




Contribuições das análises moleculares sobre o status taxonômico do gênero *Pseudopaludicola*: uma revisão de literatura

*Contributions of molecular analyses to the taxonomic status of the genus *Pseudopaludicola*: A literature review*

¹ Kléssia Denise Soares dos Santos Sousa  

² Jonas Pederassi  

³ Maria Regiane Araujo Soares  

⁴ Mauro Sérgio Cruz Souza Lima  

¹ Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí Campus Amílcar Ferreira Sobral, UFPI, Brasil.

² Doutor, Associação Educacional Dom Bosco, AEDB.

³ Doutora, Universidade Federal do Piauí Campus Amílcar Ferreira Sobral

⁴ Doutor, Universidade Federal do Piauí Campus Amílcar Ferreira Sobral

RESUMO

Anuros do gênero *Pseudopaludicola* é caracterizado pelo pequeno porte dos indivíduos e similaridades entre as espécies. Diante de erros na taxonomia em virtude de análise comparativa morfológica, técnicas moleculares vêm auxiliando na diagnose molecular e análise filogenética do gênero. Uma prospecção foi realizada a partir da consulta de artigos em periódicos científicos, objetivando conhecer o estado da arte para estudos moleculares com espécies de *Pseudopaludicola*, bem como as mudanças taxonômicas ocorridas no gênero. Utilizando-se termos descritores para seleção dos artigos, a literatura demonstra que, a partir de análises moleculares, o gênero conta com espécies reavaliadas devido a equívocos na identificação e/ou sinonímias incorretas, além de contar com uma heterogeneidade quanto aos genes empregados na filogenia molecular.

Palavras-chave:

Anura. DNA barcode. mtDNA. Taxonomia.

ABSTRACT

Frogs of the genus *Pseudopaludicola* are characterized by a relatively small size and similarities between species. Faced with errors in taxonomy due to comparative morphological analysis, molecular techniques have enabled the identification and phylogenetic analysis of the genus. A survey was conducted by reviewing scientific articles, aiming to identify state-of-the-art molecular studies on *Pseudopaludicola* species, as well as the taxonomic changes that have occurred in the genus. Using keywords for the selection of articles, the review showed that, based on molecular analyses, species of this genus that were earlier misidentified and/or had incorrect synonyms, in addition to being heterogeneous regarding the genes used in molecular phylogeny, were reevaluated.

KEYWORDS:

Anura. DNA barcode. mtDNA. Taxonomy.

1 INTRODUÇÃO

A biologia molecular dispõe de grande versatilidade quanto às análises sequenciais de DNA. A exemplo, tem-se aplicabilidade na taxonomia filogenética para exploração da biodiversidade pelo viés evolutivo (NUÑEZ, 2020). Como de praxe, a sistemática morfológica é empregada amplamente para análises evolutivas de diferentes táxons, todavia a abordagem molecular é igualmente importante, demonstrando sua eficácia investigativa a partir das divergências entre as sequências nucleotídicas dos genomas das espécies (NUÑEZ, 2020). Nesse contexto, insere-se a técnica de DNA barcode, consistindo na aplicação de fragmentos de gene mitocondrial (mtDNA) Cytochrome Oxidase subunit 1 (CO1), segmento com taxa de conservação superior a outros genes mitocondriais (HEBERT *et al.*, 2003).

A classe Amphibia é dividida em três ordens (Caudata, Caeciliae e Anura), compreendendo 8.314 espécies (FROST, 2021). Diferentes anfíbios, incluindo-se os anuros, são caracterizados molecularmente através de fragmentos de mtDNA. A família *Leptodactylidae*, a exemplo, após avaliação molecular, passou a englobar a subfamília monofilética *Leiuperinae* com 5 gêneros, sendo um deles *Pseudopaludicola* (PYRON; WIENS, 2011). Esse gênero é característico pelo pequeno porte das espécies, em média 20 mm no comprimento total, e pela presença de tubérculo hipertrofiado no antebraço, sinapomorfia do gênero (LYNCH, 1989; LOBO, 1995). Com 26 espécies alocadas em *Pseudopaludicola*, algumas delas exibem traços morfológicos similares levando a sinonímias, por vezes causadas por errôneas análises morfológicas, osteológicas e bioacústicas, como ocorrera com *P. mystacalis* com *P. ameghini*, sinonímia proposta por Haddad e Cardoso (1987).

Este estudo objetiva uma revisão de literatura acerca da avaliação molecular de *Pseudopaludicola*, com enfoque nos principais genes utilizados para filogenia, aliado a uma revisão das mudanças taxonômicas ocorridas no gênero.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As publicações foram pesquisadas nas bases de dados do *PUBMED*, *Scielo*, *Web of Science* e *Scopus*, utilizando-se como critérios de inclusão: 1) Artigos com metodologia molecular para espécies de *Pseudopaludicola*; 2) Publicações com avaliação taxonômica da espécie *P. mystacalis*; 3) Artigos sobre sistemática filogenética no gênero *Pseudopaludicola*. Para exclusão, foram considerados artigos que não atenderam aos critérios anteriores. A revisão de literatura buscou responder às perguntas: 1) Como a espécie *P. mystacalis* vem sendo estudada molecularmente? 2) Quais os principais iniciadores empregados e genes estudados para taxonomia molecular de *Pseudopaludicola*?

Para os artigos com estudo molecular com a espécie *P. mystacalis*, foram utilizados os descritores: "*Pseudopaludicola mystacalis* AND DNA", "*Pseudopaludicola mystacalis* AND mtDNA", "*Pseudopaludicola mystacalis* AND mitochondrial DNA" e "*Pseudopaludicola mystacalis* AND molecular". Para os demais trabalhos envolvendo o gênero, foram usados: "*Pseudopaludicola* AND DNA", "*Pseudopaludicola* AND mtDNA", "*Pseudopaludicola* AND 12S OR 16S", "*Pseudopaludicola* AND mitochondrial DNA", "*Pseudopaludicola* AND rRNA OR rDNA" e "*Pseudopaludicola* AND molecular". Para artigos com sistemática filogenética que englobassem ambos dados moleculares quanto morfológicos, foram utilizados os descritores: "*Pseudopaludicola mystacalis* AND taxonomy", "*Pseudopaludicola mystacalis* AND integrative taxonomy", "*Pseudopaludicola* AND taxonomy" e "*Pseudopaludicola* AND integrative taxonomy". Somaram-se a essas buscas suas respectivas variações na língua portuguesa.

3 RESULTADOS

Foram encontrados 98 artigos dentre as bases *PUBMED*, *Scielo*, *Web of Science* e *Scopus*, com ocorrência de repetições. Aplicados os critérios de inclusão, 20 artigos foram analisados na íntegra. A Tabela 1 lista a distribuição dos artigos encontrados e a Tabela 2 apresenta uma síntese das publicações.

Tabela 1. Distribuição dos artigos encontrados, conforme palavras-chave utilizadas e bases de dados consultadas / **Table 1.** Distribution of scientific articles found according to keywords used and data-bases consulted.

*Palavras-chave	Base de Dados			
	Pubmed	Scielo	Web of science	Scopus
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> AND molecular	1	-	1	1
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> AND taxonomy	-	-	1	1
<i>Pseudopaludicola</i> AND DNA	-	-	2	5
<i>Pseudopaludicola</i> AND mtDNA	1	-	1	1
<i>Pseudopaludicola</i> AND (12S OR 16S)	1	1	2	2
<i>Pseudopaludicola</i> AND mitochondrial DNA	-	-	1	4
<i>Pseudopaludicola</i> AND (rRNA OR rDNA)	1	-	2	2
<i>Pseudopaludicola</i> AND molecular	5	-	9	9
<i>Pseudopaludicola</i> AND taxonomy	3	1	14	15
<i>Pseudopaludicola</i> AND integrative taxonomy	-	-	5	5
** <i>Pseudopaludicola</i> E taxonomia	-	1	-	-

* Demais descritores não incluídos por resultarem em 0 publicações em todas as bases.

** Demais palavras-chave em português não sofreram variação distinta da língua inglesa, resultando nas mesmas publicações.

Fonte: autores

Tabela 2. Síntese dos artigos examinados, conforme autor, ano de publicação e principais conclusões / **Table 2.** Summary of the reviewed scientific articles according to author, year of publication, and main conclusions.

AUTOR	ANO	CONCLUSÕES
Cardozo e Suárez	2012	A osteologia da espécie <i>P. canga</i> demonstra ausência de falange em T, havendo mudança na posição taxonômica sendo removida do grupo <i>P. pusilla</i> , passando a ser grupo irmão de <i>P. mystacalis</i> .
Cardozo e Toledo	2013	O canto de <i>P. riopiedadensis</i> foi igual ao observado por <i>P. ternetzi</i> e as comparações morfológicas não distinguiram as duas espécies, devendo <i>P. riopiedadensis</i> ser tratada como sinônimo júnior de <i>P. ternetzi</i> .

Andrade e Carvalho	2013	<i>P. facureae</i> pertence ao clado III 2n=18, distinguindo-se das espécies do grupo <i>P. saltica</i> por possuir pernas menores que os representantes desse grupo, encontrada apenas na localidade tipo no Município de Uberlândia e no Município de Limeira do Oeste, Minas Gerais.
Pansonato et al.	2013	<i>P. ameghini</i> , <i>P. mystacalis</i> e <i>P. saltica</i> são diagnosticadas por osteologia, morfometria, citogenética e bioacústica, sendo <i>P. ameghini</i> e <i>P. mystacalis</i> espécies com posições taxonômicas diferentes.
Pansonato et al.	2014a	Análises morfológicas e bioacústicas do canto de anúncio identificaram <i>P. mystacalis</i> em 15 localidades distribuídas pelos estados: Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Piauí e São Paulo, com ocorrência nos biomas Cerrado, Caatinga e Pantanal.
Pansonato et al.	2014b	Pela morfologia e citogenética, <i>P. atragula</i> e <i>P. facureae</i> são parecidas, entretanto ambas são diferenciadas e diagnosticadas como válidas por bioacústica e distância genética.
Veiga-Menoncello et al.	2014	O gênero <i>Pseudopaludicola</i> é monofilético, com quatro cladogramas conforme citogenética, variando de 2n = 22 a 2n = 16, com parafiletismo das espécies sem falange terminais em T em relação ao grupo <i>P. pusilla</i> .
De Carvalho et al.	2015a	<i>P. giarettai</i> é uma das maiores espécies de <i>Pseudopaludicola</i> , com variações no canto de anúncio, sendo a análise bioacústica o melhor meio de identificar a espécie das outras do gênero.
De Carvalho et al.	2015b	<i>P. parnaiba</i> , <i>P. canga</i> , <i>P. facureae</i> , <i>P. hyleaustralis</i> não são distinguíveis pela morfologia, entretanto a análise do canto distinguiu <i>P. facureae</i> de <i>P. hyleaustralis</i> , e ambas de <i>P. canga</i> e <i>P. parnaiba</i> , sendo as duas últimas indistinguíveis no canto de anúncio.
Santos et al.	2015	O gênero <i>Pseudopaludicola</i> é monofilético e dividido em quatro cladogramas conforme redução no número de cromossomos, 2n =22 a 2n = 16, correlacionando-se com a simplificação estrutural dos espermatozoides.
Langone, Camargo e De Sá	2016	O estudo filogeográfico em espécies de <i>P. falcipes</i> demonstrou baixa variação intraespecífica para considerá-las complexo de espécie, além de confirmar mais uma vez o monofiletismo do gênero <i>Pseudopaludicola</i> .
Andrade et al.	2016	A espécie <i>P. jaredi</i> é a terceira espécie do grupo <i>P. saltica</i> , devido ao comprimento alongado da tíbia, característico desse grupo, pertencendo, então, ao clado I, relacionando-se com espécies de 2n = 22.
Gomes et al.	2016	Espécies de <i>Pseudopaludicola canga</i> apresentam, em sua composição da região-controle (CR), repetições de sequências tandem (VNTRs).

Pansonato et al.	2016	A espécie <i>P. motorzinho</i> , devido a semelhanças com <i>P. boliviana</i> , era relatada a esse táxon, entretanto as análises bioacústicas e citogenéticas permitiram distinguir as duas espécies. <i>P. ibisoroca</i> é encontrada apenas na localidade tipo, pertencendo ao clado III (2n = 18), possuindo canto característico.
Andrade et al.	2018a	A filogenia obtida configurou <i>P. florencei</i> como grupo-irmão de <i>P. pocoto</i> , com a nova espécie pertencendo ao clado I.
Andrade et al.	2018b	A espécie <i>P. matuta</i> é diagnosticada por ausência da falange em T, pertencendo ao clado I como grupo-irmão de <i>P. mineira</i> .
Cardozo et al.	2018	A espécie <i>P. restinga</i> apresenta baixa divergência genética em comparação com espécies do clado I, sendo <i>P. pocoto</i> a espécie mais próxima a <i>P. restinga</i> .
Andrade et al.	2019	<i>P. jazmynmcdonaldae</i> pertence ao gênero <i>Pseudopaludicola</i> por presença do tubérculo hipertrofiado no antebraço e pelo pequeno tamanho de 12,8 e 14,8 mm. Distingue-se das espécies do grupo <i>P. pusilla</i> e <i>P. saltica</i> pela ausência de falanges terminais em T ou expansões laterais e pernas pequenas, respectivamente.
Andrade et al.	2020a	<i>P. parnaíba</i> relacionou-se como clado-irmão de <i>P. atragula</i> e <i>P. facurae</i> , sendo indistinguível de <i>P. canga</i> nas análises moleculares e bioacústicas, devendo ser tratada como sinônimo júnior dessa espécie. A espécie <i>P. coracoralinae</i> é diagnosticada como grupo-irmão de <i>P. atragula</i> e <i>P. facurae</i> , pertencendo ao clado I.
Andrade et al.	2020b	Espécies do grupo <i>P. saltica</i> encontram-se distribuídas nos biomas: Floresta Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal, e <i>P. boliviana</i> com ampla distribuição geográfica.

Fonte: autores

O *Scopus* apresentou o maior número de publicações, 45 no total. Em contrapartida, as pesquisas no banco do *Scielo* resultaram em apenas três, com duplicação de um trabalho. O *Web of Science* foi a segunda base com maior prevalência de publicações (38 no total), seguido pelo *PUBMED* com 12.

Houve predomínio de publicações em inglês, com 19 artigos. Quando buscados variações em língua portuguesa, apenas uma publicação foi encontrada com o descritor “*Pseudopaludicola* E taxonomia” na base do *Scielo*, todavia, com apenas título e resumo traduzidos no português.

A respeito da metodologia empregada, totalizaram nove artigos com técnicas moleculares e 12 com demais métodos, como análises morfológicas e bioacústicas. Majoritariamente, foram encontradas publicações descrevendo espécies, dois artigos sobre avaliações do canto de anúncio, cinco sobre revisão taxonômica no gênero, uma publicação voltada à caracterização citogenética e um estudo filogeográfico.

Para os descritores “*Pseudopaludicola mystacalis*” e variações, quatro publicações foram encontradas, sendo três repetidas (Tabela 1).

Abordagens moleculares com Pseudopaludicola

No estudo de Veiga-Menoncello *et al.* (2014), a filogenia do gênero foi avaliada com sequências dos genes 12S, 16S rRNA e tRNA^{val}, obtidos com a combinação dos iniciadores MVZ50/MVZ59, 12sL13/16sTitus I, 16sL2A/16sH10 e 16sAR/16sBR (Tabela 3). Além da validação do monofiletismo do gênero, os autores apontaram possíveis candidatos a espécies: *Pseudopaludicola sp. 1*, *Pseudopaludicola sp. 2* (aff *canga*) de Barreirinhas (MA), *Pseudopaludicola sp. 2* (aff *canga*) de Içém – SP, *Pseudopaludicola sp.* (aff *saltica*).

Tabela 3. Principais pares de primers utilizados na amplificação de mtDNA em espécimes de *Pseudopaludicola* / **Table 3.** Main pairs of primers used in the amplification of mtDNA in the specimens of the genus *Pseudopaludicola*.

Primers	Sequência 5´ - 3´	Gene Alvo
MVZ 50	TYT CGG TGT AAG YGA RAK GCT T	12S
MVZ 59	ATA GCA CTG AAA AYG CTD AGA TG	
12S-L48	ATG CAA GYM TCM GCR YCC CNG TGA	12S
12S-H978	CTT ACC RTG TTA CGA CTT RCC T	
tRNA-val	GGTGT AAGCG ARAGG CTTTK GTTAA G	tRNA ^{val}
MVZ59	ATA GCA CTG AAA AYG CTD AGA TG	12S
12S-L13	TTA GAA GAG GCA AGT CGT AAC ATG GTA	16S
16S-H10	TGA TTA CGC TAC CTT TGC ACG GT	
16sAR	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	16S
16sBR	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	
16sL2A	CCA AAC GAG CCT AGT GAT AGC TGG TT	16S
16S-H10	TGA TTA CGA TAC CTT TGC ACG GT	
12sL13	TTA GAA GAG GCA AGT CGT AAC ATG GTA	16S
16STitus I	GGT GGC TGC TTT TAG GCC	
Cytb-AL	GAA TYG GRG GWC AAC CAG TAG AAG ACC C	CR
Control-BH	GTC CAT TGG AGG TTA AGA TCT ACC A	
TyrC	GGC AGA GGA WCR TGC CAA GAT GT	Nuclear
TyrG	TGC TGG CRT CTC TCC ART CCC A	

Fonte: autores.

Outros estudos sobre descrições de espécies utilizaram dados moleculares. Na descrição e caracterização molecular da espécie *P. atragula*, o gene 16S rRNA foi obtido a partir de sequências da espécie antes relatada como *Pseudopaludicola* sp. 2 (aff *canga*). Essa avaliação demonstrou o táxon como uma nova espécie (PANSONATO et al., 2014b).

Na literatura avaliada, houve relato de dois estudos envolvendo os genes nuclear e o CR. O estudo filogeográfico de Langone, Camargo e De Sá (2015) com espécies de *P. falcipes* avaliou as espécies por meio dos genes 12S e 16S rRNA, por meio dos *primers* 16SAR/16SBR e 12SMVZ50/12SMVZ59, e do gene nuclear com o par TyrC/TyrG. No artigo sobre a evolução no gene CR do mtDNA, Gomes et al. (2016) amplificaram e sequenciaram o gene em populações de *P. canga* a partir dos *primers* Cytb-AL e Control-BH, evidenciando a presença de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*).

No trabalho de Andrade et al. (2016), a espécie *P. jaredi* fora analisada por filogenia e por comparações genéticas com os genes 12S e 16S rRNA, a partir de extração de DNA de fígado, amplificados com os *primers* MVZ50/MVZ59 e 16Sar/16SBr. De forma semelhante, a espécie *P. florencei* teve os genes ribossomais mitocondriais sequenciados para comparação genética com as demais espécies a partir dos iniciadores 12S-L48/12S-H978 e 16Sa-L/16Sb-H (ANDRADE et al., 2018a), sendo os mesmos *primers* utilizados para descrever *P. matuta* por Andrade et al. (2018b).

Cardozo et al. (2018) utilizaram oito novas sequências de 16S rRNA para identificação de *P. restinga*, amplificadas com 16Sar/16SBr, e posterior comparação com sequências das demais espécies de *Pseudopaludicola*. Na descrição da espécie *P. jazmynmcdonaldae*, Andrade et al. (2019) realizaram comparações morfológicas, bioacústicas e moleculares, com amplificação dos genes 12S e 16S. A espécie *P. coracoralinae* foi descrita, pertencendo ao gênero *Pseudopaludicola* pela presença de traços morfológicos característicos do gênero e pela avaliação molecular de mtDNA (genes 12S, 16S e tRNA-val) das espécies coletadas na localidade-tipo, a partir dos *primers* MVZ59/tRNA-VAL, 12S-L13/16S-H10 e 16Sar/16SBr (ANDRADE et al., 2020a), os mesmos iniciadores utilizados no artigo de Andrade et al. (2020b) para avaliar as espécies do grupo *P. saltica* e a espécie *P. boliviana*.

Mudanças taxonômicas no gênero

Espécies antes consideradas como *Pseudopaludicola* aff. *canga*, ocorrendo em Uberlândia (MG), foram avaliadas por Andrade e Carvalho (2013) a partir de descrição osteológica e bioacústica como novo táxon de *Pseudopaludicola*. Denominada *P. facureae*, a espécie possui canto característico e presença de $2n = 18$. Os autores salientaram que as populações de Uberlândia (MG) representam *P. facureae*, entretanto as espécies de *Pseudopaludicola* aff. *canga* de Içém (SP) diferem de *P. facureae*, sendo consideradas espécies não descritas, confirmado, posteriormente, por Pansonato et al. (2014b) como a nova espécie *P. atragula*.

P. jaredi antes denominada *Pseudopaludicola* sp. (aff *saltica*), após análise molecular, foi descrita como a terceira espécie pertencente ao grupo *P. saltica*, devido à baixa divergência genética com *P. saltica* e *P. murundu* (ANDRADE et al., 2016). A espécie *Pseudopaludicola* sp. 1 também foi reavaliada, agora descrita como *P. motorzinho*, espécie semelhante à *P. boliviana* (PANSONATO et al., 2016).

Com relação à *P. canga*, a espécie foi inicialmente relacionada ao grupo *P. pusilla*, todavia, a partir da sua descrição osteológica, Cardozo e Suárez (2012) removeram a espécie do grupo, devido à ausência do das falanges terminais no formato de T ou expansões laterais que caracterizam o grupo *P. pusilla*. Com a retificação, *P. canga* foi alocada no clado III. Conforme Veiga-Menoncello et al. (2014), tanto a ausência do caractere do formato da falange em T, quanto o número de cromossomos da espécie $2n = 18$ reforçam a posição de *P. canga* no clado III.

No trabalho de Cardozo e Toledo (2013), a posição taxonômica de *P. riopiedadensis* fora questionada quanto à validação. Conforme os autores, a espécie fora diagnosticada a partir de morfologia de duas fêmeas, apresentando semelhanças com espécies *P. ternetzi*. No estudo comparativo dos cantos de anúncio e da morfologia de ambas as espécies, não houve discernimento entre elas. Esse estudo comparativo reforçou a posição de *P. riopiedadensis* como sinônimo júnior de *P. ternetzi* (CARDOZO; TOLEDO, 2013).

P. serrana foi também revisada por Veiga-Menoncello *et al.* (2014). As análises moleculares de mtDNA não puderam esclarecer as relações entre *P. serrana* e *P. murundu*, sendo a primeira considerada sinônimo júnior da segunda, sinonímia confirmada por Pansonato *et al.* (2014a) a partir de comparações bioacústicas entre as espécies, dessa forma, ampliando-se a área de ocorrência de *P. murundu* para além da localidade-tipo. Na avaliação bioacústica de *P. giarettai*, Carvalho *et al.* (2015a) ampliaram os locais de ocorrência da espécie, antes encontrada apenas na localidade-tipo, além de demonstrar pequenas variações no canto de anúncio.

Nas comparações entre o canto de quatro espécies, foram distintas *P. facureae* de *P. hyleaustralis*, e ambas de *P. parnaiba* e *P. canga*, com as duas últimas não distinguíveis por bioacústica, levando à hipótese de pertencerem ao mesmo táxon (CARVALHO *et al.*, 2015b). A espécie *P. parnaiba* foi descrita por Roberto *et al.* (2013) a partir de morfologia e osteologia, até então sem dados genéticos para a espécie. Andrade *et al.* (2020a) avaliaram molecularmente essa espécie para comparação com sequências de *P. canga*. Nesse trabalho, as espécies ditas como *P. parnaiba* apresentaram baixa divergência genética de *P. canga*, com ambas no mesmo clado. Os achados reforçaram *P. parnaiba* como sinônimo júnior de *P. canga*.

No estudo de Pansonato *et al.* (2013), as espécies *P. mystacalis*, *P. ameghini* e *P. saltica* foram caracterizadas para elucidar as sinonímias e incertezas taxonômicas desses táxons. Os autores confirmaram as espécies como válidas a partir da combinação de dados morfológicos, osteológicos e bioacústicos, este último permitindo a retificação da sinonímia entre *P. mystacalis* e *P. ameghini*, sinonímia também removida por Veiga-Menoncello *et al.* (2014) a partir de análise molecular, com *P. ameghini* no clado II e *P. mystacalis* no clado IV, e também confirmado por Santos *et al.* (2015), pelas diferenças encontradas na estrutura dos espermatozoides entre as duas espécies.

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve aumento nos relatos de novas espécies do gênero *Pseudopaludicola*, consequências da implementação conjunta de dados morfológicos, osteológicos, citogenéticos e bioacústicos, aliado às análises sequenciais de DNA.

O termo DNA barcode originou-se após a implementação em filogenia molecular das análises com base em fragmentos do gene CO1 (HEBERT *et al.*, 2003). Apesar de utilizado em diferentes táxons com eficácia, em anfíbios, a abordagem do CO1 não contempla todas as espécies, sendo o gene 16S rRNA utilizado com essa finalidade (VENCES *et al.*, 2005). De forma análoga, registra-se, neste estudo, uma heterogeneidade na aplicação dos genes mitocondriais para identificação de espécies de *Pseudopaludicola*, com maior prevalência do gene 16S rRNA com relação aos demais. Nenhuma publicação foi encontrada utilizando-se o CO1, apenas um artigo abordava o gene CR, outro a análise de DNA nuclear e os demais abordavam os genes 12S e tRNAval, este último pouco recorrente nos estudos de taxonomia molecular.

O gênero *Pseudopaludicola* nem sempre teve posição definida na ordem Anura, atualmente pertencente à subfamília Leiuperinae como um grupo monofilético. Veiga-Menoncello *et al.* (2014)

caracterizaram o gênero com filogenia composta por quatro cladogramas correlacionados com a redução no número de cromossomos: clado I ($2n = 22$), clado II ($2n = 20$), clado III ($2n = 18$) e clado IV ($2n = 16$), com o grupo *P. pusilla* e *P. saltica* pertencendo ao clado I. Santos *et al.* (2015) realizaram um estudo comparativo entre a estrutura dos espermatozoides de espécies de *Pseudopaludicola*, a fim de contribuir com os achados da redução cromossomal apresentados por Veiga-Menoncello *et al.* (2014), demonstrando que, de maneira semelhante à redução do número diploide, há uma simplificação na estrutura dos espermatozoides das espécies.

Em relação a *P. mystacalis*, a espécie foi considerada sinônimo júnior de *P. falcipes* por Milstead (1963) a partir de análise morfológica, e com *P. ameghini* por análise bioacústica (HADDAD; CARDOSO, 1987). Todavia, Pansonato *et al.* (2013) apontaram que as análises bioacústicas de *P. ameghini* representavam o canto de *P. mystacalis*, o que levou a errônea identificação da espécie. Ademais, *P. mystacalis* tem ocorrência nos estados do Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Piauí e São Paulo, apresentando $2n = 16$, enquanto *P. ameghini* limita-se a regiões do Mato Grosso e da Bolívia, com $2n = 20$ (PANSONATO *et al.*, 2013; PANSONATO *et al.*, 2014a; FÁVERO *et al.*, 2011; FROST, 2021). A respeito da sinonímia entre *P. mystacalis* e *P. falcipes*, ambas são distintas por citogenética, com posições taxonômicas diferentes no clado IV ($2n = 16$) e clado I ($2n = 22$), respectivamente, com *P. falcipes* endêmica no bioma Pampa (LANGONE *et al.*, 2015) e *P. mystacalis* distribuída nos biomas Cerrado, Caatinga e Pantanal (PANSONATO *et al.*, 2014a).

5 CONCLUSÃO

No gênero *Pseudopaludicola*, a utilização de DNA para avaliação de espécies ampliou-se, com descrição de novas espécies e revisões de táxons no período de 2012 a 2020, com a maioria das espécies já possuindo DNA sequenciado e cadastrado no GenBank. Os genes mitocondriais foram os mais aplicados para filogenia ou comparações genéticas e os genes ribossomais 16S e 12S destacados dentre os demais, com prevalência do gene da subunidade maior. Congruente a isso, das espécies arquivadas no GenBank, todas possuem sequências cadastradas do gene 16S, se comparado ao 12S. Dentre os primers utilizados, os mais frequentes foram 16sAR/16sBR para o gene 16S e MVZ50/MVZ59 para o 12S. As análises moleculares demonstram-se essenciais para evitar erros de identificação de espécies de *Pseudopaludicola*, normalmente ocorridas a partir de metodologia centrada na morfologia ou bioacústica. Ademais, faz-se necessária a abordagem de diferentes métodos de investigação para melhor avaliação do gênero e, conseqüentemente, avaliação filogenética. A baixa incidência de dados moleculares para os genes 12S, tRNA^{val}, CO1 e CR reforça a necessidade de estudos envolvendo essas regiões gênicas.

6 AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de História Natural da UFPI (NHNUFPI) e à Universidade Federal do Piauí (UFPI), pelo auxílio para realização da pesquisa através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. S.; CARVALHO, T. R. de. A new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro (Leiuperinae: Leptodactylidae: Anura) from the Cerrado of southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3608, n. 5, p. 389-397, 2013.
- ANDRADE, F. S.; HAGA, I. A.; LYRA, M. L.; LEITE, F. S. F.; KWET, A.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; GIARETTA, A. A. A new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from eastern Brazil, with novel data on the advertisement call of *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel). **Zootaxa**, v. 4433, p. 71-100, 2018a.
- ANDRADE, F. S. de; MAGALHÃES, F. de M. de; NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; SANTANA, D. J.; GARDA, A. A.; LOEBMANN, D.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; GIARETTA, A. A.; TOLEDO, L. F. A new species of long-legged *Pseudopaludicola* from northeastern Brazil (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae). **Salamandra**, v. 52, n. 2, p. 107-124, 2016.
- ANDRADE, F. S. de; HAGA, I. A.; LYRA, M. L.; CARVALHO, T. R. de; HADDAD, C. F. B.; GIARETTA, A. A.; TOLEDO, L. F. A new species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae) from the state of Minas Gerais, Brazil. **European Journal of Taxonomy**, v. 480, p. 1-25, 2018b.
- ANDRADE, F. S. de; SILVA, L. A. da; KOROIVA, R.; FADEL, R. M.; SANTANA, D. J. A new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from na Amazon-Cerrado Transitional zone state of Tocantis, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 53, p. 68-80, 2019.
- ANDRADE, F. S. de; HAGA, I. A.; LYRA, M. L.; CARVALHO, T. R. de; HADDAD, C. F. B.; GIARETTA, A. A.; TOLEDO, L. F. Reassessment of the taxonomic status of *Pseudopaludicola parnaiba* (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae), with the description of a new cryptic species from the Brazilian Cerrado. **European Journal of Taxonomy**, p. 1-36, 2020a.
- ANDRADE, F. S. de; HAGA, I. A.; LYRA, M. L.; GAZONI, T.; ZARACHO, V.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; GIARETTA, A. A. Geographic distributions of *Pseudopaludicola boliviana* and congeneric long-legged species (Anura: Leiuperinae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, p. 1–17, 2020b.
- CARDOZO, D. E.; BALDO, D.; PUPIN, N.; GASPARINI, J. L.; HADDAD, C. F. B. A new species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperinae) from Espírito Santo, Brazil. **PeerJ**, 2018.
- CARDOZO, D.; SUÁREZ, P. Osteological description of *Pseudopaludicola canga* with implications for the taxonomic position of this taxon. **Zootaxa**, v. 3515, p. 75-82, 2012.
- CARDOZO, D.; TOLEDO, L. F. Taxonomic status of *Pseudopaludicola riopiedadensis* Mercadal de Barrio and Barrio, 1994 (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae). **Zootaxa**, v. 3734, n. 5, p. 571-582, 2013.
- DE CARVALHO, T. R.; MARTINS, L. B.; DA VEIGA TEIXEIRA, B. F.; GODINHO, L. B.; GIARETTA, A. A. Intraspecific variation in acoustic traits and body size, and new distributional records for *Pseudopaludicola giarettai* (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae): implication for its congeneric diagnosis. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 55, n. 17, p. 245-254, 2015a.

DE CARVALHO, T. R.; DA VEIGA TEIXEIRA, B. F.; MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. Intraspecific variation and new distributional records for *Pseudopaludicola* species (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae) with triled advertisement call pattern: diagnostic characters revisited and taxonomic implications. **North-Western Journal of Zoology**, v. 11, n. 2, 2015b.

FÁVERO, E. R.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; ROSSA-FERES, D. C.; STRÜSSMANN, C.; GIARETTA, A. A.; ANDRADE, G. v.; COLOMBO, P.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Intrageneric karyotypic variation in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae) and its taxonomic relatedness. **Zoological Studies**, v. 50, n. 6, p. 826–836, 2011.

FROST, D. R. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference, Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>>. Acesso em: 12/04/2021.

GOEBEL, A. M.; DONNELLY, J. M.; ATZ, M. E. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 163–199, 1999.

GOMES, C.; RODRIGUES-FILHO, L. F.; SODRÉ, D.; NECKEL-OLIVEIRA, S.; GORDO, M.; GALLATI, U.; SEQUEIRA, F.; VALLINOTO, M. Concerted evolution in the mitochondrial control region of the Amazon small-bodied frog *Pseudopaludicola canga* (Anura, Leiuperidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, p. 2470-1408, 2016.

HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J. Taxonomia de três espécies de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). **Pap. Av. Zool.**, v. 36, n. 24, p. 287-300, 1987.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 270, p. 313-321, 2003.

LANGONE, J. A.; CAMARGO, A.; DE SÁ, R. O. High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 95, p. 137-151, 2016.

LOBO, F. Analisis filogenetico del genero *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). **Cuad. Herp.**, v. 9, p. 21 – 43, 1995.

LYNCH, J. D. A review of the leptodactylid frogs of the genus *Pseudopaludicola* in northern South America. **Copeia**, v. 1989, n. 3, p. 577-588, 1989.

MILSTEAD, W. W. Notes on Brazilian frogs of the genera *Physalaemus* and *Pseudopaludicola*. **Copeia**, v. 1, p. 565-566, 1963.

NUÑEZ, D. L. R. Aplicabilidade da Sistemática Molecular. In: OSWALD, C. B.; DIAS, C. A. R.; GARBINO, G. T.; OLIVEIRA, J. C. P. de (Org.). **Princípios de Sistemática Zoológica**. Belo Horizonte: PGZoo UFMG, 2020, p. 1-77.

PANSONATO, A.; MUDREK, J. R.; SIMIONI, F.; MARTINS, I. A.; STRÜSSMANN, C. Geographical Variation in Morphological and Bioacoustic Traits of *Pseudopaludicola mystacalis* (Cope, 1887) and a Reassessment of the Taxonomic Status of *Pseudopaludicola serrana* Toledo, 2010 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae). **Advances in Zoology**, v. 2014, p. 1–13, 2014a.

PANSONATO, A.; MUDREK, J. R.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; ROSSA-FERES, D. de C.; MARTINS, I. A.; STRÜSMANN, C. A new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from northwestern state of São Paulo, Brazil. **Zootaxa**, v. 3861, n. 3, p. 249-264, 2014b.

PANSONATO, A.; STRÜSMANN, C.; MUDREK, J. R.; MARTINS, I. A. Morphometric and bioacoustics data on three species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) described from Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil, with the revalidation of *Pseudopaludicola ameghini* (Cope, 1887). **Zootaxa**, v. 3620, n. 1, p. 147-162, 2013.

PANSONATO, A.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; MUDREK, J. R.; JASEN, M.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; MARTINS, I. A.; STRÜSMANN, C. Two new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from eastern Bolivia and western Brazil. **Herpetologica**, v. 72, n. 3, p. 235-255, 2016.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543–583, 2011.

ROBERTO, I. J.; CARDOZO, D.; ÁVILA, R. W. A new species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae) from western Piauí State, Northeast Brazil. **Zootaxa**, v. 3636, n. 2, p. 348-360, 2013.

SANTOS, J. S. dos; INTROÍNI, G. O.; VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Ultrastructure variation in the spermatozoa of *Pseudopaludicola* frogs (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), with brief comments on its phylogenetic relevance. **Journal of Morphology**, v. 276, p. 1495-1504, 2015.

VEIGA-MENONCELLO, A. C. P.; LOURENÇO, L. B.; STRÜSMANN, C.; ROSSA-FERES, D. C.; ANDRADE, G. V.; GIARETTA, A. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A phylogenetic analysis of *Pseudopaludicola* (Anura) providing evidence of progressive chromosome reduction. **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 3, p. 261-272, 2014.

VENCES, M.; THOMAS, M.; MEIJDEN, A. V. D.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 5, 2005.