SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

Desvendando a história evolutiva do sapinho-cururu *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) no Cerrado

Beatriz Batista Innocente

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr. Joaquim Manoel da Silva
Coorientador: Dr. Ricardo Marques da Silva
Coorientadora: Dra. Karina de Cassia Faria

Nova Xavantina-MT
Fevereiro, 2025

SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS DE NOVA XAVANTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

Desvendando a história evolutiva do sapinho-cururu *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) no Cerrado

Beatriz Batista Innocente

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr. Joaquim Manoel da Silva
Coorientador: Dr. Ricardo Marques da Silva
Coorientadora: Dra. Karina de Cassia Faria

Nova Xavantina-MT
Fevereiro, 2025

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

This study was partially funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazilian Ministry of Education)

Ficha catalográfica elaborada pela Supervisão de Bibliotecas da UNEMATCatalogação de Publicação na Fonte.
UNEMAT - Unidade padrão

I58d Innocente, Beatriz Batista.
Desvendando a história evolutiva do sapinho-cururu Rhinella mirandaribeiroi (Gallardo, 1965) (Anura: Bufonidae) no Cerrado / Beatriz Batista Innocente. - Cáceres, 2025.
62f.: il.

Universidade do Estado de Mato Grosso "Carlos Alberto Reyes Maldonado", Ecologia e Conservação/NVX-PPGEC - Nova Xavantina - Mestrado Academico, Campus Universitário De Nova Xavantina.
Orientador: Joaquim Manoel da Silva.
Coorientador: Ricardo Marques da Silva.
Coorientador: Karina de Cassia Faria.

1. Anuro. 2. Filogeografia. 3. Estrutura populacional. I. Silva, Joaquim Manoel da. II. Silva, Ricardo Marques da. III. Faria, Karina de Cassia. IV. Título.

UNEMAT / MTSCB CDU 575.1

TERMO DE APROVAÇÃO

DESVENDANDO A HISTÓRIA EVOLUTIVA DO SAPINHO-CURURU *RHINELLA MIRANDARIBEIROI* (GALLARDO, 1965) (ANURA: BUFONIDAE) NO CERRADO

BEATRIZ BATISTA INNOCENTE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Nova Xavantina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2025.

Banca Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
JOAQUIM MANOEL DA SILVA
Data: 19/02/2025 16:52:22-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Joaquim Manoel da Silva
Orientador
Universidade do Estado do Mato Grosso

gov.br Documento assinado digitalmente
FABRICIUS MAIA CHAVES BICALHO DOMINGOS
Data: 19/02/2025 17:21:33-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos
(Membro titular-Interno)
Universidade Federal do Paraná

gov.br Documento assinado digitalmente
LEANDRO ALVES DA SILVA
Data: 25/02/2025 07:06:15-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Leandro Alves da Silva
(Membro titular-Externo)
Universidade Federal de Rondonópolis

gov.br Documento assinado digitalmente
DIOGO ANDRADE COSTA
Data: 25/02/2025 12:38:15-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dr. Diogo Andrade Costa
(Membro suplente)
Universidade do Estado do Mato Grosso

“Foi solitário, exaustivo e me arrancou até o brilho nos olhos. Mas entre café, silêncio e fé, eu terminei. Por mim. Só por mim.”.

AGRADECIMENTOS

Quero começar expressando minha mais profunda gratidão a cada indivíduo que desempenhou um papel fundamental na realização deste trabalho de pesquisa. Cada palavra que pronuncio transborda com o imenso amor e apreço que sinto por aqueles que estiveram ao meu lado, segurando minha mão, encorajando-me e acreditando em mim em cada etapa desta jornada.

Em primeiro lugar, desejo expressar meu mais sincero agradecimento à minha família pelo apoio ao longo desta jornada acadêmica. Seu amor, incentivo e compreensão foram a âncora que me sustentou nos momentos mais desafiadores. Agradeço às minhas queridas irmãs Gabi e Isa pelo carinho constante, à minha madrasta Cléo por seu apoio desde o início até os primeiros passos na obtenção das bolsas, e aos meus pais, Antônio Sergio e Selma, pelo apoio incondicional e pelos abraços reconfortantes nos momentos mais difíceis.

Expresso minha sincera gratidão ao meu namorado Adrian pelo seu apoio, pela paciência em compreender os desafios desta jornada sendo peça fundamental para minha não desistência.

Aos meus colegas de mestrado, Carla Heloisa, Elisvan e Regiane, quero manifestar minha gratidão pelas horas de desabafo, pelas lágrimas compartilhadas e pelas risadas intermináveis na sala do café. Sua amizade tornou essa jornada mais leve e significativa. E a você, Kelby, a outra metade da minha alma, obrigada por embarcar nesta jornada do mestrado comigo, enfrentando desafios juntos e passando inúmeras noites acordados, obrigada por tornar NX meu lar.

Aos meus amigos de longa data em São Paulo, Luana, Fernanda e Patrick, meu eterno agradecimento por sempre me encorajarem, por ouvirem minhas reclamações incessantes e por me acolherem durante minhas visitas à cidade.

Expresso minha gratidão ao meu laboratório e à equipe de iniciação científica, Mirela, Andressa, Késsia e Amanda, pelo trabalho árduo nos campos e nas aplicações dos protocolos de citogenética. À doutoranda Bruna Pontes, MEU MUITO OBRIGADA POR TUDO, sem você, este estudo seria muito mais complicado. Agradeço pelas longas horas no laboratório, por adaptar os protocolos até que dessem certo, pelas conversas e pela orientação e por me ajudar muito nas análises. Ao meu coorientador, Ricardo Marques, que liderou este projeto, obrigada por apresentar este mundo dos anuros e da filogeografia, por me ensinar e treinar nas aplicações dos protocolos e pelas inúmeras contribuições e correções neste trabalho.

Ao meu orientador, Joaquim, e minha coorientadora, Karina, agradeço por me acolherem em seus laboratórios, pela paciência ao longa desta caminhada. E ao professor Ricardo Firmino, obrigada pelas suas orientações durante o experimento

Um agradecimento especial ao Professor Diogo Andrade Costa, por suas palavras de encorajamento e apoio constante.

Agradeço às instituições UNESP, UFMG, UFMS, UFRN e INPA por fornecerem as amostras de tecidos de *Rhinella mirandariberoi* de suas coleções zoológicas.

Não posso deixar de agradecer ao programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade do campus de Nova Xavantina, especialmente a Artemisa, por sua orientação gentil em toda a papelada e trâmites necessários. À Capes, por financiar minha bolsa durante esses dois anos (processo 88887.680090/2022-00) e à FAPEMAT por financiar este projeto (FAPEMAT 0000060/2022, 300076/2022-3)

Agradeço aos professores e colaboradores pela disciplina "Filogeografia Estatística/Adaptação Ambiental - Edição 2023", que foi fundamental para o entendimento e progresso deste trabalho.

Por fim, quero expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para este projeto. A todos vocês, meu mais sincero obrigado por fazerem parte desta conquista e por contribuírem para o meu crescimento pessoal e acadêmico

SUMÁRIO

1. Introdução Geral 15
1.1 A família Bufonidae Gray, 1825 15
1.2 O Cerrado e a herpetofauna 17
1.3 Filogeografia 18
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL 20
1. Introdução 24
2. Material e Métodos 28
2.1 Coleta de dados 28
2.2 Protocolos laboratoriais Extração de DNA 28
2.3 Edição das sequências 29
2.4 Estatísticas sumárias 29
2.5 Assinalamento populacional 29
2.6 Reconstrução filogenética e rede de haplótipos 30
2.7 Estimativa de tempo de divergência e inferências demográficas 30
2.8 Modelagem de nicho ecológico 31
2.9 Isolamento por Distância 32
3. Resultados 33
3.1 Estruturação Populacional 33
3.2 Estimativa de divergência e inferências demográficas 39
3.3 Modelagem de Nicho 41
3.4 Isolamento por Distância 42
4. DISCUSSÃO 43
5. Conclusão 47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48
7. APÊNDICES 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Mapa de distribuição das amostras de tecidos de *Rhinella mirandaribeiroi*. Os pontos pretos representam os pontos de tecidos da espécie. Datum: SIRGAS 2000. Base de dados IBGE. Mapa ESRI Physical. 28

Figura 2. Assinalamento populacional de *Rhinella mirandaribeiroi* no Geneland com dados de mtDNA e nDNA. (A) e (B) mostram as populações 1 e 2, respectivamente, com base nos dados de mtDNA. (C) e (D) correspondem às populações 1 e 2, respectivamente, com base nos dados de nDNA 34

Figura 3. Mapa com as populações assinaladas no *Geneland* sendo em verde população 1 e roxo população 2. As linhas em azul representas as grandes bacias que cruzam o Cerrado, a linha vermelha delimitação do bioma no Brasil. Mapa Physical. Base de dados IBGE. 35

Figura 4. FastBaps com nDna: A) assinalamento populacional K=3. B) Heatmap: No agrupamento Hierárquico Bayesiano é possível observar a matriz gráfica de bootstrap, cores mais claras são atribuídas aos pares de amostras que se mantiveram assinaladas a uma mesma população ao longo das réplicas de bootstrap. Matriz gráfica com cores claras (Amarelo/Branco) representa pares de amostras que consistentemente pertencem à mesma população em diferentes réplicas de bootstrap. As Cores Escuras (Laranja/Vermelho): indicam que os pares de amostras foram menos consistentes nos agrupamentos ao longo das réplicas. 36

Figura 5. Reconstrução filogenética mitocondrial (16S+CytB) de *Rhinella mirandaribeiroi* (A). As barras representam os resultados dos assinalamentos do Geneland mtDNA+nuDNA (B), Geneland nuDNA (C) e do fastBAPS (D). A população 2 é representada em roxo, a população 1 em verde e em amarelo é a terceira população assinalada no fast BAPS. 38

Figura 6.Rede de haplótipos das populações 1 e 2 a partir dos marcadores: População um em verde e a dois em Roxo A) Rede de haplótipo do gene 16S, B) Cytb e C) Pomc Os círculos representam os haplótipos, o tamanho dos círculos representa a frequência do haplótipo, as linhas a relação entre os haplótipos, os riscos e os passos mutacionais. ... 39

Figura 7. StarBeast das populações de *R.mirandaribeiroi* data em 290 m.a.a (95% HPD: 170-420 m.a.a). A) posterior e idade do nó B) A forma de "V" invertido representa o processo de divergência populacional, onde o ponto de encontro na base do "V" indica o momento mais recente de ancestralidade comum. O eixo horizontal reflete o tempo, desde o

passado (à esquerda) até o presente (à direita), enquanto a largura do "V" revela mudanças no tamanho efetivo das populações ao longo do tempo, com áreas mais estreitas indicando gargalos populacionais e áreas mais largas sugerindo expansões. A coloração azulada reflete o suporte estatístico para o modelo, com tons mais escuros indicando maior confiança nos parâmetros inferidos. 40

Figura 8. Starbest das populações 1 e 2 sendo A) população 1 e B) população 2. A linha azul mais grossa representa a mediana da estimativa, o polígono em azul claro representa o intervalo de confiança. (HPD de 95%). O eixo x é o tempo em anos e o eixo representa o tamanho efetivo populacional em escala logarítmica 41

Figura 9. Modelagem de Nicho: A) Presente 0k. B) Holoceno Médio 6k. C) Último máximo Glacial 21K D) Interglacial 130k. E) Refúgio. 42

Figura 10.Número de clusters sugeridos para *R. mirandaribeiroi* inferido no Geneland mtDNA/nDna no Geneland, K=2. 61

Figura 11.Histograma do Teste de Mantel do gene mitocondrial 16s. O gráfico representa a distribuição dos valores permutados no Teste de Mantel, que avalia a correlação entre duas matrizes de distância. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística sumária dos marcadores locus mitocondrial 16s e nucleares POMC, RAG1 e População um e dois. Colunas indicando os locus (marcador usado), Pares de bases (pd), número de sequências (Seq), sítios de segregação(S), número de haplótipos(h), diversidade dos haplótipos (HD), desvio padrão da diversidade dos haplótipos (SDHd), diversidade dos nucleotídeos (Pi), Tajima's (D) e F de Fu (Fu). (*) indicam valores significativos..... 37

Tabela 2. Distância genética da população 1 e 2 inferidas com uso dos marcadores mitocondriais e o Nuclear. 37

Tabela 3. Lista dos tecidos e marcadores utilizados para qualificação. Inclui as seguintes colunas: Os pontos do mapa da figura 1. Tombo (Código de identificação do tecido, os nomes com * são de sequências do banco de dados NBCI), Marcadores (Mitocondrial: 16s, Cytb, Nucleares: Pomc), Município da coleta e estado, coordenadas e assinalamento populacional..... 57

Tabela 4.Ciclos, Temperatura e Tempo da PCR de cada marcador molecular. 61

RESUMO

Os anfíbios são ótimos modelos para estudos de diversificação devido à sua forte tendência genética. O sapinho-cururu *Rhinella mirandaribeiroi* é amplamente distribuído no Cerrado, tornando-se um organismo ideal para testar hipóteses biogeográficas. O bioma passou por significativas mudanças geomorfológicas e climáticas ao longo do tempo, influenciando a estruturação genética das espécies. Para compreender os processos que moldaram a evolução de *R. mirandaribeiroi*, foram analisadas 97 amostras de tecidos de 49 localidades, utilizando três marcadores genéticos (16S, Cytb e POMC). Os resultados indicaram uma clara estruturação genética, com duas populações bem definidas (k=2), a primeira abrangendo Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Piauí e São Paulo, e segunda, incluindo Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Amazonas, Bahia e Minas Gerais. A população 2 apresentou maior diversidade haplotípica e evidências de uma expansão recente, enquanto a população 1 demonstrou menor diversidade e maior estabilidade ao longo do tempo. A divergência entre as populações foi estimada em aproximadamente 290 mil anos, sendo influenciada pelas oscilações climáticas do Pleistoceno. A análise filogenética confirmou a monofilia da espécie, mas sem suporte robusto para a monofilestimo das populações um e dois. Os dados sugerem que as variações climáticas desempenharam um papel crucial na conectividade e diversificação genética da espécie.

Palavras-chave: Anuro, Filogeografia, Estrutura populacional, Pleistoceno, Expansão demográfica.

ABSTRACT

Amphibians are excellent models for diversification studies due to their strong genetic structuring. The toad *Rhinella mirandaribeiroi* is widely distributed across the Cerrado biome, making it an ideal organism for testing biogeographic hypotheses. This biome has undergone significant geomorphological and climatic changes over time, which have influenced the genetic structuring of its species. To understand the processes shaping the evolution of *R. mirandaribeiroi*, 97 tissue samples from 49 localities were analyzed using three genetic markers (16S, Cytb, and POMC). The results revealed clear genetic structuring, identifying two well-defined populations (k=2): the first encompassing Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Piauí, and São Paulo; and the second including Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Amazonas, Bahia, and Minas Gerais. Population 2 exhibited higher haplotypic diversity and evidence of recent expansion, whereas population 1 showed lower diversity and greater stability over time. The divergence between these populations was estimated at approximately 290,000 years ago, likely influenced by Pleistocene climatic oscillations. Phylogenetic analysis confirmed the monophyly of the species but did not provide strong support for the monophyly of populations one and two. These data suggest that climatic fluctuations have played a crucial role in shaping the connectivity and genetic diversification of the species.

Keywords: Anuran, Demographic expansion, Pleistocene, Phylogeography, Population structure.

1. Introdução Geral

1.1 A família Bufonidae Gray, 1825

Conhecidos popularmente como sapos cururus, apresentam diferentes tamanhos e formas, os anuros da família Bufonidae possuem distribuição cosmopolita, à exceção de Madagascar e Oceania, com mais de 650 espécies descritas. Apesar de naturalmente ausentes nestes locais, atualmente possuem espécies introduzidas em seus territórios (Lever, 2001; Frost, 2024). Essa família possui origem sul-americana datada do Cretáceo Superior, seguida por uma expansão e radiação relativamente rápidas ao redor do globo (Pramuk et al., 2008). Dentre os 55 gêneros conhecidos desta família, o gênero *Rhinella* é formado por mais de 95 espécies, sendo o segundo maior gênero da família Bufonidae, com ampla distribuição geográfica desde os Estados Unidos até a América do Sul meridional (Frost, 2023). O gênero engloba os “sapos verdadeiros", com elevada diversidade em tamanho e morfologia (Pramuk, 2006). A taxonomia do gênero *Rhinella* é composta pela presença de diversos grupos de espécies (Maciel et al., 2010). Alguns estudos indicam que esses grupos abrangem consideráveis níveis de diversidade genética, padrões de introgressão mitocondrial e nuclear, além da ocorrência de hibridização (Pereyra et al., 2016; Pereyra et al., 2021; Rivera et al., 2021).

Um dos grupos de espécies é *Rhinella granulosa*, um grupo monofilético de pequenos sapos neotropicais encontrados em áreas abertas da América Central e América do Sul (Narvaes & Rodrigues, 2009). O grupo já foi revisado em diferentes aspectos de morfologia e filogenia (Narvaes & Rodrigues, 2009; Pramuk, 2006; Pereyra et al., 2016), com a hipótese filogenética mais recente proposta por Pereyra et al. (2021), sugerindo que o grupo é composto por 13 espécies: *R. azarai* (Gallardo, 1965), *R. beebei* (Gallardo, 1965), *R. bergi* (Céspedez, 2000), *R. bernardoi* (Sanabria et al., 2010), *R. centralis* (Narvaes & Rodrigues, 2009), *R. dorbignyi* (Duméril e Bibron, 1841), *R. granulosa* (Spix, 1824), *R. humboldti* (Gallardo, 1965), *R. major* (Müller & Hellmich, 1936), *R. merianae* (Gallardo, 1965), *R. mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965), *R. nattereri* (Bokermann, 1967) e *R. pygmaea* (Myers & Carvalho, 1952).

Acredita-se que uma população ancestral de *Rhinella* tenha sido amplamente distribuída em ambientes abertos da América do Sul, e que as mudanças geomorfológicas durante o Plioceno e as alterações climáticas no Pleistoceno tenham causado efeitos vicariantes, promovendo a diversificação do grupo (Narvaes & Rodrigues, 2009). O grupo teria surgido aproximadamente 5 milhões de anos atrás, com as divergências entre as espécies

irmãs ocorrendo no Pleistoceno médio. Durante esse período, o tamanho populacional efetivo da população foi estimado em cerca de 1,3 milhões de indivíduos, mantendo-se estável ao nas espécies de *R. granulosa e R. mirandaribeiroi*. Com o passar do tempo se expandiu para a região da Amazônia, com o surgimento das espécies que envolve *R. major, R. merianae e R. humbolti-centralis.* Essa expansão foi seguida por um gargalo populacional, originando *R. major*, o que resultou em uma redução drástica no tamanho populacional. Em seguida originou-se *R. merianae* (Rivera et al., 2022). As pressões climáticas exercidas ao longo do tempo em cada habitats das espécies parecem ter moldado características cranianas distintas, como o tamanho do focinho, com diferentes linhagens respondendo a essas pressões de maneira adaptativa (Simon et al., 2016).

Encontramos o grupo *R. granulosa* com distribuição associada a formações abertas dos biomas (Narvaes & Rodrigues, 2009). As distribuições das espécies do grupo *R. granulosa* são predominantemente alopátricas, com simpatria limitada. Entretanto, em algumas regiões, as distribuições das espécies desse grupo se sobrepõem (*R. major, R. merianae e R. humbolti)* de maneira significativa (Narvaes & Rodrigues, 2009; Rivera et al., 2022).

Rhinella mirandaribeiroi (Gallardo, 1965), popularmente conhecida como cururuzinho, é majoritariamente distribuída em habitats abertos do Cerrado brasileiro, mas também está presente na Bolívia (Narvaes & Rodrigues, 2009; Rivera et al., 2022). A espécie possui tamanho pequeno, com machos adultos apresentando entre 40 e 71 mm e fêmeas adultas apresentando entre 49 e 73 mm (Narvaes & Rodrigues, 2009). Apresenta coloração uniforme e pele dorsal granulosa, com o ventre branco, glândulas paratóides pequenas e cristas cefálicas queratinizadas e desenvolvidas (Vaz-Silva et al., 2020).

No Brasil está presente nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí e Tocantins. Também é encontrada em enclaves de Cerrado nos estados de Amazonas, Roraima, São Paulo e áreas ecotonais na Caatinga *sensu stricto* (Narvaes & Rodrigues, 2009; Valdujo et al., 2009; Pina et al., 2015; Benício et al., 2015; Schulze et al., 2015). A espécie é associada às terras baixas, geralmente com altitudes inferiores a 300 m, relevos planos e alta pluviosidade, permitindo o acúmulo de água para formar as lagoas temporárias amplamente utilizadas durante sua reprodução (Narvaes & Rodrigues, 2009; Schulze et al., 2015).

Até o momento, o conhecimento sobre a história evolutiva da espécie ainda é limitado. A maior parte das pesquisas realizadas concentra-se em aspectos como distribuição geográfica, comportamento, morfologia e vocalização (Narvaes & Rodrigues, 2009; Valdujo

et al., 2009; Morais et al., 2012; Pina et al., 2015; Benício et al., 2015; Schulze et al., 2015; Vaz-Silva et al., 2020). Embora existam estudos que envolvam dados moleculares, estes têm se dedicado principalmente a entender as relações de parentesco entre o grupo *R. granulosa* (Pereyra et al., 2016; Pereyra et al., 2021; Rivera et al., 2021), sem focar na história evolutiva da espécie em si. Para compreender a diversificação das espécies do Cerrado, é fundamental investigar suas razões, especialmente em espécies de ampla distribuição no bioma. Neste contexto, *Rhinella mirandaribeiroi* se destaca como uma excelente espécie modelo para estudos filogeográficos no Cerrado.

1.2 O Cerrado e a herpetofauna

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, superado em área apenas pela Amazônia (Ab'Saber, 2005). Abrange áreas contínuas nos estados de Goiás e Distrito Federal, Tocantins e parcialmente os estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Manchas disjuntas ainda são encontradas nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas "ilhas" no Paraná (Ribeiro & Walter, 2008). Em geral, apresenta solo Latossolo, pobre e bem drenado, intemperizado ao longo dos tempos geológicos (Solbrig et al.,1996). O Cerrado é caracterizado (Ab'Saber, 2005), como chapadões centrais com formas irregulares poligonais,e por maciços planaltos de estrutura complexa com superfícies de cimeira aplainadas, além de planaltos sedimentares compartimentados com altitude variável entre 300 e 1700 metros. Este bioma desempenha um papel hidrológico crucial por abrigar numerosas nascentes de rios, especialmente devido à sua topografia de planalto. Ele contribui significativamente para algumas das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, como a Tocantins-Araguaia, São Francisco e Paraná (Aubertin, 2013).

A vegetação do bioma Cerrado está relacionada com as modificações geomorfológicas do início do quaternário. A vegetação de formação savânica está relacionada com os planaltos antigos, enquanto as formações florestais são encontradas nas depressões (Da Silva & Bates, 2002; Werneck, 2011). A estrutura de vegetação também está ligada ao gradiente de fertilidade do solo (Solbrig et., 1996; Ab'Sáber, 2017) e frequência de ocorrência de fogo sendo presente naturalmente no Cerrado há milhares de anos, moldando o ambiente e as espécies espécies adaptadas (Bond & Keeley, 2005 Durigan & Ratter, 2016). O Cerrado possui a flora mais rica dentre as savanas do mundo (Klink & Machado, 2005). Essa riqueza é ainda mais destacada pelos índices de endemismo tanto na flora quanto na fauna (Myers, 2000). Essas características consolidam o Cerrado como a savana tropical mais diversificada e

também a mais ameaçada, sendo reconhecida como um hotspot fundamental para a conservação da biodiversidade global (Myers, 2000).

No Cerrado, há registro de 209 espécies de anuros, das quais 150 são fortemente associadas ao bioma, e 59 transitam no bioma (Valdujo et al., 2012). As espécies de anuros do Cerrado representam 18,26 % da anurofauna brasileira (Segalla et al., 2021). Destas, 108 espécies são endêmicas do bioma (Valdujo et al., 2012). As altas taxas de endemismo estão associadas a grade heterogeneidade ambiental formada durante às mudanças geológicas do Neógeno, incluindo o surgimento da cordilheira dos Andes, a transgressão marinha do Mioceno e a elevação do Planalto Central Brasileiro. (Santos et al., 2009; Maciel et al., 2010).

Dois grandes eventos impactaram a herpetofauna do Cerrado, os eventos geológicos no Neógeno (23~2,6 milhões de anos atrás) foram marcados pela formação da cordilheira dos Andes, com impactos significativos na divergência de espécies (Vallinoto et al., 2010; Maciel et al., 2010). No Cerrado, estudos indicam que eventos geomorfológicos, como a elevação do Planalto Central Brasileiro e a transgressão marinha do Mioceno, foram cruciais para a diversificação da herpetofauna, promovendo o isolamento das espécies, interrompendo o fluxo gênico e criando rotas de dispersão (Oliveira et al., 2018; Santos et al., 2009). Durante o Quaternário (2,6 m.a.), mudanças climáticas, intercaladas por períodos glaciais e intervalos mais quentes, alteraram significativamente a paisagem do Cerrado. Em fases mais úmidas, houve o desenvolvimento de um mosaico de savanas arbóreas densas e florestas esparsas; já em períodos mais secos, predominavam savanas abertas e campos (Meyer et al., 2014; Salgado-Labouriau, 1997).

No Último Interglacial, há cerca de 130 mil anos, o clima mais quente e seco favoreceu a expansão da flora arbórea do Cerrado em direção à bacia amazônica e à costa atlântica (Bueno et al., 2017). Já no Último Máximo Glacial, 21 mil anos atrás, houve retração significativa das espécies, concentrando-se no centro do Brasil e leste da Bolívia, com as depressões e encostas do Brasil Central servindo como refúgios climáticos (Ab'Saber, 2005; Werneck et al., 2012). Essas flutuações climáticas do Pleistoceno impulsionaram a diversidade genética, permitindo que populações isoladas acumulassem diferenças genéticas suficientes para se diferenciar, o que contribuiu para a formação de vicariantes ecológicos completos (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1981; Collevatti et al., 2012).

1.3 Filogeografia

A filogeografia é um campo interdisciplinar que investiga os processos evolutivos responsáveis pela distribuição geográfica das linhagens genéticas, conectando padrões

espaciais e temporais à história evolutiva das espécies (Avise, 1987; 2000; Turchetto-Zolet et al., 2013). Com o uso de marcadores moleculares e ferramentas de filogeografia estatística, tornou-se possível formular e testar hipóteses biogeográficas, revelando como eventos geológicos, variações climáticas e barreiras ambientais moldaram a diversidade genética e a estrutura das populações ao longo do tempo (Hickerson et al., 2010; Martins & Domingues, 2011). Esses estudos fornecem informações valiosas sobre dispersão, tempos de diversificação, refúgios climáticos e processos de especiação, contribuindo para a compreensão dos padrões de biodiversidade atuais (Turchetto-Zolet et al., 2012; Cox & Moore, 2011).

Os principais aspectos biogeográficos do Cerrado estão intimamente relacionados à influência dos eventos geológicos do neogeno e às flutuações climáticas do Quaternário (Colli, 2005; Werneck et al., 2012; Turchetto-Zollet et al., 2013). Nesse contexto, os principais eventos de diversificação da herpetofauna do Cerrado ocorreram predominantemente durante o Neogeno (Giugliano et al., 2007; Maciel et al., 2010; Werneck et al., 2012), enquanto as variações intraespecíficas observadas em plantas (Ramos et al., 2007; Bueno et al.,2017) e invertebrados (Moraes et al., 2009) parecem ter sido influenciadas, sobretudo, pelas mudanças climáticas do Quaternário.

Pesquisas filogeográficas com anuros do Cerrado têm revelado como a história geológica e climática da região deixou marcas na diversidade genética dessas espécies. Eventos geomorfológicos, como o soerguimento de planaltos e a formação de redes hidrográficas, combinados com as variações climáticas do período Quaternário, atuaram como motores de isolamento e reconexão entre populações ao longo do tempo (Santos et al., 2009; Vallinoto et al., 2010; Maciel et al., 2010; Oliveira et al., 2018; Vasconcellos et al., 2019; Arantes et al., 2023). Essas dinâmicas resultaram em padrões variados de divergência genética, muitas vezes associados a refúgios ecológicos e à heterogeneidade ambiental do bioma. Com isso, o Cerrado se destaca não apenas por sua biodiversidade atual, mas também por sua história evolutiva complexa, que ajudou a moldar a organização genética das espécies que o habitam hoje.

Com o objetivo de preencher lacunas prestonianas (abundância e dinâmica populacional) e darwinianas (evolução e diversificação) sobre *Rhinella mirandaribeiroi*, adotamos uma abordagem filogeográfica. Investigamos eventos demográficos pretéritos ao longo do Cerrado e os processos históricos que moldaram sua evolução. Para isso, realizamos ampla amostragem geográfica e utilizamos marcadores moleculares mitocondriais (cytb, 16S) e nucleares (POMC) nas análises genéticas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AB'SABER, A. Os **domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2005.

AB'SABER, A. O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento. **Revista do Serviço Público**, v. 40, n. 4, p. 41–56, 2017.

ARANTES, I. C. VASCONCELLOS, M. M.; SMITH, M. L.; GARRICK, R. C.; COLLI, G. R.; NOONAN, B. P. Species limits and diversification of the *Dendropsophus rubicundulus* subgroup (Anura, Hylidae) in Neotropical savannas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 186, 2023.

AUBERTIN, C. O surgimento do bioma Cerrado. **Ateliê Geográfico**, v. 7, n. 1, p. 5–24, 2013.

AVISE, J. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489–522, 1987.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard: Harvard University Press, 2000.

BENÍCIO, R. A.; SILVA, G. R ; FONSECA, M. G. Anurans from Caatinga area in state of Piauí, northeastern Brazil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 37, n. 2, p. 207–217, 2015.

BOND, William J.; KEELEY, Jon E. Fire as a global 'herbivore': the ecology and evolution of flammable ecosystems. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 7, p. 387-394, 2005.

BUENO, M. L. et al. Effects of Quaternary climatic fluctuations on the distribution of Neotropical savanna tree species. **Ecography**, v. 40, n. 3, p. 403–414, 2017.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008.

DURIGAN, G.; RATTER, J. A. The need for a consistent fire policy for Cerrado conservation. **Journal of Applied Ecology**, v. 53, p. 11–15, 2016.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World**: An Online Reference. Version 6.2. American Museum of Natural History, New York, USA, 2024.

GIUGLIANO, L. G.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 168–179, 2007.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131–138, 1969.

LEVER, C. The Cane Toad: The History and Ecology of a Successful Colonist. Otley: **Westbury Academic**, 2001.

MACIEL, N. M.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R.; SCHWARTZ, E. F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 2, p. 787–797, 2010.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. D. C. Biologia molecular e evolução. In: **Biologia molecular e evolução**, 2012.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 2000.

MEYER, K. E. B.; CASSINO, R. F.; LORENTE, F. L.; RACZKA, M.; PARIZZI, M. G. Paleoclima e Paleoambiente do Cerrado durante o Quaternário com base em análises palinológicas. In: Paleontologia: Cenários Da Vida - **Paleoclimas**, p. 403–420, 2014.

MORAIS, A. R. et al. Description of the advertisement call of *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)(Anura: Bufonidae). **Zootaxa**, v. 3265, n. 1, p. 66-68, 2012.

MORAES, E. M.; YOTOKO, K. S. C.; MANFRIN, M. H.; SOLFERINI, V. N.; SENE, F. M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 2136–2147, 2009.

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, n. 1, p. 1–73, 2009.

OLIVEIRA, E. F. et al. Phylogeography of Muller's termite frog suggests the vicariant role of the Central Brazilian Plateau. **Journal of Biogeography**, v. 45, n. 11, p. 2508–2519, 2018.

PEREYRA, M. O. et al. Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): A molecular perspective with comments on hybridization and introgression. **Cladistics**, v. 32, n. 1, p. 36–53, 2016.

PEREYRA, M. O. et al. Evolution in the Genus *Rhinella*: A Total Evidence Phylogenetic Analysis Neotropical True Toads (Anura: Bufonidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 447, n. 1, p. 1-156, 2021.

PINA, L. F.; MORAIS, A. R. PRADO, C. P. A. *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Amphibia: Anura: Bufonidae): Distribution extension and new state record. **Check List**, v. 11, n. 3, 2015.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, p. 345–379, 2006.

PRAMUK, J. B.; ROBERTSON, T.; SITES, J. W.; NOONAN, B. P. Around the world in 10 million years: Biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, v. 17, n. 1, p. 72–83, 2008.

RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1219–1228, 2007.

RIBEIRO, J. F. WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Brasília: Embrapa Cerrados, 1998.

RIVERA, D. et al. Testing assertions of widespread introgressive hybridization in a clade of neotropical toads with low mate selectivity (*Rhinella granulosa* species group). **Heredity**, v. 130, n. 1, p. 14–21, 2022.

RIVERA, D. et al. Phylogenomics, introgression, and demographic history of South American true toads (*Rhinella*). **Molecular Ecology**, v. 31, n. 3, p. 978–992, 2021.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. Late quaternary palaeoclimate in the savannas of South America. **Journal of Quaternary Science**, v. 12, n. 5, p. 371–379, 1997.

SANTOS, J. C. et al. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. **PLoS Biology**, v. 7, n. 3, 2009.

SCHULZE, A.; JANSEN, M.; KÖHLER, G. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment. **Zootaxa**, v. 4016, n. 1, 2015.

SIMON, M. N.; MACHADO, F. A.; MARROIG, G. High evolutionary constraints limited adaptive responses to past climate changes in toad skulls. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 283, n. 1841, 2016.

SOLBRIG, O. T. The diversity of the savanna ecosystem. In: SOLBRIG, O. T.; MEDINA, E.; SILVA, J. F. (Eds.). Biodiversity and Savanna Ecosystem Processes. Ecological Studies, v. 121. **Berlin: Springer**, 1996.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193–1213, 2012.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Guia Prático para estudos Filogeográficos**. Ribeirão Preto: SBG,. p. 10-15. 2013.

VALDUJO, P. H.; SILVANO, D. L.; COLLI, G.; MARTINS, M. Anuran Species Composition and Distribution Patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical Hotspot. American **Journal of Herpetology**, v. 7, n. 2, p. 63–78, 2012.

VASCONCELLOS, M. M. et al. Isolation by instability: Historical climate change shapes population structure and genomic divergence of tree frogs in the Neotropical Cerrado savanna. **Molecular Ecology**, 2019.

VAZ-SILVA, W. et al. **Guia de identificação das espécies de anfíbios** (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil. 2020.

WERNECK, F. P.; NOGUEIRA, C.; COLLI, G. R. SITES, J. W.; COSTA, G. C. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 9, p. 1695–1706, 2012.

1. Introdução

No estudo das espécies neotropicais, a filogeografia tem se destacado como um dos principais pilares para revelar o papel dos eventos histórico-geográficos nos limites de distribuição das espécies e na diversificação genética das linhagens (Martins & Domingues, 2011; Turchetto-Zolet et al., 2012; Gehara et al., 2017; Rull, 2018). A integração de dados moleculares com informações biogeográficas da região Neotropical permite elucidar aspectos importantes sobre os processos de diversificação da biota (Avise et al., 1987; Hickerson et al., 2010; Turchetto-Zolet et al., 2013). Diversas hipóteses biogeográficas têm sido propostas para explicar os padrões de diversificação na região, incluindo aquelas baseadas nas mudanças geomorfológicas do Neógeno, nas flutuações climáticas do Pleistoceno (Haffer, 1969), na atuação dos rios como barreiras naturais (Wallace, 1854), e na hipótese dos refúgios, segundo a qual as espécies teriam permanecido isoladas em áreas estáveis durante períodos de instabilidade climática, reencontrando-se geneticamente diferenciadas com o retorno à estabilidade no Holoceno (Vanzolini & Williams, 1970). Também se destaca a hipótese da instabilidade histórica dos habitats, que propõe que a fragmentação induzida por mudanças climáticas promoveu eventos de vicariância (Hewitt, 2001).

No Cerrado, duas grandes hipóteses explicam a diversificação das espécies (Colli, 2005). A primeira envolve as mudanças do Neógeno, como a separação entre florestas úmidas e áreas abertas na América do Sul, o soerguimento andino, além de eventos de vicariância associados a transgressões marinhas e ao soerguimento do Planalto Central brasileiro, os quais têm sido apontados como os principais motores geológicos da divergência de linhagens (Santos et al., 2009; Vallinoto et al., 2010; Maciel et al., 2010; Oliveira et al., 2018). A segunda hipótese atribui às flutuações climáticas um papel crucial na estruturação da diversidade genética de diversos táxons (Collevatti et al., 2015; Werneck et al., 2012; Turchetto-Zolet et al., 2013; Ledo & Colli, 2017; Pereyra et al., 2021).

De modo geral, espera-se que os anfíbios apresentem distribuição geográfica limitada, em processo de sua alta filopatria ao ambiente aquático, essencial ao seu ciclo de vida (Becker et al., 2010). Além disso, muitas espécies possuem pequeno porte corporal, o que restringe sua capacidade de dispersão (Wells, 2007). Prates et al. (2013) demonstraram que a dispersão por longas distâncias pode causar fadiga nos anfíbios. Ademais, fatores como disponibilidade de recursos, interações ecológicas, mecanismos

adaptativos, características da paisagem e eventos climáticos também influenciam sua dispersão (Brown et al., 1996; Avise, 2000). Por apresentarem forte estrutura genética, os anfíbios constituem um modelo ideal para a investigação de processos de diversificação (Johns & Avise, 1998).

O gênero *Rhinella,* conhecido como os verdadeiros sapos com elevada diversificação em tamanho e morfologia (Pramuk, 2006), são frequentemente usados para tentar explicar processos históricos que levaram a alta diversificação do grupo (Maciel et al., 2010). O grupo *R. marina* reforça a importância dos eventos neogeno na diversificação da fauna neotropical. Sua diversificação ocorreu há aproximadamente 8,08 milhões de anos, esse processo aconteceu mais tardiamente no Mioceno, em direção ao norte, influenciado pelas rotas e barreiras de dispersão criadas pela elevação do Escudo Central Brasileiro. Essa elevação alterou drasticamente a paisagem, e a hipótese principal sugere que esse evento foi o gatilho inicial para a diversificação do grupo *R. marina* (Maciel et al., 2010). No caso do grupo *R. crucifer*, a diversificação ocorreu no Pleistoceno, possivelmente impulsionada pela fragmentação causada por mudanças climáticas (Thomé et al., 2010). Algumas espécies sugerem diferenciação ao longo de gradientes ecológicos, e há evidência de duas zonas híbridas, possivelmente oriundas de fluxo gênico contínuo ou contato secundário (Thomé et al., 2012).

O grupo *Rhinella granulosa* tem sido historicamente de difícil delimitação taxonômica devido à alta similaridade morfológica entre suas espécies. Atualmente, esse grupo inclui *Rhinella mirandaribeiroi* e outras 12 espécies, formando um grupo monofilético (Pereyra et al., 2021). A primeira revisão do grupo *R. granulosa* identificou 13 espécies com base na morfologia, relacionando sua diversificação às bacias hidrográficas da América do Sul (Gallardo 1965). Narvaes & Rodrigues (2009), usando morfometria e morfologia, confirmaram as 13 espécies, mas rejeitaram a ligação com as bacias, sugerindo que o ancestral do grupo ocupava amplas áreas abertas. Pramuk (2006) corroborou a monofilia do grupo com análises moleculares e morfológicas. Pereyra et al. (2016) destacaram hibridização e introgressão mitocondrial.

O grupo *R. granulosa* remonta a aproximadamente 5 milhões de anos. As divergências entre espécies irmãs dentro desse grupo ocorreram principalmente durante o Pleistoceno médio (Rivera et al., 2022), sob a hipótese de diferenciação associada a eventos geomorfológicos do Neógeno e às flutuações climáticas do Quaternário (Narvaes & Rodrigues, 2009). Posteriormente, cada espécie se adaptou ao clima local

(Simon et al., 2016). Dentro desse grupo, as espécies *R. beebei, R. merianae, R. humboldti* e *R. centralis* foram separadas pela elevação dos Andes no final do Mioceno (Murphy et al., 2017). No caso de *Rhinella granulosa*, sua estrutura genética reflete diferenças regionais no clima, conforme previsto pela hipótese da assincronia das estações, com a distância geográfica também desempenhando um papel na diferenciação (Thomé et al., 2021). Ainda são escassos os estudos filogeográficos envolvendo as espécies do grupo *Rhinella granulosa*. No entanto, as evidências disponíveis indicam que diferentes processos históricos moldaram a trajetória evolutiva dessas espécies, sugerindo que elas podem desempenhar um papel-chave na reconstrução de padrões evolutivos e biogeográficos na América do Sul.

Rhinella mirandaribeiroi possui ampla distribuição no bioma Cerrado e, por isso, constitui um modelo adequado para testar hipóteses biogeográficas relacionadas aos padrões e processos que moldaram a história evolutiva da espécie. Sua ocorrência abrange os estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará e Piauí, além de populações isoladas em enclaves de Cerrado nos estados do Amazonas, Roraima e São Paulo, bem como em áreas ecotonais e na Caatinga sensu stricto (Narvaes & Rodrigues, 2009; Pina et al., 2015; Benício et al., 2015). Apesar de sua ampla distribuição, a espécie apresenta uma ocorrência mais contínua na região central do Brasil, tornando-se mais esparsa e fragmentada em áreas periféricas, especialmente a oeste do bioma.

Rhinella mirandaribeiroi teria se originado entre o Plioceno e o Pleistoceno médio, períodos caracterizados por intensas flutuações climáticas que influenciaram a divergência de diversos grupos de organismos (Rivera et al., 2022). Durante essas flutuações, a biota típica de ambientes abertos teria se dispersado com a expansão desses habitats e, com a retração da vegetação, sofreram isolamento (Turchetto-Zolet et al., 2013). Quando as populações ficaram confinadas a refúgios, puderam se adaptar às condições dos ambientes abertos, constituindo vicariantes ecológicos completos (Vanzolini & Williams, 1981). Arantes et al. (2023) e Vasconcellos et al. (2019) relatam que, para espécies endêmicas do Cerrado, as oscilações climáticas provavelmente resultaram em isolamento impulsionado pela vicariância, seguido de contato secundário após o restabelecimento das condições climáticas.

Com base na ampla distribuição geográfica *de Rhinella mirandaribeiroi* ao longo de todo o bioma Cerrado, incluindo enclaves de Cerrado inseridos na Amazônia,

levantamos a hipótese de que a espécie apresenta estruturação populacional em duas ou mais populações geneticamente distintas. Essa estruturação pode refletir a exposição de diferentes condições ambientais e climáticas ao longo de sua distribuição, ainda que todos habitem predominantemente ambientes abertos característicos do Cerrado. Considerando a origem da espécie durante o Plioceno-Pleistoceno (Rivera et al., 2022), testamos se os eventos paleoclimáticos tenham desempenhado um papel mais significativo na diversificação populacional do que barreiras físicas como grandes rios ou elevações. Seguindo essa lógica, propomos que as regiões centrais do Cerrado atuaram como refúgios climáticos e, portanto, permaneceram mais estáveis ao longo do tempo em comparação com áreas periféricas do bioma, que podem ter passado por maior instabilidade climática e, consequentemente, maior dinâmica populacional.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta de dados

Visamos cobrir o máximo da distribuição geográfica de *Rhinella mirandaribeiroi* através de solicitações de amostras de tecido de diferentes coleções zoológicas (UNESP, UFMG, UFMS, UFRN e INPA; Tabela S1) e idas a campo sob autorização de coleta SISBIO 82985. Os espécimes capturados foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do campus da UNEMAT, município de Nova Xavantina, aonde foram eutanasiados com lidocaína 5% (Leary et al., 2020), retiramos tecido do fígado e os espécimes foram fixados em formol 10%, posteriormente armazenados em álcool 70% na coleção do laboratório, enquanto os tecidos estão armazenados em álcool absoluto 98,9%. Complementamos nosso conjunto de dados com sequências disponíveis para nossos marcadores moleculares de interesse disponíveis no Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Totalizamos 97 indivíduos provenientes de 49 localidades (**Figura 1**).

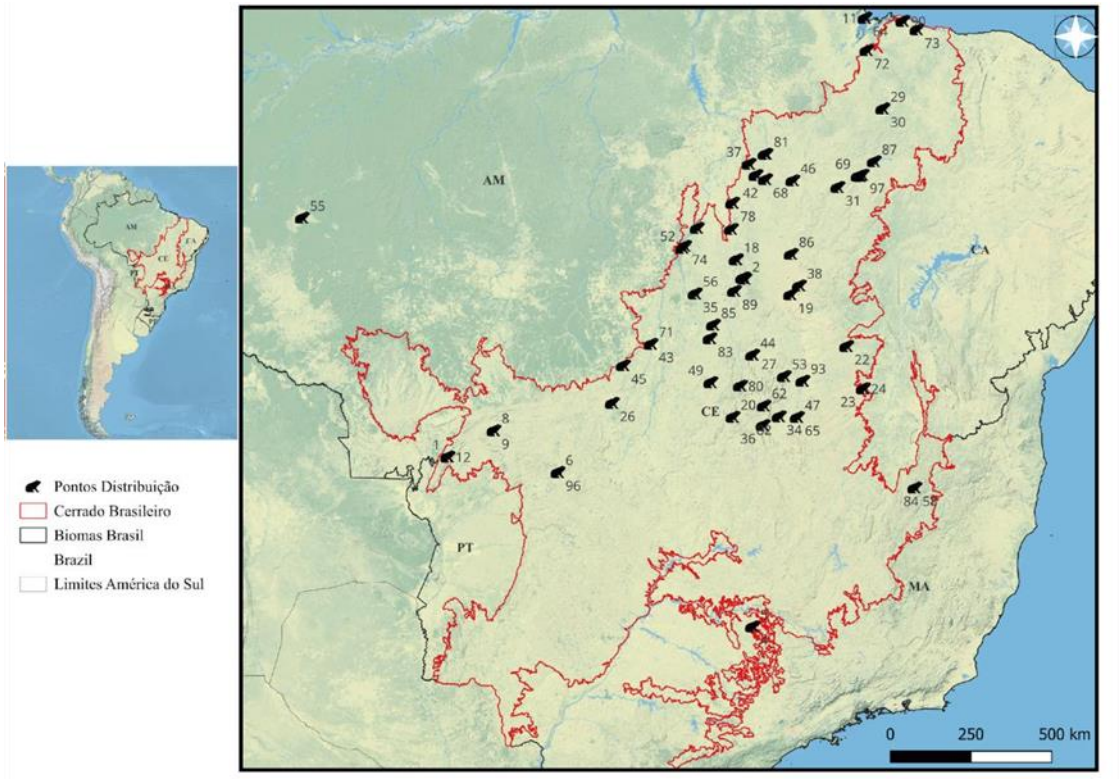


Figura 1. Mapa de distribuição das amostras de tecidos de *Rhinella mirandaribeiroi*. Os pontos pretos representam os pontos de tecidos da espécie. **Datum**: SIRGAS 2000. Base de dados IBGE. Mapa ESRI Physical.

2.2 Protocolos laboratoriais Extração de DNA

Extraímos o DNA das amostras seguindo o protocolo salino adaptado de Bruford et al. (1992). Utilizamos três marcadores moleculares: o mitochondrial RNA ribossômico 16S

(16S), o citocromo b (Cytb) e o marcador nuclear pró-opiomelanocortina (POMC), para amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR). Os ciclos de PCR estão especificados na Tabela S2. A purificação realizada em laboratório segiu o seguinte protocolo: um mix contendo 2,45 µL de água miliq, 0,5 µL de Fast AP e 0,05 µL de Exonuclease (Thermo Fisher), preparado para 10 amostras. Foram utilizados 3 µL desse mix em 15-20 µL de PCR. A reação foi realizada no termociclador com as seguintes condições: 30 minutos a 37ºC e 5 minutos a 95ºC. Após a quantificação das amostras, foi realizado o gel do material purificado e enviado para sequenciamento.

2.3 Edição das sequências

Para a edição manual das sequências, utilizamos o software *Geneious Prime* (versão 2023.2.1). As sequências foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE no MEGA v.11 (Tamura et al., 2021). Para o marcador nucleares, tratamos as ambiguidades com o algoritmo PHASE do software DnaSP (Librado & Rozas, 2009), utilizando sequências acima de 0.7 de confiança.

2.4 Estatísticas sumárias

Calculamos as estatísticas sumárias e testes de neutralidade para todos os marcadores no DnaSP (Librado & Rozas, 2009). Inferimos: sítios segregantes (S), número de haplótipos (h), diversidade de haplótipos (HD), desvio padrão da diversidade de haplótipos (SDHd) e diversidade de nucleotídeos (Pi). Também realizamos os testes de neutralidade de Tajima (D) (Tajima, 1989) e os testes F e D de Fu e Li (1993), que consideram a frequência de mutações nos sítios segregantes (Turchetto-Zolet et al., 2013). Calculamos a distância genética média entre populações recuperadas com método da estimativa de variância com *Bootstrap* (10.000 replicações) e método de Kimura 2 no MEGA v.11 (Tamura et al., 2021).

2.5 Assinalamento populacional

Geneland (mitocondrial e nuclear)

Para testar nossa primeira hipótese, inferimos o número de populações para verificar se há estruturação genética ao longo da distribuição de *Rhinella mirandaribeiroi*, utilizamos o Geneland 4.2.9 (referência) no R 4.1.2 (R Core Team, 2024), alimentado com os haplótipos definidos no DnaSP. Combinamos duas abordagens para comparar os resultados: utilizamos um conjunto de dados com os genes mitocondriais (16S e Cytb) e nuclear (POMC) com as respectivas coordenadas geográficas, enquanto que na segunda inferência, utilizamos somente

dados nucleares e suas coordenadas geográficas. Para ambas, realizamos 10 simulações variando de 1 a 6 populações (k) através do método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com $5x10^6$ gerações amostradas a cada $5x10^3$ gerações, considerando um burn-in de $2x10^2$.

FatsBAPS

Utilizamos uma segunda abordagem de assinalamento populacional com o Fast BAPS, foi utilizado para inferir populações genéticas com base no marcador nuclear. Na primeira etapa, foi calculada uma matriz de dissimilaridade genética para estimar o número máximo de agrupamentos genéticos, utilizando o método de *Ward*. Inferimos o K maximo se baseados nas distâncias genéticas Em seguida, aplicou-se o modelo de Agrupamento Hierárquico Bayesiano para encontrar uma solução que maximize a probabilidade posterior. Essas etapas foram repetidas com *bootstrap* para gerar uma matriz de confiabilidade para os clusters identificados (Tonkin-Hill et al., 2019; Werneck et al., 2024).

2.6 Reconstrução filogenética e rede de haplótipos

Reconstruímos as relações filogenéticas dos indivíduos com as sequências mitocondriais (16S e Cytb), concatenadas no MEGA v.11 (Tamura et al., 2021). Utilizamos *Rhinella crucifer* e *R. diptycha* como outgroups. O modelo evolutivo mais adequado (HKY+G) foi selecionado no jModelTest 2.1.7 (Posada, 2008) e aplicado no BEAST2 v.2.7.6 (Bouckaert et al., 2019). Configuramos o BEAST2 com relógio molecular strict clock, modelo Yule tree prior e 10^7 gerações amostradas a cada 10^3 gerações. Após verificar os valores ESS (>200) no Tracer 1.7 (Rambaut & Drummond, 2007), unimos as três corridas no LogCombiner 2.7.6 e geramos uma árvore consenso no TreeAnnotator v1.7.2, excluindo 20% de burn-in. A visualização foi feita no FigTree 1.4.2 (Suchard et al.,2018). Baseados nos resultados do assinalamento populacional, reconstruímos as redes de haplótipos com o algoritmo median-joining no PopArt v1.7 (Leigh & Bryant, 2015), destacando as populações recuperadas.

2.7 Estimativa de tempo de divergência e inferências demográficas

Para auxiliar a responder nossa segunda hipótese e testar os impactos de eventos históricos e climáticos na história evolutiva de *R. mirandaribeiroi*, estimamos o tempo de divergência entre as populações com dados multilocus com o starBeast no BEAST2 v.2.7.6 ((Drummond et al., 2005). Os melhores modelos de substituição, estimados no jModeltest2 (Posada, 2008) foram: TrN+I para o gene 16S, GTR+I+G para o CytB e GTR+I+G para o

gene POMC. No BEAST2, os conjuntos de taxa foram separados por populações, utilizando um relógio molecular "relaxed clock log normal", com a taxa do gene 16S fixada em $5{,}43x10^{-3}$ (Fouquet et al. 2012), e as taxas dos outros genes foram estimadas durante a análise. O prior da árvore foi o modelo Yule, e a execução foi realizada por 3×10^8 gerações, amostradas a cada 3×10^4 gerações. A soma de todas as três corridas foi verificada no Tracer 1.7, e a estacionariedade avaliada pelo tamanho efetivo da amostra (ESS) para cada parâmetro com valores>200 (Rambaut & Drummond, 2007). Unimos as três corridas no LogCombiner 2.7.6 e geramos uma árvore de consenso no TreeAnnotator v1.7.2, (Drummond et al., 2012) excluindo 20% de burn-in. A exibição foi feita no FigTree 1.4.2 (Suchard et al.,2018).

Para verificar se houve mudanças no tamanho efetivo da população ao longo do tempo, executamos o *Bayesian Skyline Plot* no BEAST2 (Drummond et al., 2005) para cada população com os dados mitocondriais. Os melhores modelos evolutivos foram inferidos no jModeltest2 (Posada, 2008) para o 16S (TrN+I+G pra população 1 e TrN+I+G pra população 2) e CytB (TrN+G pra pop 1 e TrN+G para a pop 2). Utilizamos o Strict Clock model com a taxa de mutação do 16S em 5.43x10-9 (Fouquet et al 2012) e a taxa do CytB (2.27x10-9) estimada pelo starBEAST. Utilizamos o coalescente *Bayesian Skyline tree* prior, executado a 2x107 gerações e amostrados a cada 2x103 gerações. Para verificar a convergência de execuções e valores de tamanho efetivo da amostra (>200), utilizamos o Tracer 1.67 (Rambaut & Drummond, 2007) para verificação e visualização no FigTree 1.4.2.(Suchard et al.,2018).

2.8 Modelagem de nicho ecológico

Realizamos um levantamento nos bancos de dados Gbif, SpecieLink, além de disso usamos as localizações levantadas por Narvaes & Rodrigues (2009) e Benício et al (2015). Juntando os levantamentos com as localidades de nossos tecidos tivemos 251 pontos de amostragem. No R Studio (R Core Team, 2024). Realizamos Spthin para remover pontos muito próximos. Com a remoção ultilizamos nossos 171 pontos para obter o modelo de distribuição de *R. mirandariberoi* com base em variáveis climáticas. Para isso, realizamos modelagem de nicho ecológico para o período atual e projetamos seus resultados para o Holoceno Médio (6.000 anos atrás), Último Máximo Glacial (LGM; 21.000 anos) e Último Interglacial (LIG; 130.000 anos). Foram baixadas 19 variáveis climáticas disponíveis no Worldclim version 1.4 (Hijmans et al., 2005, disponível em www.worldclim.org), em uma resolução de 2,5 minutos de arco (grades de 5 x 5 quilômetros) para todos os períodos, exceto para o LIG, com resolução de 30 segundos de arco (grades de 1 x 1 quilômetro), que foi

redimensionada para corresponder aos períodos anteriores. No software R, versão 4.4.2 (R Core Team, 2024), carregamos todas as 19 variáveis climáticas restritas à porção central do Brasil, juntamente com os registros de distribuição de *R. mirandariberoi*. Testamos a colinearidade das variáveis utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r = 0.75) e mantivemos apenas aqueles relevantes para a biologia da espécie. O conjunto final de variáveis climáticas consistiu em sete variáveis: BIO1: Temperatura Média Anual; BIO7: Amplitude anual de temperatura BIO12: Precipitação Anual; BIO15: Sazonalidade da Precipitação; BIO17: Precipitação do Trimestre Mais Seco; BIO18: Precipitação do Trimestre Mais Quente; BIO19: Precipitação do Trimestre Mais Frio.

Em seguida, realizamos 20 réplicas no software MaxEnt para cada modelo, utilizando 25% dos pontos como teste aleatório, com o método bootstrap. Os modelos finais foram selecionados com base em valores aceitáveis da área sob a curva (AUC > 0.9). Por fim, produzimos um mapa de sobreposição combinando rasters de todos os períodos, a fim de identificar possíveis áreas de estabilidade nos últimos 120 mil anos.

2.9 Isolamento por Distância

Realizamos a análise de isolamento por distância no R Studio com o pacote Vegan 2.6 (R Core Team, 2024). Com finalidade de identificar isolamento por distância genética. Para isso, construímos uma matriz de distâncias genéticas utilizando o método de Kimura 2 no MEGA v.11 (Tamura et al., 2021), com estimativa Bootstrap baseada em 10.000 replicações. No R Studio, também elaboramos a matriz de distâncias geográficas a partir das coordenadas das amostras e realizamos o teste de Mantel (Mantel, 1967) com o método de correlação de Pearson, utilizando 9.999 permutações.

3. Resultados

3.1 Estruturação Populacional

Nossas análises de estrutura populacional apresentaram resultados concordantes, ambas as inferências realizadas no Geneland identificaram duas populações distintas (k = 2), evidenciando que *Rhinella mirandaribeiroi* está geneticamente estruturada. A População 1 apresentou distribuição disjunta, abrangendo indivíduos do norte do Tocantins, Mato Grosso, Maranhão e Piauí, além de espécimes do estado de São Paulo e do sudoeste do Mato Grosso. Já a População 2 está restrita à região central do Brasil, incluindo amostras do Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Amazonas, Bahia e Minas Gerais (**Figuras 2–3**).

O fastBAPS identificou três populações (**Figura 4).** A primeira população foi atribuída à região de Lizarda, no Tocantins. A segunda população abrangeu áreas do Tocantins, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo e Piauí, enquanto a terceira população foi encontrada no Maranhão, Mato Grosso, São Paulo e Goiás. No Tocantins, foram sinalizadas duas populações. A primeira está localizada na região próxima à fronteira com o Maranhão, enquanto a segunda se distribui por grande parte do estado. O município de Lizarda, no Tocantins, encontra-se a cerca de 200 km de Mateiros. Além disso, a segunda população também foi identificada no Maranhão, circundando a área ocupada pela primeira população. A estruturação observada entre essas populações pode ser explicada pelo distanciamento genético entre os indivíduos, com valores de divergência par a par variando de 0,01 a 0,09.

Adicionalmente, nosso dendrograma revela que, ao longo das permutações do bootstrap, as populações tendem a permanecer agrupadas, indicando estabilidade na estrutura genética, com agrupamentos bem definidos aparecendo nas regiões de coloração amarela e branca, sugerindo uma forte coesão genética entre os indivíduos ali representados. Já as áreas em tons avermelhados indicam regiões com maior variabilidade, possivelmente refletindo processos como fluxo gênico. As populações no canto superior direito do heatmap apresentam maior certeza na classificação, com predominância de cores claras, enquanto no canto inferior esquerdo há maior variação, sugerindo possível fluxo gênico ou diferenciação incompleta entre algumas populações. O dendrograma e o heatmap fornecem insights valiosos sobre a estrutura genética das populações analisadas, e a presença de grupos bem definidos reforça a hipótese de estabilidade genética dentro dessas populações, embora as áreas com maior incerteza

possam indicar processos evolutivos em andamento (**Figura 4B**). Optamos por conduzir as demais análises com base no assinalamento do Geneland.

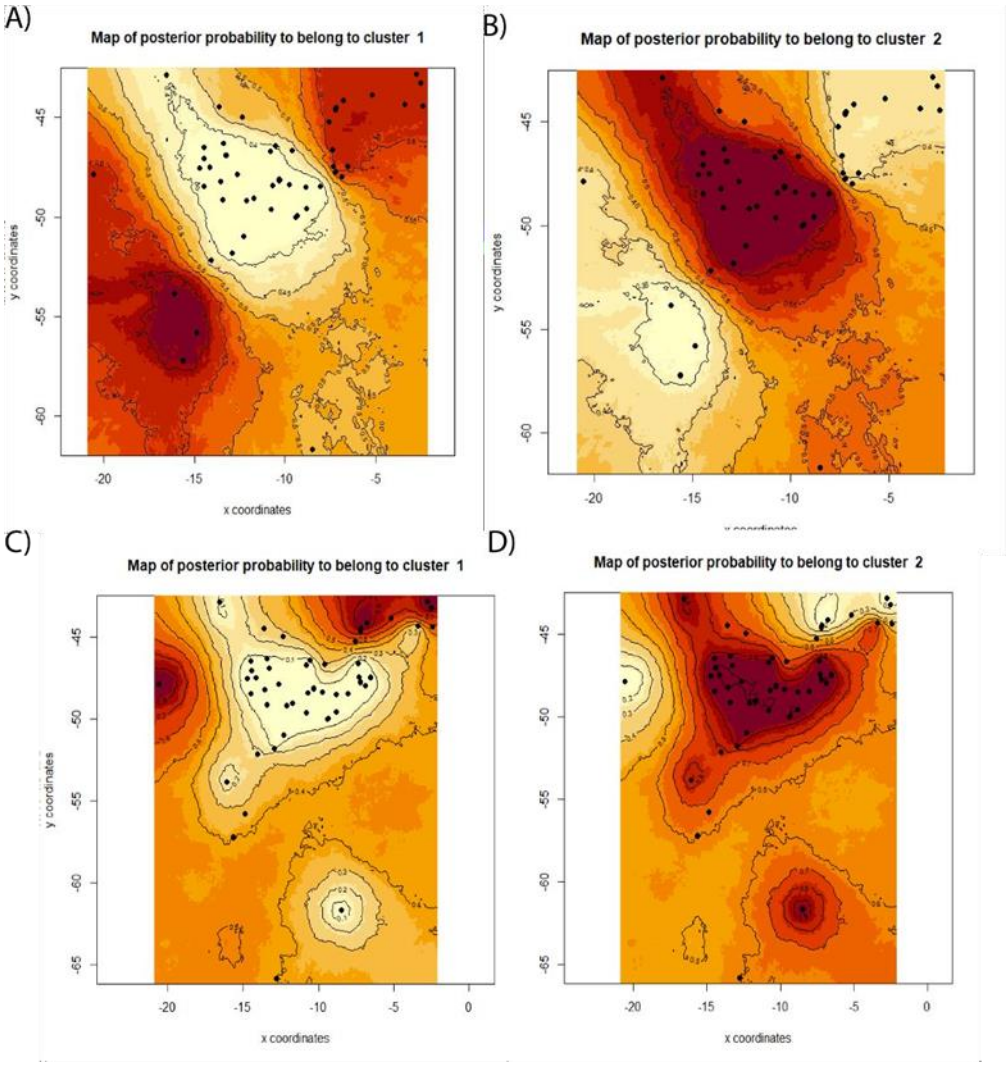


Figura 2. Assinalamento populacional de *Rhinella mirandaribeiroi* no Geneland com dados de mtDNA e nDNA. (A) e (B) mostram as populações 1 e 2, respectivamente, com base nos dados de mtDNA. (C) e (D) correspondem às populações 1 e 2, respectivamente, com base nos dados de nDNA

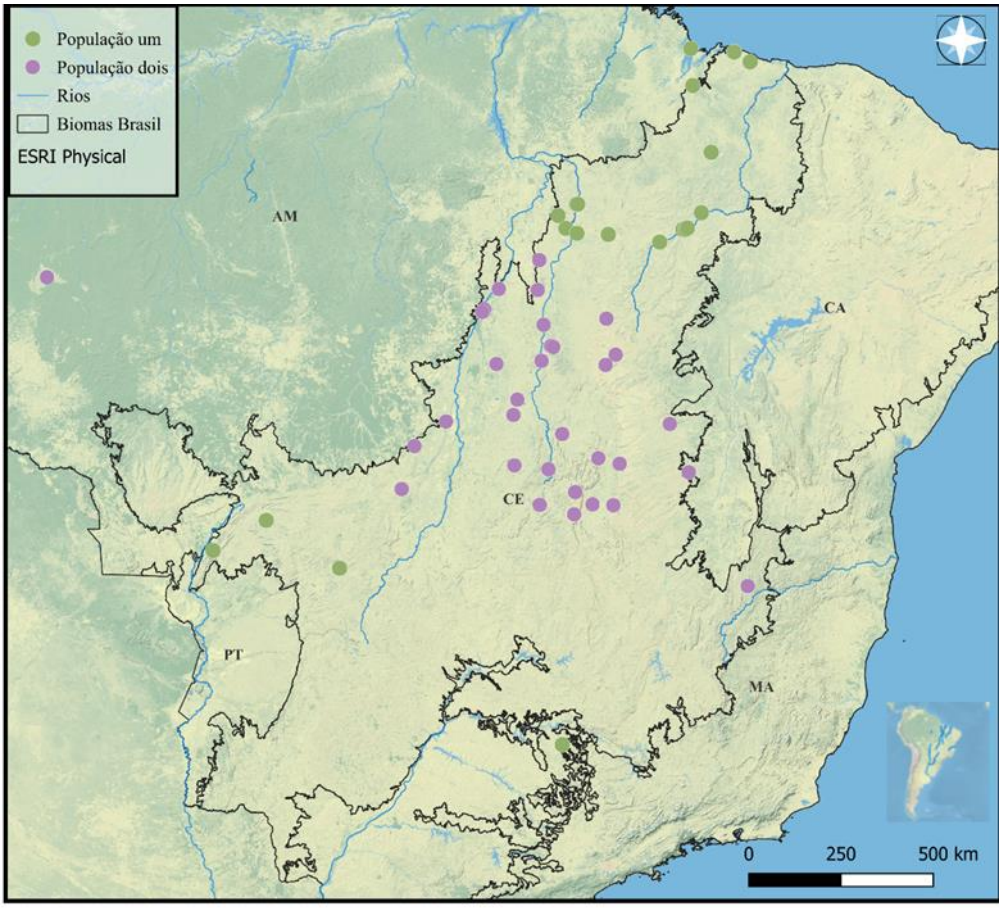
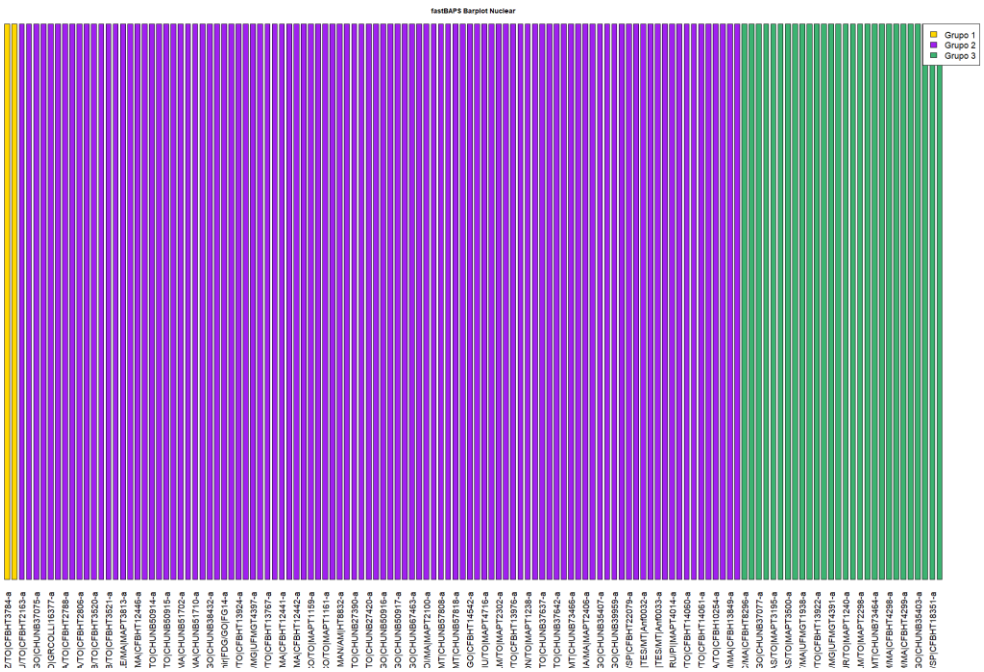


Figura 3. Mapa com as populações assinaladas no *Geneland* sendo em verde população 1 e roxo população 2. As linhas em azul representas as grandes bacias que cruzam o Cerrado, a linha vermelha delimitação do bioma no Brasil. Mapa Physical. Base de dados IBGE.

A)



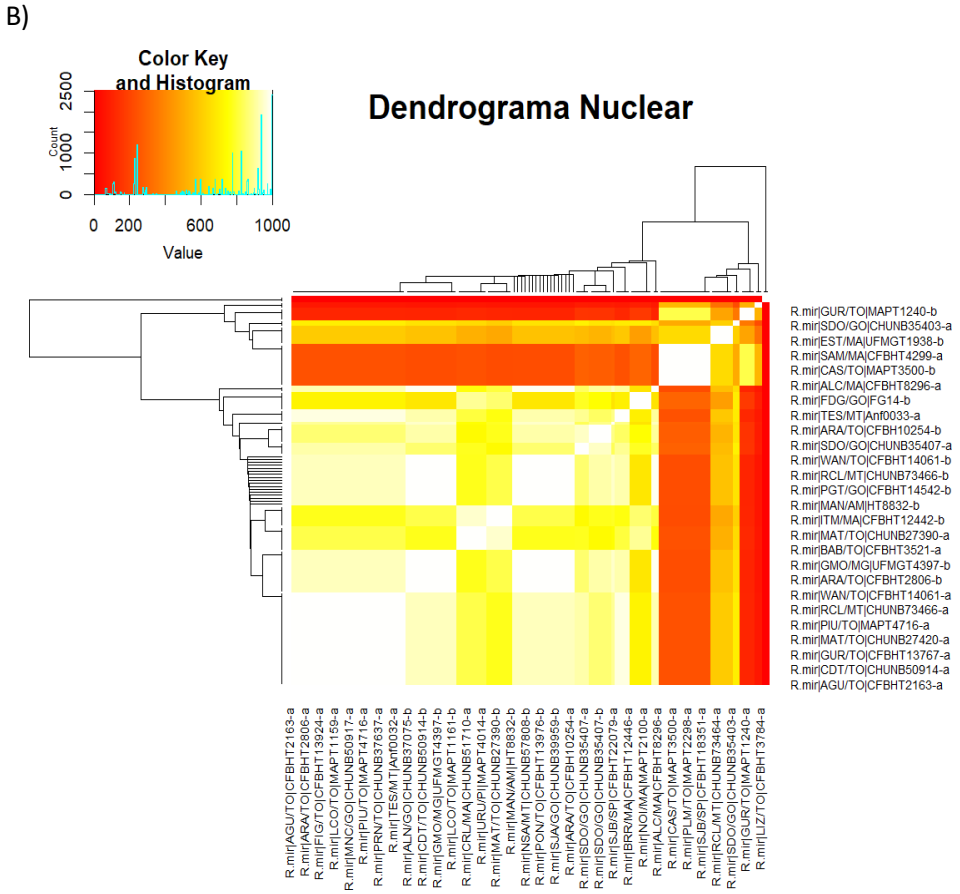


Figura 4. FastBaps com nDna: A) assinalamento populacional K=3. B) Heatmap: No agrupamento Hierárquico Bayesiano é possível observar a matriz gráfica de bootstrap, cores mais claras são atribuídas aos pares de amostras que se mantiveram assinaladas a uma mesma população ao longo das réplicas de bootstrap. Matriz gráfica com cores claras (Amarelo/Branco) representa pares de amostras que consistentemente pertencem à mesma população em diferentes réplicas de bootstrap. As Cores Escuras (Laranja/Vermelho): indicam que os pares de amostras foram menos consistentes nos agrupamentos ao longo das réplicas.

A análise dos dados genéticos demonstra uma elevada variabilidade genética nas populações de *Rhinella mirandaribeiroi*, com alta diversidade haplotípica (HD), que atingiu o valor máximo (1) em diversos loci. Além disso, os sítios de segregação (S) e o número de haplótipos (h) apontam maior variabilidade genética na população 2, especialmente no marcador POMC, que apresentou 72 sítios segregantes e 15 haplótipos (Tabela 1). Apesar da elevada diversidade haplotípica, a diversidade nucleotídica (Pi) foi relativamente baixa, variando entre 0,005 e 0,019, indicando diferenças nucleotídicas moderadas entre as sequências. Os testes de neutralidade, como Tajima's D e Fu, corroboram esses padrões, com valores predominantemente negativos que sugerem expansão populacional recente, especialmente na população 2, que também apresenta maior diversidade genética e sinais mais evidentes de eventos demográficos recentes. Por outro lado, a população 1 mostrou menor diversidade genética e evidências menos claras de expansão. Esses resultados refletem

processos históricos distintos, responsáveis por moldar a estruturação genética das populações ao longo do tempo.

Tabela 1. Estatística sumária dos marcadores locus mitocondrial 16s e nucleares POMC, RAG1 e População um e dois. Colunas indicando os locus (marcador usado), Pares de bases (pd), número de sequências (Seq), sítios de segregação(S), número de haplótipos(h), diversidade dos haplótipos (HD), desvio padrão da diversidade dos haplótipos (SDHd), diversidade dos nucleotídeos (Pi), Tajima's (D) e F de Fu (Fu). (*) indicam valores significativos.

Locus	Pb	Seq	S	h	HD	SDHd	Pi	D	Fu
16s	537	93	41	40	0,9	0.015	0.007	-1.7	-2.9*
16s Pop 1	537	40	21	18	0,9	0.019	0.008	0.3	-0.3
16s Pop 2	537	53	31	26	0,9	0.038	0.005	-1.9*	-2.9*
Cytb	342	60	56	34	1	0.015	0.010	-1.9*	-0.6
Cytb Pop 1	342	23	47	17	0,9	0.027	0.019	-1.9*	-3.2
Cytb B Pop 2	342	37	51	19	0,2	0.03	0.014	-2.3*	-4.2
Pomc	552	130	76	26	0,8	0.038	0.007	-2.2*	0.4*
Pomc Pop 1	552	46	13	15	0,9	0.035	0.005	-0.4	1.03
Pomc Pop 2	552	84	72	15	0,7	0.056	0.009	-2.1*	0.5

Verificamos a distância genética entre as populações para cada marcador (**Tabela 2)** e observamos baixos valores entre elas.

Tabela 2. Distância genética da população 1 e 2 inferidas com uso dos marcadores mitocondriais e o Nuclear.

População	Distância genética
16S	0,01
Cytb	0,02
POMC	0,01

Nossa reconstrução das relações filogenéticas com os marcadores mitocondriais concatenados recuperou a monofilia de *R. mirandaribeiroi* com alto suporte (probabilidade posterior=1). No entanto, não encontramos valores de suporte consistentes para evidenciar uma monofilia das populações 1 e 2, com indivíduos de ambas estando misturadas na árvore **(Figura 5**).

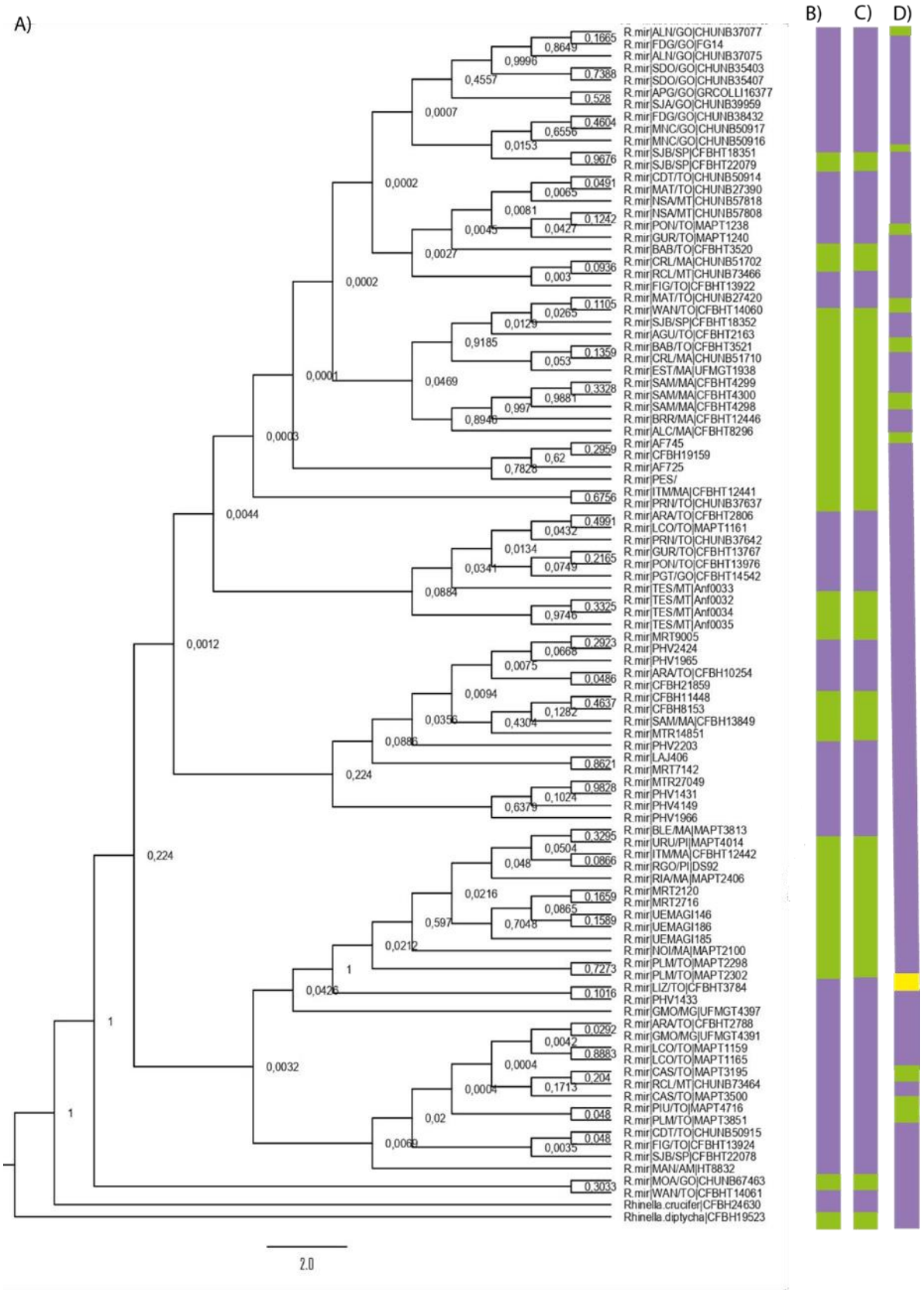


Figura 5. Reconstrução filogenética mitocondrial (16S+CytB) de *Rhinella mirandaribeiroi* (A). As barras representam os resultados dos assinalamentos do Geneland mtDNA+nuDNA (B), Geneland nuDNA (C) e do fastBAPS (D). A população 2 é representada em roxo, a população 1 em verde e em amarelo é a terceira população assinalada no fast BAPS**.**

A reconstrução haplotípica de todos os marcadores (Figura 6) não mostrou uma separação clara entre as populações. Para o marcador mitocondrial 16S, observamos um haplótipo central mais frequente com outros haplótipos derivando dele, o que sugere uma expansão populacional recente. O mesmo padrão pode ser observado no marcador Cytb. Para o marcador nuclear POMC, a rede mostrou alta conectividade no centro, mas com maior isolamento nos haplótipos periféricos. De forma geral, os resultados das redes haplotípicas indicam que os marcadores mitocondriais (16S e Cytb) refletem uma história evolutiva recente, caracterizada por alta conectividade genética. Por outro lado, o marcador nuclear POMC sugere maior estabilidade genética com eventos pontuais de divergência. Esses valores refletem os valores sinalizados nos testes de neutralidade.

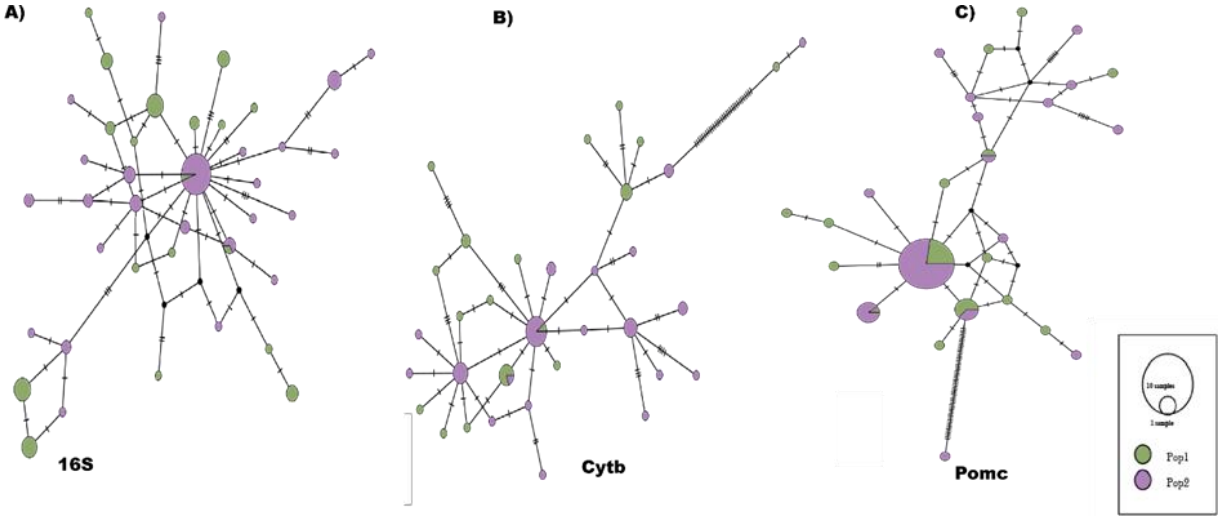
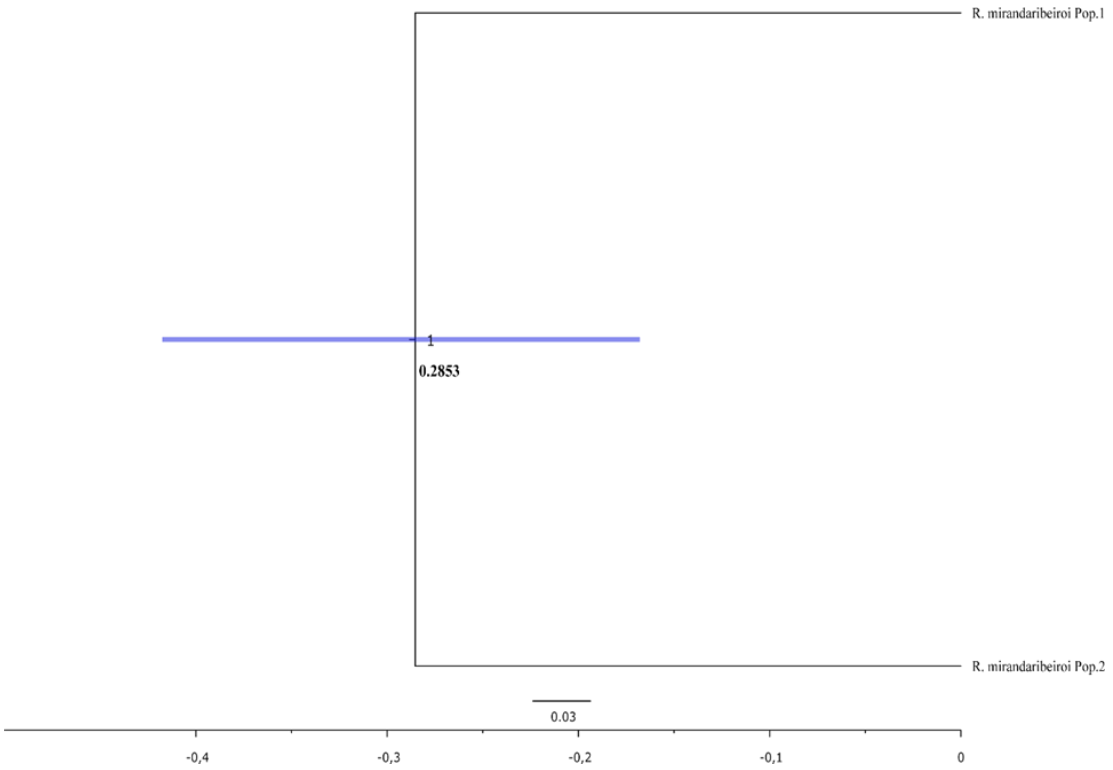


Figura 6.Rede de haplótipos das populações 1 e 2 a partir dos marcadores: População um em verde e a dois em Roxo A) Rede de haplótipo do gene 16S, B) Cytb e C) Pomc Os círculos representam os haplótipos, o tamanho dos círculos representa a frequência do haplótipo, as linhas a relação entre os haplótipos, os riscos e os passos mutacionais.

3.2 Estimativa de divergência e inferências demográficas

Estimamos a divergência entre as duas populações recuperadas em meados de 290 mil anos (170– 420 m.a.a. 95% HPD; **Figura 7**). Ao testar se houve mudança no tamanho efetivo da população, o Bayesian Skyline Plot de *R. mirandaribeiroi* mostrou diferentes padrões demográficos para cada população. A população 1 se manteve estável nos últimos um milhão de anos (**Figura 8 A**), enquanto a população 2 exibiu expansão populacional recente em cerca de 300 a 250 mil anos (**Figura 8 B**), corroborando o valor encontrado nos testes de neutralidade

A)



B)

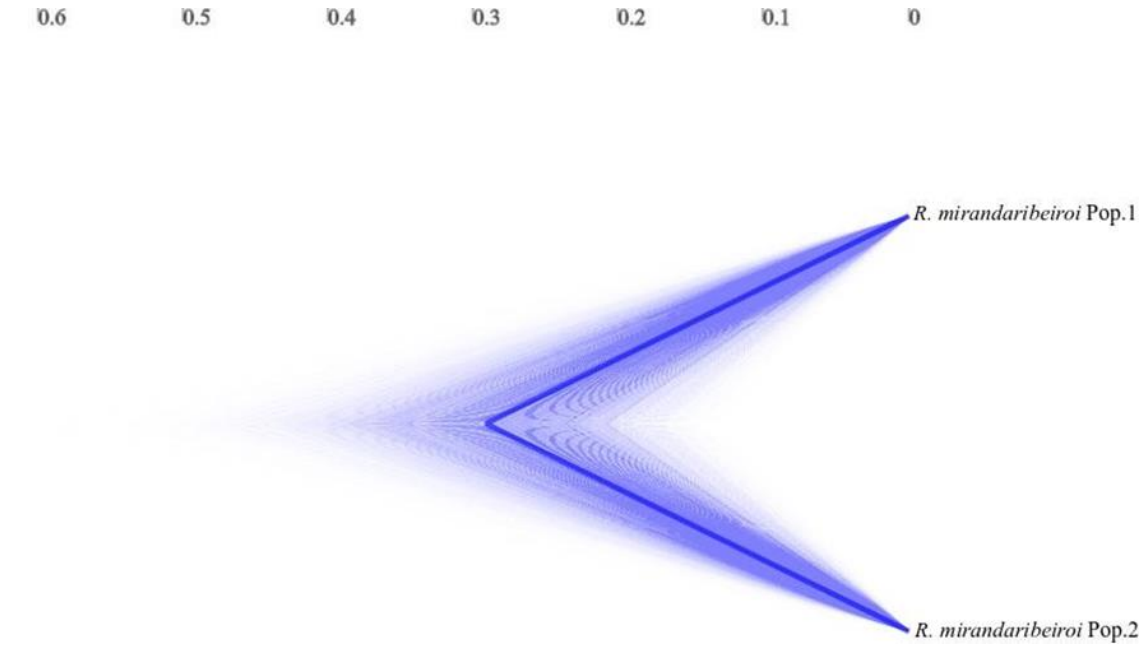


Figura 7. StarBeast das populações de *R. mirandaribeiroi* data em 290 m.a.a (95% HPD: 170-420 m.a.a). A) posterior e idade do nó B) A forma de "V" invertido representa o processo de divergência populacional, onde o ponto de encontro na base do "V" indica o momento mais recente de ancestralidade comum. O eixo horizontal reflete o tempo, desde o passado (à esquerda) até o presente (à direita), enquanto a largura do "V" revela mudanças no tamanho efetivo das populações ao longo do tempo, com áreas mais estreitas indicando gargalos populacionais e áreas mais largas sugerindo expansões. A coloração azulada reflete o suporte estatístico para o modelo, com tons mais escuros indicando maior confiança nos parâmetros inferidos.

A) B)

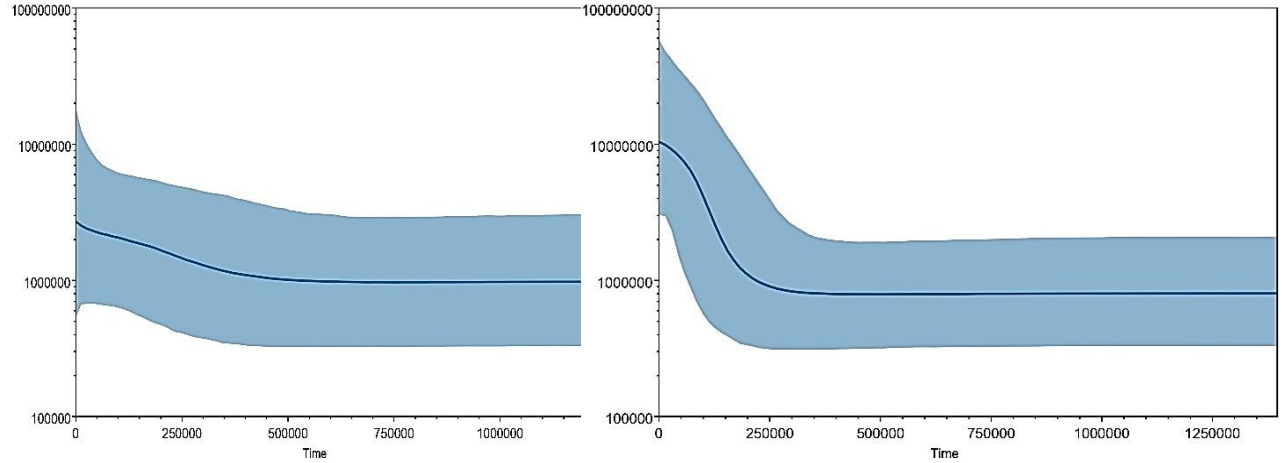


Figura 8. Starbest das populações 1 e 2 sendo A) população 1 e B) população 2. A linha azul mais grossa representa a mediana da estimativa, o polígono em azul claro representa o intervalo de confiança. (HPD de 95%). O eixo x é o tempo em anos e o eixo representa o tamanho efetivo populacional em escala logarítmica

3.3 Modelagem de Nicho

O Modelo de Nicho Ecológico para o presente indicou uma distribuição compatível com as áreas conhecidas da espécie no centro do Brasil, abrangendo amplamente o Cerrado e ocorrendo também em regiões como a Bolívia e Amazonas (**Figura 9A**). A projeção para o Holoceno Médio (6 mil anos atrás) indicou uma redução das áreas adequadas para a espécie, embora sua distribuição ainda permanecesse semelhante à atual, com ocorrência no centro do Brasil e em áreas costeiras (**Figura 9B**). No Último Máximo Glacial (21 mil anos atrás), observou-se uma contração dos habitats adequados para a espécie, com redução das áreas costeiras e concentração no centro do Brasil (**Figura 9C**). Já na projeção para o Último Interglacial (130 mil anos atrás), a distribuição da espécie apresentou maior concentração no centro do Brasil (**Figura 9D**). Ao integrar as projeções dos quatro períodos analisados, identificamos uma ampla área de estabilidade ambiental no centro do Brasil, sugerindo uma região climaticamente estável para *Rhinella mirandaribeiroi* ao longo do tempo (**Figura 9E**).

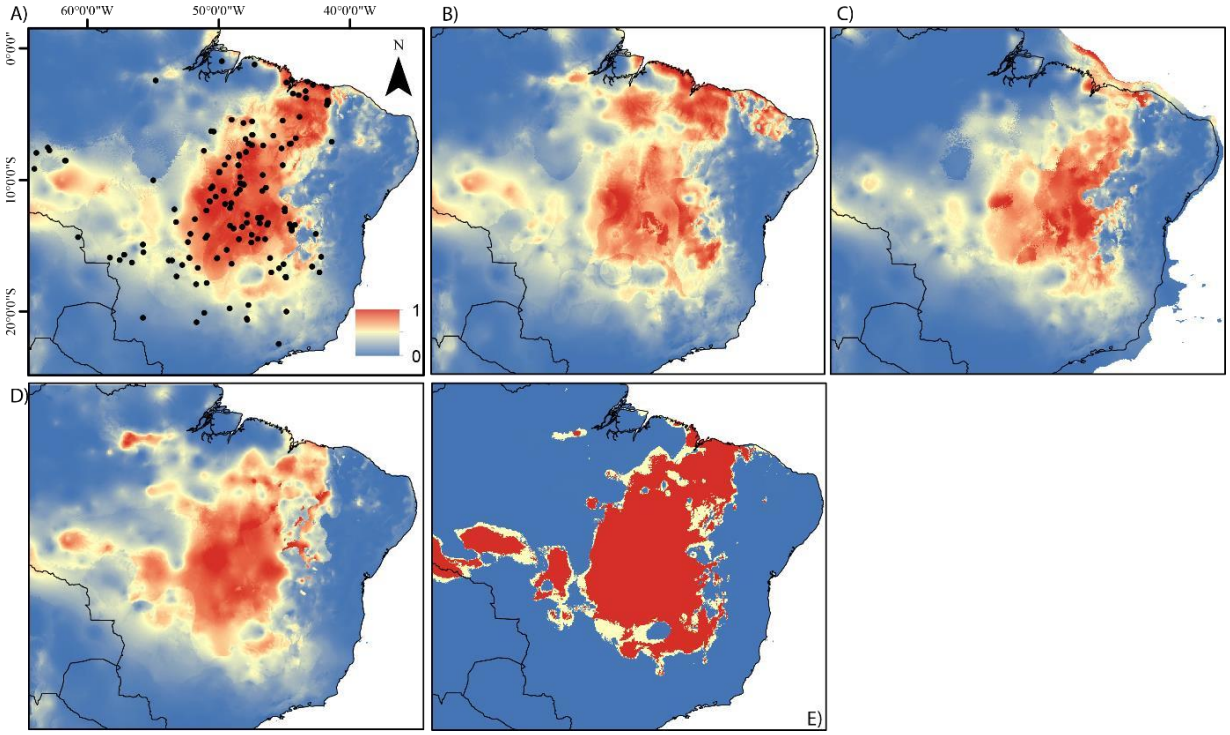


Figura 9. Modelagem de Nicho: A) Presente 0k. B) Holoceno Médio 6k. C) Último máximo Glacial 21K D) Interglacial 130k. E) Refúgio**.**

3.4 Isolamento por Distância

Realizamos o teste de Mantel para verificar se a distância geográfica influencia a distância genética. O resultado foi significativo (p-valor = 0,0001), com uma estatística de Mantel r = 0.2612. Esse valor indica uma correlação moderada e positiva entre as duas variáveis, sugerindo que populações mais próximas geograficamente tendem a ser mais geneticamente semelhantes. Isso significa que populações que estão mais próximas geograficamente tendem a compartilhar mais características.

4. DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciaram uma estruturação genética bem definida em *Rhinella mirandaribeiroi*, com padrões distintos de expansão e estabilização entre as duas populações identificadas por meio das análises de estrutura populacional. Os heatmaps gerados pelo Fast BAPS indicaram agrupamentos geneticamente diferenciados, embora com zonas de contato que sugerem a ocorrência de fluxo gênico entre as populações. A análise filogenética corroborou a monofilia da espécie no conjunto de dados analisado; entretanto, não apresentou suporte estatístico robusto para a separação clara entre as populações. Os testes de neutralidade e as inferências de demografia histórica apontaram para uma expansão populacional recente na população 2, possivelmente relacionada às condições climáticas instáveis que caracterizaram o Pleistoceno.

Identificamos duas populações geneticamente distintas de *Rhinella mirandaribeiroi*. Rivera et al. (2022) também reconheceram duas populações da espécie no Cerrado, com base em uma amostragem de 13 indivíduos, majoritariamente concentrada no Brasil Central. Em contraste, nossos resultados revelaram a estruturação populacional em dois agrupamentos distintos tanto em K=4 quanto em K=6, abrangendo amostras provenientes tanto do Brasil Central quanto da região amazônica. Embora as áreas de ocorrência identificadas por ambos os estudos sejam compatíveis com a distribuição conhecida da espécie, há divergências notáveis na organização espacial das populações. Enquanto Rivera et al. (2022) observaram populações contínuas dentro de cada região, nossos dados indicam que a população 1 apresenta uma distribuição disjunta, separada geograficamente da população 2. Apesar dessa separação espacial, as populações 1 e 2 demonstram elevada similaridade genética. A distância genética não corrigida com base no mtDNA entre elas é igual ou inferior a 2%, valor abaixo do limiar geralmente utilizado para a identificação de espécies crípticas em anuros (3%, conforme Fouquet et al., 2007).

Os rios desempenham um papel central na formação dos padrões biogeográficos na América do Sul, atuando frequentemente como barreiras naturais à dispersão de organismos terrestres e promovendo a divergência genética por isolamento alopátrico (Wallace, 1854; Turchetto-Zolet et al., 2012; Bruschi et al., 2019). A bacia Tocantins-Araguaia, em particular, tem sido reconhecida como uma unidade biogeográfica relevante para diversos grupos de répteis (Squamata) e anuros, com padrões de ocorrência frequentemente associados aos canais fluviais (Azevedo et al., 2016; Guarnizo et al., 2016; Arantes et al., 2023). No entanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que as populações de *Rhinella mirandaribeiroi*

ocorrem em ambas as margens da bacia e compartilham haplótipos mitocondriais. Esse padrão sugere que, diferentemente do observado para outras espécies, a bacia Tocantins-Araguaia não atua como uma barreira efetiva à dispersão para *R. mirandaribeiroi*, não configurando, portanto, um elemento limitante na paisagem para essa espécie.

Outra hipótese frequentemente discutida para explicar a diversificação biológica na região é a elevação final do Planalto Central durante o Neógeno, entre aproximadamente 7 e 5 milhões de anos atrás (Colli, 2005). Esse evento geológico tem sido apontado como um fator determinante para a estruturação populacional de diferentes espécies de anuros (Maciel et al., 2010; Oliveira et al., 2018; Mittan et al., 2022). No entanto, a divergência estimada entre as populações de *Rhinella mirandaribeiroi* neste estudo remonta a aproximadamente 290 mil anos, durante o Pleistoceno Médio, período muito mais recente do que o soerguimento do Planalto Central, sugerindo que esse processo geológico não é o principal responsável pela estruturação observada.

Por outro lado, as oscilações climáticas do Pleistoceno parecem oferecer uma explicação mais plausível. Esse período foi marcado por sucessivas glaciações que fragmentaram as florestas úmidas e favoreceram a expansão de ambientes abertos, como as savanas (Haffer, 1969). Durante o Quaternário, ocorreram pelo menos quatro ciclos glaciais, caracterizados por quedas acentuadas nas temperaturas e na precipitação. Essas mudanças climáticas provocaram alterações significativas na cobertura vegetal, com retração das florestas tropicais e temperadas úmidas e expansão de vegetações sazonalmente secas (Carvalho & Almeida, 2011). Em regiões semiáridas, como a Caatinga, evidências genéticas apontam para eventos de expansão populacional síncrona no final do Pleistoceno (Gehara et al., 2017), reforçando a influência desses ciclos climáticos na dinâmica demográfica e na estruturação genética de diversas espécies neotropicais.

O resultado encontrado em nosso estudo é condizente com datações do Pleistoceno Médio, tanto no que se refere à diversificação das populações quanto à expansão da população 2. Padrões semelhantes também foram observados em outros anuros com distribuição no Cerrado. *Boana albopunctata*, por exemplo, aparentemente evoluiu a partir de um grupo de haplótipos localizado no Cerrado Central. Sua diversificação ocorreu durante o Pleistoceno Médio, período marcado por alternâncias climáticas entre fases úmidas e secas, que resultaram em mudanças recorrentes na distribuição histórica do Cerrado. De forma semelhante, as linhagens de *Boana raniceps* também divergiram ao longo do Pleistoceno Médio, quando períodos de expansão dos biomas durante as oscilações climáticas do Quaternário parecem ter favorecido o fluxo gênico entre linhagens ao longo do tempo.

Esse cenário é compatível com um modelo de ciclos de isolamento e reconexão gênica, no qual as mudanças climáticas ocorridas entre o Último Máximo Glacial (LGM) e o presente influenciaram a migração e a conectividade entre populações (Camurugi et al., 2020). Além disso, os dados de Prado et al. (2011) indicam que a fragmentação das florestas tropicais na bacia Amazônica teve início no começo do Pleistoceno Médio, e não apenas durante os máximos glaciais mais recentes, sugerindo que o Cerrado começou a expandir-se em direção à Amazônia já naquele período.

O contato secundário tem sido apontado como uma possível explicação para a mistura genética observada entre populações de *Physalaemus cuvieri* no Cerrado centro-norte (Miranda et al., 2019). A diferenciação genética entre populações de sapos, como *Boana albopunctata* e *Dendropsophus rubicundulus*, foi atribuída a mudanças climáticas pleistocênicas, nas quais a instabilidade ambiental pode ter restringido o fluxo gênico contínuo entre as populações (Vasconcellos et al., 2019; Arantes, 2023).

Após a divergência entre as populações, a população do 2 expandiu-se há aproximadamente 250 mil anos, em concordância com a influência das variações climáticas do Quaternário nos processos de diversificação. O gênero *Rhinella jimi* apresentou uma expansão populacional sincronizada com o Pleistoceno (Vallinoto et al., 2010). Da mesma forma, a última diversificação do grupo *Rhinella marina* (155 m.a). teria ocorrido nesse período (Maciel et al., 2010). Além disso, a população nordeste de *Dermatonotus muelleri* (150 m.a) também indicou sinais de expansão, possivelmente após ter permanecido restrita a uma área de refúgio no extremo nordeste do continente (Oliveira et al., 2018).

Os modelos de nicho ecológico de *R. mirandaribeiroi* foram compatíveis com o que se espera para o bioma Cerrado. Durante o Último Interglacial, há aproximadamente 130 mil anos, o clima mais quente e seco favoreceu a expansão da flora arbórea do Cerrado em direção à bacia amazônica e à costa atlântica (Bueno et al., 2017). Já no Último Máximo Glacial, há cerca de 21 mil anos, ocorreu uma retração significativa das espécies, que passaram a se concentrar principalmente no centro do Brasil e no leste da Bolívia (Werneck et al., 2012).

Nosso teste parcial de Mantel indicou que o isolamento por distância desempenhou um papel significativo na estrutura genética da espécie. Para algumas espécies do Cerrado como m *Colobosaura modesta* (Ledo et al., 2020) e *Boana albopunctata* (Vasconcellos et al., 2019) os resultados foram significativos para diferenciações populacionais das espécies.

Para as espécies endêmicas do Cerrado, as oscilações climáticas provavelmente resultaram em isolamento climático impulsionado pela vicariância, seguido de ocorrência de

contato secundário (Vasconcellos et al., 2019). Esse contato secundário pode explicar a mistura observada entre populações. As mudanças climáticas durante o Pleistoceno levaram à instabilidade, o que possivelmente limitou o fluxo gênico contínuo entre populações. A biota endêmica do Cerrado segue padrões de dispersão, isolamento e potencial reconexão devido a esses padrões climáticos cíclicos e instáveis (Vasconcellos et al., 2019; Arantes et al., 2023).

Werneck et al. (2012) relataram que, no Cerrado Central, havia uma extensa área contínua com clima estável e pouca variação interna. No entanto, identificaram uma estreita disjunção no sentido norte-sul, sugerindo uma separação geográfica marcante entre as porções norte e sul do bioma. A autora também destacou a presença de um refúgio climático no Cerrado, o Refúgio da Serra Geral de Goiás, que corresponde amplamente ao Planalto da Serra Geral de Goiás, uma região que atua como fronteira natural e política entre os estados de Goiás, Tocantins e Bahia. Outros refúgios climáticos foram previstos em áreas mais afastadas, como no extremo nordeste do bioma, no Maranhão (Refúgio do Maranhão), e na região oeste, na confluência dos estados de Goiás, Tocantins e Mato Grosso (Refúgio Oeste). Na nossa amostragem, observamos que algumas populações estão restritas a um único estado. A população 1, por exemplo, inclui espécimes provenientes do Maranhão, Piauí e São Paulo, enquanto a população 2 possui indivíduos apenas da Bahia e de Goiás. Esses padrões indicam que as populações provavelmente ficaram isoladas em refúgios distintos durante as flutuações climáticas do passado.

A sinalização de *R. mirandaribeiroi* espécime HT8832 na Amazônia pode ser explicada pelo trabalho de Bueno et al. (2017) que relata que a flora do Cerrado experimentou sua expansão máxima durante o Último Interglacial (LIG), quando as espécies se espalharam em direção ao sul e leste da bacia amazônica, essas áreas abrigam os atuais enclaves de Cerrado dentro de florestas úmidas do bioma Amazônica.

Reconhece-se que as flutuações climáticas exerceram um papel significativo na história evolutiva de *Rhinella mirandaribeiroi*. No entanto, não se pode descartar a influência de outros fatores na estruturação genética da espécie. O grupo *Rhinella granulosa* demonstrou uma rápida adaptação a clima local (Simon et al., 2016). Além disso, fatores como a precipitação revelaram-se determinantes na estruturação populacional de *R. granulosa* (Thomé et al., 2021). Dessa forma, investigações adicionais sobre a história evolutiva de *R. mirandaribeiroi* são essenciais, especialmente sob a perspectiva de sua ecologia, a fim de elucidar os processos que moldaram sua atual distribuição. No presente estudo, foram identificadas duas populações, cuja diferenciação foi analisada à luz das flutuações climáticas.

5. Conclusão

Este estudo evidenciou a presença de estrutura genética em *Rhinella mirandaribeiroi*, suportada pela identificação de duas populações geneticamente diferenciadas, conforme evidenciado pelas análises de estrutura populacional utilizando Geneland. A delimitação geográfica dessas unidades populacionais sugere que processos históricos e barreiras geográficas atuaram como fatores determinantes para a divergência genética observada.

As evidências sugerem que a ampla distribuição geográfica de *R. mirandaribeiroi* está associada a um padrão de estruturação populacional, com delimitação espacial entre as populações. Esse padrão é compatível com cenários de isolamento e reconexão provocados por eventos climáticos pretéritos. Os resultados também apontam para a importância das oscilações climáticas do Pleistoceno, cujos efeitos diferenciaram as histórias demográficas das populações: uma delas apresentou estabilidade ao longo do tempo, enquanto a outra passou por expansão populacional. Ainda assim, outros fatores, como o isolamento geográfico e as especificidades ecológicas regionais, também podem ter influenciado os caminhos evolutivos seguidos pela espécie, não sendo possível atribuir exclusivamente ao clima quaternário o papel de principal motor da diversificação.

A análise da estabilidade climática ao longo do tempo revelou que o centro do Cerrado manteve condições ambientais mais constantes, favorecendo a permanência de refúgios e possibilitando a expansão da população 2. Por outro lado, a população 1, localizada de forma disjunta e aparentemente isolada pela população central, apresentou um padrão inesperado, mesmo sob possível pressão de isolamento, os sinais indicaram estabilidade histórica, ao invés de retração populacional.

Esses resultados posicionam *Rhinella mirandaribeiroi* como um modelo relevante para compreender como a interação entre mudanças paleoclimáticas e geográficas molda a diversidade genética de anuros em ambientes de savana tropical. Apesar de limitações amostrais, especialmente em zonas de transição com a amazônicas. Este trabalho representa uma base para o avanço da compreensão da biogeografia e história evolutiva da espécie. A integração de análises moleculares, espaciais e demográficas oferece uma base sólida para estudos futuros e contribui para o entendimento dos processos que estruturam a biodiversidade do Cerrado, ressaltando ainda a importância de abordagens integradas na conservação das espécies e esforços para interpretar padrões evolutivos em ecossistemas altamente dinâmicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ab'Saber, A. (2005). **Os domínios de natureza no Brasil**: Potencialidades paisagísticas. São Paulo: Ateliê Editorial.

Azevedo, J. A. R., Valdujo, P. H., & de C. Nogueira, C. (2016). Biogeography of anurans and squamates in the Cerrado hotspot: Coincident endemism patterns in the richest and most impacted savanna on the globe. **Journal of Biogeography**, 43(12), 2454–2464.

Arantes, Í. C., Vasconcellos, M. M. Smith, M. L., Garrick, R. C. Colli, G. R., Noonan, B. P. (2023). Species limits and diversification of the *Dendropsophus rubicundulus* subgroup (Anura, Hylidae) in Neotropical savannas. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 186.

Avise, J. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18,489–522.

Avise, J. C. (2000). **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard: Harvard University Press.

Becker, C. G., Fonseca, C. R., Haddad, C. F. B., & Prado, P. I. (2010). Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae: Contributed paper. **Conservation Biology**, 24(1), 287–294.

Benício, R. A. Silva, G. R. da, & Fonseca, M. G. (2015). Anurans from Caatinga area in state of Piauí, northeastern Brazil. **Bol. Mus. Biol**. **Mello Leitão**, 37(2), 207–217.

Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Popinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., Suchard, M. A., Wu, C.-H., Xie, D., Zhang, C., Stadler, T., & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology,** 15,e1006650.

Brown, J. H., Stevens, G. C., & Kaufman, D. M. (1996). The geographic range: Size, shape, boundaries, and internal structure. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 27,597–623.

Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y., & Burke, T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In A. R. Hoelzel (Ed.), **Molecular genetic analysis of populations: A practical approach** (pp. 225–269). Oxford: RL Press.

Bruschi, D. P., Peres, E. A. Lourenço, L. B., De Macedo Bartoletti, L. F., Sobral-Souza, T., & Recco-Pimentel, S. M. (2019). Signature of the paleo-course changes in the São Francisco Riveras source of genetic structure in neotropical *Pithecopus nordestinus* (Phyllomedusinae, Anura) treefrog. **Frontiers in Genetics**, 10(JUL), 1–16.

Bueno, M. L. Pennington, R. T., Dexter, K. G., Kamino, L. H. Y., Pontara, V., Neves, D. M., Ratter, J. A. & Oliveira-Filho, A. T. (2017). Effects of Quaternary climatic fluctuations on the distribution of Neotropical savanna tree species. **Ecography**, 40(3), 403–414.

Camurugi, F., Gehara, M., Fonseca, E. M., Zamudio, K. R., Haddad, C. F., Colli, G. R., ... & Garda, A. A. (2021). Isolation by environment and recurrent gene flow shaped the evolutionary history of a continentally distributed Neotropical treefrog. **Journal of Biogeography**, *48*(4), 760- 772.

Carnaval, A. C., & Moritz, C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, 35(7), 1187–1201.

Carvalho, C. J. B., & Almeida, E. A. B. (2011). **Biogeografia da América do Sul: Padrões e processos**. São Paulo: Editora Roca.

Collevatti, R. G. Lima-Ribeiro, M. S., Souza-Neto, A. C. Franco, A. A., de Oliveira, G., & Terribile, L. C. (2012). Recovering the demographical history of a Brazilian cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: Coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. **Natureza & Conservação**, 10(2), 169–176.

Colli, G. R. (2005). **As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado**. In A. Scariot, J.C. Sousa-Silva, & J. M. Felfili (Eds.), Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação (pp. 247– 264). Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Distrito Federal.

Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis sampling trees. BMC **Evolutionary Biology**, 7, 214.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol. Biol. Evol.** 29, 1969–1973.

Fouquet, A., Courtois, E. A., Baudain, D., Lima, J. D., Souza, S. M., Noonan, B. P., & Rodrigues, M. T. (2015). The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, 31(04), 361–373.

Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M. D., Meyer, A., Marty, C., Blanc, M., & Gilles, A. (2007). Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Evolution,** 43, 567–582.

Fouquet, A., Noonan, B. P., Rodrigues, M. T., Pech, N., Gilles, A., & Gemmell, N. J. (2012). Multiple Quaternary refugia in the Eastern Guiana Shield revealed by comparative phylogeography of 12 frog species. **Systematic Biology**, 61(3), 461.

Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Maximum likelihood estimation of population parameters. **Genetics**, 134(4), 1261–1270.

Gehara, M., Garda, A. A., Werneck, F. P., Oliveira, E. F. da Fonseca, E. M., Camurugi, F., Magalhães, F. de M., Lanna, F. M., Sites, J. W., Marques, R., Silveira-Filho, R., São Pedro, V. A., Colli, G. R., Costa, G. C., & Burbrink, F. T. (2017). Estimating synchronous demographic changes across populations using hABC and its application for a herpetological community from northeastern Brazil. **Molecular Ecology**, 26(19), 4756–4771.

Guillory, W. X., Magalhães, M. F., Coelho, F. E. A., Bonatelli, I. A., Palma-Silva, C., Moraes, E. M. (2024). Geoclimatic drivers of diversification in the largest arid and semi-arid environment of the Neotropics: Perspectives from phylogeography. **Molecular Ecology**, e17431.

Guarnizo, C. E., Werneck, F. P., Giugliano, L. G., Santos, M. G., Fenker, J., Sousa, L., & Colli, G. R. (2016). Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 94, 279–289.

Faleiro, F. G. (2007). **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados.

Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165(3889), 131–138.

Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. **Mol Ecol** 10:537–49

Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P. F., & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54(1), 291–301.

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high-resolution interpolated climate surfaces for global land areas. International **Journal of Climatology**, 25, 1965–1978.

GALLARDO, J. M. The species *Bufo granulosus* Spix (Salientia: Bufonidae) and its geographic variation. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 134, n. 4, p. 107-138, 1965.

Johns, G. C., & Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Biology and Evolution,** 15, 1481–1490.

Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Carter, S., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant, S., McCrackin, M. A., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J., Turner, T., & Yanong, R. (Eds.). (2020). **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020** Edition. Schaumburg, Illinois, USA: American Veterinary Medical Association.

Ledo, R. M. D., & Colli, G. R. (2017). The historical connections between the Amazon and the Atlantic Forest revisited. **Journal of Biogeography**, 44(11), 2551–2563.

Ledo, RMD, Domingos, FM, Giugliano, LG, Sites Jr, JW, Werneck, FP, & Colli, GR (2020). Expansão e conectividade pleistocênica de florestas mésicas dentro da Diagonal Seca da América do Sul apoiada pela filogeografia de um pequeno lagarto. **Evolution** , *74* (9), 1988-2004.

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, 6(9), 1110–1116.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics,** 25(11), 1451–1452.

Maciel, N. M., Collevatti, R. G., Colli, G. R., & Schwartz, E. F. (2010). Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 57(2), 787– 797.

Magalhães, F. de M., Camurugi, F., Lyra, M. L., Baldo, D., Gehara, M., Haddad, C. F. B., & Garda, A. A. (2022). Ecological divergence and synchronous Pleistocene diversification in the widespread South American butter frog complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 169, 107398.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, 27, 209-220.

Martins, F. de M., & Domingues, M. V. (2018**). Filogeografia. Revista da Biologia**, 7(1), 26–30.

Miranda, N. E. O., Maciel, N. M., Lima-Ribeiro, M. S., Colli, G. R., Haddad, C. F. B., & Collevatti, R. G. (2019). Diversification of the widespread Neotropical frog *Physalaemus cuvieri* in response to Neogene-Quaternary geological events and climate dynamics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 132, 67–80.

Mittan, C. S., Zamudio, K. R., Thomé, M. T. C., Camurugi, F., Colli, G. R., Garda, A. A., Haddad,C. F. B., & Prado, C. P. A. (2022). Temporal and spatial diversification along the Amazonia- Cerrado transition in Neotropical treefrogs of the *Boana albopunctata* species group. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 175, 107579.

Murphy, J. C., Sierra, T. A., Downie, J. R., & Jowers, M. J. (2017). Toads, tall mountains and taxonomy: the *Rhinella granulosa* group (Amphibia: Anura: Bufonidae) on both sides of the Andes. **Salamandra**, 53(2), 267-278.

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), 1–73.

Oliveira, E. F., Gehara, M., São-Pedro, V. A., Costa, G. C., Burbrink, F. T., Colli, G. R., Rodrigues, M. T., & Garda, A. A. (2018). Phylogeography of Muller's termite frog suggests the vicariant role of the Central Brazilian Plateau. **Journal of Biogeography**, 45(11), 2508–2519.

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. (2016). Phylogenetic relationships of toads of the *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): A molecular perspective with comments on hybridization and introgression**. Cladistics**, 32(1), 36–53

Pereyra, M. O., Blotto, B. L., Baldo, D., Chaparro, J. C., Ron, S. R., Elias-Costa, A. J., Iglesias, P.P., Venegas, P. J., Thomé, M. T. C., Ospina-Sarria, J. J., Maciel, N. M., Rada, M., Kolenc, F., Borteiro, C., Rivera-Correa, M., Rojas-Runjaic, F. J. M., Moravec, J., De La Riva, I., Wheeler, W. C., Castroviejo-Fisher, S., Grant, T., Haddad, C. F. B., & Faivovich, J. (2021). Evolution in the genus *Rhinella*: A total evidence phylogenetic analysis of Neotropical true toads (Anura: Bufonidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History,** 447(1), 1–156.

Pina, L. F., Morais, A. R., & Prado, C. P. A. (2015). *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) (Amphibia: Anura: Bufonidae): Distribution extension and new state record. **Check List,** 11(3), 1654.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25(7), 1253–1256.

C. P. A., HADDAD, C. F. B., & ZAMUDIO, K. R. (2011). Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. **Molecular Ecology**, 21(4), 921–941.

Pramuk, J. B. (2006). Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 146(4), 407–452.

Prates, I., Angilleta, M. J., Wilson, R. S., Niehaus, A. C., & Navas, C. A. (2013). Dehydration hardly slows hopping toads (*Rhinella granulosa*) from xeric and mesic environments. **Physiological and Biochemical Zoology**, 86(4), 451–457.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, 67(5), 901–904.

Rivera, D., Prates, I., Caldwell, J. P., Rodrigues, M. T., & Fujita, M. K. (2022). Testing assertions of widespread introgressive hybridization in a clade of Neotropical toads with low mate selectivity (*Rhinella granulosa* species group). **Heredity**, 130(1), 14–21. https://doi.org/10.1038/s41437-022- 00571-9

Rivera, D., Prates, I., Firneno, T. J., Rodrigues, M. T., Caldwell, J. P., & Fujita, M. K. (2021). Phylogenomics, introgression, and demographic history of South American true toads (*Rhinella)*. **Molecular Ecology**, 31(3), 978–992.

RStudio Team. (2024). **RStudio: Integrated development for R. RStudio**, PBC. Boston, MA.

Rull, V. (2018). Neotropical diversification: Historical overview and conceptual insights. **PeerJ Preprints**, 6, e27294v1.

Santos, J. C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R., & Cannatella, D. C. (2009). Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. **PLoS Biology**, 7(3).

Simon, M. N., Machado, F. A., & Marroig, G. (2016). High evolutionary constraints limited adaptive responses to past climate changes in toad skulls. Proceedings of the **Royal Society** B: Biological Sciences, 283(1841).

Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetics**, 68(4), 978– 989.

Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ & Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 **Virus Evolution 4**, vey016.

Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G., Haddad, C. F., Baldissera Jr, F. A., & Alexandrino, J. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular phylogenetics and evolution**, *55*(3), 1018-1031.

Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Haddad, C. F., & Alexandrino, J. (2012). Delimiting genetic units in Neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. *BMC* **Evolutionary Biology**, *12*, 1-13.

Thomé, M. T. C., Carstens, B. C., Rodrigues, M. T., Galetti Jr, P. M., Alexandrino, J., & Haddad, C. F. (2021). A role of asynchrony of seasons in explaining genetic differentiation in a Neotropical toad. **Heredity,** *127*(4), 363-372.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, 38(7), 3022–3027.

Tonkin-Hill, G., Lees, J., Bentley, S., Frost, S., & Corander, J. (2019). Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. **Nucleic Acids Research**, 47(11), 5539–5549.

Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2012). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, 22(5), 1193–

Turchetto-Zolet, A. C., Segatto, A. L. A., Turchetto, C., Palma-Silva, C., & Freitas, L. B. (2013). **Guia prático para estudos filogeográficos**. Ribeirão Preto: SBG.

Vallinoto, M., Sequeira, F., Sodré, D., Bernardi, J. A. R., Sampaio, I., & Schneider, H. (2010). Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: Implications for neotropical diversification hypotheses. **Zoologica Scripta**, 39, 128– 140.

Vanzolini, P. E., & Williams, E. E. (1970). South American anoles: The geographic differentiation and evolution of the Anolis chrysolepis species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia**, 19(3–4), 125–298.

Vanzolini, P. E., & Williams, E. E. (1981). The vanishing refuge: A mechanism for ecogeographic speciation. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 34(23), 251–255.

Vasconcellos, M. M., Colli, G. R., Weber, J. N., Ortiz, E. M., Rodrigues, M. T., & Cannatella, D.C. (2019). Isolation by instability: Historical climate change shapes population structure and genomic divergence of treefrogs in the Neotropical Cerrado savanna. **Molecular Ecology**

Wallace, A. R. (1854). **On the monkeys of the Amazon. Annals and Magazine of Natural History**, 14(84), 451–454.

Wells, K. D. (2007). **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago: University of Chicago Press.

Werneck, F. P., Nogueira, C., Colli, G. R., Sites, J. W., & Costa, G. C. (2012). Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, 39(9), 1695–1706.

Werneck, F.. P., Domingos, F. M. C. B. , Garda, A. A., Azevedo, J., Vasconcellos, M. M., Pirani, R. M. Magalhães, F. M., Taucci, P. P. G., Choueri, E. H. L., Fenker, J. **Guia prático de análises e tutoriais** edição 2023 'Filogeografia Estatística/Adaptação Ambiental'. 2023.

7. APÊNDICES

Tabela 3. Lista dos tecidos e marcadores utilizados para qualificação. Inclui as seguintes colunas: Os pontos do mapa da figura 1. Tombo (Código de identificação do tecido, os nomes com * são de sequências do banco de dados NBCI), Marcadores (Mitocondrial: 16s, Cytb, Nucleares: Pomc), Município da coleta e estado, coordenadas e assinalamento populacional

Ponto	Nome	16s	Cytb	Pomc	Município	UF	Long	Lat	Pop
1	AF725*	X	-	-	Coimbra	MT	-14,872	-55,786	1
2	AF745*	X	-	-	Coimbra	MT	-14,872	-55,786	1
3	CFBHT2163	X	X	X	Aguiarnópolis	TO	-6,560	-47,476	1
4	CFBHT8296	X	X	X	Alcântara	MA	-2,404	-44,415	1
5	CHUNB37075	X	X	X	Alvorada do Norte	GO	-14,480	-46,488	2
6	CHUNB37077	X	X	X	Alvorada do Norte	GO	-14,480	-46,488	2
7	GRCOLLI16377	X	X	X	Alto Paraíso de Goiás	GO	-14,138	-47,509	2
8	CFBH10254	-	X	X	Araguacema	TO	-8,808	-49,557	2
9	CFBHT2788	X	-	X	Araguacema	TO	-8,808	-49,557	2
10	CFBHT2806	X	X	X	Araguacema	TO	-8,808	-49,557	2
11	CFBHT3520	X	X	X	Babaçulândia	TO	-7,203	-47,759	1
12	CFBHT3521	X	X	X	Babaçulândia	TO	-7,203	-47,759	1
13	MAPT3813	X	X	X	Benedito Leite	MA	-7,228	-44,623	1
14	CFBHT12446	X	X	X	Barreirinhas	MA	-2,760	-42,824	1
15	MAPT3195	X	X	X	Caseara	TO	-9,351	-49,948	2
16	MAPT3500	X	X	X	Caseara	TO	-10,303	-48,144	2
17	CHUNB50914	X	X	X	Colinas do Tocantins	TO	-8,045	-48,470	2
18	CHUNB50915	X	X	X	Colinas do Tocantins	TO	-8,045	-48,470	2
19	CFBH11448	X	-	-	Babaçulândia	TO	-7,204	-47,759	1
20	CFBH19159	X	-	-	Alcântara	MA	-2,404	-44,416	1
21	CFBH21859	X	-	-	Porto Estrela	MT	-15,651	-57,194	1
22	CFBH8153	X	-	-	Aguiarnópolis	TO	-6,560	-47,476	1

23	CHUNB51702	-	X	X	Carolina	MA	-7,333	-47,466	1
24	CHUNB51710	X	X	X	Carolina	MA	-7,333	-47,466	1
25	UFMGT1938	X	X	X	Estreito	MA	-6,560	-	1
26	CHUNB38432	X	-	X	Flores de Goiás	GO	-14,457	-47,046	2
27	FG14	X	X	X	Flores de Goiás	GO	-14,457	-47,046	2
28	CFBHT13922	X	X	X	Figueirópolis	TO	-12,128	-49,164	2
29	CFBHT13924	X	X	X	Figueirópolis	TO	-12,128	-49,164	2
30	UFMGT4391	X	-	X	Grão Mogol	MG	-16,564	-42,889	2
31	UFMGT4397	X	X	X	Grão Mogol	MG	-16,564	-42,889	2
32	CFBHT13767	X	X	X	Gurupi	TO	-11,725	-49,060	2
33	MAPT1240	X	X	X	Gurupi	TO	-11,725	-49,060	2
34	CFBHT12441	X	X	X	Itapecuru Mirim	MA	-3,394	-44,360	1
35	CFBHT12442	X	X	X	Itapecuru Mirim	MA	-3,394	-44,360	1
36	LAJ406*	X	-	-	Lajeado	TO	-9,758	-48,360	2
37	MAPT1159	X	X	X	Lagoa da Confusão	TO	-10,787	-49,619	2
38	MAPT1161	X	-	X	Lagoa da Confusão	TO	-10,787	-49,619	2
36	MAPT1165	X	X	-	Lagoa da Confusão	TO	-10,787	-49,619	2
40	CFBHT3784	X	-	X	Lizarda	TO	-9,595	-46,674	2
41	HT8832	X	X	X	Manicoré	AM	-8,499	-61,660	2
42	CHUNB27390	X	X	X	Mateiros	TO	-10,545	-46,427	2
43	CHUNB27420	-	X	X	Mateiros	TO	-10,545	-46,427	2
44	CHUNB50916	X	X	X	Minaçu	GO	-13,545	-48,229	2
45	CHUNB50917	X	X	X	Minaçu	GO	-13,545	-48,229	2
46	CHUNB67463	X	X	X	Monte Alegre de Goiás	GO	-13,264	-46,889	2
47	MRT2120*	X	-	-	Uruçuí	PI	-7,234	-44,556	1
48	MRT2716*	X	-	-	Uruçuí	PI	-7,234	-44,556	1

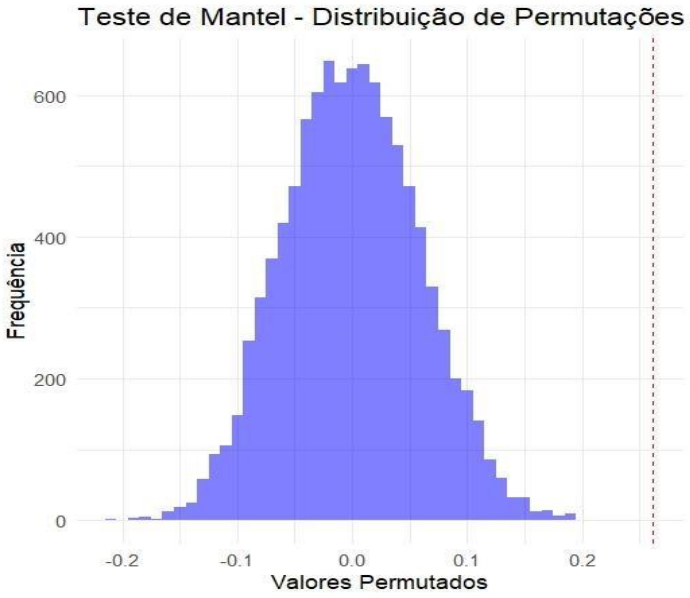


Figura 11. Histograma do Teste de Mantel do gene mitocondrial 16s. O gráfico representa a distribuição dos valores permutados no Teste de Mantel, que avalia a correlação entre duas matrizes de distância.

49	MRT7142*	X	-	-	Guaraí	TO	-8,838	-48,512	2
50	MRT9005*	X	-	-	Lajeado	TO	-9,758	-48,360	2
51	MRT14851*	X	-	-	Serra Geral	TO	-10,814	-46,696	2
52	MRT27049*	X	-	-	Niquelândia	GO	-14,471	-48,460	2
53	MAPT2100	X	X	X	Nova Iorque	MA	-6,786	-44,132	1
54	CHUNB57808	X	X	X	Novo Santo Antônio	MT	-12,297	-50,969	2
55	CHUNB57818	X	X	X	Novo Santo Antônio	MT	-12,297	-50,969	2
56	CFBHT10208	X	-	-	Porto Estrela	MT	-15,648	-57,211	1
57	CFBHT14542	X	X	X	Porangatu	GO	-13,444	-49,140	2
58	PHV1431*	X	-	-	São Desidério	BA	-12,363	-44,976	2
59	PHV1433*	X	-	-	São Desidério	BA	-12,363	-44,976	2
60	PHV1965*	X	-	-	São Desidério	BA	-13,624	-44,467	2
61	PHV1966*	X	-	-	São Desidério	BA	-13,624	-44,467	2
62	PHV2203*	X	-	-	Serra Geral	TO	-10,814	-46,696	2
63	PHV2424*	X	-	-	Água Boa	MT	-14,059	-52,158	2
64	PHV4149*	X	-	-	Monte Alegre de Goiás	GO	-13,257	-46,892	2
65	MAPT4716	X	X	X	Pium	TO	-9,418	-50,000	2
66	MAPT2298	X	X	X	Palmas	TO	-10,315	-48,159	2
67	MAPT2302	X	X	X	Palmas	TO	-10,315	-48,159	2
68	MAPT3851	X	-	-	Palmas	TO	-10,342	-48,099	2
69	CFBHT13976	X	X	X	Porto Nacional	TO	-10,707	-48,412	2
70	MAPT1238	X	X	X	Porto Nacional	TO	-10,707	-48,412	2
71	CHUNB37637	X	X	X	Paranã	TO	-12,625	-47,857	2
72	CHUNB37642	-	X	X	Paranã	TO	-12,625	-47,857	2
73	CHUNB73464	X	X	X	Ribeirão Cascalheira	MT	-12,938	-51,816	2
74	CHUNB73466	X	X	X	Ribeirão Cascalheira	MT	-12,938	-51,816	2

75	DS92	X	X	-	Ribeiro Gonçalves	PI	-7,567	-45,247	1
76	MAPT2406	X	X	X	Riachão	MA	-7,365	-46,623	1
77	CFBH13849	X	X	X	Santo Amaro do Maranhão	MA	-2,499	-43,254	1
78	CFBHT4298	X	-	X	Santo Amaro do Maranhão	MA	-2,499	-43,254	1
79	CFBHT4299	X	X	X	Santo Amaro do Maranhão	MA	-2,499	-43,254	1
80	CFBHT4300	X	-	-	Santo Amaro do Maranhão	MA	-2,499	-43,254	1
81	CHUNB35403	X	X	X	São Domingos	GO	-	-	2
82	CHUNB35407	X	X	X	São Domingos	GO	-13,401	-46,319	2
83	CHUNB39959	X	-	X	São João d'Aliança	GO	-14,716	-47,538	2
84	CFBHT18351	X	X	X	São Joaquim da Barra	SP	-20,591	-47,858	1
85	CFBHT18352	X	-	-	São Joaquim da Barra	SP	-20,591	-47,858	1
86	CFBHT22078	X	-	-	São Joaquim da Barra	SP	-20,591	-47,858	1
87	CFBHT22079	X	X	X	São Joaquim da Barra	SP	-20,591	-47,858	1
88	Anf0032	X	X	X	Tesouro	MT	-16,106	-53,822	1
89	Anf0033	X	X	X	Tesouro	MT	-16,106	-53,822	1
90	Anf0034	X	-	-	Tesouro	MT	-16,106	-53,822	1
91	Anf0035	X	-	-	Tesouro	MT	-16,106	-53,822	1
92	UEMAGI146*	X	-	-	São João do Soter,	MA	-5,178	-43,868	1
93	UEMAGI185*	X	-	-	São João do Soter,	MA	-5,178	-43,868	1
94	UEMAGI186*	X	-	-	São João do Soter,	MA	-5,178	-43,868	1
95	MAPT4014	X	X	X	Uruçuí	PI	-7,194	-44,506	1
96	CFBHT14060	X	X	X	Wanderlândia	TO	-6,860	-47,967	1
97	CFBHT14061	X	X	X	Wanderlândia	TO	-6,860	-47,967	1

Tabela 4. Ciclos, Temperatura e Tempo da PCR de cada marcador molecular.

Estágio do Ciclo	**16s**	**POMC**	**Cityb**
Desnaturação Inicial	1x 94°C 3 min	1x 94°C 3min	1x 94°C 3min
Desnaturação	35x94°C 20s	45x 94°C 30s	35x 94°C 30s
Anelamento	35x 48°C 20s	45x 58°C 40s	35x 51°C 40s
Extensão	35x68°C 40s	45x72°C 45s	35x72°C 45s
Extensão Final	1x68°C 5min	1x72°C 10min	1x72°C 10min

A)

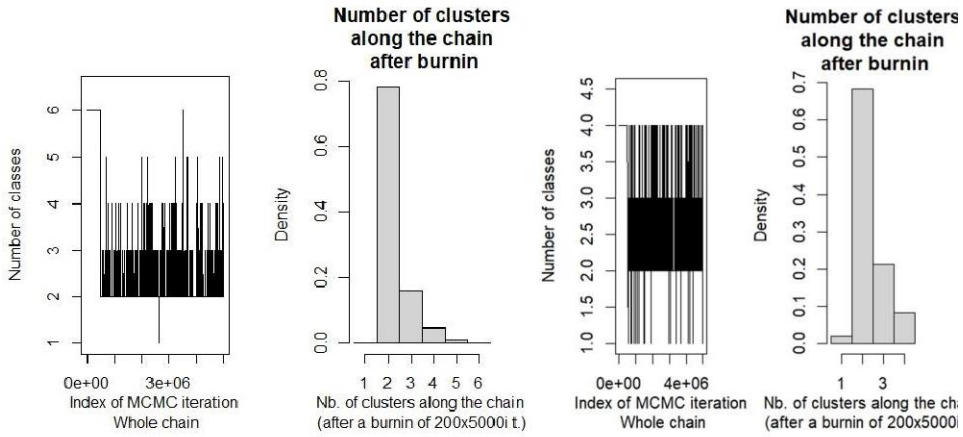


Figura 10. Número de clusters sugeridos para *R. mirandaribeiroi* inferido no Geneland mtDNA/nDna no Geneland, K=2.