentou diferença na localização das NORs. Através do método de bandamento C, também é possível detectar variações que diferenciam espécies consideradas próximas e que

apresentam morfologia cromossômica bastante semelhante. A localização e o número de NORs e de heterocromatina são caracteres informativos em nível de variação intra-específica, conforme caracterizado nas espécies *Agalychnis callidryas* (Schmid et al. 1995), *Hyla ebraccata* (Kaiser et al. 1996), *Physalaemus petersi* (Lourenço et al. 1998) e *Physalaemus cuvieri* (Silva et al. 1999).

Existem poucas análises citogenéticas nas espécies brasileiras de *Rhinella* (por exemplo, Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Ghilardi et al. 2007). Dentro dos bufonídeos, espécies dos gêneros *Anaxyrus*, *Atelopus*, *Bufo*, *Capensibufo*, *Melanophryniscus*, *Nannophryne*, *Nectophrynoides*, *Ollotis*, *Schismaderma* e *Werneria* são caracterizadas pelo número diplóide $2n=22$ (King 1990; Kuramoto 1990). Fugindo a essa estabilidade cromossômica, algumas espécies de *Amietophrynus* apresentam $2n=20$ e $NF=40$, provavelmente devido a eventos de fusão cromossômica (Beckert & Doyle 1968; Bogart 1968; Bogart & Perret 1977). Segundo Bogart (1968) esse número seria derivado de espécies ancestrais com $2n=22$.

Bogart (1972) e Formas (1978) destacam a uniformidade cromossômica de *Rhinella* (consideradas como *Bufo* ou *Chaunus* na época) e outros bufonídeos, e sugerem que os primeiros membros do gênero que chegaram à América do Sul eram $2n=22$, além de apresentar uma constrição secundária no par 7. No gênero *Rhinella*, uma única Ag-NOR foi detectada no sétimo par cromossômico nas espécies *R. arenarum*, *R. ornata* (chamada de *R. crucifer* em trabalhos anteriores), *R. ictérica*, *R. marina*, *R. rubescens* e *R. schneideri*; por outro lado a Ag-NOR ocorre no quinto par em *R. granulosa* e *R. pygmaea* (Schmid 1978, 1980 e 1982; Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Azevedo et al. 2003).

Duellman & Schutle (1992) mencionam que o grupo de *R. crucifer* é mais próximo do grupo de *R. marina*, e que se separam por apresentarem a crista cranial mais

baixa, a pele dorsal mais lisa e glândulas paratóides menores. Baldissera-Jr et al. (1999) mencionam que esses dois grupos são citogeneticamente próximos entre si, pois apresentam a NOR no sétimo par cromossômico.

São poucos os trabalhos que abordam a citogenética de espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer*, sendo que até o momento, apenas os cariótipos de *R. ornata* (tratado de *B. crucifer* em trabalhos anteriores) e de uma população *R. crucifer* do Estado da Bahia (chamado de *Bufo crucifer*) são conhecidos (Beçak, 1968; Beçak et al. 1970; Brum-Zorilla & Saez 1971; Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Guilardi et al. 2004). O objetivo deste trabalho é a comparação citogenética (coloração convencional, padrões de banda C e Ag-NORs) de *R. crucifer* e *R. pombali*. As duas espécies se distinguem por *R. crucifer* apresentar maior tamanho que *R. pombali* (média CRC *R. crucifer* 81.6mm e média CRC de *R. pombali* 73.3mm), focinho curto em visão lateral (focinho longo em *R. pombali*) e linha vertebral muito fina ou ausente (linha vertebral sempre presente em *R. pombali*, às vezes larga e limitada por marcas escuras).

Material e Métodos

Animais

Foram analisados neste estudo uma população de *R. crucifer* provenientes de Alfredo Chaves no estado do Espírito Santo e 10 populações de *R. pombali* de diversas localidades do estado de Minas Gerais (Figura 1, Tabela 1). Os espécimes estão depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen, da Universidade Federal de Viçosa, situada em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

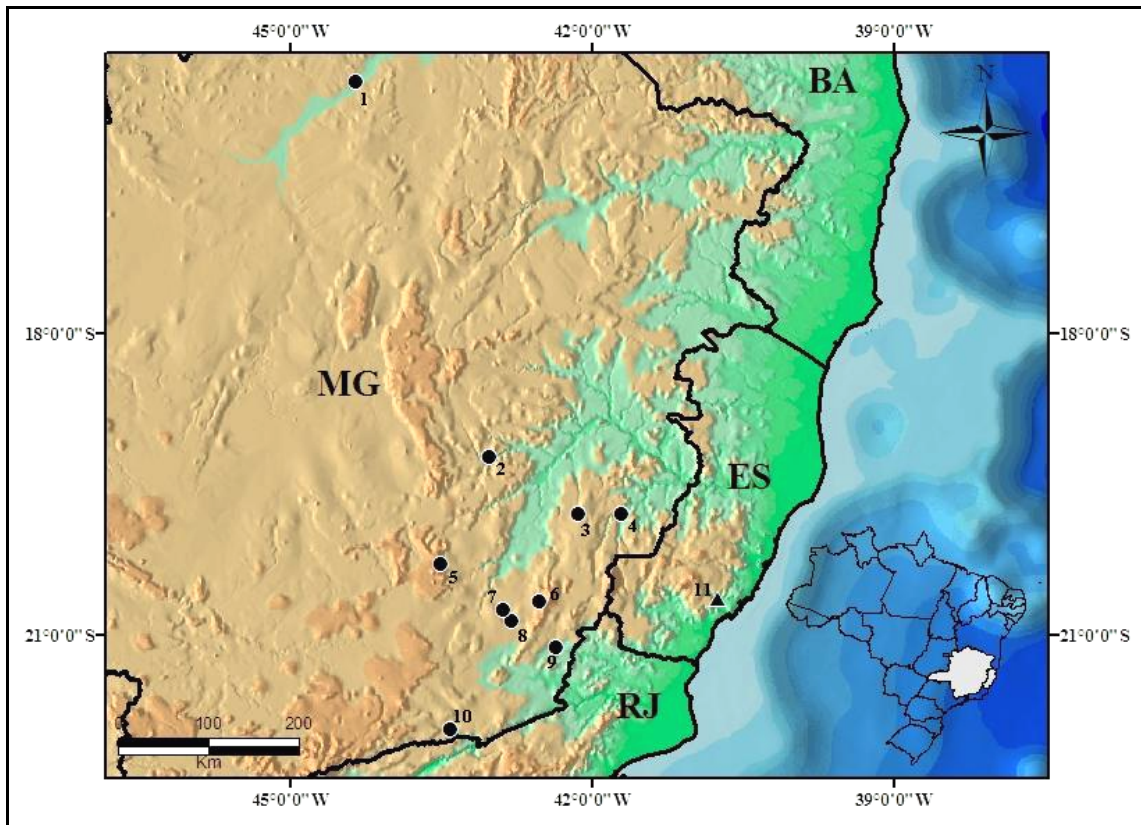


Figura 1. Localidades em Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES) onde foram coletados os exemplares analisados neste estudo de *Rhinella crucifer* (▲) e *Rhinella pombali* (●): 1) APA Pandeiros; 2) Sete Cachoeiras, Ferros; 3) Caratinga; 4) Ipanema; 5) FLOE Uaimii, Ouro Preto; 6) PESB, Araponga; 7) Viçosa; 8) Coimbra; 9) Muriaé; 10) Belmiro Braga; 11) Alfredo Chaves.

Preparações cromossômicas e técnicas de bandeamento

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do epitélio intestinal seguindo a metodologia proposta por Schmid (1978). Em cada espécime foi injetado intraperitoneamente 0,1 mL (para cada 10 g de peso) de uma solução de 0,1% de colchicina por 4h antes da eutanásia (feita a partir do uso de Lidocaína 5%). Após os procedimentos, as preparações foram examinadas em microscópio óptico e as metáfases foram capturadas com o sistema digital fotomicroscópio Olympus BX41 com a objetiva de imersão de 100x, para aumento de 1000x. Os cromossomos homólogos foram pareados utilizando o software Image Pro Plus® (IPP) e classificados pelo seus índices centroméricos segundo Levan et al. (1964).

A técnica de coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolo pelo Nitrato de Prata (Ag-NOR) seguiu Howell & Black (1980), o protocolo de Banda C foi o proposto por Sumner (1972).

Resultados

Todos os espécimes analisados de *R. pombali* e *R. crucifer* apresentaram número diplóide $2n=22$. O cariótipo (Figura 2) tem cinco pares maiores de cromossomos metacêntricos, um par maior submetacêntrico e cinco pares menores de metacêntricos. Com relação ao tamanho, os pares 1, 2 e 5 foram grandes metacêntricos, os pares 3 e 4 são representados por grandes submetacêntricos; o par 6 é um submetacêntrico de tamanho médio e os cromossomos dos pares de 7 a 11 correspondem a pequenos metacêntricos. Em algumas metáfases, foi observada uma constrição secundária no sétimo par cromossômico (Figura 3), sendo esta uma variação de caráter intra-individual.

Nas duas espécies as regiões organizadoras de nucléolo foram observadas nas regiões subteloméricas nos braços curtos do sétimo par. Neste local também aparecem as constrições secundárias eventuais (Figura 4), e foram idênticas para todas as populações analisadas e entre as duas espécies do estudo.

A heterocromatina constitutiva apresentou-se de forma característica, nas regiões pericentroméricas, além de uma marcação intersticial no sétimo par (Figura 5). Porém, a obtenção dessa técnica não foi satisfatória para todas as populações analisadas.

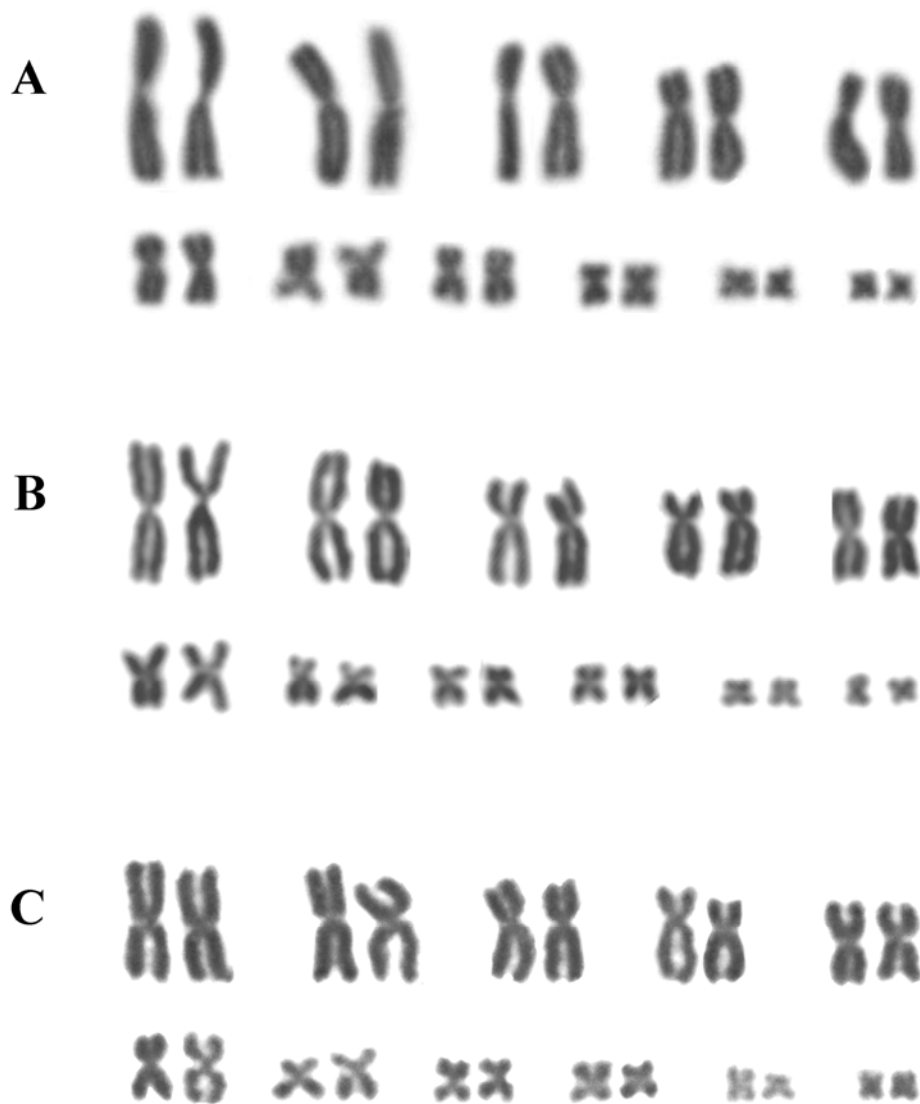


Figura 2. Cariótipos de algumas populações analisadas nesse estudo: (A) *Rhinella crucifer* de Alfredo Chaves, ES e B) *Rhinella pombali* de Viçosa, MG e C) de Belisário, Muriaé, MG.

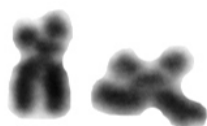


Figura 3. Constrição secundária no braço menor do sétimo par cromossômico de um espécime macho de *R. crucifer*.

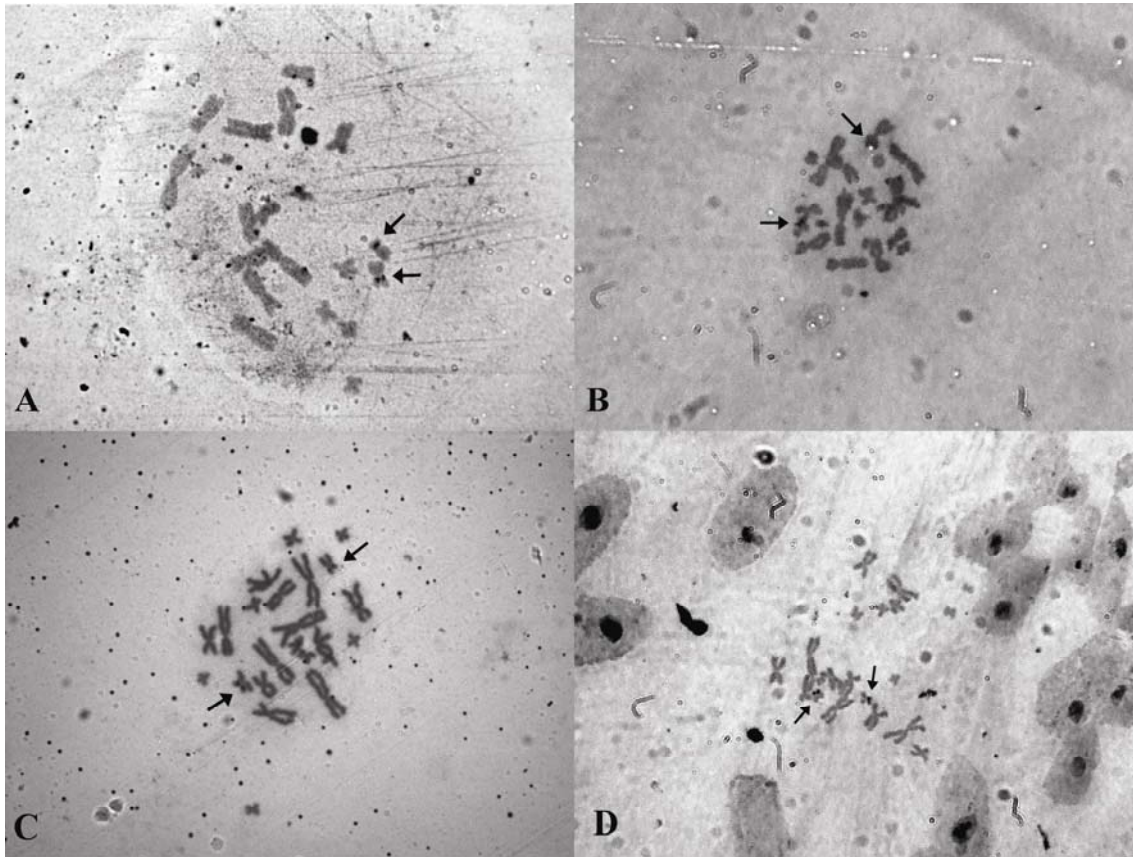


Figura 4. Metáfases com bandeamento NOR de algumas populações analisadas: (A) Viçosa, MG; (B) Belmiro Braga, MG; (C) Belisário, Muriaé, MG e (D) Sete Cachoeiras, Ferros, MG. Marcações indicadas pela seta, encontradas no sétimo par.

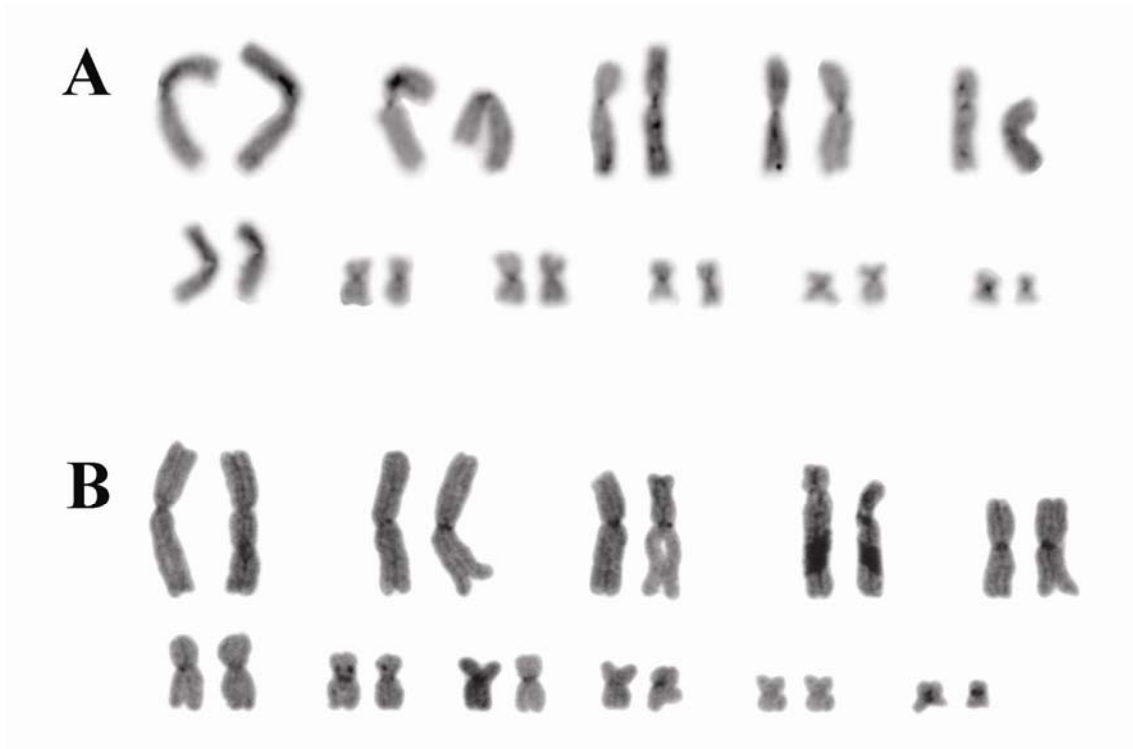


Figura 5. Padrão de distribuição de Banda-C em (A) *Rhinella crucifer* macho, de Alfredo Chaves, ES; (B) *R. pombali* de Viçosa, MG.

Discussão

Rhinella pombali e *R. crucifer* apresentaram número diplóide $2n=22$, característico de bufonídeos em todo o mundo (e. g. Beçak 1968; Morescalchi & Gargiulo 1968; Bogart 1972; Brum-Zorrilla & Saez 1971; Kuramoto, 1990; Piazzese, 1995; Kasahara et al. 1996; Amaro-Ghilardi et al. 2007). A exceção na família ocorre com as espécies do gênero *Amietophrynus* Frost et al. (2006), que agrupa antigas espécies de *Bufo* do grupo *B. regularis*, é restrito a África Subsaariana e que possui o cariótipo $2n=20$ (. Dentro da família Bufonidae não há um padrão quanto à morfologia cromossômica, sendo estável apenas o número diplóide $2n=22$.

Das espécies de *Rhinella* do grupo *R. crucifer* (*sensu* Baldissera-Jr et al., 2004), apenas o cariótipo de *R. ornata* (tratado de *B. crucifer* em trabalhos anteriores) (Beçak, 1968; Beçak et al. 1970; Brum-Zorrilla & Saez 1972; Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Guilardi et al. 2004) e de *R. crucifer* procedente de Ilhéus, Bahia (tratado de *Bufo crucifer*) (Baldissera-Jr et al. 1999) são conhecidos.

Baldissera-Jr et al. (1999) descrevem o cariótipo de *R. ornata* proveniente de Ubatuba, estado de São Paulo e *R. crucifer* de Ilhéus, estado da Bahia (ambos referidos no texto como *Bufo crucifer*). Neste trabalho não há comparação entre as duas populações, sendo apresentado apenas um cariótipo para ambas. Os dados indicam que não há diferenças na morfologia cromossômica e nos padrões de Ag-NOR entre essas duas espécies.

Na literatura, é evidente que o cariótipo das espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer* é extremamente conservado. Esta estabilidade é também presente em *R. ornata* (Beçak, 1968; Beçak et al. 1970; Brum-Zorrilla & Saez 1972; Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Guilardi et al. 2004) e em *R. crucifer* (Baldissera-Jr et

al. 1999). Conclui-se que as espécies de *Rhinella* da América do Sul (e.g. Kuramoto, 1990; Piazzese, 1995; Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Ghilardi et al. 2007) apresentam cariótipos extremamente conservados em nível de coloração convencional.

Constrições secundárias são comumente observadas na família Bufonidae (Bogart, 1972) e a presença dela no braço curto do sétimo par cromossômico, como observado nas duas espécies analisadas são encontradas também em *R. ornata* (Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Ghilardi et al. 2007) e em outros grupos e espécies de *Rhinella* sul americanos (e.g. *R. atacamensis*, *R. arenarum*, *R. granulosa*, *R. marina*, *Rhaebo maematiticus*, *Incilius valliceps*, “*Bufo*”*stomaticus*) (Bogart, 1972).

Rhinella crucifer de Ilhéus, Bahia e *Rhinella ornata*, assim como diversas outras espécies do gênero *Rhinella* (tratados como *Bufo*) apresentam suas NORs na região intersticial do braço curto do cromossomo sete (Baldissera-Jr et al. 1999; Amaro-Ghilardi et al. 2007). O número e a posição das NORs são semelhantes ao achado nas duas espécies analisadas neste estudo.

Com base na semelhança morfológica e a presença da região organizadora de nucléolo no par cromossômico 7, Low (1972) e Maxson (1984), sugerem que o grupo *R. marina* é mais próximo de *R. crucifer*. Este padrão foi corroborado por Baldissera-Jr et al. (1999). Os resultados aqui apresentados indicam que a posição da NOR no sétimo cromossomo é estável para o grupo de *R. crucifer*. Essa proximidade citogenética de ambos os grupos, é também verificada de forma independente por evidências moleculares (Pramuk, 2006; Chaparro et al. 2007), onde as topologias da família Bufonidae mostram os dois grupos como clados irmãos.

Através das técnicas de Banda C, as regiões que apresentaram heterocromatina constitutiva mostraram-se similar entre eles, sendo que foi possível avaliar apenas duas populações de *R. pombali* (Viçosa e Muriaé) e uma de *R. crucifer* (Alfredo Chaves), assim, faz-se necessário uma avaliação de um maior número de localidades para confirmar essa invariabilidade desse bandejamento.

Os únicos dados disponíveis de padrões de banda-C em espécies do gênero *Rhinella* do grupo *R. crucifer* (*R. ornata*) foram indicados por Kasahara et al. (1996). Da mesma forma que em nossos resultados, as bandas ocorrem nas regiões centroméricas de todos os pares cromossômicos. Kasahara et al (1996) associaram a marcação no cromossomo 7 à presença da constrição secundária, porém, esta marcação era visível às vezes com, ou sem a presença da constrição no cariótipo. E assim como observado por Amaro-Ghilardi et al. (2007), que analisaram quatro espécies do grupo de *R. marina*, no presente estudo também foram descobertas algumas marcações nas regiões intersticiais restritas a alguns cromossomos e de ocorrência eventual (Figura 5).

Todas as espécies analisadas mostraram associação entre a heterocromatina e Ag-NORs. Em alguns casos, os padrões de distribuição de heterocromatina podem ser excelentes marcadores de linhagens. Tal foi o caso de Matsui et al. (1985), os quais reconheceram seis cariótipos no complexo de espécies de *Bufo bufo* baseado nos padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva. Miura (1995) distinguiu dois cariótipos em *Bufo japonicus japonicus* usando também padrões de Banda-C, apesar da uniformidade desses cariótipos utilizando coloração convencional.

Rhinella crucifer e *R. pombali* tem os padrões de Banda-C e Ag-NOR exatamente como observado em trabalhos anteriores (e.g. Kasahara et al. 1996; Baldissera-Jr et al. 1999; Azevedo et al. 2003; Amaro-Ghilardi et al. 2007). Assim, nenhuma das espécies dos grupos de *R. marina* e *R. crucifer* apresentam padrões espécie-específico de

distribuição da heterocromatina constitutiva ou das regiões organizadoras de nucléolo. Porém, é evidente que em bufonídeos as técnicas clássicas de bandeamento, como Ag-NOR e Banda-C não são suficientes para identificar esses padrões. Análises citogenéticas deverão ser realizadas ainda em *R. henseli* e em *R. abei*, que possuem a distribuição mais meridional das espécies do gênero.

Agradecimentos

Aos amigos U. Jacobina e C. B. Lima pela ajuda na fase inicial desse projeto com críticas e sugestões além da parte laboratorial. Aos amigos do Museu de Zoologia João Moojen pela coleta de alguns exemplares utilizados. Ao InstitUG Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela licença de coleta (ICMBio 17696-1).

Referências Bibliográficas

- Amaro-Gulardi, R.C.; Silva, M.J.J.; Rodrigues, M.T. & Yonenaga-Yassuda, Y. 2007. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). **Genetica (The Hague)**. 134: 159-168.
- Azevedo M.F.C.; Foresti, F.; Ramos, P.R.R. & Jim, J. 2003. Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. **Genetics and Molecular Biology**. 26: 289-294.
- Baldissera-Jr, F.A.; Batistic, R.F. & Haddad, C.F.B. 1999. Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). **Amphibia-Reptilia**. 20(3): 413-420.

- Baldissera-Jr, F.; Caramaschi, U. & Haddad, C.F.B. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with description of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Arquivos do Museu Nacional**. 62(3): 255-282.
- Beçak, M.L.; Denaro, L. & Beçak, W. 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics**. 9: 225-238.
- Beçak, M.L. 1986. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**. 21: 191-208.
- Beckert W.H. & Doyle, B.W. 1968. *Bufo regularis*, a twenty-chromosome toad. **Genetic Research**. 11: 209-210.
- Bogart, J.P. 1968. Chromosome number difference in the amphibian genus *Bufo*: the *Bufo regularis* species group. **Evolution**. 22: 42-45.
- Bogart, J.P. 1972. Karyotypes. In Blair, W.F. (ed). **Evolution in the genus *Bufo***. Univ. Texas Press, Austin. pp. 171-195.
- Bogart, J.P. & Perret, J.P. 1977. The karyotype of *Bufo danielae* Perret. **Revue Suisse de Zoologie**. 84: 501-504.
- Bogart J.P. & Tandy, M. 1976. Polyploid amphibians: three more diploid-tetraploid cryptic species of frogs. **Science**. 193: 334-335.
- Brum-Zorilla, N. & F. A. Saez, 1971. Chromosomes of South American Bufonidae (Amphibia, Anura). **Experientia**. 27: 470-471.
- Brum-Zorilla, N, & Saez, F.A. 1971. Chromosome of South American Bufonidae (Amphibia, Anura). **Experientia**. 27: 470-471.
- 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(2): 203-212.

- Duellman, W.E. & Schulte, R. 1992. Description of a new species of *Bufo* from northern Peru with comments on phonetic groups of South American toads (Anura: Bufonidae). **Copeia** 1992: 162-172.
- Formas, J.R. 1978. The chromosomes of *Bufo rubropunctatus* and *Bufo chilensis* (Anura, Bufonidae) and other species of the *spinulosus* group. **Experientia**. 34: 452-454.
- Frost, D. R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; De Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. & Wheeler, W.C. 2006. The Amphibian tree of life. **Bulletin of The American Museum of Natural History**. 297: 370pp.
- Frost, D.R. 2009. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Electronic Database Accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.
- Howell, W.M. & Black, D.A. 1980. Controlling silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. 36: 1014-1015.
- Kasahara, S.; Silva, A.P.Z. & Haddad, C.F.B. 1996. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Brazilian Journal of Genetics**. 19: 237-242.
- King, M. 1990. Animal cytogenetics. In: Jonh, B, Gwent, C. (eds) **Chordata 2. Amphibia**, vol 4. Gebrüeder Borntraeger, Berlim. 241 p.

- Kuramoto, M. 1990. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**. 39:83-127.
- Levan, A.; Fredga, K. & Sabdberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 52: 201-220.
- Low, B.S. 1972. Evidence from parotoid-gland secretions. In Blair, W.F. (ed). **Evolution in the genus Bufo**. Univ. Texas Press, Austin, pp. 244-264.
- Matsui, M.; Seto, T.; Kohsaka, Y. & Borkin, L.J. 1985. Bearing of chromosome C-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. **Amphibia-Reptilia**. 6: 23-33.
- Maxson, L.R. 1984. Molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus *Bufo*. **Molecular Biology and Evolution**. 1: 345-356.
- McDiarmid, R.W. 1971. Comparative morphology and evolution of frogs of the neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. **Bulletin of Los Angeles County Museum of Natural History**. 12: 1-66.
- Miura, I. 1995. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. **Caryologia**. 48: 123-136.
- Morescalchi, A. & Gargiulo, G. 1968. Su alcune relazione cariologiche del genere *Bufo* (Amphibia, Salientia). **Rendiconto dell'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche**. 35: 117-120.
- Narvaes, P. & Rodrigues, M.T. 2009. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arquivos de Zoologia**. 40: 1-73.

- Piazzese, M.E.R. 1995. Cariotipo y patrones de bandas C en *Bufo spinulosus arequipensis* (Amphibia: Anura). **Revista Ecológica Latino Americana**. 2: 5-11.
- Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; & Wells, K.D. 1998. **Herpetology**. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ. 577 pp.
- Pramuk, J.B. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**. 146: 407-452.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**. 66: 361-368.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75: 304-306.

ANEXO 1

Protocolos utilizados

Técnica de obtenção de cromossomos a partir de intestino

1. Injetar, intraperitonealmente, solução de colchicina a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1 mL/10 g de peso do animal, cerca de 4 h antes do sacrifício.
2. Após o sacrifício, retirar todo intestino delgado e uma parte do estômago (para auxiliar na manipulação). Apoiando o intestino no dedo indicador, abri-lo longitudinalmente, iniciando pelo estômago. Lavar com solução de citrato de sódio a 0,9% para retirar restos de alimento.
3. Fazer o tratamento hipotônico colocando o intestino em uma placa de Petri com cerca de 3 mL de solução de citrato de sódio a 0,9%, à temperatura ambiente, durante 25 a 30 min. Durante esse processo, movimentar a placa para impedir que o intestino se dobre.
4. Após a hipotonização, transferir o intestino para uma placa de Petri contendo fixador Carnoy (metanol:ácido acético, 3vv:1v) e, gentilmente, raspar a mucosa intestinal com auxílio de uma pequena espátula. Após 20 min, transferir a suspensão para um tubo de centrífuga. Centrifugar e descartar o sobrenadante.
5. Adicionar fixador, pipetar e fazer pelo menos mais duas lavagens. Seguir os demais passos como descrito na técnica de obtenção de cromossomos a partir de medula óssea.

Observação: Em geral, a técnica produz melhores resultados (bom índice mitótico), quando o animal for sacrificado imediatamente após ser coletado na natureza ou se alimentado em cativeiro, um pouco antes de se iniciar o procedimento técnico.

Técnica de obtenção de Banda C (Heterocromatina Constitutiva)

1. Incubar a lâmina em solução 0,2 N de ácido clorídrico, à temperatura ambiente, durante 30 a 45 min.

2. Lavar em água destilada.
3. Incubar em solução de hidróxido de bário octahidratado $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ a 5%, à temperatura de 60 °C, durante 10 a 20 segundos. Lavar em água destilada.
4. Passar rapidamente em solução 1 N de ácido clorídrico, a 60 °C. Lavar em água destilada.
5. Incubar em solução de 2xSSC, a 60 °C, durante 15 min. Lavar em água destilada.
6. Corar com solução de Giemsa (2 mL da solução comercial + 28 mL de tampão fosfato, pH 6,8), durante 20 min.
7. Lavar em água destilada. Secar.

Técnica de coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolo pelo Nitrato de Prata (Ag-NORs)

1. Proceder a hidrólise, incubando a lâmina em solução 1 N de ácido clorídrico, a 60 °C, durante 3 min. Sem lavar a lâmina, deixar secá-la à temperatura ambiente.
2. Pingar na lâmina uma gota de solução coloidal reveladora e, sobre ela, duas gotas de solução a 50% de nitrato de prata. Cobrir com lamínula.
3. Incubar a lâmina em câmara úmida, preparada com placa de Petri forrada com papel-filtro, a 60 °C, durante 3 minUGs.
4. Lavar em água destilada.
5. Corar em solução de Giemsa (ver coloração convencional), durante 30 segundos.
6. Lavar em água destilada. Secar.

ANEXO 2

Tabela 1. Espécimes analisados neste trabalho.

Código	Taxa	Sexo	Procedência	UF	Coordenadas Município (lat° / lon°)
DS044	<i>Rhinella pombali</i>	M	Sete Cachoeiras, Ferros/ MG	MG	-19.235818° / -43.019063
DS045	<i>Rhinella pombali</i>	M	Sete Cachoeiras, Ferros/ MG	MG	-19.235818° / -43.019063
DS063	<i>Rhinella aff. crucifer</i>	M	Área de Proteção Ambiental Pandeiros.	MG	-44.821667 / -15.440556
CT 1585	<i>Rhinella pombali</i>	-	Parque Estadual Serra do Brigadeiro	MG	-20.686322 / -42.461827
CT 1679	<i>Rhinella pombali</i>	-	Caratinga	MG	-19.790428 / -42.139286
CT 1404	<i>Rhinella pombali</i>	F	Belisário, Muriaé	MG	-20.916667 / -42.466667
CT 1405	<i>Rhinella pombali</i>	F	Coimbra	MG	-20.849815 / -42.789975
CT 1412	<i>Rhinella pombali</i>	F	Coimbra	MG	-20.849815 / -42.789975
CT 1408	<i>Rhinella pombali</i>	F	Macuco, Muriaé	MG	-21.133333 / -42.500000
CT 1532	<i>Rhinella crucifer</i>	F	Alfredo Chaves	ES	-20.635712 / -40.749310
CT 1406	<i>Rhinella pombali</i>	F	Muriaé	MG	-21.130315 / -42.367389
CT 1680	<i>Rhinella pombali</i>	F	Sto. Ant. Manhuaçu, Caratinga	MG	-19.726520 / -41.818270
CT 1431	<i>Rhinella pombali</i>	F	Parque Estadual Serra do Brigadeiro	MG	-20.686322 / -42.461827
CT 1538	<i>Rhinella pombali</i>	M	Belmiro Braga	MG	-21.922997 / -43.402699
CT 1539	<i>Rhinella pombali</i>	M	Belmiro Braga	MG	-21.922997 / -43.402699
CT 1540	<i>Rhinella pombali</i>	M	Belmiro Braga	MG	-21.922997 / -43.402699
CT 1745	<i>Rhinella pombali</i>	M	Floresta Estadual do Uaimii, Ouro Preto	MG	-20.296623 / -43.574757
CT 1385	<i>Rhinella pombali</i>	M	Ipanema	MG	-19.801256 / -41.713840
CT 1432	<i>Rhinella pombali</i>	M	Macuco, Muriaé	MG	-21.133333 / -42.500000
CT 1748	<i>Rhinella pombali</i>	M	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524
CT 1531	<i>Rhinella crucifer</i>	M	Alfredo Chaves	ES	-20.635712 / -40.749310
CT 1533	<i>Rhinella crucifer</i>	M	Alfredo Chaves	ES	-20.635712 / -40.749310
CT 1301	<i>Rhinella pombali</i>	M	Muriaé	MG	-21.130315 / -42.367389
CT 1302	<i>Rhinella pombali</i>	M	Muriaé	MG	-21.130315 / -42.367389
CT 1313	<i>Rhinella pombali</i>	M	Muriaé	MG	-21.130315 / -42.367389
CT 1372	<i>Rhinella pombali</i>	M	Parque Estadual Serra do Brigadeiro	MG	-20.686322 / -42.461827
CT 1373	<i>Rhinella pombali</i>	M	Parque Estadual Serra do Brigadeiro	MG	-20.686322 / -42.461827
CT 1407	<i>Rhinella pombali</i>	M	Pirapanema, Muriaé	MG	-21.077683 / -42.435631
CT 1386	<i>Rhinella pombali</i>	M	Sto. Ant. Manhuaçu, Caratinga	MG	-19.726520 / -41.818270
CT 1387	<i>Rhinella pombali</i>	M	Sto. Ant. Manhuaçu, Caratinga	MG	-19.726520 / -41.818270
CT 1411	<i>Rhinella pombali</i>	M	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524
CT 1676	<i>Rhinella pombali</i>	M	Caratinga	MG	-19.790428 / -42.139286
CT 1677	<i>Rhinella pombali</i>	M	Caratinga	MG	-19.790428 / -42.139286
CT 1376	<i>Rhinella pombali</i>	M	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524
CT 1384	<i>Rhinella pombali</i>	M	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524
CT 1569	<i>Rhinella pombali</i>	M	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524
CT 1187	<i>Rhinella pombali</i>	-	Muriaé	MG	-21.130315 / -42.367389
CT 1403	<i>Rhinella pombali</i>	-	Viçosa	MG	-20.754590 / -42.882524

2.2. Santana, D.J.; Hote, P.S.; Feio, R.N. & Dergam, J.A. Análise morfométrica de populações de *Rhinella pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004).

Análise morfométrica de populações de *Rhinella pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004).

Diego José Santana^{1,2*}, Priscila Soares Hote², Renato Neves Feio², Jorge Abdala Dergam¹

¹*Beagle – Laboratório de Sistemática Molecular Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil.*

²*Museu de Zoologia João Moojen, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. CEP 36571-000, Viçosa, MG, Brasil*

* *santana_herpeto@yahoo.com.br*

Abstract

Rhinella pombali is a species recently separated from *R. crucifer*, and considered restricted to the state of Minas Gerais, in southeastern Brazil. Although their systematics was recently revised, it remains some taxonomic and geographical inconsistencies, due mainly to morphological variation of the *R. crucifer* group. This work analyzed the external morphology and 25 morphometrical characters of specimens of *R. pombali*, distributed in 10 geographical unities (GUs) to verify the interpopulational variation of this species and detect possible variations along geographical gradients. Sexually dimorphic traits were also included. The analysis of regional aspects of sympatry between *R. pombali* and other species of the *R. crucifer* group in Espírito Santo and Rio de Janeiro states, led to some inconsistencies for the expected geographical distribution of taxonomic characters. The results indicate the existence of high level of morphometrical sexual dimorphism and some morphological

differences between males and females. The analyses of the 10 OTUs showed absence of significant levels of differentiation among them.

Resumo

Separada recentemente de *R. crucifer*, *R. pombali* é uma espécie restrita ao Estado de Minas Gerais. Embora uma revisão sistemática tenha sido feita há pouco tempo, algumas inconsistências taxonômicas e geográficas seriam esperadas devido à grande variação morfológica das espécies do grupo de *R. crucifer*. Baseamos nosso trabalho no estudo da morfologia externa e em 25 caracteres morfométricos de 10 unidades taxonômicas operacionais para verificar o nível de variação interpopulacional deste táxon e definir possíveis variações em gradientes geográficos. Apresentamos também dados de dimorfismo sexual para a espécie. Analisando aspectos regionais de simpatria de *R. pombali* com outras espécies do grupo nos estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, percebemos algumas inconsistências quanto ao registro geográfico nesses locais. Vemos que a espécie apresenta acentuado dimorfismo morfométrico e algumas diferenças morfológicas separando machos e fêmeas. Nas análises populacionais entre as 10 UGs, foi verificado que não há separação significativa entre elas, não apresentando também tendências de separação.

Introdução

As espécies do grupo de *Rhinella crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) encontram-se distribuídas por todos os domínios morfo-climáticos da Floresta Atlântica, desde o Estado do Ceará até o Estado do Rio Grande do Sul e adentrando os estados de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Distribuem-se, também, no leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Frost, 2009).

Este grupo foi revisado recentemente (Baldissera-Jr et al. 2004), sendo que anteriormente muitos nomes estavam disponíveis para diversas populações ao longo da distribuição das espécies devido à grande variação cromática entre os táxons, ou mesmo pela variação intraespecífica. O grupo é composto por *R. abei* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004), *R. crucifer* (Wied-Neuwied, 1821), *R. henseli* (A. Lutz, 1934), *R. ornata* (Spix, 1824), *R. pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004) e é caracterizado por uma série de características morfológicas (para revisão ver Baldissera-Jr, 2001).

A espécie *Rhinella pombali* (Baldissera-Jr, Caramaschi & Haddad, 2004), foi separada de *R. crucifer*, sendo *R. pombali* restrita ao estado de Minas Gerais, com sua localidade tipo em São Gonçalo do Rio Abaixo, e de distribuição geográfica através da Mata Atlântica e áreas de transição com o cerrado no Estado. Como todas as espécies do grupo, é uma espécie bastante adaptada a ambientes antropizados, sendo bastante comum em parques ou jardins (Santana et al. 2010). *Rhinella pombali* apresenta o corpo recoberto por glândulas que conferem à sua pele um aspecto bastante rugoso. É uma espécie de tamanho relativamente grande para o grupo (♂ comprimento rostro-cloacal (CRC) 54,5-92,7 mm; ♀ 74,9-118,7 mm), cabeça mais larga que longa, com uma subdivisão claramente observada entre a cabeça e o corpo em vista dorsal; focinho arredondado em vista dorsal; cristas craniais conspícuas; glândulas paratóides ovóides, não subdivididas, mais largas na porção anterior, e em vista lateral pendendo sobre a lateral do corpo; primeiro tubérculo da fileira lateral sempre em contato com a glândula paratóide; padrão geral cinza escuro nos membros, variando para um padrão único de coloração mais clara; em vida, as marcas amarelas aproximam da cloaca e na superfície posterior das coxas pode ocorrer uma linha de tubérculos na superfície ventral da parte

posterior do esqueleto, formando uma franja em indivíduos grandes (Baldissera-Jr et al. 2004).

Estudos com análises multivariadas para o estudo de populações e espécies de anfíbios têm sido amplamente utilizados (e.g. Prado & Pombal, 2008; Narvaes & Rodrigues, 2009; Napoli et al. 2009). Os métodos morfométricos podem ser usados para detectar diferenças sutis entre populações (Reyment et al. 1981). A morfometria multivariada é útil na detecção de diferenças e no estudo das variações de caracteres quantitativos (Cavalcanti & Lopes 1993). A Análise de Componentes Principais (ACP) utilizada na ordenação dos dados morfométricos permite que parâmetros biológicos possam ser mais facilmente detectados e interpretados (Blackith & Reyment 1971; Reis 1988).

Embora uma revisão sistemática tenha sido feita há pouco tempo (Baldissera-Jr et al. 2004), algumas inconsistências taxonômicas e geográficas poderiam ser encontradas devido à grande variação morfológica das espécies, uma vez que as espécies são muito semelhantes entre si, e a inclusão de espécimes de localidades mais distantes poderia apresentar padrões inconsistentes de variação.

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar estatisticamente a variação morfológica e morfométrica de amostras populacionais de *R. pombali*.

Material e Métodos

Este trabalho se baseou no estudo da morfologia externa e em dados morfométricos de exemplares de *R. pombali* fixados em formol 10% e preservados em álcool 70%. Para verificar o nível de variação interpopulacional deste táxon e definir possíveis variações em gradientes geográficos, sendo estas amostras populacionais organizadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UGs) divididos por localidades

geográficas (ou populações), como proposto por Heyer (1983). Cada UG incluiu no mínimo 5 exemplares. Outras espécies do grupo de localidades com distribuição conhecida em limites com a distribuição de *R. pombali*. Localidades estas definidas *a priori* foram utilizadas na comparação, para um melhor entendimento sobre a variação morfométrica de *R. pombali* buscando dessa forma auxiliar em sua taxonomia e revelar a real distribuição geográfica deste táxon.

Os dados da morfologia externa utilizados no estudo, são caracteres usualmente utilizados em estudos de taxonomia, seguindo Heyer et al. (1990) e aspectos mencionados na diagnose da espécie por Baldissera-Jr et al. (2004).

Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de significância de 5%. Foram utilizados “análise de componentes principais” (ACP), visto que se mostra um procedimento empregado em estudos de variação geográfica, objetivando-se verificar as distâncias morfométricas entre as UGs (Tabela 1, Figura 1).

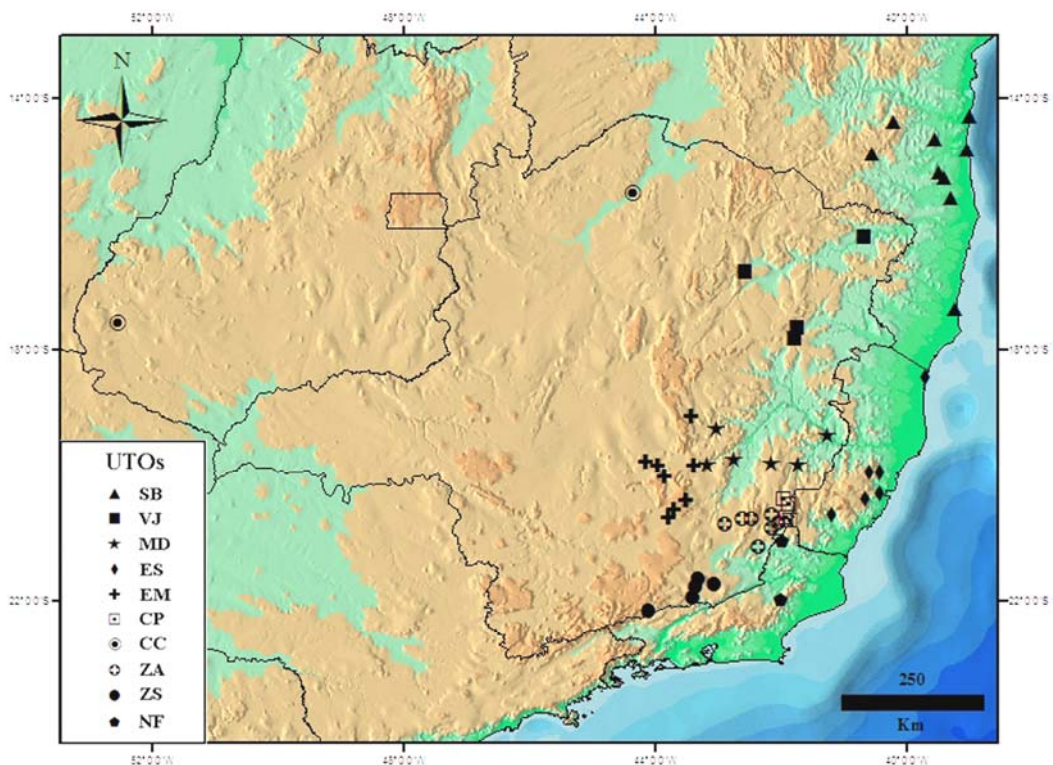


Figura 1. Distribuição das localidades de *Rhinella pombali* e *R. crucifer* utilizadas para a estruturação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UGs) definidas na tabela 1.

Tabela 1. Unidades Taxonômicas Operacionais (UGs) utilizadas para a análise das amostras populacionais de *Rhinella pombali*, com suas respectivas áreas de abrangência.

UG	Nome	Abrangência
SB	Sul da Bahia	BA: Arataca, Barra do Choça, Boa Nova, Coaraci, Ilhéus, Itacaré, Jussari, Mascote, Prado
VJ	Vale do Jequitinhonha	MG: Almenara, Ladainha, Poté, Irapé
CC	Cerrado Central	GO: Mineiros; MG: Januária
MD	Médio Rio Doce	MG: João Monlevade, Ipanema, Caratinga, Ferros, PERD (Marliéria), Resplendor
ES	Espírito Santo	ES: Cariacica, Castelo, Domingos Martins, Fundão, Itaúnas, Santa Teresa
CP	Caparaó	ES: Dolores do Rio Preto; MG: Espera Feliz, Alto Caparaó, Manhumirim
EM	Espinhaço Meridional	MG: Belo Horizonte, Conceição do Mato Dentro, Conselheiro Lafaiete, Ouro Preto, Ouro Branco, São Gonçalo do Rio Abaixo (Localidade Tipo), Nova Lima, Ucrânia
ZA	Zona da Mata Alta	MG: Viçosa, Muriaé, Canaã, PESB (Araponga), Pedra Dourada, Carangola, Divino
ZS	Zona da Mata Sul	MG: Belmiro Braga, Bicas, Coronel Pacheco, Juiz de Fora, Santa Rita de Jacutinga
NF	Norte Fluminense	RJ: Santa Maria Madalena, Natividade

Foram examinados os 25 caracteres morfométricos seguidos por Baldissera-Jr et. al (2004) os quais ele apresenta como significativos para estudos com morfometria das espécies do grupo de *R. crucifer*. Os 25 caracteres morfométricos, obtidos sempre de medidas realizadas em linha reta, com paquímetro de precisão 0,01 mm, foram os seguintes: CRC (comprimento rostro-cloacal: medida da extremidade do focinho à extremidade posterior do corpo), CC (comprimento da cabeça: medida da extremidade do focinho ao canto da boca), LC (largura da cabeça: medida transversalmente à cabeça, na altura do canto da comissura bucal), DC (distância entre coanas: medida entre os bordos internos das coanas), DIN (distância internasal: medida entre os bordos internos das narinas), DNO (distância narina-olho: medida entre o bordo posterior da narina e o

bordo anterior do olho), DO (diâmetro do olho: medida horizontal entre os bordos anterior e posterior do olho), LP (largura da pálpebra superior: medida transversal entre o bordo externo da pálpebra superior e o bordo externo da crista supra-orbital), DIO (distância interorbital: medida transversal entre os bordos externos das cristas supra-orbitais), DOM (distância olho-borda do maxilar superior: medida vertical entre o bordo inferior do olho e o bordo do maxilar superior), CCC (comprimento da crista cantal), CCST (comprimento da crista supra-timpânica), DOT (distância olho-tímpano: medida entre o bordo posterior do olho e o bordo anterior do tímpano), DT (diâmetro do tímpano: distancia horizontal entre os bordos anterior e posterior do tímpano), AT (altura do tímpano: distância vertical entre os bordos superior e inferior do tímpano), DGP (distância entre glândulas paratóides: medida transversal entre os bordos internos anteriores das glândulas paratóides), CA (comprimento do antebraço: medida entre a articulação da mão e a articulação braço com o antebraço), CB (comprimento do braço: medida entre a articulação do braço com o antebraço e a articulação do braço com a cintura escapular), CCCI (comprimento do calo carpal interno), LCCI (largura do calo carpal interno), MAO (comprimento da mão: medida entre a articulação antebraço-mão e a base do terceiro dedo), DAV (distância axila-virilha: medida longitudinal entre a axila e a virilha), COXA (comprimento da coxa: medida entre a articulação da coxa com a cintura pélvica e a articulação da coxa com a tíbia), TIBIA (comprimento da tíbia: medida entre a articulação da coxa com a tíbia e a articulação do tarso com a tíbia) e TARSO (comprimento do tarso: medida entre a articulação do tarso com a tíbia e a base do calo metatarsal externo).

Para o tratamento estatístico de dimorfismo sexual, o teste t, conforme indicado por Zar (1984) e Análise de Componentes Principais foram aplicados para verificar a significância da diferença entre medidas de machos e fêmeas. O dimorfismo sexual foi

analisado apenas em indivíduos da amostra ZA, para evitar possíveis variações geográficas.

Os acrônimos das instituições dos exemplares analisados utilizados neste estudo são: CHUFJF (Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG), CHUNB (Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília, DF), MBML (Museu de Biologia Mello Leitão, ES), MCNAN (Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, MG), MNRJ (Museu Nacional do Rio de Janeiro, RJ), MZUESC (Universidade Estadual de Santa Cruz, BA), MZUFV (Museu de Zoologia João Moojen, MG).

Resultados e Discussão

Aspectos regionais de simpatria

Rödder et al. (2007) citam a presença de *R. crucifer* e *R. pombali* ocorrendo em simpatria no município de Santa Teresa, Estado do Espírito Santo. Avaliando separadamente a ACP (Figura 1), sobre os 25 dados morfométricos, de exemplares procedentes do município de Santa Teresa sob a denominação desses dois nomes (RC, n= 28; RP, n=6) sendo cada espécie considerada uma UG para a análise.

Os três primeiros componentes da ACP acumularam 87.86% da variação encontrada. Os caracteres morfométricos que mais contribuíram para a discriminação obtida e suas respectivas significâncias estão apresentadas na Tabela 2.

Os indivíduos analisados apresentaram um alto grau de sobreposição, sendo que os escores individuais dos exemplares analisados foram projetados no espaço reduzido dos dois componentes principais de maiores contribuições (Figura 1).

Tabela 2. AUGvetores e coeficientes de correlação (r) da análise de componentes principais (ACP) para os 25 caracteres morfométricos de machos adultos de *Rhinella crucifer* e *Rhinella pombali* do Município de Santa Teresa, Estado do Espírito Santo, Brasil. NS, não significativo; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Caractere	PC1	PC2	PC3	r (PC1)	r (PC2)	r (PC3)
CRC	-0.698340	0.108186	-0.135246	-0.9000 ***	0.0478 ^{NS}	-0.0665 ^{NS}
CC	-0.231995	0.101699	0.077263	-0.8574 ***	0.1306 ^{NS}	0.0015 *
LC	-0.314815	0.067377	0.203413	-0.8558 ***	0.0635 ^{NS}	0.0460 ^{NS}
DC	-0.063444	0.020676	0.032676	-0.8215 ***	0.0948 ^{NS}	0.0023 ^{NS}
DIN	-0.039683	-0.011943	0.033074	-0.7375 ***	-0.0801 ^{NS}	-0.0916 ^{NS}
DNO	-0.044228	0.040658	0.058632	-0.6597 ***	0.2269 ^{NS}	0.1984 ^{NS}
DO	-0.043844	0.037070	0.040437	-0.5686 ***	0.1700 ^{NS}	-0.0278 ^{NS}
LP	-0.045955	0.016062	0.049420	-0.6592 ***	0.0818 ^{NS}	0.2514 ^{NS}
DIO	-0.109380	0.017905	0.056505	-0.8672 ***	0.0459 ^{NS}	-0.0540 ^{NS}
DOM	-0.033524	0.009466	0.042606	-0.5676 ***	0.0582 ^{NS}	0.1847 ^{NS}
CCC	-0.059764	0.073280	-0.038755	-0.7398 ***	0.3092 *	-0.0538 ^{NS}
CCST	-0.061140	0.068241	0.086279	-0.5475 ***	0.2425 ^{NS}	0.1283 ^{NS}
DOT	-0.028847	-0.002336	0.020547	-0.7085 ***	-0.0197 ^{NS}	0.0176 ^{NS}
DT	-0.047841	0.040895	0.006030	-0.5758 ***	0.1845 ^{NS}	0.0107 ^{NS}
AT	-0.050938	0.029870	-0.005212	-0.7128 ***	0.1484 ^{NS}	-0.1899 ^{NS}
DGP	-0.170950	0.029478	0.161192	-0.6615 ***	0.0398 ^{NS}	0.0057 ^{NS}
CA	-0.157324	-0.019224	0.014374	-0.8506 ***	-0.0356 ^{NS}	-0.0217 ^{NS}
CB	-0.112977	-0.126539	-0.059955	-0.7191 ***	-0.2518 ^{NS}	-0.0562 ^{NS}
CCCI	-0.037639	0.081587	-0.080015	-0.2334 ^{NS}	0.1902 ^{NS}	-0.0635 ^{NS}
LCCI	-0.022952	0.024537	0.000989	-0.6810 ***	0.2586 ^{NS}	-0.0125 ^{NS}
MAO	-0.099479	-0.088373	0.103310	-0.5488 ***	-0.1705 ^{NS}	0.0432 ^{NS}
DAV	-0.259916	-0.769763	-0.463215	-0.7384 ***	-0.6330 ***	-0.2985 *
COXA	-0.242771	0.522027	-0.382183	-0.6085 ***	0.4602 **	-0.1750 ^{NS}
TIBIA	-0.262120	0.016455	0.075597	-0.8706 ***	0.0187 ^{NS}	-0.1204 ^{NS}
TARSO	-0.218880	-0.242723	0.705009	-0.5862 ***	-0.2273 ^{NS}	0.2251 ^{NS}

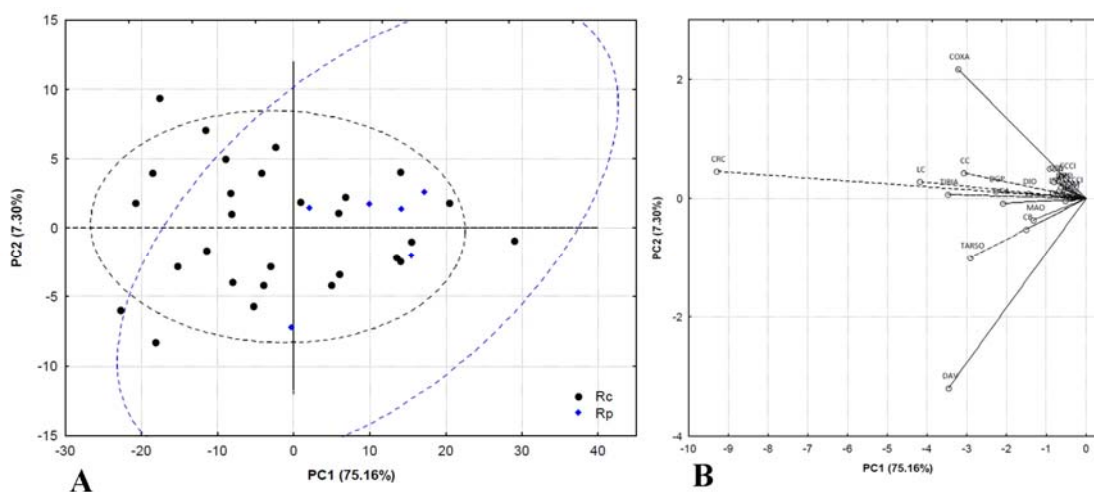


Figura 2. (A) Projeção dos escores individuais resultado da Análise dos Componentes Principais (ACP) para 25 caracteres morfométricos de machos adultos de espécimes de *Rhinella crucifer* e *R. pombali* provenientes de Santa Teresa, ES. *Rc*, *Rhinella crucifer*; *Rp*, *Rhinella pombali* e (B) Projeção dos escores individuais resultantes da análise de componente principal no espaço reduzido dos dois primeiros componentes.

Em relação à ACP realizada entre as duas espécies, pode-se considerar o primeiro componente principal como um indicador de tamanho, visto que todos os aUGvetores mostram valores positivos. Os demais componentes, por alternarem valores positivos e negativos, podem ser considerados indicadores de forma (Humphries et al. 1981). A projeção dos escores individuais resultantes da análise mostrou agrupamento claro entre as amostras, sendo observada uma tendência à aglomeração dos indivíduos (Figura 1).

Da mesma forma a análise da morfologia externa conduzida posteriormente, mostra também todos os exemplares como uma espécie. Assim, todos os indivíduos encontrados no município de Santa Teresa, no estado do Espírito Santo podem ser considerados como *Rhinella crucifer*. Considera-se assim que até o momento não há registros de *R. pombali* no Estado do Espírito Santo.

Esse fato encontrado em Santa Teresa mostra que estas duas espécies são facilmente confundidas, o que corrobora a necessidade de estudos complementares que permitam a separação mais objetiva destes dois táxons com a conseqüente delimitação mais precisa das localidades onde as espécies ocorrem. A difícil identificação poderia ser explicada por uma hipótese alternativa, como a existência de uma extensa zona de hibridismo entre 2 ou mais espécies do grupo *R. crucifer*. Esta condição foi observada em espécies do gênero *Phyllomedusa* (Haddad et al. 1994), e mesmo no gênero *Rhinella*, entre *R. ornata* e *R. icterica* (Haddad, 1990). Casos de hibridismo na família Bufonidae são bem reportados em diversos grupos sul americanos, sendo conhecidas formas intermediárias em alguns grupos como *R. granulosa* e *R. marina* (Bogart, 1972).

Silveira et al. (2009) registram a presença de *R. crucifer*, *R. pombali* e *R. ornata* na região norte do Estado do Rio de Janeiro, ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul, com a presença conjunta de *R. crucifer* e *R. pombali* em 2 localidades do Estado

(Itaperuna e Santa Maria Madalena). Apenas os exemplares chamados pelos aUGres de *R. pombali* foram analisados no presente estudo e foram considerados como a UG NF. Entretanto quando analisados morfometricamente com as outras populações de *R. pombali* ao longo da distribuição da espécie, não foram observadas diferenças morfométricas que os distinguíssem das outras populações. Porém, esses espécimes não foram comparados com seus respectivos táxons sintópicos para comparações morfológicas externas. Assim, como em Silveira et al. (2009) não são apresentadas as diferenças pelos aUGres encontradas para denominar os táxons como espécies distintas, visto que o grupo em questão possui complicados padrões de variações morfológicas, podendo levar a identificações errôneas.

Dimorfismo Sexual

Exemplares machos (n=29) e fêmeas (n=14) da UG ZA foram analisados com os mesmos 25 caracteres morfométricos apresentados anteriormente. Quando comparados morfometricamente pela ACP (Figura 2), estes apresentaram diferenças significativas. Os dois primeiros componentes entre machos e fêmeas acumularam 95.33% da variação encontrada (PC1 90.35%; PC2 4.98%). Os caracteres morfométricos que mais contribuíram para a discriminação obtida e suas respectivas significâncias estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Coeficientes AUGvetores e coeficientes de correlação (*r*) da análise de componentes principais (ACP) para os 25 caracteres morfométricos de machos adultos de *Rhinella crucifer* e *Rhinella pombali* do Município de Santa Teresa, Estado do Espírito Santo, Brasil. NS, não significativo; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Caractere	PC1	PC2	PC3	<i>r</i> (PC1)	<i>r</i> (PC2)	<i>r</i> (PC3)
CRC	-0.708263	-0.229751	0.157817	-0.5816 ***	0.1091 ^{NS}	0.0345 ^{NS}
CC	-0.206915	-0.071673	0.104077	-0.5618 ***	-0.1219 ^{NS}	0.0767 ^{NS}
LC	-0.305255	-0.041634	0.134179	-0.5725 ***	-0.0794 ^{NS}	0.0676 ^{NS}
DC	-0.075001	-0.055188	-0.019283	-0.4331 ***	-0.1828 ^{NS}	-0.0373 ^{NS}
DIN	-0.036693	-0.002259	0.011898	-0.4700 **	-0.0874 ^{NS}	0.0450 ^{NS}
DNO	-0.033059	-0.005099	0.048863	-0.5007 ***	-0.0118 ^{NS}	0.1920 ^{NS}
DO	-0.035641	0.002803	0.014782	-0.5317 ***	-0.0542 ^{NS}	0.0487 ^{NS}

LP	-0.030404	0.018865	0.019553	-0.4545**	0.0932 ^{NS}	0.0735 ^{NS}
DIO	-0.113071	-0.058894	0.126476	-0.4977***	-0.1300 ^{NS}	0.1619 ^{NS}
DOM	-0.040428	-0.030142	-0.005402	-0.4013***	-0.1868 ^{NS}	-0.0180 ^{NS}
CCC	-0.064694	-0.012981	0.028768	-0.4855***	-0.1624 ^{NS}	0.0645 ^{NS}
CCST	-0.050882	-0.032756	0.038605	-0.4641***	-0.2417 ^{NS}	0.1012 ^{NS}
DOT	-0.031429	-0.018262	0.042342	-0.5463***	-0.1886 ^{NS}	0.1743 ^{NS}
DT	-0.035902	-0.011198	0.010689	-0.5367***	-0.1221 ^{NS}	0.0429 ^{NS}
AT	-0.039404	-0.021562	0.030423	-0.5062***	-0.1516 ^{NS}	0.1093 ^{NS}
DGP	-0.144924	-0.092622	-0.009585	-0.5054***	-0.1353 ^{NS}	-0.0099 ^{NS}
CA	-0.143577	-0.038367	0.248775	-0.5434***	-0.0732 ^{NS}	0.2504 ^{NS}
CB	-0.101679	0.078360	0.085254	-0.5059***	0.0170 ^{NS}	0.1072 ^{NS}
CCCI	-0.015395	0.003824	0.034287	-0.4136**	-0.1129 ^{NS}	0.2118 ^{NS}
LCCI	-0.015764	0.015187	0.033658	-0.5025***	0.1339 ^{NS}	0.2189 ^{NS}
MAO	-0.084104	0.094855	0.159214	-0.5046***	0.1516 ^{NS}	0.2538 ^{NS}
DAV	-0.353038	-0.153349	-0.851419	-0.4450**	-0.1483 ^{NS}	-0.3489*
COXA	-0.262688	0.934150	-0.116968	-0.4746***	0.4680***	-0.0530 ^{NS}
TIBIA	-0.246231	0.087387	0.288869	-0.5820***	0.0336 ^{NS}	0.1763 ^{NS}
TARSO	-0.115328	-0.033741	0.051298	-0.4670***	-0.0605 ^{NS}	0.0603 ^{NS}

Os escores individuais dos exemplares machos e fêmeas analisados foram projetados no espaço reduzido dos componentes PC1 E PC2 (Figura 2).

Fêmeas apresentaram maior tamanho em todos os 25 caracteres morfométricos, sendo que as médias de todos eles revelaram médias com diferenças estatisticamente significativas entre machos e fêmeas (Tabela 4).

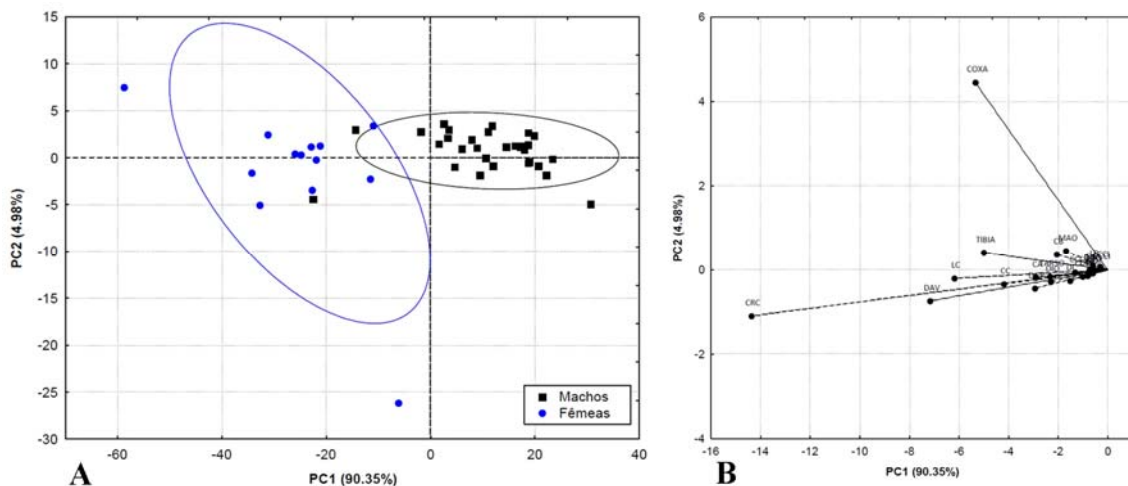


Figura 3. (A) Projeção dos escores individuais resultado da Análise dos Componentes Principais (ACP) para 25 caracteres morfométricos de espécimes adultos machos e fêmeas de *Rhinella pombali* provenientes da UG ZA e (B) Projeção dos escores individuais resultantes da análise de componente principal no espaço reduzido dos dois primeiros componentes.

Dimorfismo sexual com fêmeas maiores do que machos é comum entre anuros (Shine, 1979), mas existem diferentes interpretações sobre como esta característica surgiu (Thomé & Brasileiro, 2007). As fêmeas maiores seriam selecionadas por sua capacidade reprodutiva (maior produção de óvulos ou de óvulos maiores) (Crump & Kaplan 1979, Prado et al. 2000). Por sua vez, machos não atingiriam tamanhos grandes devido a restrições energéticas relacionadas à reprodução (Woolbright, 1983), ou à maior pressão de predação decorrente de atividades relacionadas à reprodução (Ryan, 1985).

O padrão dimórfico de tamanho de *R. pombali* tem sido indicado para várias espécies do gênero *Rhinella* (e.g. Maciel, 2008; Narvaes & Rodrigues, 2009). Em *R. pombali*, as causas do dimorfismo também podem estar relacionadas ao aumento de fecundidade das fêmeas, geralmente associado ao padrão de reprodução explosiva (Sebbins & Cohen 1995). Embora *R. pombali* não apresenta comportamento reprodutivo explosivo, ela tem um curto período de reprodução em diversos locais (por exemplo, Grandinetti & Jacobi, 2005; Canelas & Bertoluci, 2007; Assis, 2009). A grande quantidade de ovos presentes nos grandes cordões gelatinosos das desovas de *Rhinella* (Eterovick & Sazima, 2004) sugere novamente uma relação direta entre o maior tamanho da fêmea e a alta produção de óvulos (Crump & Kaplan 1979, Prado et al. 2000).

Tabela 4. Resultados da análise do teste *t* para os 25 caracteres morfométricos de machos e fêmeas da UG ZA.

Caracter	Média ♂♂	Média ♀♀	P	t
CRC	75.33	102.19	< 0.0001	11.88
CC	23.38	31.27	< 0.0001	11.46
LC	28.38	39.91	< 0.0001	11.38
DC	6.61	9.62	< 0.0001	9.93
DIN	4.63	6.1	< 0.0001	7.74
DNO	4.84	6.03	< 0.0001	6.3
DO	6.65	7.89	< 0.0001	5.03
LP	6.04	7.01	< 0.0001	4.13

Caracter	Média ♂♂	Média ♀♀	P	t
DIO	11.88	16.32	< 0.0001	10.48
DOM	2.65	4.44	< 0.0001	12.98
CCC	5.8	8.3	< 0.0001	10.11
CCST	3.63	5.62	< 0.0001	8.05
DOT	2.12	3.35	< 0.0001	7.47
DT	4.05	5.4	< 0.0001	8.9
AT	4.9	6.45	< 0.0001	8.15
DGP	1.86	2.61	< 0.0001	12.09
CA	17.62	22.92	< 0.0001	8.57
CB	15.62	18.8	< 0.0001	4.79
CCCI	3.42	3.97	0.0003	3.76
LCCI	2.27	2.73	0.0093	2.61
MAO	11.99	14.43	< 0.0001	4.58
DAV	30.93	44.61	< 0.0001	8.01
COXA	33.76	41.05	0.0077	2.75
TIBIA	33.84	42.14	< 0.0001	7.51
TARSO	15.28	19.23	< 0.0001	5.25

Além da significativa distância morfométrica, machos e fêmeas diferenciam entre si em vários aspectos. Machos (Figura 3A) apresentam as mesmas características como apresentadas na descrição da espécie por Baldissera-Jr et al. (2004). Porém, as fêmeas (Figura 3B) que não possuem descrição formal com dados de dimorfismo sexual, geralmente apresentam coloração mais viva, sendo a linha vertebral mais freqüente e a faixa negra, que acompanha a linha vertebral mais clara, é melhor demarcada e, por vezes, mais larga. A coloração amarelada em torno da região cloacal, está sempre presente nos espécimes de ambos os sexos, mas nas fêmeas, o colorido é mais intenso essas linhas amarelas são mais largas que nos machos.

Este padrão da coloração mais viva e intensa em fêmeas é também observado em outras espécies do gênero *Rhinella*. Algumas espécies do grupo *R. marina* como *R. icterica*, *R. cerradensis* e *R. veredas*, apresentam dimorfismo sexual bem mais acentuado. Nestas espécies os machos possuem coloração dorsal uniforme, enquanto que as fêmeas apresentam coloração preta em muitas áreas de dorso (as vezes nos membros posteriores) (Heyer et al., 1990; Brandão et al., 2007; Maciel et al., 2007).

Além dessas pequenas diferenças, os machos de *R. pombali* possuem, como a maioria dos anuros, fenda vocal lateral à língua. No período reprodutivo, ou próximo dele, aparecem calosidades nupciais, sempre na superfície dorsal do dedo I, podendo estar presente também no dedo II ou mesmo chegar ao dedo III. Outra diferença são os braços dos machos, os quais são proporcionalmente mais robustos.

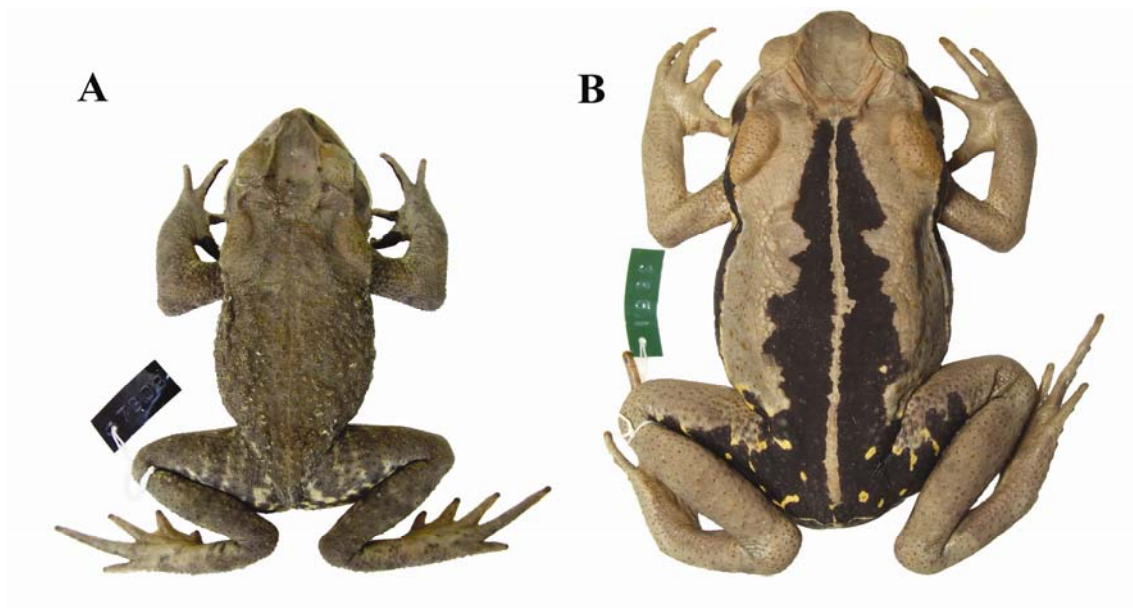


Figura 4. *Rhinella pombali*: (A) Exemplar macho (MZUFV 7303; CRC 81.82) proveniente APA Pedra Dourada, Município de Pedra Dourada (MG), e (B) fêmea (MZUFV 3851; CRC 122.87) proveniente Estadual da Serra do Brigadeiro, Município de Araçuaia (MG).

Análise morfométrica em nível de populações

Os 3 primeiros componentes principais da ACP das 10 UGs de *Rhinella* analisadas neste estudo, acumularam 90.25% da variação encontrada (PC1 77.88%; PC2 9.21%; PC3 3.06%). Os caracteres morfométricos que mais contribuíram para a discriminação obtida e suas respectivas significâncias estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. AUGvetores e coeficientes de correlação (r) da análise de componentes principais (ACP) para os 25 caracteres morfométricos de machos adultos de *Rhinella crucifer* e *Rhinella pombali* de diversas populações dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia, Brasil. NS, não significativo; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Caractere	PC1	PC2	PC3	r (PC1)	r (PC2)	r (PC3)
CRC	-0.698340	0.108186	-0.135246	-0.9000 ***	0.0478 ^{NS}	-0.0665 ^{NS}
CC	-0.231995	0.101699	0.077263	-0.8574 ***	0.1306 ^{NS}	0.0015*
LC	-0.314815	0.067377	0.203413	-0.8558 ***	0.0635 ^{NS}	0.0460 ^{NS}
DC	-0.063444	0.020676	0.032676	-0.8215 ***	0.0948 ^{NS}	0.0023 ^{NS}
DIN	-0.039683	-0.011943	0.033074	-0.7375 ***	-0.0801 ^{NS}	-0.0916 ^{NS}
DNO	-0.044228	0.040658	0.058632	-0.6597 ***	0.2269 ^{NS}	0.1984 ^{NS}
DO	-0.043844	0.037070	0.040437	-0.5686 ***	0.1700 ^{NS}	-0.0278 ^{NS}
LP	-0.045955	0.016062	0.049420	-0.6592 ***	0.0818 ^{NS}	0.2514 ^{NS}
DIO	-0.109380	0.017905	0.056505	-0.8672 ***	0.0459 ^{NS}	-0.0540 ^{NS}
DOM	-0.033524	0.009466	0.042606	-0.5676 ***	0.0582 ^{NS}	0.1847 ^{NS}
CCC	-0.059764	0.073280	-0.038755	-0.7398 ***	0.3092*	-0.0538 ^{NS}
CCST	-0.061140	0.068241	0.086279	-0.5475 ***	0.2425 ^{NS}	0.1283 ^{NS}
DOT	-0.028847	-0.002336	0.020547	-0.7085 ***	-0.0197 ^{NS}	0.0176 ^{NS}
DT	-0.047841	0.040895	0.006030	-0.5758 ***	0.1845 ^{NS}	0.0107 ^{NS}
AT	-0.050938	0.029870	-0.005212	-0.7128 ***	0.1484 ^{NS}	-0.1899 ^{NS}
DGP	-0.170950	0.029478	0.161192	-0.6615 ***	0.0398 ^{NS}	0.0057 ^{NS}
CA	-0.157324	-0.019224	0.014374	-0.8506 ***	-0.0356 ^{NS}	-0.0217 ^{NS}
CB	-0.112977	-0.126539	-0.059955	-0.7191 ***	-0.2518 ^{NS}	-0.0562 ^{NS}
CCCI	-0.037639	0.081587	-0.080015	-0.2334*	0.1902 ^{NS}	-0.0635 ^{NS}
LCCI	-0.022952	0.024537	0.000989	-0.6810 ***	0.2586 ^{NS}	-0.0125 ^{NS}
MAO	-0.099479	-0.088373	0.103310	-0.5488 ***	-0.1705 ^{NS}	0.0432 ^{NS}
DAV	-0.259916	-0.769763	-0.463215	-0.7384 ***	-0.6330 ***	-0.2985 ^{NS}
COXA	-0.242771	0.522027	-0.382183	-0.6085 ***	0.4602**	-0.1750 ^{NS}
TIBIA	-0.262120	0.016455	0.075597	-0.8706 ***	0.0187 ^{NS}	-0.1204 ^{NS}
TARSO	-0.218880	-0.242723	0.705009	-0.5862 ***	-0.2273 ^{NS}	0.2251 ^{NS}

Os escores individuais dos exemplares analisados foram projetados no espaço reduzido dos dois componentes principais de maiores contribuições (Cavalcanti e Lopes, 1993) (Figura 4 e 5).

Em relação à ACP realizada entre as dez UGs, pode-se considerar o primeiro componente principal como um indicador de tamanho, visto que todos os aUGvetores mostraram valores positivos. Os demais componentes, por alternarem valores positivos e negativos, podem ser considerados indicadores de forma (Humphries et al. 1981). A projeção dos escores individuais resultantes da análise não mostrou agrupamento claro entre as amostras de acordo com a localidade, não observando nem mesmo tendências de aglomeração (Figura 4).

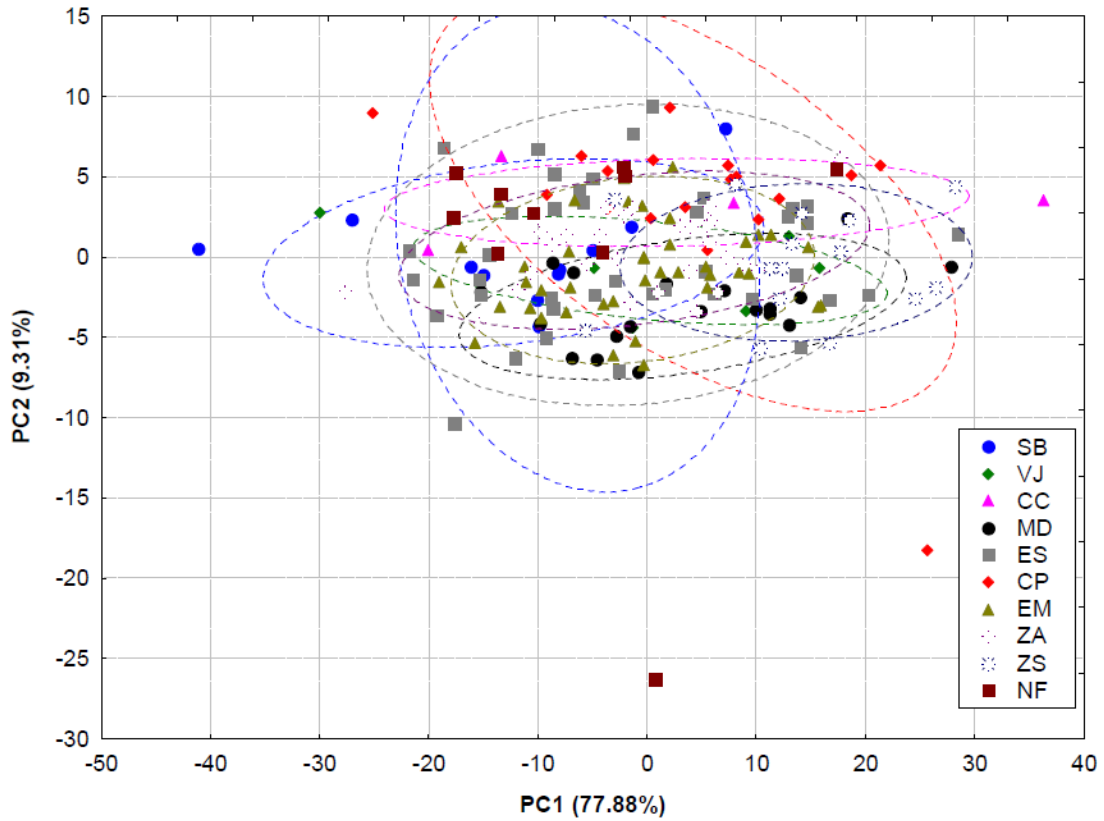


Figura 5. Projeção dos escores individuais resultado da Análise dos Componentes Principais (ACP) para 25 caracteres morfométricos de espécimes adultos machos de *Rhinella pombali* e *Rhinella crucifer* provenientes das 25 UGs analisadas neste estudo.

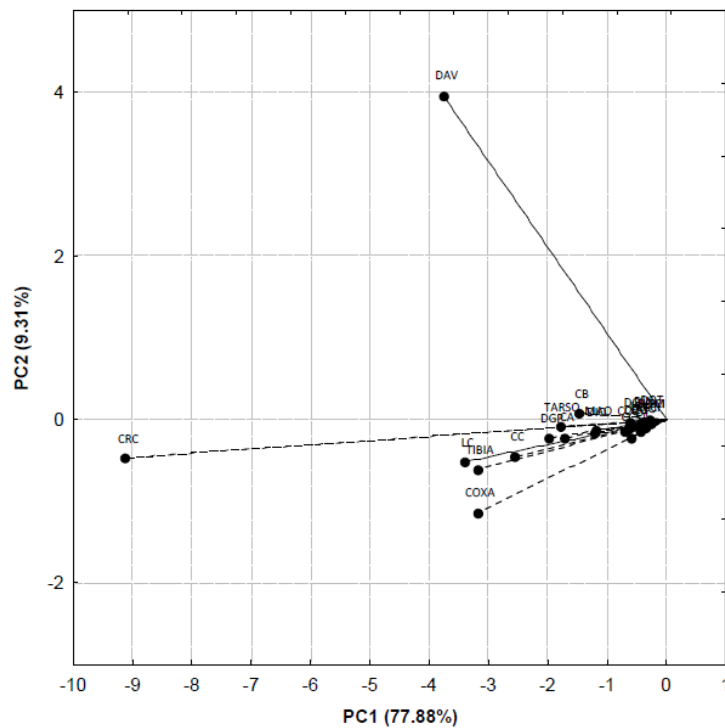


Figura 6. Projeção dos escores individuais resultantes da análise de componente principal no espaço reduzido dos dois primeiros componentes.

Como mencionado por Baldissera-Jr (2001), análises morfométricas são utilizadas como ferramenta auxiliar para o entendimento da estrutura de espécies do grupo de *R. crucifer*, não sendo necessário utilizá-las para discriminar as morfoespécies, visto que estas são reconhecíveis por caracteres qualitativos externos. Embora Baldissera-Jr et al., (2004) indicam que *R. crucifer* e *R. pombali* aparecem bem definidas na análise discriminante canônica, os dados deste estudo não mostram esse padrão. Uma explicação para esse fenômeno seria que os aUGres utilizaram indivíduos das espécies com grande distancia geográfica, e no presente estudo, as UGs analisadas representam locais mais próximos.

Agradecimentos

A M.R. Moura pelo auxílio com a estatística; A.J.S. Argolo (UESC), L.M. Sarmiento-Soares (MBML), R. Mary (CHUFJF), G.R. Colli (UnB), L.B. Nascimento (MCNAN-PUC) pelo empréstimo de material aos seus cuidados; e a J.P. Pombal Júnior (MNRJ) pela recepção no Museu Nacional quando fui analisar a série tipo de *R. pombali*. A E.T. da Silva e P.S. Santos pelo auxílio para a coleta de exemplares da UG MD e R.M. Pirani pela coleta de exemplares da UG EM. Aos amigos do Museu de Zoologia João Moojen pela coleta de alguns exemplares utilizados. Ao InstitUG Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela licença de coleta (ICMBio 17696-1).

Referências Bibliográficas

- Assis, B. 2009. **Riqueza, distribuição sazonal e utilização de habitats por anfíbios anuros na Serra do Brigadeiro, Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
- Baldissera-Jr, F.A. 2001. **Taxonomia e filogenia do grupo de *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821 (Anura, Bufonidae)**. Tese de DoUGrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Baldissera-Jr, F.; Caramaschi, U. & Haddad, C.F.B. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with description of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Arquivos do Museu Nacional**. 62(3): 255-282.
- Blackith, R.E. & Reyment, R.A. 1971. **Multivariate morphometrics**. London, Academic Press, 412p.
- Bogart, J.P. 1972. Evidence from hybridizations. In Blair, W.F. (ed). **Evolution in the genus *Bufo***. Univ. Texas Press, Austin. pp. 196-232.
- 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.
- Canelas, M.A.S., Bertoluci, J. (2007): Anurans of the Serra do Caraça, southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. **Iheringia, Série Zooloogia**. 97(1): 21-26.
- Cavalcanti, M.J. & Lopes, P.R.D. 1993. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de Serranidae (Teleostei, Perciformes). **Acta Biológica Leopoldensia**. 15: 53-64.
- Crump, M.L. & Kaplan, R.H. 1979. Clutch energy portioning of tropical tree frogs (Hylidae). **Copeia** 1979(4): 626-635.

- Eterovick, P. C. & Sazima, I. 2004. **Anfibios da Serra do Cipó, Minas Gerais - Amphibians from the Serra do Cipó, Minas Gerais**. Belo Horizonte, Editora PUC Minas.
- Grandinetti, L. & Jacobi, C.M. 2005. Distribuição estacional e espacial de uma taxocenose de anuros (Amphibia) em uma área antropizada em Rio Acima - MG. **Lundiana** 6(1): 21-28.
- Haddad, C.F.B.; Cardoso, A.J. & Castanho, L.M. 1990. Hibridação natural entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). **Revista Brasileira de Biologia**. 50(2): 739-744.
- Haddad, C.F.B.; Pombal-Jr.; J.P. & Batistic, R. 1994. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). **Journal of Herpetology**. 38(4): 425-430.
- Heyer, W.R. & Maxson, L.R. 1983. Relationships, zoogeography, and speciation mechanisms of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae), **Arquivos de Zoologia Sao Paulo**. 30(5): 341-373.
- Heyer, W.R.; Rand, A.S.; Cruz, C.A.G.; Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**. 31(4): 231-410.
- Humphries, J.M.; Bookstein, F.L.; Chernoff, B.; Smith, G.R.; Elder, R.L. & Poss, S.g. 1981. Multivariate discrimination by shape in relation to size. **Systematic Zoology**. 30(3): 291-308.
- Maciel, N.M. 2008. **Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura, Bufonidae)**. Tese de DoUGrado. Universidade de Brasília.
- Maciel, N.M.; Brandão, R.A.; Campos, L.A. & Sebben, A. 2007. A large new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Cerrado of Brazil. **Zootaxa**. 1627: 23-39.

- Napoli, M.F.; Ananias, F.; Fonseca, P.M. & Zampieri, A.P. 2009. Morphological and karyotypic contributions for a better taxonomic definition of the frog *Ischnocnema ramagii* (Boulenger, 1888) (Anura, Brachycephalidae). **South American Journal of Herpetology**. 4(3) 164-172.
- Narvaes, P. & Rodrigues, M.T. 2009. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arquivos de Zoologia**. 40: 1-73.
- Prado, C.P.A.; Uetanabaro, M. & Lopes, F.S. 2000. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brasil. **Journal of Herpetology**. 34(1): 135-139.
- Prado, G.M & Pombal-Jr, J.P. 2008. Espécies de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 com apêndices palpebrais (Anura; Cycloramphidae). **Arquivos de Zoologia**. 39(1): 1-85.
- Reyment, R.A.; Blackith, R.E. & Campbell, N.A. 1981. **Multivariate morphometrics**. New York, Academic Press, 233p.
- Reis, S.F. dos. 1988. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**. 5: 571-580.
- Rödder, D.; Teixeira, R.L.; Ferreira, R.B.; Dantas, R.B.; Peral, W. ; Guarneire, G.J. 2007. Anuran hotspots: the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo, southeastern Brazil. **Salamandra**. 41: 91-110.
- Ryan, M.J. 1985. **The Tungara frog: a study in sexual selection and communication**. The University of Chicago Press, Chicago.
- Santana, D.J.; São-Pedro, V.A.; Hote, P.S.; Roberti, H.M.; Sant'Anna, A.C.; Figueiredo-de-Andrade, C.A. & Feio, R.N. Anurans in the region of the High Muriaé River, state of Minas Gerais, Brazil. **Herpetology Notes**. 3: 1-10.

- Sebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. **A natural history of amphibians**. Princeton University Press, New Jersey.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. **Copeia** 2: 297-306.
- Silveira, A.L.; Sales, R.O.L. & Pontes, R.C. Primeiro registro de *Rhinella pombali* e novos registros de *R. crucifer* e *R. ornata* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Biotemas**. 22 (4): 231-235.
- Thomé, M.T.C. & Brasileiro, C.A. 2007. Dimorfismo sexual, uso do ambiente e abundância sazonal de *Elachistocleis* cf. *ovalis* (Anura: Microhylidae) em um remanescente de Cerrado no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotrópica**. 7(1): 27-33.
- Woolbright, L.L. 1983. Sexual selection and size dimorphism in anuran amphibia. **The American Naturalist** 121(1): 110-119.

ANEXO 1

Material Examinado

Rhinella crucifer

Bahia: Arataca UESC 1531, 2221; Barra do Choça UESC 691; Boa Nova UESC 1257, 4539-4540; Coaraci UESC 2326; Ilhéus UESC 4278, 4778, 6915, 7500; Itacaré CHUNB 35670-35671, 39954-39955, UESC 4039; Jussari UESC 1508-1509; Mascote CHUNB 25280; Prado CHUNB 49567.

Espírito Santo: Cariacica MBML 4831, 5030, 5054, 6054, 6081, 6084, 6123, 6349-6351, 6356, 6358-6360, 6363-6364, MCNAN 2841-2842; Castelo MBML 4646, 4649; Domingos Martins CHUNB 36199-36200, 36204, 36212; Dolores do Rio Preto MCNAN 8047; Fundação MBML 4830; Itaúnas MBML 4836; Santa Teresa MBML 587, 589, 1112, 1176, 1178, 1181, 2574, 2579, 2727, 4647.

Rhinella pombali

Minas Gerais: Almenara MZUFV 4139, 5348; Alto Caparaó CHUNB 46250, 46289, 46298, 46300; 46320, 46330, 46334, 46336, 46338, 46344, 46347, 46351, 46353, 46358, 46360; Belmiro Braga MZUFV 8692-8596; Belo Horizonte CHUNB 14273, MCNAN 3525-3531, 3534, 3538, 3548, 3554, 5143-5144, 5176, 5453, 5494, 5571-5572, 5618, 6003; Bicas CHUFJF 398, 413-414; Canaã MZUFV 7693-7695; Conceição do Mato Dentro MCNAN 9127; Conselheiro Lafaiete MCNAN 6947; Carangola MZUFV 211; Coronel Pacheco CHUFJF 279-282; Divino MZUFV 9760; Dolores do Rio Preto MZUFV 7156-7157; Espera Feliz MZUFV 9762; Ferros MZUFV 8681-8682; Ipanema DS 131, 135-144, MZUFV 9086; Irapé MCNAN 9400; João Monlevade MZUFV 1983; Juiz de Fora MCNAN 6061, 6064, CHUFJF 258, 261, 537; Ladainha MZUFV 5155-5156; Manhumirim CHUNB 35666; Muriaé MZUFV 8881-8882; Nova

Lima MCNAN 9445; Ouro Branco MCNAN 7551-7552; Ouro Preto MZUFV 9880-9882, 10083-10084; Pedra Dourada MZUFV 6946-6947, 7302-7305; PERD MCNAN 1406; MZUFV 2122, 2394-2395; PESB MZUFV 3101-3103, 3283, 3847-3851, 6644, 7140; Poté MZUFV 5635-5636; Resplendor MCNAN 7191; Rio Preto CHUFJF 435; Santa Rita de Jacutinga MCNAN 2058-2059, 2314; São Gonçalo do Rio Abaixo MCNAN 1914; MNRJ 22291-22300 (**parátipos**), MNRJ 22310 (**parátipo**), MNRJ 22311 (**holótipo**), MNRJ 22219 (**parátipo**); Ucrânia MCNAN 8049; Viçosa MZUFV 79, 216, 276, 278, 968, 1388, 1391, 1394-1395, 3127, 5261, 7051-7052.

Rio de Janeiro: Angra dos Reis CHUNB 14275; Paraíba do Sul CHUFJF 128, 132; Santa Maria Madalena MNRJ 56634, 566360-56641; Natividade MNRJ 56633, 56635, 57054.

Rhinella ornata

São Paulo: Mogi das Cruzes CHUNB 35676.

Rhinella aff. pombali

Minas Gerais: Januária MZUFV 4933, 9269.

Goiás: Mineiros CHUNB 36547.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base no estudo realizado conclui-se que:

- Todos os espécimes analisados de *R. pombali* e *R. crucifer* apresentaram número diplóide $2n=22$.
- Nas duas espécies as regiões organizadoras de nucléolo foram observadas nas regiões teloméricas nos braços curtos do sétimo par.
- A heterocromatina constitutiva apresentou-se de forma característica, nas regiões centroméricas, além de uma marcação intersticial no sétimo par.
- Os indivíduos analisados de *R. crucifer* e *R. pombali* no município de Santa Teresa, Estado do Espírito Santo não ocorrem em simpatria. Considerou-se que não há registros de *R. pombali* no Estado do Espírito Santo.
- Fêmeas apresentaram maior tamanho que os machos em todos os 25 caracteres morfométricos diferenciando também em vários aspectos morfológicos.
- A projeção dos escores individuais resultantes da análise de componentes principais não mostrou agrupamento claro entre as 25 UGs, não observando nem mesmo tendências de aglomeração.