
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCAS NICIOLI BANDEIRA

Variação fenotípica nas espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer* (Anura: Bufonidae) na Mata Atlântica do Brasil.

A large, abstract geometric pattern composed of overlapping triangles in various shades of blue and white, creating a complex, crystalline structure that fills the lower half of the page.

Rio Claro
2009

LUCAS NICIOLI BANDEIRA

**Variação fenotípica nas espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer* (Anura:
Bufonidae) na Mata Atlântica do Brasil.**

Orientador: João Miguel Alexandrino de Barros

Co-orientador: Maria Tereza Chiarioni Thomé

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel e Licenciado em Ciências
Biológicas....

Rio Claro
2009

597.8 Bandeira, Lucas Nicioli
B214v Variação fenotípica nas espécies de *Rhinella* do grupo crucifer (Anura : Bufonidae) na Mata Atlântica do Brasil / Lucas Nicioli Bandeira. - Rio Claro SP : [s.n.], 2009
27 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: João Miguel de Barros Alexandrino
Co-Orientador: Maria Tereza Chiarioni Thomé

1. Anuro. 2. *Rhinella*. 3. Morfometria geométrica. 4. Variação fenotípica em Bufonídeos. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	03
2. OBJETIVOS.....	08
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
3.1. Classificação das espécies e Amostragem.....	09
3.2. Obtenção das Radiografias.....	10
3.3. Definições dos Marcos Anatômicos e Coleta dos Dados.....	11
3.4. Análises dos dados.....	12
3.4.1. Alinhamento das Coordenadas e Obtenção do “Consensus”.....	12
3.4.2. Obtenção de Variáveis de Forma parciais e os Valores de “ α ”.....	13
3.4.3. Relative Warps.....	13
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Alinhamento das Coordenadas e o “Consensus”.....	15
4.2. Deformações Relativas.....	15
4.2.1. Alpha igual a Zero.....	16
4.2.2. Alpha igual a Um	17
4.2.3. Alpha igual a menos Um.....	20
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

A Mata Atlântica Brasileira apresenta ampla distribuição e diferenças regionais na composição de suas paisagens, favorecendo alta diversidade e endemismo. O grupo de espécies de *Rhinella crucifer* é endêmico a este bioma, e distribui-se através de todo seu domínio. O grupo é composto por cinco morfoespécies, definidas com o auxílio da morfometria tradicional. Recentemente foi encontrado que apenas três destas morfoespécies correspondem a linhagens genéticas exclusivas. Neste trabalho é proposta uma releitura da variação fenotípica das espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer* com base na morfometria geométrica, uma técnica moderna capaz de detectar padrões de variação mais refinados. Tanto em análise realizada com peso igual para variações de forma globais e locais, quanto em análise que valoriza apenas variações localizadas houve a formação de dois grupos; um contendo morfoespécie *Rhinella henseli* e outro formado pelo restante das morfoespécies. A alta sobreposição encontrada neste segundo grupo evidencia grande semelhança na forma craniana, sendo *R. henseli* a morfoespécie mais diferente do grupo. Este resultado é condizente com os achados genéticos recentes, podendo-se concluir que a variação fenotípica no grupo é acompanhada pela variação genética. Um estudo futuro com amostragem mais representativa e aprimoramento na metodologia poderá contribuir para uma melhor compreensão da diversificação morfológica nesse grupo de espécies em escala mais fina.

1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados nas últimas décadas revelam que a região neotropical abriga a mais rica fauna de anfíbios anuros do mundo (DUELLMAN, 1992; HEYER *et al.*, 1990; SILVANO & SEGALLA, 2005), com o Brasil apresentando 821 espécies (SBH, 2008) das quais cerca de 450 ocorrem na Mata Atlântica Brasileira (HADDAD *et al.*, 2008). Este bioma ocupava originalmente cerca de 150 milhões de hectares distribuídos em condições ambientais heterogêneas. A ampla variação latitudinal, incluindo regiões de clima tropical e subtropical, acarreta em diferenças na composição de suas paisagens (RIBEIRO *et al.*, 2009) e favorece alta diversidade e endemismo; estimativas indicam que este bioma abrigue de 1 a 8 % do total de espécies do mundo (SILVA & CASTELETTI, 2003). Entretanto, este bioma sofreu exploração de diversas riquezas por séculos (LAURANCE, 2009) e atualmente encontra-se ameaçado por grandes concentrações humanas e pólos industriais (EMBRAPA, 1996), com somente 1% de sua distribuição original em áreas protegidas (LAURANCE, 2009).

A destruição de habitat, juntamente com mudanças climáticas, aumento na radiação UV-B e doenças causadas por fungos, são considerados responsáveis pela redução e extinção de populações de anfíbios por todo o mundo (BEEBEE & GRIFFITHS, 2005), tornando este grupo mais ameaçado que aves ou mamíferos (STUART *et al.*, 2004). A família Bufonidae apresenta diversos gêneros ameaçados (YOUNG *et al.*, 2001), e estudos sistemáticos e taxonômicos são imprescindíveis em qualquer grupo biótico como base para traçar políticas adequadas de conservação (NARVAES, 2003). O emprego de morfometria tradicional tem auxiliado em estudos de variação morfológica e taxonomia em diversos Bufonídeos. Exemplos estão na separação das espécies do complexo norte americano *Anaxyrus microscaphus* (p.e. GERGUS, E. W. A. *et al.*, 1997), e também no complexo neotropical de *Rhinella granulosa* (NARVAES, 2003).

O grupo de *Rhinella crucifer* era considerado monotípico até recentemente (FROST, 2009). Após revisão taxonômica incluindo uma amostragem ampla, cinco espécies morfológicas (morfoespécies) foram delimitadas segundo caracteres morfológicos e morfométricos: *Rhinella crucifer* Wied-Neuwied, 1821 foi mantida da descrição original; *Rhinella ornata* Spix, 1824 e *Rhinella henseli* A.Lutz, 1934 foram

revalidadas; e *Rhinella abei* e *Rhinella pombali* foram descritas (BALDISSERA *et al.*, 2004) (**fig.1**).

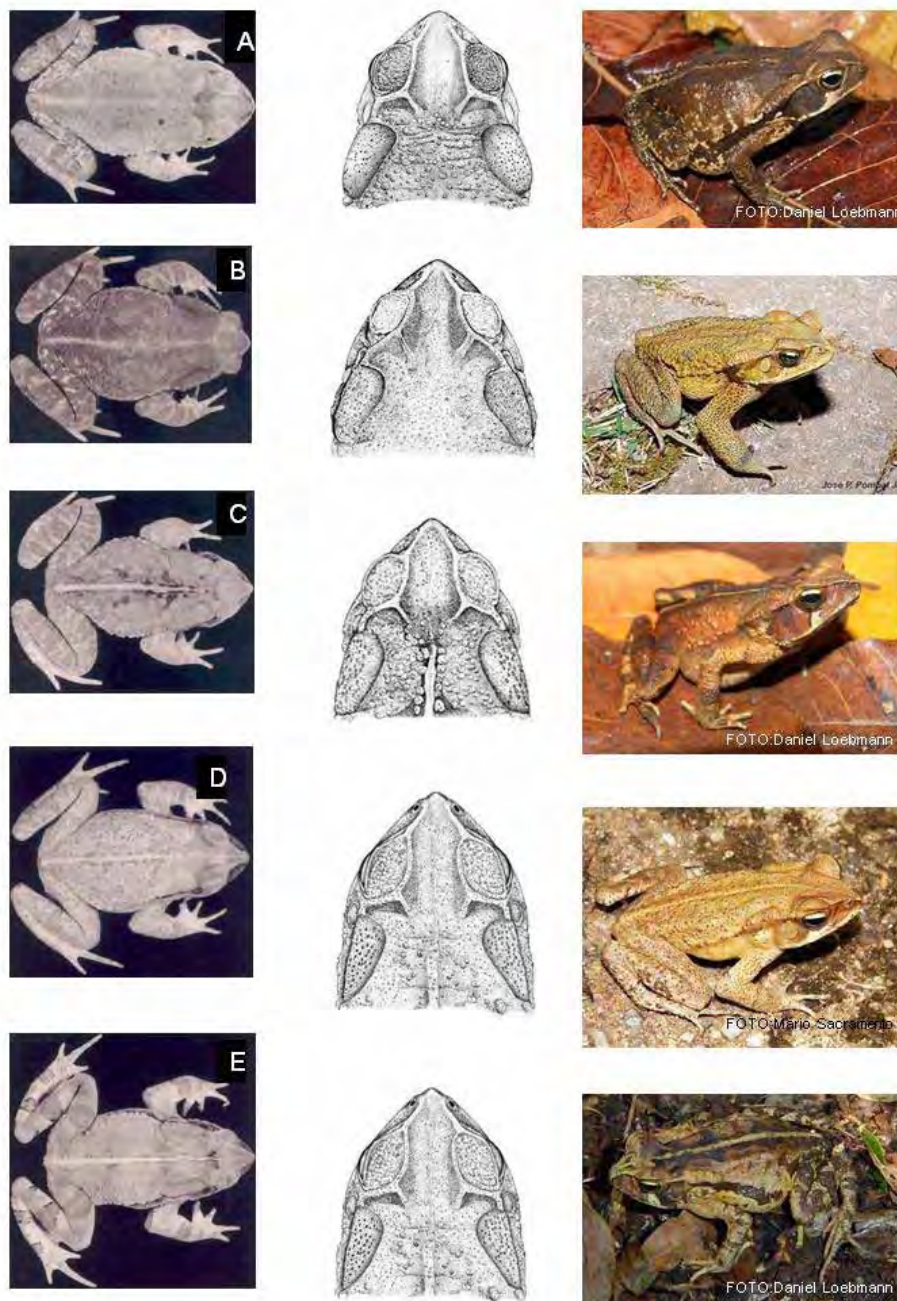


Figura 1: As cinco morfoespécies do grupo observadas em preservativo, em visão dorsal da cabeça (modificado de Baldissera *et al.*, 2004), e “in vivo”. “A”: *Rhinella crucifer*; “B”: *R. pombali*; “C”: *R. ornata*; “D”: *R. abei* e “E”: *R. henseli*.

O grupo de *Rhinella crucifer* distribui-se através do domínio da Mata Atlântica do estado do Ceará ao estado do Rio Grande do Sul, Paraguai e nordeste da Argentina. Dentre as cinco morfoespécies, três apresentam distribuições sem sobreposição: *Rhinella crucifer* ocorre desde o estado do Ceará ao sul do estado do Espírito Santo e nordeste do estado de Minas Gerais; *R. ornata* está distribuída no sul do estado do Espírito Santo, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, até ao norte do estado do Paraná e, possivelmente, no nordeste da Argentina (províncias de Misiones e Corrientes); e *R. pombali* restringe-se ao estado de Minas Gerais e áreas de fronteira com os estados do Rio de Janeiro e São Paulo (BALDISSERA *et al.*, 2004). Já as distribuições de *R. henseli* e *R. abei* apresentam-se parcialmente sobrepostas, sendo *R. henseli* encontrada desde o interior do estado do Paraná ao Rio Grande do Sul (BALDISSERA *et al.* 2004, LIMA *et al.*, 2005) e *R. abei* nos estados do Paraná e Santa Catarina, principalmente nas regiões costeiras (BALDISSERA *et al.*, 2004) (**fig. 2A**). A distribuição destas morfoespécies parece corresponder com a subdivisão da mata Atlântica por Lynch (1979) em sete subunidades que correspondem às principais áreas de endemismo dos anuros.

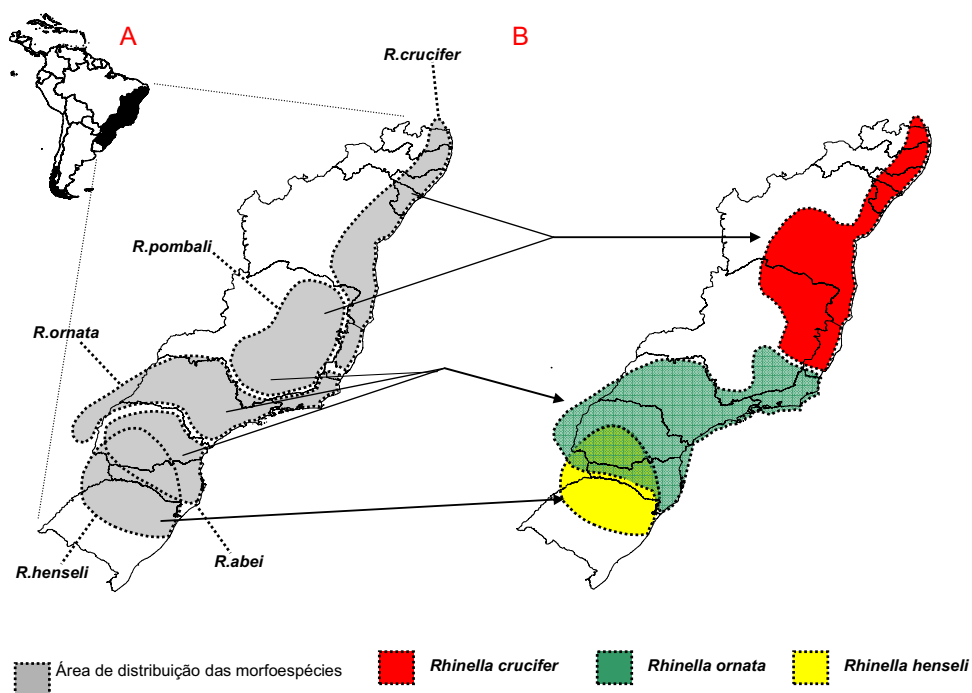


Figura 2: Distribuição geográfica das cinco espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer*. “A” Mapa da área de distribuição das morfoespécies do grupo *Rhinella crucifer*

baseado em Baldissera *et al.*, 2004; “B” distribuição da espécie do grupo segundo Thomé *et al.*, submetido.

Apesar da delimitação das cinco morfoespécies atuais, o grupo apresenta-se extremamente polimórfico, sendo evidência disso os muitos outros morfótipos descritos anteriormente na literatura (FROST, 2009). Estas variações vêm confundindo autores ao longo de muitos anos, resultando em um histórico vasto de nomes propostos e sinonímias (ver em BALDISSERA, 2001). Um exemplo de característica polimórfica refere-se ao nome *crucifer* Wied-Neuwied, 1821, originalmente designado em referência a um padrão de cor encontrado no dorso de alguns indivíduos (BOKERMANN, 1966), mas que está presente e ausente em todas as populações conhecidas do grupo (BALDISSERA *et al.*, 2004). Outras variações morfológicas podem estar também baseadas em caracteres sem sinal evolutivo; recentemente, o grupo foi avaliado quanto a sua composição genética e apenas três espécies podem ser mantidas se considerado o conceito filogenético de espécie: *Rhinella crucifer*, *R. ornata* e *R. henseli* (THOMÉ *et al.*, submetido). Segundo este estudo, parte dos indivíduos classificados anteriormente como *R. pombali* pertencem à linhagem de *R. crucifer*, e parte à linhagem de *R. ornata*. *Rhinella abei* corresponde a um subclado contido na linhagem de *R. ornata*, e *Rhinella henseli* representa uma linhagem genética exclusiva (Fig. 2 “B”, adaptado de THOMÉ *et al.* submetido). Existe ainda evidência de que fatores ambientais locais possam também influenciar na morfologia dos animais, visto que o grupo apresenta uma variação latitudinal em relação ao comprimento do corpo (BALDISSERA *et al.*, 2004), (fig. 3).



Figura 3: Comparação do comprimento entre as cinco espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer*. (todos os exemplares ♂; da esquerda pra direita: *Rhinella crucifer*, *R. pombali*, *R. abei*, *R. ornatus*, *R. henseli*).

A recente delimitação das espécies de *Rhinella* do grupo *crucifer* contribuiu para uma primeira avaliação de sua diversificação na Mata Atlântica, fornecendo uma hipótese inicial de trabalho. Entretanto, frente às novas informações geradas, faz-se necessária uma releitura da variação fenotípica no grupo através do uso de técnicas mais poderosas, para que seja possível um melhor entendimento de sua diversificação no bioma. Atualmente, o campo da morfometria encontra-se em desenvolvimento conceitual e metodológico (REIS & MONTEIRO, 1999), e técnicas mais modernas de coleta de dados podem acarretar em um aumento de resolução. Através da morfometria geométrica é possível averiguar, por exemplo, a variação morfológica entre indivíduos sem que haja interferência do tamanho, pois apenas a forma pura é analisada (REIS & MONTEIRO, 1999). Assim, o objetivo deste estudo é investigar a variação fenotípica dentro do grupo de *Rhinella crucifer*, reavaliar a existência das morfoespécies e verificar sua correspondência com as principais linhagens genéticas recentemente encontradas o grupo.

2. OBJETIVOS

A principal questão a ser respondida no presente trabalho é: a variação fenotípica é compatível com as morfoespécies atualmente aceitas e/ou com a variação genética no grupo? Como hipóteses alternativas propõem-se: i) variação fenotípica existe, mas é clinal e contínua, não se apresentando em unidades correspondentes às espécies ou linhagens; ii) a variação fenotípica existe, não é clinal, mas não corresponde às espécies ou linhagens (com averiguação das possíveis fontes causadoras) ou ainda iii) a variação fenotípica caracteriza-se por polimorfismos sem distribuição geográfica específica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Classificação das espécies e Amostragem

Foram analisados um total de 27 indivíduos do sexo masculino das cinco espécies que compõem o grupo, distribuídos ao longo de 18 localidades (**tabela 1, figura 4**). Todos os espécimes estão depositados na coleção Célio Fernando Baptista Haddad (CFBH), Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

TABELA 1: Número de indivíduos e coordenadas de latitude e longitude para cada uma das 18 localidades amostradas no estudo.

LOCALIDADES, U.F.	ESPÉCIE	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	LATITUDE	LONGITUDE
Itanháem, SP	<i>R. ornatus</i>	1	-24.183460	-46.789458
Capão Bonito, SP	<i>R. ornatus</i>	1	-24.003998	-48.339266
Ilha Bela, SP	<i>R. ornatus</i>	1	-23.917076	-45.323885
Iporanga, SP	<i>R. ornatus</i>	1	-23.439164	-47.424532
Cananéia, SP	<i>R. ornatus</i>	1	-25.024353	-47.932267
Caraíva, BA	<i>R. crucifer</i>	1	-16.800000	-39.150000
Aurelino Leal, BA	<i>R. crucifer</i>	1	-14.360787	-39.408552
Ilhéus, BA	<i>R. crucifer</i>	1	-14.727980	-39.035521
B. Horizonte, MG	<i>R. pombali</i>	1	-19.815731	-43.954223
Cristina, MG	<i>R. pombali</i>	2	-22.209178	-45.271985
Vitória, ES	<i>R. crucifer</i>	1	-20.322186	-40.338089
C. da Barra, ES	<i>R. crucifer</i>	1	-18.592569	-39.734653
Morretes, PR	<i>R. abei</i>	1	-25.476311	-48.835779
Blumenau, SC	<i>R. abei</i>	2	-26.918996	-49.066078
Anitápolis, SC	<i>R. abei e R. henseli</i>	6	-27.902458	-49.129065
Rio dos Cedros, SC	<i>R. abei</i>	3	-26.738244	-49.272623
Itapema, SC	<i>R. abei</i>	1	-27.090960	-48.611995
Treviso, SC	<i>R. abei</i>	1	-28.513920	-49.457338



Figura 4: Mapa ilustrativo das 18 localidades amostradas no estudo (círculos vermelhos), cobrindo a área de distribuição das cinco espécies do grupo.

3.2 Obtenção das Radiografias

Para a avaliação fenotípica do grupo foram analisados apenas os crânios dos animais. Para isso, obtivemos radiografias no Laboratório de Odontologia Comparada (LOC), Departamento de Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ-USP. Seguimos um protocolo padronizado dividido em três etapas: **posicionamento da cabeça dos exemplares, obtenção das radiografias e revelação dos filmes.**

O posicionamento da cabeça dos exemplares foi feito através da técnica de Paralelismo (CESAR, LASCALA & MATSON, 2002), que consiste em posicionar a linha da maxila inferior do animal paralelamente ao filme radiológico (oclusal #4 KODAK® e periapical KODAK®) e a saída do cone de radiação do aparelho. Para obtermos o paralelismo usamos um suporte de acrílico com base flexível onde o filme era apoiado, e para a abertura de saída da radiação usamos uma régua posicionando esta sempre a uma distância de dez centímetros do exemplar a ser radiografado. Após o

posicionamento do espécime, as radiografia foram tiradas com o aparelho ASTON COLUNA MÓVEL FLEX de 70 kV e 7 mA. O tempo de exposição ao cone de radiação a que cada exemplar foi submetido foi de 0,8 segundos. Cada filme radiológico foi submetido a um tratamento químico para a obtenção da imagem. Esse tratamento consistiu da imersão de cada filme, separadamente, em solução reveladora (KODAK®) por 10 segundos, seguido de breve imersão em água, e por último imersão em solução fixadora (KODAK®) por 10 minutos. Todo o processo de revelação foi realizado dentro de caixa escura. Em seguida, os filmes foram colocados em água corrente para se retirar o excesso dos reagentes, e colocados para secar.

3.3 Definições dos Marcos Anatômicos e Coleta dos Dados

Para analisar a variação na forma do crânio entre os indivíduos das cinco espécies estudadas, foram definidos marcos anatômicos (“landmarks”) nas imagens digitalizadas das radiografias. O procedimento foi adaptado de Clemente-Carvalho *et al.* (2008). As radiografias foram digitalizadas com uso de uma câmera digital NIKON® 12.0 Megapixels e Negatoscópio LUMATRON®. Marcos anatômicos foram definidos nas imagens digitalizadas usando o software *tpsDig* (F.J.ROHLF, <http://life.bio.sunysb.edu/morph>). Estes marcos foram escolhidos seguindo critério de certeza de identificação (mesmos pontos em todas as imagens) e, portanto foram assumidos como homólogos. Por causa da simetria, só foram definidos marcos para o lado esquerdo da imagem do crânio, método amplamente aceito (LARSON, 2004; FABREZI, 2006; STAYTON & RUTA, 2006). Foi definido um total de 12 marcos (**Fig. 5**): (1) Topo do rosto; (2) Junção do osso nasal com a maxila superior; (3) Junção do osso nasal com a borda anterior do olho; (4) Ponto de sobreposição da borda lateral do olho com o osso neopalatino (inferior); (5) Junção do osso, localizado entre a maxila e o osso quadrojugal, com a maxila; (6) Junção do osso, localizado entre a maxila e osso quadrojugal, com o quadrojugal; (7) Ponta mais exterior do osso quadrojugal; (8) Junção do osso esquamosal com o osso quadrojugal; (9) Ponto de sobreposição da borda inferior olho com o osso pterigóide (inferior); (10) Topo da crista pós-orbital; (11) Borda interna mais proeminente do côndilo occipital; (12) Junção entre os dois ossos nasais, direito e esquerdo, com os dois ossos frontoparietais.

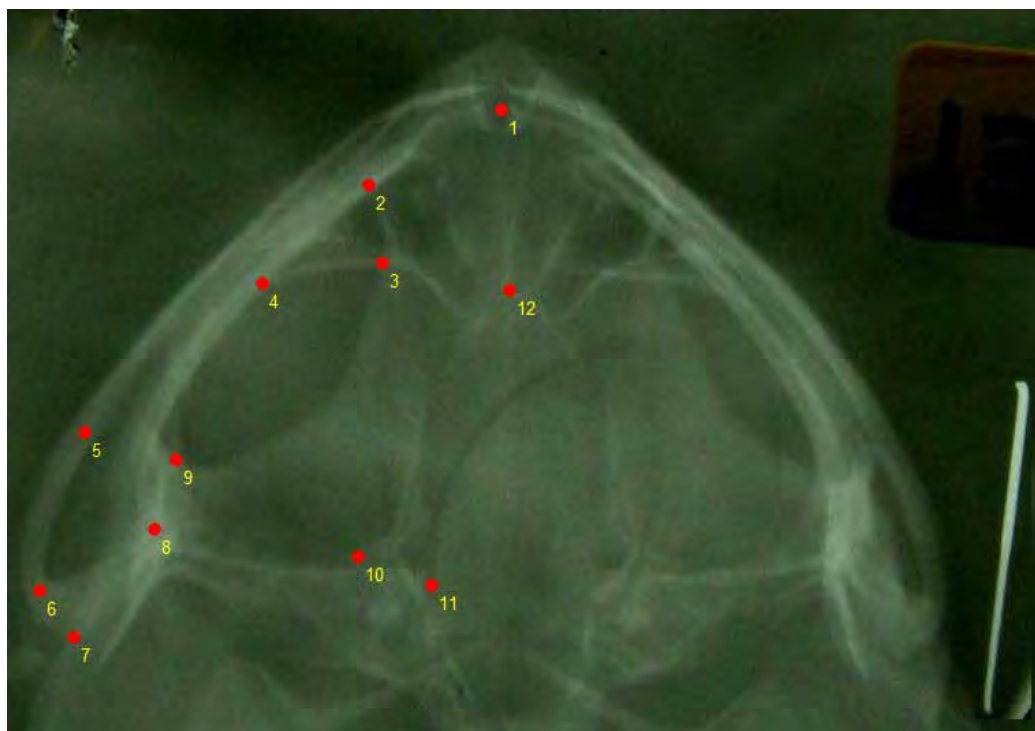


Figura 5: Marcos anatômicos (círculos vermelhos) tomados na região craniana dorsal das espécies de *Rhinella* gr. *crucifer* (CFBH 13370). Escala 15mm (barra à direita).

3.4 Análises dos dados

3.4.1 Alinhamento das Coordenadas e Obtenção do “Consensus”.

Para cada imagem obtida, as coordenadas “x”-“y” que definem os marcos anatômicos foram padronizadas em uma etapa conhecida como alinhamento. No alinhamento são retiradas as diferenças de orientação, posição e de escala, rotacionando as imagens através de um critério de otimização, sobrepondo os centróides de todas as imagens e proporcionalizando todos os indivíduos. Como critério, foi minimizada a soma dos quadrados das distâncias entre os marcos associado com o procedimento de Procrustes (BOOKSTEIN, 1991), gerando uma configuração consenso (*Consensus*) a partir das medidas médias das coordenadas alinhadas (ROHLF & SLICE, 1990). Este método faz uma aproximação linear entre o espaço de forma curva e o espaço Euclidiano pela definição do ponto de menor tangência (BOOKSTEIN, 1991) e contém todas as informações de variabilidade na forma.

3.4.2 Obtenção de Variáveis de Forma parciais e os Valores de “ α ”

Autovetores são eixos multidimensionais de deformações principais que explicam as possíveis variações localizadas no crânio em diferentes escalas geométricas. Para obtenção dos autovetores foi formada uma matriz de energia de transformação com as funções das distâncias entre os marcos e a configuração consenso. Essa matriz foi decomposta, produzindo os autovetores e uma matriz diagonal de autovalores reais. As coordenadas x-y alinhadas foram então projetadas nestes eixos de deformações principais, produzindo as variáveis de forma parciais (*Partial Warps*). Após a obtenção destas variáveis, uma matriz de deformações parciais (matriz das variáveis de forma) foi definida com $W = VE^{-\alpha/2}$, onde “V” é a matriz das coordenadas de cada espécie (expressa como desvios em relação à configuração consenso); “E” é a matriz das deformações principais, e “ ” a matriz dos autovalores. Nessa fórmula, o expoente “ α ” permite a atribuição de “pesos” diferentes as variáveis de forma parciais em relação à escala espacial. Utilizando-se $\alpha = 1$, maior peso é dado para marcos espacialmente mais distantes, e utilizando-se $\alpha = -1$ maior peso é dado para marcos espacialmente mais próximos.

3.4.3 Relative Warps

Foram obtidas 18 variáveis de forma parciais ($2p - 6 =$ número de variáveis de forma parciais, onde “p”= número de marcos = 12). A redução de dimensão destas variáveis foi realizada através da análise de deformação relativa (*relative warps analysis*) (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF, 1996). Esse tipo de análise nada mais é que uma análise de componentes principais da matriz das variáveis de forma parciais, e evidencia a principal direção da variação na forma (REIS & MONTEIRO, 1999). Assim, as diferenças de forma entre os crânios das populações do grupo *Rhinella crucifer* foram visualizadas como deformações projetando-se cada escore das 18 variáveis de forma obtidas nesses eixos relativos de deformação (ROHLF *et al.*, 1996). Este procedimento é rotineiramente usado para visualizar padrões e tendências de variação morfológica no formalismo da morfometria geométrica (ROHLF, 1993; LARSON, 2004; CLABAUT *et al.*, 2007). Para todos os passos das análises foram usados os softwares *tpsUTIL* e *tpsRELW* (F.J.ROHLF, <http://life.bio.sunysb.edu/morph>).

4. RESULTADOS

4.1 Alinhamento das Coordenadas e o “Consensus”

O alinhamento das coordenadas dos marcos anatômicos para todos os indivíduos (análise de Procrustes) gerou uma configuração consenso (**figura 6**).

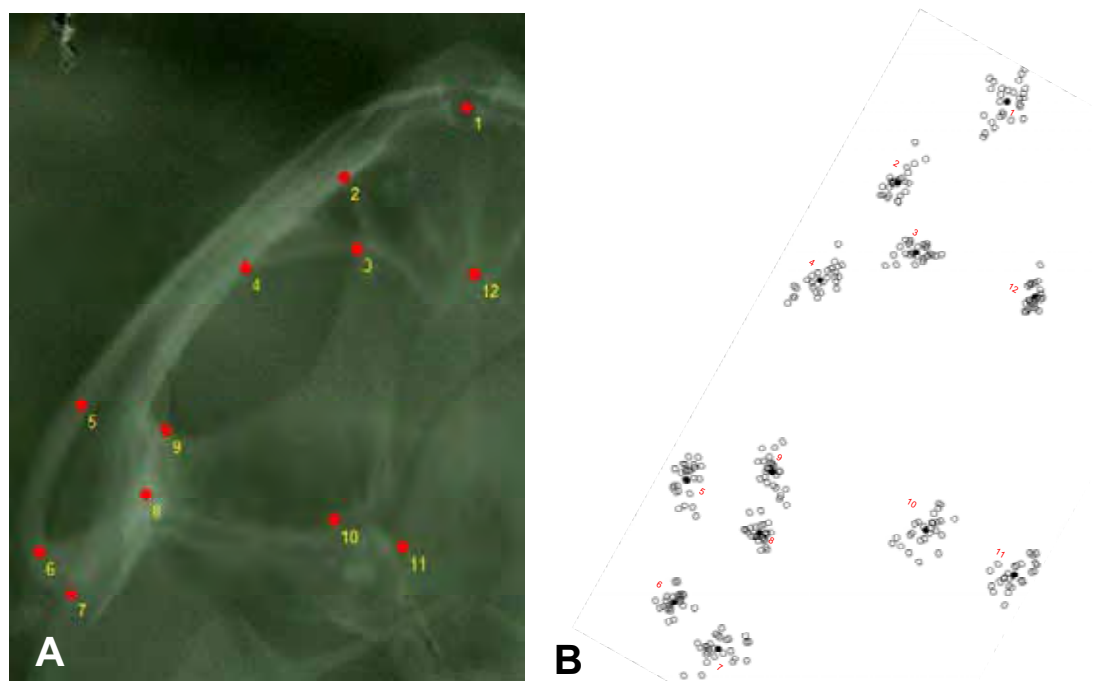


Figura 6: “A” Disposição dos 12 marcos anatômicos definidos em imagem craniana; “B” Dispersão dos marcos de cada indivíduo componente da amostra (pontos brancos) em relação à configuração consenso (pontos pretos). Números correspondendo aos marcos previamente definidos (para definição ver o texto).

4.2 Deformações Relativas

A ordenação das amostras populacionais das morfoespécies do grupo *Rhinella crucifer* nos espaços reduzidos aos dois primeiros eixos, que descrevem as principais direções da variação total na forma craniana, e a visualização da variação da forma craniana das morfoespécies em grades de deformação, é ilustrada nas figuras 7 a 11. Nas figuras de análise de ordenação, os polígonos delimitam as cinco morfoespécies do grupo.

4.2.1 Alpha igual a Zero

Para dados analisados com a alpha igual a zero ($\alpha=0$), no qual as mudanças de forma do crânio tanto em larga escala como em pequena escala tem o mesmo peso, os dois primeiros eixos explicaram 56,67% (**tabela 2**). As amostras apresentaram ampla sobreposição com exceção das amostras correspondentes à espécie *Rhinella henseli*, que ficou posicionada no extremo positivo do segundo eixo de deformação relativa (RW2) (**Fig. 7**).

Tabela 2: Coeficientes dos seis primeiros eixos de variação gerados na análise de forma, $\alpha = 0$.

EIXOS DE VARIAÇÃO	VARIÂNCIA	VARIÂNCIA EXPLICADA (%)	VARIÂNCIA ACUMULADA (%)
1	0.24521	33.32%	33.32%
2	0.20526	23.35%	56.67%
3	0.13392	9.94%	66.61%
4	0.11601	7.46%	74.07%
5	0.10477	6.08%	80.15%
6	0.08609	4.11%	84.26%

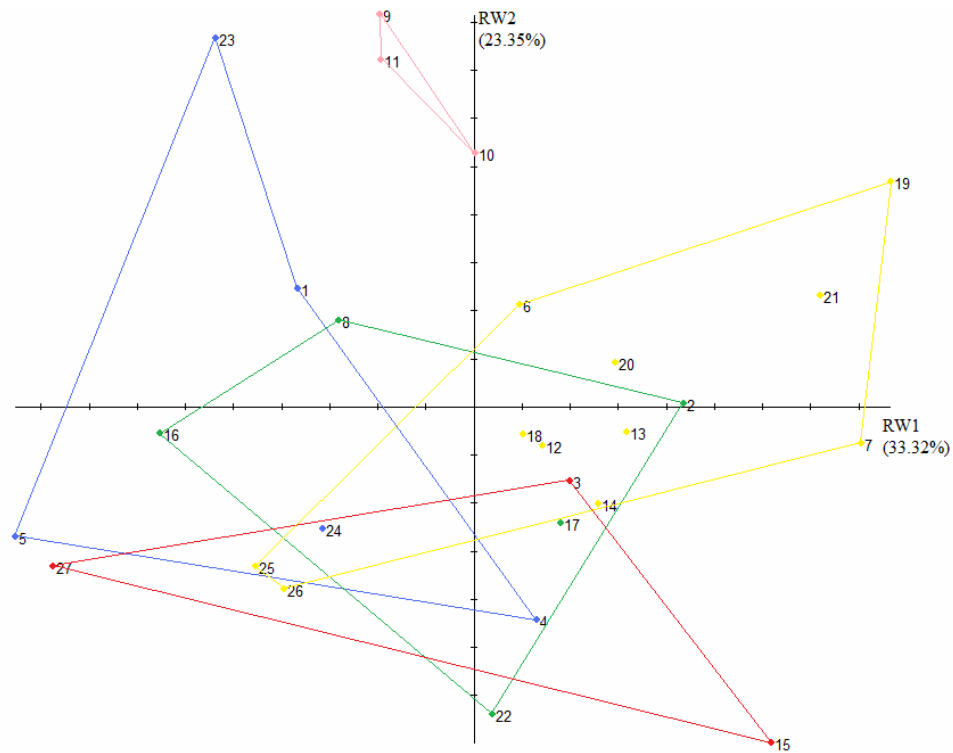


Figura 7: Ordenação das populações das cinco morfoespécies no espaço do primeiro e segundo eixo de deformação relativa, pesados para $\alpha = 0$. Nessa figura cada ponto representa a posição de um indivíduo. Polígonos delimitam morfoespécies. *Rhinella crucifer* (verde); *R. pombali* (vermelho); *R. ornata* (azul); *R. abei* (amarelo) e *R. henseli* (rosa).

4.2.2 Alpha igual a 1

Para a análise feita com alpha igual a um, na qual é dado maior peso para mudanças de forma em marcos espacialmente mais distantes, os primeiros dois eixos de deformação relativa explicam 74,19% da variação total da forma do crânio (**tabela 3**).

Tabela 3: Coeficientes dos seis primeiros eixos de variação gerados na análise de forma para $\alpha = 1$.

EIXOS DE VARIAÇÃO	VARIÂNCIA	VARIÂNCIA EXPLICADA (%)	VARIÂNCIA ACUMULADA (%)
1	0.12071	55.37%	55.37%
2	0.07038	18.82%	74.19%
3	0.04929	9.23%	83.42%
4	0.03615	4.97%	88.39%
5	0.03228	3.96%	92.35%
6	0.02641	2.65%	95.00%

A ordenação das amostras promoveu um agrupamento de todos os pontos. As amostras correspondente a espécie *R. crucifer* se sobrepuseram com todas as outras espécies do grupo; *R. ornata* se sobrepôs com as espécies *R. crucifer* e *R. henseli*; *R. abei* sobrepôs-se somente com *R. crucifer* e *R. pombali*; *R. henseli* se sobrepôs com *R. ornata* e levemente com *R. crucifer* e a amostra de *R. pombali* sobrepôs somente com as da espécies *R. crucifer* e *R. abei* (**Fig. 8**).

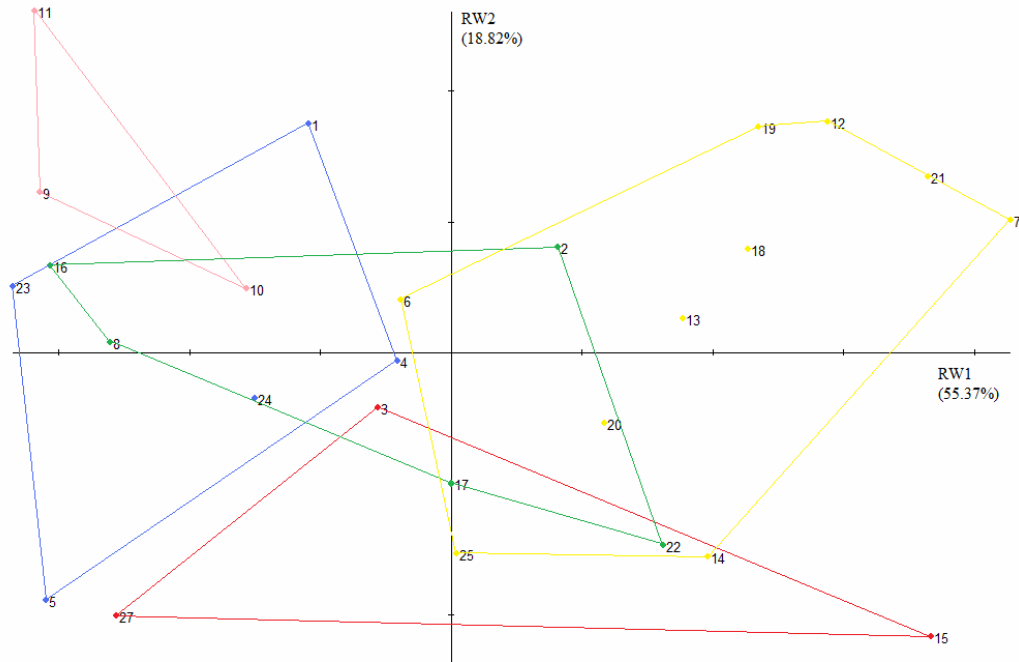


Figura 8: Ordenação das populações das cinco morfoespécies no espaço do primeiro e segundo eixo de deformação relativa, pesados para $\alpha = 1$. Nessa figura cada ponto representa a posição de um indivíduo. Polígonos delimitam morfoespécies. *Rhinella crucifer* (verde); *R. pombali* (vermelho); *R. ornata* (azul); *R. abei* (amarelo) e *R. henseli* (rosa).

Quanto a contribuição de cada marco para a variação na forma craniana com peso maior para mudanças relacionadas a marcos espacialmente mais distantes, os marcos anatômicos 8 (Junção do osso esquamosal com o osso quadrojugal) e 9 (Ponto de sobreposição da borda inferior olho com o osso Pterigóide (inferior)) foram aqueles que mais contribuíram para a variação da forma do crânio entre essas espécies nessa análise (**Tabela 4, Fig. 9**).

Tabela 4: Contribuição relativa de cada marco para a variação da forma craniana das espécies estudadas, para alpha igual a um ($\alpha = 1$).

LANDMARK	CONTRIBUIÇÃO	LANDMARK	CONTRIBUIÇÃO
1	0.00648	7	0.07132
2	0.06994	8	0.22595
3	0.12671	9	0.24396
4	0.02266	10	0.02081
5	0.06357	11	0.00704
6	0.12469	12	0.01688

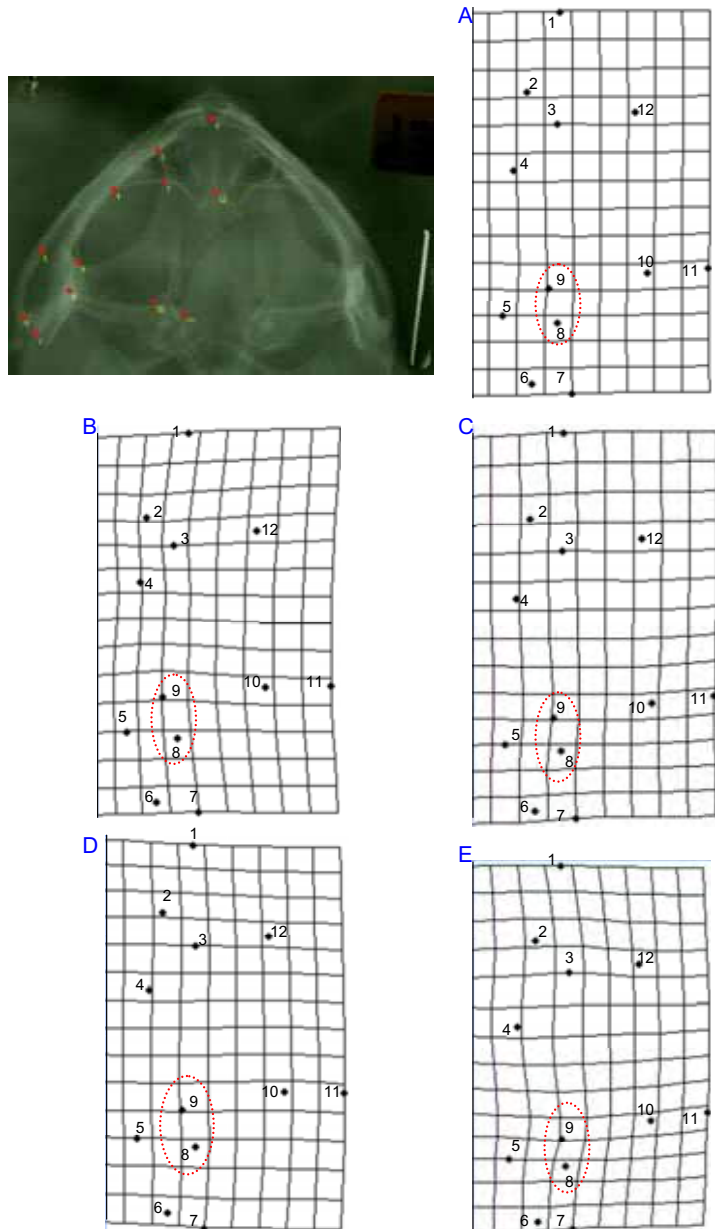


Figura 9: Grades de deformação geradas a partir da configuração consenso para as cinco morfoespécies ao longo dos dois primeiros eixos de variação. Os Números correspondem aos marcos anatômicos. As elipses vermelhas indicam marcos de

maior variação. A) *Rhinella crucifer*. B) *Rhinella pombali*. C) *Rhinella ornata*. D) *Rhinella abei*. E) *Rhinella henseli*.

4.2.3 Alpha igual a menos Um

Para a análise feita com alpha igual a menos um ($\alpha=-1$), na qual mudanças na forma em pequena escala têm mais peso, os dois primeiros RW explicaram 51,82% da variação total da forma do crânio (Tabela 5).

Tabela 5: Coeficientes dos seis primeiros eixos de variação gerados na análise de forma para $\alpha = -1$.

EIXOS DE VARIAÇÃO	VARIÂNCIA	VARIÂNCIA EXPLICADA (%)	VARIÂNCIA ACUMULADA (%)
1	0.85468	30.39%	30.39%
2	0.71780	21.43%	51.82%
3	0.59613	14.78%	66.60%
4	0.43336	7.81%	74.41%
5	0.41532	7.18%	81.59%
6	0.32378	4.36%	85.95%

Ocorreu alta sobreposição entre as amostras de quatro espécies no extremo positivo do primeiro eixo de deformação relativa, *R. crucifer* - *R. ornata* - *R. abei* e *R. pombali*. No extremo negativo do primeiro eixo ocorre uma leve sobreposição entre as populações de *R. henseli* e *R. ornata* (Fig 10).

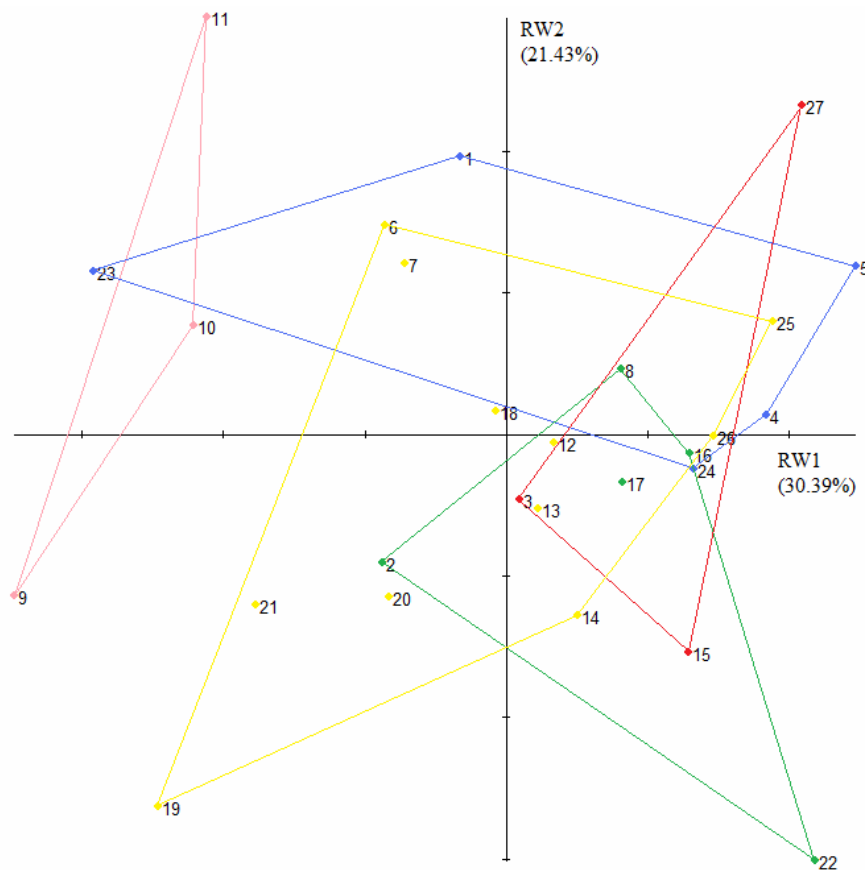


Figura 10: Ordenação das populações das cinco morfoespécies no espaço do primeiro e segundo eixo de deformação relativa, pesados para $\alpha = -1$. Nessa figura cada ponto representa a posição de um indivíduo. Polígonos delimitam morfoespécies. *Rhinella crucifer* (verde); *R. pombali* (vermelho); *R. ornata* (azul); *R. abei* (amarelo) e *R. henseli* (rosa).

Quanto à contribuição de cada marco para a variação na forma craniana, com peso maior para mudanças em pequena escala, os marcos anatômicos 8 e 9 também foram aqueles que mais contribuíram para a variação da forma entre essas espécies nessa análise (Tabela 6, Fig. 11).

Tabela 6: Contribuição relativa de cada marco para a variação da forma craniana das espécies estudadas, para alpha igual a menos um ($\alpha = -1$).

LANDMARK	CONTRIBUIÇÃO	LANDMARK	CONTRIBUIÇÃO
1	0.01923	7	0.07763
2	0.09258	8	0.15373
3	0.13070	9	0.14903
4	0.05818	10	0.06884
5	0.07530	11	0.02891
6	0.11214	12	0.03374

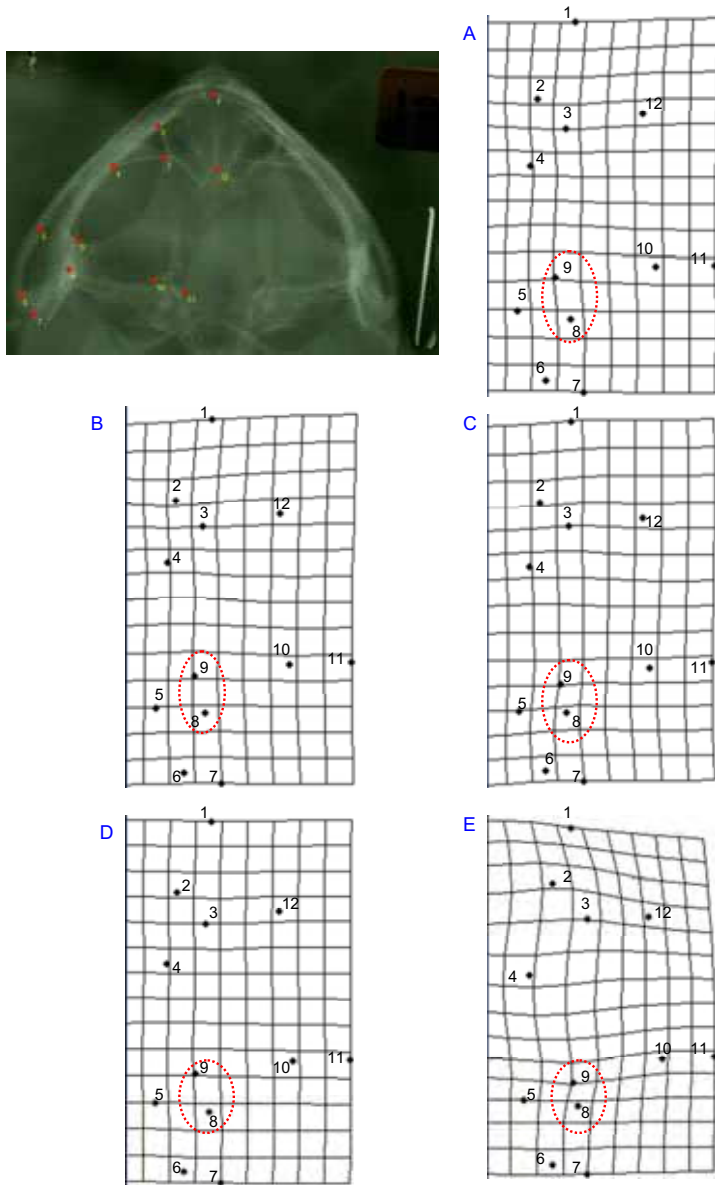


Figura 11: Grades de deformação geradas a partir da configuração consenso para as cinco morfoespécies ao longo dos dois primeiros eixos de variação. Os Números correspondem aos marcos anatômicos. As elipses vermelhas indicam marcos de maior variação. A) *Rhinella crucifer*. B) *Rhinella pombali*. C) *Rhinella ornata*. D) *Rhinella abei*. E) *Rhinella henseli*.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O emprego da morfometria tradicional tem auxiliado em estudos de variação morfológica de diversos grupos de animais, incluindo o grupo de *Rhinella crucifer* (ver em BALDISSERA *et al.*, 2004). Entretanto, frente às informações genéticas recentemente obtidas, faz-se necessária uma releitura da variação fenotípica neste grupo. Para isso, a morfometria geométrica pode ser uma ferramenta mais adequada do que a morfometria tradicional, pois vem contribuindo na descrição de padrões mais refinados de variação morfológica (FABREZI, 2006; STAYTON & RUTA, 2006). Por exemplo, um estudo comparativo entre essas duas metodologias com peixes do gênero *Plagioscion* (VIANA *et al.*, 2006) encontrou que a diferenciação de padrões de dimorfismo sexual só é possível com a morfometria geométrica, demonstrando seu maior poder de análise.

A análise de deformações relativas (*Relative Warps analysis*) permite que a variação global e local seja observada separadamente, ou seja, a contribuição das mudanças na posição dos marcos que estão espacialmente mais próximos e mudanças na posição dos marcos que são espacialmente mais distantes. Quando esta análise foi realizada enfatizando-se as variações de forma sem escala ($\alpha = 0$) com posterior projeção das variáveis de forma nos eixos obtidos, houve a formação de dois grupos distintos ao longo dos dois primeiro eixos, um contendo as espécies *Rhinella crucifer*, *R. pombali*, *R. ornata* e *R. abei*, localizado ao longo do RW1, e outro formado somente pela espécie *R. henseli*, localizado no extremo positivo do RW2. Resultado semelhante foi encontrado na análise das variações enfatizando uma escala local com alpha igual a menos um ($\alpha = -1$), ou seja, alta sobreposição entre as mesmas quatro espécies (*Rhinella crucifer* – *R. pombali* – *R. ornata* e *R. abei*) no extremo positivo do primeiro eixo de deformação relativa (RW1), e grupo amostral da morfoespécie *R. henseli* ficou localizado no extremo negativo do “RW1”, apresentando uma leve sobreposição com o polígono correspondente à *R. ornata*. A sobreposição das morfoespécies *Rhinella crucifer*, *R. pombali*, *R. ornata* e *R. abei* reflete a grande semelhança na forma de seus crânios.

Já quando as análises foram feitas usando variáveis calculadas com o uso de $\alpha = 1$, ou seja, maior ênfase foi dada as variações na forma entre os marcos espacialmente mais distantes, uma situação diferente foi obtida. Ocorreu alta sobreposição das amostras ao longo de todo o primeiro eixo de deformação (RW1); o polígono correspondente a espécie *R. crucifer*, localizado na região central dos dois eixos, sobrepôs-se aos das quatro outras espécies, *R. ornata* agrupou-se com *R. crucifer* e *R. henseli* na parte negativa do RW1, *R. henseli* também formou um agrupamento na parte negativa do RW1 com *R. crucifer* e *R. ornata*. Já *Rhinella pombali* agrupou-se na parte negativa do RW2 com os polígonos da espécies *R. crucifer* e *R. abei* e essa sobrepôs-se a *R. crucifer* e *R. pombali* na parte positiva do RW1. Logo, os resultados encontrados mostram que a variação de forma entre os crânios das morfoespécies em questão está concentrada em regiões específicas locais, sendo que esta variação não é evidente em escala global. De fato, na visualização da direção principal em que ocorre variação na forma como deformações em uma grade, a variação parece estar contida principalmente em dois marcos próximos, situados na região de junção entre maxilas.

Os resultados encontrados são altamente notáveis, uma vez que concordam em grande parte com aqueles encontrados por Clemente-Carvalho *et al.*, 2008 para outro anuro, a espécie *Brachycephalus ephippium*. Nesse estudo, a análise feita dando-se maior ênfase as mudanças dos marcos espacialmente mais distantes ($\alpha = 1$), obteve como resultado uma alta sobreposição entre as amostras analisadas sem nenhuma variação distinguível, semelhante ao o que obtivemos. Já para as análises feitas enfatizando-se mudanças dos marcos espacialmente mais próximos, em ambos os estudos ocorreu a distinção de dois grupos ao longo dos eixos de deformações. Estes resultados, segundo Clemente-Carvalho *et al.*, 2008, seriam relacionados a questões de alometria das amostras, ou seja, é observado que a variação na forma é dependente da escala e espacialmente localizada em estruturas morfológicas complexas (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2008).

Segundo as variáveis de forma e das técnicas formais da morfometria geométrica, a sobreposição observada para quatro espécies, *Rhinella crucifer* - *R. pombali* - *R. ornata* e *R. abei*, pode ser atribuída a grande semelhança entre a forma dos seus crânios. Este achado é concordante com a morfologia conservativa observada em anuros (HEYER, 1979; AUSTIN *et al.*, 2002; LOUGHEED *et al.*, 2006). Quanto a *R. henseli*, há grande relevância nos dados obtidos uma vez que a diferenciação dessa espécie baseada nas características morfológicas em relação as outras espécies do grupo

corroborar os resultados obtidos por Thomé *et al.*, submetido, no qual *R. henseli* corresponde a uma linhagem genética única localizada no extremo sul da área de distribuição.

Uma “clina” pode ser definida como modificações graduais de uma característica do fenótipo de uma espécie ao longo de sua distribuição (HUXLEY 1938), resultante do efeito de duas forças: seleção natural diferenciada nos extremos de um gradiente ecológico, e fluxo gênico entre os indivíduos ao longo deste gradiente. A variação fenotípica encontrada para o grupo como um todo pode ser caracterizada como uma variação não contínua, com um quebra morfológica entre *R. henseli* e o grupo formado pelas quatro morfoespécies restantes, ou seja, não clinal. No entanto, é possível que exista variação clinal dentro do grupo que engloba as morfoespécies restantes, como encontrado para três outras espécies pertencentes à família Bufonidae (ASHTON, 2002b). Para examinar esta hipótese seriam necessárias mais amostras, e análises concatenadas com outras variáveis (i.e. características geográficas e/ou parâmetros climáticos biologicamente relevantes (CVETKOVIĆ *et al.*, 2008) seriam interessantes para resolver esta questão. Por outro lado, os resultados fazem sentido se considerarmos que o alto grau de divergência entre *R. henseli* e as outras espécies do grupo pode estar dificultando o fluxo gênico entre estes grupos. A sobreposição das outras morfoespécies pode estar relacionada com a menor divergência genética entre elas. Como conclusão, seguindo a metodologia usada, os dados obtidos e os tipos de análises feitas, temos que a variação fenotípica parece corresponder com a variação genética, e não com as morfoespécies previamente definidas por Baldissera *et al.*, (2004). No entanto, devido ao baixo número de amostras utilizadas é possível que os resultados encontrados não sejam representativos da situação real no grupo. Há também a possibilidade de que os marcos tomados sejam insuficientes para evidenciar toda complexidade da forma craniana (BURGIO *et al.*, 2009), o que modificaria o resultado mascarando a real situação para o grupo *crucifer* de espécies. Logo, vê-se necessário, futuramente, uma reavaliação do presente trabalho assumindo um número amostral maior, tanto em número de indivíduos como em número de localidades, pois uma vez aumentado adequadamente o tamanho da amostra o poder da análise estatística também será aumentado (HAIR *et al.*, 2009) e uma maior quantidade de marcos tomados ao longo da estrutura analisada. Também dever ser consideradas possíveis inovações desenvolvidas para a metodologia aqui usada, diminuindo erros de medida. As respostas angariadas com presente trabalho podem contribuir com a criação de uma base de dados

importantes para análises e inferências posteriores, como por exemplo, para estudos de diversificação no bioma da Mata Atlântica. O conhecimento básico dos processos promotores da biodiversidade é de fundamental importância para que seja possível fundar adequadamente possíveis estratégias de conservação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTON K. G. 2002b. Do amphibians follow Bergmann's rule? **J Zool** 80 : 708-716.
- ARIF, S., D. C. Adams, and J. A. Wicknick. 2007. Bioclimatic modelling, morphology, and behaviour reveal alternative mechanisms regulating the distributions of two parapatric salamander species. **Evolutionary Ecology Research** 9 : 843–854.
- BALDISSERA, F. A. 2001. Taxonomia e filogenia de *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821 (Anura, Bufonidae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro.
- BALDISSERA, F. A.; U. Caramaschi & C. F. B. Haddad. 2004. Review of the *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Arquivos do Museu Nacional** 62 : 255-282.
- BEEBEE, T. J. C. & Griffiths, R. A. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation** 125 : 271-285.
- BERGMANN, K. 1847. Ueber die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. **Gottinger Studien** 3 : 595-708.
- BOKERMANN, W. C. A., 1966. Lista Anotada das Localidades-Tipo de Anfíbios Brasileiros. São Paulo: Serviço de Documentação, Reitoria da Universidade de São Paulo. 183p.
- BURGIO, G.; Baylac, M.; Heyer, E. & Montagutelli, X. 2009. Genetic analysis of skull shape variation and morphological integration in the mouse using

interespecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the *Mus spretus* species. **Evolution** 63-10 : 2668 – 2686.

CLABAUT, C., P. M. E. Bunje, W. Salzburger, & A. Meyer. 2007. Geometric Morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the Tanganyikan cichlid fish radiations. **Evolution** 61 : 560 – 578.

CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; Monteiro, L. R.; Bonato, V.; Rocha, H. S.; Pereira, G. R.; Oliveira, D. F.; Lopes, R. T.; Haddad, C. F. B.; Martins, E. G. & dos Reis, S. F. 2008. Geographic variation in cranial shape in the Pumpkin Toadlet (*Brachycephalus ephippium*): a geometric analysis. **Journal of herpetology** 42 (1) : 176-185.

CESAR, P. R. S. M., Lascala, C. A., Matson, E. Riscos Radiobiológicos produzidos pela técnica de Paralelismo. Associação de Cirurgiões de Dentistas (APCD) – Portal APCD - **ACPD Revista**.

CVETKOVIĆ, D.; Tomasević, N.; Ficetola, G. F.; Crnobrnja-Isailović & Miaud, C. 2009. Bergmann's rule in amphibians: combining demographic and ecological parameters to explain body size variation among populations in the common toad *Bufo bufo*. **Journal Zoological Systematic Evolutionary Research** 47 (2) : 171-180.

DRYDEN, I. L., & K. V. Mardia. 1998. Statistical Shape Analysis. John Wiley and Sons, New York.

DUELLMAN, W. & 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.

EMBRAPA. 1996. Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasília, Serviço de Produção e Informação, Terra Viva, 160 p.

- FABREZI, M. 2006. Morphological evolution of Ceratophryinae (Anura, Neobatrachia). **Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research** 44 : 153-166.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. 1998. Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica do período de 1990 – 1995. Relatório Nacional. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Instituto Sócio-Ambiental, 7p.
- 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.
- GERGUS, E. W. A.; Sullivan, B. K. & Malmos, K. B. 1997: Call variation in the *Bufo microscaphus* complex: implications for species boundaries and the evolution of mate recognition. **Ethology** 103 : 979-989.
- HADDAD, C. F. B.; Toledo, L. F. & Prado, C. P. A. 2008. Guia de Anfíbios da Mata Atlântica. 1ªed. 244págs. Editora Neotropica.
- HEYER, W. R.; Rand A. S.; Cruz C. A. G.; Peixoto O. L. & Nelson C. E. 1990. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, 31 (4) : 231-410.
- HUXLEY, J. S. 1938. Clines: An auxilliary taxonomic principle. **Nature** 142 : 219-220.
- LARSON, P. M. 2002. Chondrocranial morphology and ontogenetic allometry in larval *Bufo americanus* (Anura, Bufonidae). **Zoomorphology** 123 : 95 - 106
- LAURANCE, W. F. 2009. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation** 142 (2009) : 1137.
- LIMA, A. M. X., Rodrigues, R. G., Bittencourt, S., Condriatti, L. H. & Machado, R. A. 2005. *Bufo henseli*: First record. **Herpetological Review** 36 (2) : 198.

- LYNCH, J. D. 1979. The amphibians of the lowland tropical forests. Em: Duellman, W. E. (ed.). The South American herpetofauna: Its origin, evolution and dispersal. The Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence. p.189-215.
- MACIEL, N. M., Schwartz, C. A., Pires Júnior, O. R., Sebben, A., Castro, M. S., Sousa, M. V., Fontes, W., Schwartz, E. N. F. 2003. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. **Comparative Biology and Physiology Part B** 134 : 641-649.
- MAY, R. M., Endler, J. A. & McMurtrie, R. E. 1975. Gene frequency clines in the presence of selection oppose by gene flow. **The American Naturalist** 109 : 659-676.
- NARVAES, P. 2003. Revisão Taxonômica das Espécies de *Bufo* do Complexo *granulosus* (Amphibia, Anura, Bufonidae). Unpublished Ph.D. Dissertation, Departamento de Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 305.
- REIS, S. F. & Monteiro, L. F. 1999. Princípios de Morfometria Geométrica. 1ªed. 198págs. Editora Holos.
- RIBEIRO, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J & Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how this remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142 (2009) : 1141-1153.
- ROHLF, F. J. 1993. Relative-Warp analysis and an example of this application to mosquito wings. In L. F. Marcus, E. Bello & A. Garcia – Valdecasas (eds.), Contributions to Morphometrics, pp 131- 159. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, Spain.
- ROHLF, F. J. 1996. Morphometric spaces, shape components and the effect of linear transformations. In L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. Naylor & D. E. Slice (eds.), Advances in Morphometrics, pp 117 – 129. **Plenum Press**, New York.

- SBH. 2008. Brazilian amphibians – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- da SILVA, J. M. C., Casteleti, C. H. M. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.), The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook. CABS and Island Press, Washington, pp. 43–59.
- SILVANO, D. L. & M. V. Segalla. 2005. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology** 19 : 653–658.
- SLATKIN, M. 1975. Gene flow and selection in a cline. **Genetic**, 75 : 733-756.
- STAYTON, C. T. & M. Ruta. 2006. Geometric morphometrics of the skull roof of stereospondyls (Amphibia: Temnospondyli). **Palaeontology** 49 : 307-337
- VIANA, A. P., Frédou, T. & Lucena, F. 2006. Aplicação de técnicas morfométricas no estudo da morfometria de pescada branca, *Plagioscion squamosissimus*, Heckel (1940), Perciformes, Sciaenidae, Desembarcada na Ilha do Mosqueiro – PA. **Boletim do laboratório de Hidrologia**, 19 : 01-12.
- YOUNG, B. E., Lips, K. R., Reaser, J. K., Ibáñez, R., Salas, A. W., Cedeño, J. R., Coloma, L. A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J. R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G. & Romo, D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology** 15 : 1213-1223.