

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Identidade taxonômica de populações atribuíveis a *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)  
(Anura: Bufonidae) e sua diagnose em relação à *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)

Julián Sebastián Ramírez Moreno

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Ribeirão Preto - SP

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Identidade taxonômica de populações atribuíveis a *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)  
(Anura: Bufonidae) e sua diagnose em relação à *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)

Julián Sebastián Ramírez Moreno

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Orientador: Dr. Ariovaldo Antônio Giaretta

Ribeirão Preto - SP

2023

Não autorizo a reprodução e divulgação deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, uma vez que os dados aqui contidos são inéditos.

Julián Sebastián Ramírez Moreno

Identidade taxonômica de populações atribuídas a *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) e sua diagnose em relação à *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)

87 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Giaretta, Arioaldo Antônio

1. Acústica. 2. Amazônia. 3. Biodiversidade. 4. Morfometria. 5. Taxonomia.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Julián Sebastián Ramírez Moreno

Identidade taxonômica de populações atribuídas a *Rhinella mirandariberoi* (Gallardo, 1965)  
(Anura: Bufonidae) e sua diagnose em relação à *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Ariovaldo A. Giaretta por ter me dado a oportunidade de ingressar nos estudos dos anuros, pela paciência em me explicar minhas dúvidas e por me ajudar quando tive problemas de saúde.

Aos colegas de laboratório, especialmente Pedro Marinho e André G. Lopes por responder todas as minhas perguntas e estar disposto a me ajudar a qualquer momento.

Ao Dr. Thiago R. de Carvalho, pelo auxílio nos procedimentos de extração e amplificação.

À Cornell University, por disponibilizar gratuitamente o software “Raven Pro”. À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao programa de Biologia Comparada e seus professores, por contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal, especialmente ao laboratório de Paleontologia e Evolução e Biologia Integrativa, por me proporcionar um local de trabalho.

Aos meus pais e irmão, que me apoiaram nessa louca decisão de viajar e estudar o que eu amava, e que me deram e continuam me dando todo o seu amor à distância.

À minha namorada, que gosta de me ouvir quando falo sobre sapos, que cozinha muito bem, que tem paciência comigo quando fico desesperado, que está ao meu lado quando fico doente e que me ama tanto quanto eu a amo.

## RESUMO

Ramirez-Moreno J. S. **Identidade taxonômica de populações atribuídas a *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) e sua diagnose em relação à *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)**

Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

O grupo de *Rhinella granulosa* é composto por 13 espécies amplamente distribuídas na América do Sul e Panamá. A riqueza do grupo pode estar pobremente caracterizada em função de caracterizações limitadas pela falta de dados de topótipos. Esse é o caso de *Rhinella mirandaribeiroi*, que carece de caracterização topotípica (Ilha de Marajó, PA) em termos acústicos e moleculares e da existência de variação interpopulacional, que considere espécimes do Cerrado e mesmo de seu sinônimo júnior *Bufo granulosa lutzii* (Pirapora, MG). Ao mesmo tempo, as diferenças morfológicas e acústicas parecem escassas e sutis em comparação com *R. granulosa*, uma espécie irmã com áreas de distribuição contíguas. Portanto, uma abordagem taxonômica integrativa é necessária para avaliar a riqueza do complexo e caracterizá-las diferencialmente. Aqui apresentamos dados morfológicos de topótipos de *R. mirandaribeiroi* recentemente coletados, assim como dados acústicos e genéticos dessa população. Encontramos evidências acústicas, moleculares e morfológicas que *B. g. lutzii* e indivíduos distribuídos no Cerrado pertencem à mesma linhagem de *R. mirandaribeiroi*. Também, encontramos que *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi* apresentam fenótipo conservado (morfologia e acústica) e que a presença/ausência da linha vertebral clara não é um caráter diagnóstico de ambas as espécies nominadas. No entanto, *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi* apresentam uma expressiva distância genética e, portanto, devem ser mantidas como espécies válidas até que se conheça melhor qual a distribuição de ambas as espécies.

Palavras-chave: Acústica, Biodiversidade, Cerrado, Morfometria, Taxonomia.

## ABSTRACT

Ramirez-Moreno J. S. **Taxonomic identity of populations attributed to *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) and their diagnosis in relation to *Rhinella granulosa* (Spix, 1824)**

Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

The *Rhinella granulosa* group is composed of 13 species widely distributed in South America and Panama. The richness of the group may be poorly characterized due to limited characterizations caused by a lack of topotype data. This is the case for *Rhinella mirandaribeiroi*, which lacks topotypical characterization (Marajó Island, PA) in terms of acoustics and molecular data, as well as interpopulation variation, considering specimens from the Cerrado and even its junior synonym *Bufo granulosis lutzi* (Pirapora, MG). At the same time, morphological and acoustic differences seem scarce and subtle compared to *R. granulosa*, a sister species with contiguous distribution areas. Therefore, an integrative taxonomic approach is necessary to assess the richness of the complex and differentiate them. Here, we present morphological data from recently collected topotypes of *R. mirandaribeiroi*, as well as acoustic and genetic data from this population. We found acoustic, molecular, and morphological evidence that *B. g. lutzi* and individuals distributed in the Cerrado belong to the same lineage as *R. mirandaribeiroi*. We also found that *R. granulosa* and *R. mirandaribeiroi* exhibit a conserved phenotype (morphology and acoustics) and that the presence/absence of a clear vertebral line is not a diagnostic character for both named species. However, *R. granulosa* and *R. mirandaribeiroi* show a significant genetic distance and therefore should be maintained as valid species until a better understanding of the distribution of both species is achieved.

Key-words: Acoustics, Amazon, Biodiversity, Morphometry, Taxonomy.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	10
OBJETIVOS .....	13
CAPÍTULO 1: Avaliação da identidade taxonômica de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) ao longo da sua distribuição geográfica .....	14
RESUMO .....	14
INTRODUÇÃO .....	15
MATERIAL E MÉTODOS .....	15
Morfometria e morfologia .....	16
Acústica .....	17
Análises Moleculares .....	17
Análises estatísticas .....	18
RESULTADOS .....	19
Morfologia e Morfometria .....	19
Acústica .....	11
Análises Moleculares .....	18
Análises discriminantes e estatísticas .....	18
DISCUSSÃO .....	27
CAPÍTULO 2: Avaliação da identidade taxonômica de <i>R. granulosa</i> em comparação com <i>R. mirandaribeiroi</i> .....	29
INTRODUÇÃO .....	30
METODOLOGIA .....	30
Morfometria e morfologia .....	30
Acústica - reanálise de dados já publicados .....	31
Análises Moleculares .....	32
Análises estatísticas .....	33
RESULTADOS .....	33
Morfometria e morfologia .....	33
Acústica .....	38
Análises Moleculares .....	44
Análises estatísticas .....	44
DISCUSSÃO .....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
Apêndice I. Espécimes examinados de <i>R. mirandaribeiroi</i> e <i>R. granulosa</i> .....	62
Apêndice II. Lista de arquivos sonoros analisados para cada espécie no presente trabalho. ....	63
Apêndice III. Distância <i>p</i> não para o gene 16S rRNA parcial entre as espécies. ....	66
Apêndice IV. Características diagnósticas propostas por Gallardo (1965) para <i>B. g. mirandaribeiroi</i> e <i>B. g. lutzii</i> . Marcado em vermelho as diferenças .....	67
Apêndice V. Características diagnósticas propostas por Gallardo (1965) para <i>B. g. granulosa</i> e <i>B. g. mirandaribeiroi</i> . Marcado em vermelho as diferenças .....	68
Apêndice V. Continuação .....	69
Apêndice VI. Características diagnósticas propostas por Narváez & Rodriguez (2009) para <i>B. g. granulosa</i> e <i>B. g. mirandaribeiroi</i> . Marcado em vermelho as diferenças .....	70



Apêndice VII. Mapa mostrando localidades de indivíduos (círculos) e topótipos (estrelas) incluídos na análise molecular. Um mapa da América do Sul é mostrado para referência, com a seção ampliada demarcada .....	71
Apêndice VIII. Mapa mostrando localidades de indivíduos (círculos) e topótipos (estrelas) incluídos na análise acústica. Um mapa da América do Sul é mostrado para referência, com a seção ampliada demarcada .....	72
Apêndice IX. Mapa mostrando localidades de indivíduos (círculos) e topótipos (estrelas) incluídos na análise morfométrica. Um mapa da América do Sul é mostrado para referência, com a seção ampliada demarcada .....	73

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente se reconhece que a integração de distintas linhas de evidência (*e.g.* filogeografia, anatomia, genética populacional, etc.) é a maneira mais eficiente e precisa de delimitar espécies; esta abordagem é conhecida como taxonomia integrativa (DAYRAT, 2005; PADIAL *et al.*, 2010) que tem permitido a descoberta de espécies crípticas, contida em grupos de espécies cuja morfologia externa, apenas, não seria capaz de revelar (YEATES *et al.*, 2011).

A ideia de aproveitar a complementaridade entre disciplinas na delimitação de entidades biológicas, vai ao encontro do conceito de espécie proposto por Queiroz (2007), que postula que a única propriedade que define a espécie é ser uma linhagem de metapopulações que evoluem independentemente. Desta forma, admite que diferentes critérios e linhas de evidência sejam usados na tomada de decisão, análise e interpretação dos dados para estabelecer limites entre os espécimes (de QUEIROZ, 2007; SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010).

Entre os vertebrados, os lissanfíbios são um grupo em que a taxa de descobertas de novas espécies acelerou consideravelmente nas últimas décadas (GUERRA *et al.*, 2018; FROST, 2023). Este progresso taxonômico se deve à exploração de áreas tropicais pouco conhecidas, em conjunto com a aplicação de técnicas acústicas e moleculares (VENCES; KÖHLER, 2005).

Sinais acústicos são a principal forma de comunicação na maioria das espécies de anuros, sendo também um mecanismo de isolamento reprodutivo (DUELLMAN; TRUEB 1986; WELLS, 1977). Portanto, a acústica tem sido utilizada na delimitação da espécie, principalmente o canto de anúncio (ou reprodutivo). Para fins taxonômicos, as análises se concentram nos cantos de anúncio, porque são emitidas com mais frequência por machos no contexto de acasalamento, são fáceis de registrar e transmitem informações específicas da espécie (KÖHLER *et al.*, 2017). Assim a incorporação de dados acústicos tem sido um fator determinante no inventário da biodiversidade de anuros, pois permitiu a descoberta de muitas espécies morfologicamente crípticas (TOLEDO *et al.*, 2014; GUERRA *et al.*, 2018).

Outro do fator que possibilita a detenção das espécies morfologicamente similares são sequências de ADN, que permitiram realizar análises filogenéticas e comparação de distâncias moleculares (*e.g.* FOUQUET *et al.*, 2007). O código de barras de ADN é uma ferramenta baseada na divergência de pares entre sequências, diferenças acima de um limite

previamente definido podem sinalizar uma espécie nova ou candidata (VENCES *et al.*, 2005; HEBERT *et al.*, 2010).

No entanto, as características morfológicas também podem fornecer identificações rápidas e confiáveis. Embora a morfologia não seja a única abordagem para delimitar espécies, é um componente importante e valioso da biodiversidade (DAYRAT, 2005). Um exemplo disso são os inúmeros estudos que atualmente continuam usando esses caracteres, entre outros, para estabelecer os limites entre as espécies de anuros (BLOTTO *et al.*, 2020; VIDIGAL *et al.*, 2021; PEREYRA *et al.*, 2021).

Na maior parte da sua história taxonômica, os sapos verdadeiros da América do Sul (Bufonidae) fizeram parte do gênero *Bufo*, um gênero agora desmembrado por questões de monofiletismo, que incluía grupos heterogêneos com representantes distribuídos por quase todo o mundo. Frost *et al.* (2006) examinaram e dividiram o grupo em vários gêneros, dentro dos quais agora está *Rhinella* (FITZINGER, 1826) e o complexo de espécies *R. granulosa* (SPIX, 1824), atualmente composto por 13 espécies (última revisão em FROST, 2023).

O primeiro trabalho de revisão taxonômica do grupo de *R. granulosa* foi realizado por Gallardo (1965) que, com base na morfologia externa (formato da cabeça, formato da glândula paratóide, formato das cristas cefálicas e textura da pele dorsal), reconheceu 14 subespécies, sendo nove novas. Nesse trabalho, Gallardo (1965) também associou grande parte da distribuição das subespécies às bacias hidrográficas sul-americanas.

O grupo foi novamente reavaliado por Narváez e Rodriguez (2009) com base na morfologia externa (tipo de cristas cefálicas, tamanho do tímpano, tamanho e formato da glândula parotóide, entre outros) e morfometria (27 caracteres). Nessa revisão esses autores ascenderam a maioria das subespécies para espécies e consideraram outros sinônimos, assim como também associaram a distribuição das espécies do grupo com áreas abertas e com os domínios morfoclimáticos da América do sul definidos por Ab'Saber (1977).

As primeiras análises filogenéticas foram realizadas por Pramuk (2006) e Pereyra *et al.* (2016), os quais com sequências nucleares e mitocondriais recuperaram o grupo de *R. granulosa* como monofilético; entretanto, Pereyra *et al.* (2016) encontraram incongruências topológicas dentro de seu próprio estudo atribuíveis a eventos de hibridização e introgressão. Estudos subsequentes revelaram sinapomorfias do grupo relacionado à morfologia embrionária e estruturas larvais (CANDIOTI *et al.*, 2016) e foi sugerido a inclusão da espécie *R. humboldti* no grupo (MURPHY *et al.*, 2017).

Mais recentemente Pereyra *et al.* (2021) publicaram análises filogenéticas de evidência total do gênero *Rhinella* que incluíam dados moleculares (genes mitocondriais e nucleares) e fenotípicos (90 caracteres), seus resultados demonstraram novamente a monofilia do grupo que segundo esses autores atualmente inclui 13 espécies: *R. granulosa* (SPIX, 1824); *R. dorbignyi* (DUMÉRIL E BIBRON, 1841); *R. major* (MÜLLER E HELLMICH, 1936); *R. pygmaea* (MYERS E CARVALHO, 1952); *R. azarai* (GALLARDO, 1965); *R. beebeyi*, *R. humboldti*, *R. merianae*, *R. mirandaribeiroi* (GALLARDO, 1965); *R. nattereri* (BOKERMANN, 1967); *R. bergi* (CÉSPEDEZ, 2000); *R. centralis* (NARVAES; RODRIGUES, 2009) e *R. bernardoii* (SANABRIA *et al.*, 2010).

Apesar da ampla distribuição da maioria das espécies do grupo, revisões taxonômicas e sistemáticas do complexo *R. granulosa* foram concentradas em poucas localidades e para apenas algumas espécies. Por exemplo, para *R. mirandaribeiroi*, espécimes topotípicos permanecem sem caracterização em termos acústicos e moleculares. Por outro lado, devido à morfologia externa conservada de alguns membros do grupo, algumas espécies não podem ser facilmente diferenciadas nesses dados, como *R. granulosa* e *R. mirandaribeiroi*, espécies cuja distribuição se sobrepõe em algumas localidades (NARVÁEZ; RODRIGUEZ, 2009). Por esta razão, neste trabalho avaliamos a identidade taxonômica de populações de *R. mirandaribeiroi* e sua diagnose em relação a *R. granulosa* usando uma abordagem integrativa, combinando dados acústicos, genéticos e morfológicos.

## **DISCUSSÃO**

O grupo *Rhinella granulosa* apresenta algumas diferenças interespecíficas claras (morfológicas/acústicas) que permite distinguir as espécies entre si (GALLARDO, 1965; NARVÁEZ; RODRIGUES, 2009; GUERRA *et al.*, 2011). No entanto, nossos resultados não nos permitem diferenciar claramente *R. mirandaribeiroi* de *R. granulosa*. A nível morfológico na descrição original de *R. mirandaribeiroi*, Gallardo (1965) distinguiu-o de *R. granulosa* por diferenças sutis no formato da cabeça e da região loreal, mas principalmente pela presença de uma linha vertebral clara longitudinal dorsal (Apêndice V). Narváez e Rodrigues (2009) aceitam esse caráter como principal diferenciador entre as duas espécies, porém encontraram algumas exceções (Apêndice VI).

Nós encontramos que a única característica morfológica que poderia diferenciá-los é a presença de uma linha vertebral clara dorsal mais evidente e frequente em indivíduos distribuídos no Cerrado, em comparação com aqueles da Caatinga e da Mata Atlântica. Portanto, não pudemos identificar claramente ambas as espécies, uma vez que nenhum caráter morfométrico foi diagnóstico, ambas as espécies podem apresentar uma linha vertebral dorsal, e os padrões de cores dorsais ou formatos da cabeça são indistinguíveis, ao contrário do que foi descrito por Narváez e Rodriguez (2009).

Por outro lado, a análise do canto de anúncio entre as duas espécies aqui avaliadas revelou características acústicas semelhantes, tanto para as variáveis temporais quanto espectrais, embora as características espectrais tenham sido significativamente diferentes, elas não foram diagnósticas. Importante destacar que, apesar de os cantos terem sido gravados em uma faixa de temperatura, a estrutura do canto e as variáveis medidas se mantiveram constantes.

Ao analisar o fragmento do gene 16S rRNA proposto por Vences (2005) e Fouquet (2007) como um bom marcador para códigos de barras de anfíbios, encontramos alta diferenciação genética entre *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa*. As distâncias genéticas (mín. e máx. em 16S rRNA: 3,8 – 6,1) são acima dos limites sugeridos para espécies de anfíbios (3,0 – 5%; VENCES *et al.*, 2005a; VENCES *et al.*, 2005b; FOUQUET *et al.*, 2007; VIEITES *et al.*, 2009). Embora se interprete esses resultados genéticos como mais compatíveis com a existência de mais de uma espécie do que com variação dentro de uma espécie, encontramos várias semelhanças morfológicas e acústicas entre *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa* que poderiam indicar diferenciação a nível populacional apesar da distância genética. É importante ressaltar que os indivíduos incluídos na análise molecular se encontram em os extremos da

distribuição de *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa* (Apêndice VII), portanto a divergência genética observada pode estar mostrando estrutura genética entre populações distribuídas no Cerrado e na Caatinga, mas sem disparidade fenotípica (ou seja, morfologia e cantos conservados).

Sugerimos que futuros projetos incluam uma amostragem mais abrangente de dados genéticos principalmente de localidades intermediárias ao longo da distribuição das espécies, para avaliar se realmente existe diversidade genética oculta em *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa*. Com a sobreposição de caracteres morfológicos e estruturais de canto, mas com evidências de diferenças genéticas, foi considerado que *R. mirandaribeiroi* e *R. granulosa* representem espécies verdadeiras, pelo menos até que uma maior quantidade de dados e mais linhas de evidências possam indicar o contrário.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AB'SÁBER, A.N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. **Geomorfologia**, v. 52, p.1-24. 1977.
- ANDRADE, F. S. A new species of long-legged *Pseudopaludicola* from northeastern Brazil (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae). **Salamandra**, v. 52, n. 2, p. 107–124, 2016.
- ARCHER, E. rfPermute: Estimate Permutation p-values for Random Forest Importance Metrics. R package Version 1.6.1. Package on R software. Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=rfPermute> (accessed 20 January 2022). 2016.
- Bioacoustics Research Program. Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software. Version 1.6. The Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. 2019.
- BLOTTO, B. L.; PEREYRA, M. O.; GRANT, T. & FAIVOVICH, J. Hand and footmusculature of Anura: structure, homology, terminology, and synapomorphies for major clades. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 443 (1), p.1-156. 2020.
- BROWN, W. M.; GEORGE JR., M. & WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, 1979.
- CACCONE, A.; GENTILE, G.; BURNS, C. E.; SEZZI, E.; BERGMAN, W.; RUELLE, M.; SALTONSTALL, K. & POWELL, J. R. Extreme differences in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 794–798, 2004
- CANDIOTI, F. V.; GROSSO, J.; HAAD, B.; PEREYRA, M. O.; BORNSCHEIN, M. R.; BORTEIRO, C.; ... & BALDO, D. (2016). Structural and heterochronic variations during the early ontogeny in toads (Anura: Bufonidae). **Herpetological Monographs**, v. 30 (1), p.79-118. 2016.

- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean Society**. v. 85, n. 3, p. 407–15. 2005.
- DUELLMAN, W. & TRUEB, L. Biology of Amphibians. **McGraw-Hill**, New York. 670p.1986.
- de QUEIROZ, K. Species Concepts and Species Delimitation. **Systematic Biology**, v. 56 (6), p. 879–886. 2007.
- de PINA, L. F.; MORAIS, A. R. & PRADO, C. P. *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Amphibia: Anura: Bufonidae): distribution extension and new state record. **Check List**, v. 11 (3), p. 1654-1654. 2015.
- FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M. & GEMMELL, N. J. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by MtDNA Analyses. **PLoS ONE**. v. 2 (10), p. 1109. 2007.
- FOUQUET, A., MARINHO, P., RÉJAUD, A., CARVALHO, T. R., CAMINER, M. A., JANSEN, M., ... & RON, S. Systematics and biogeography of the *Boana albopunctata* species group (Anura, Hylidae), with the description of two new species from Amazonia. *Systematics and Biodiversity*, 19(4), 375-399. 2021
- FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M. & WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. – **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 297, p. 1–370. 2006.
- FROST, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.1 (07/01/2023). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. **American Museum of Natural**. New York. 2023.
- GALLARDO, J. M. The species *Bufo granulosus* Spix (Salientia: Bufonidae) and its geographic variation. – **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. v. 134, p. 107–138. 1965.



- GIARETTA, A. A.; HAGA, I. A.; DE ANDRADE, F. S. The advertisement call of two species of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, v. 17, n. 2, p. 255-265, 2018.
- GUERRA, V.; LLUSIA, D.; GAMBALE, P. G.; MORAIS, A. R. D.; MÁRQUEZ, R. & BASTOS, R. P. The advertisement calls of Brazilian anurans: Historical review, current knowledge and future directions. **PLoS One**, v. 13(1), e0191691. 2018.
- HEBERT, P.D.N.; DEWAARD, J.R. & LANDRY, J.F. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. **Biology Letters**. v. 6, p. 359–362. 2010.
- HOTHORN, T.; HORNIK, K.; VAN DE WIEL, M. A. & ZEILEIS, A. Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. **Journal of Statistical Software**, v. 28(8), p. 1–23. 2008.
- KÖHLER, J.; MARTIN J.; RODRÍGUEZ, A.; PHILIPPE J. R. K.; TOLEDO, L.; EMMRICH, M.; GLAW, F.; HADDAD, C. F.; RÖDEL, M. & VENCES, M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**. v. 4251 (1), p. 1-124. 2017.
- JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1403–1405. 2008.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S. & BALLOUX, E. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **Genetics**, v. 11, p. 1–15. 2010.
- LIAW, A. & WIENER, M. Classification and regression by randomForest. **R News**. v. 2, p. 18–22. 2002.
- LÖTTTERS, S. *et al.* Another case of cryptic diversity in poison frogs (Dendrobatidae: *Ameerega*)—description of a new species from Bolivia. **Zootaxa**, v. 2028, p. 20–30, 2009.
- LIGGES, U. S. *et al.* tuneR: analysis of music and speech. Internet resource

<https://CRAN.R-project.org/package=tuneR>. Accessed November 20, 2021.  
2017.

MORAIS, A. R.; PEREIRA, R.; ANNUNZIATA, B. B.; KOKUBUM, M. N. C. & MACIEL, N. M. Description of the advertisement call of *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)(Anura: Bufonidae). **Zootaxa**. v. 68(3265), p. 66–68. 2012.

MURPHY, J. C.; SIERRA, T. A.; DOWNIE, J. R. & JOWERS, M. J. Toads, tall mountains and taxonomy: the *Rhinella granulosa* group (Amphibia: Anura: Bufonidae) on both sides of the Andes. **Salamandra**. v.53(2), p. 267–78. 2017.

NARVAES, PATRICIA. Revisão taxonômica das espécies de Bufo do complexo granulatus. (Amphibia, Anura, Bufonidae) (**Tesis doctoral**). Universidade de São Paulo. 2003

NARVAES, P. & RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arquivos de Zoologia**. v. 40(1), 1-73. 2009.

PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. **Zootaxa**, v. 3825, n. 1, p. 1-132, 2014

PEREYRA, M. O.; BALDO, D.; BLOTTO, B. L.; IGLESIAS, P. P.; THOMÉ, M. T. C.; HADDAD, C. F. B.; BARRIO-AMORÓS, C.; IBÁÑEZ, R. & FAIVOVICH, J. Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: *Bufonidae*): A molecular perspective with comments on hybridization and introgression. **Cladistics** v.32(1), p. 36–53. 2016.

PEREYRA, M. O.; BLOTTO, B. L.; BALDO, D., CHAPARRO, J. C.; RON, S. R.; ELIAS- COSTA, A. J.; ... & FAIVOVICH, J. Evolution in the Genus *Rhinella*: A Total Evidence Phylogenetic Analysis of Neotropical True Toads (Anura: Bufonidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 447, p. 1-156. 2021

- PRAMUK, J.B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zool. J. Linn. Soc.** v.146, p. 407–452. 2006.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RODRIGUES, G. M., MASCHIO, G. F., & PRUDENTE, A. L. D. C. Snake assemblages of Marajó Island, Pará state, Brazil. **Zoologia (Curitiba)**. v. 33. 2016.
- SAO-PEDRO, V.A., MEDEIROS, P.H. AND GARDA, A.A. The advertisement call of *Rhinella granulosa* (Anura, Bufonidae). **Zootaxa**. v. 3092. p. 60-62.2011.
- SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E. & CROZIER, R. H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annual review of entomology**. v. 55. p. 421-438. 2010.
- SUEUR, J.; AUBIN, T. & SIMONIS, C. Seewave, a free modular tool for sound analysis and synthesis. **Bioacoustics**, v. 18, p. 213–226. 2008.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI, & S. KUMAR. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**.v. 30, p. 2725–2729. 2013.
- TOLEDO, L. F.; MARTINS, I. A.; BRUSCHI, D. P.; PASSOS, M. A.; ALEXANDRE. C. & HADDAD, C. F. B. The anuran calling repertoire in the light of social context. **Acta Ethol.** v. 8, p. 87–99. 2014.
- VASCONCELOS, B., DOS SANTOS CAMPOS, E. R., DE SENA, V. M. A., CARDOSO, A. G. T., DOS SANTOS, J. M. D. N., & BRANDÃO, R. A. Novos registros de *Boana raniceps* (Cope, 1862)(Anura, Hylidae) no Distrito Federal,

Brasil Central:: evidências de expansão recente da distribuição?. **Heringeriana**. v. 16. 2022.

VENCES, M. & KÖHLER, J. Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. Freshwater **Animal Diversity Assessment**. v. 42. p. 569–80. 2005.

VENCES, M.; MEIKE, T.; BONETT, R. M. & VIEITES, D. R. Deciphering Amphibian Diversity through DNA Barcoding: Chances and Challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences**. v. 360 (1462). p. 1859–68. 2005. (a).

VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI, Y.; VIEITES, D.R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Front. Zool**. v. 2 (1). p. 1-12. 2005. (b).

VIDIGAL, I.; MONTESINOS, R. & GIARETTA, A. A. A Genetic and Acoustic Evaluation of the Distribution of *Hylodes sazimai* Haddad & Pombal, 1995 (Hylodidae), a Stream- Dwelling Atlantic Forest Frog. **Journal of Herpetology**. v. 55(3), p. 253-264. 2021.

VIEITES, D. R.; WOLLENBERG, K. C.; ANDREONE, F.; KÖHLER, J., GLAW, F., & VENCES, M. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 8267-8272. 2009.

YANG, Z. Computational Molecular Evolution. **Oxford University Press**, UK. 2006

YEATES, D.; SEAGO, A.; NELSON, L.; CAMEON, S.L.; JOSEPH, L. & RUEMAN, J.W.H. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? **Syst. Entomol**. v. 36, p. 209–217. 2011.

WELLS, K. D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**. v. 25, p. 666–93. 1977.