

UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA E MOLECULAR PARA CARACTERIZAR OS GIRINOS DA CAATINGA ALAGOANA

Marcos J. M. Dubeux^{1,2,3*}, Adel T. de Sirqueira-Filho¹, Luana R. Lima^{2,3,4}, Tamí Mott^{2,3,5}

1. Estudante de Ciências Biológicas no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ UFAL
2. Pesquisador no Laboratório de Biologia Integrativa/ UFAL
3. Pesquisador vinculado ao Museu de História Natural/ UFAL
4. Mestranda em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos/ UFAL
5. Professora adjunta do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ UFAL (Orientadora)

Resumo:

A identificação de girinos é dificultada pelo conhecimento limitado das suas características diagnósticas. Assim, a utilização do DNA *barcode* vem sendo empregada com sucesso em sua identificação. Nosso objetivo foi integrar dados morfológicos e moleculares para identificar os girinos da Caatinga alagoana e elaborar chaves de identificação para essa fase de vida. Foram coletados 370 girinos, identificados em 17 morfotipos utilizando caracteres merísticos e morfométricos. O DNA de pelo menos um representante por morfotipo foi extraído e um fragmento do gene mitocondrial 16SrRNA amplificado e sequenciado. A abordagem molecular identificou a nível específico cinco espécimes identificados morfologicamente a nível genérico e corroborou a identificação morfológica de nove espécimes; além de revelar a identificação equivocada de um espécime. As chaves dicotômicas foram elaboradas. A integração das abordagens se mostrou eficaz para a identificação de girinos na Caatinga do estado de Alagoas.

Autorização legal: SISBio/ICMBIO 32920 e CEUA 36/2015

Palavras-chave: Anfíbios, Fase larval, Taxonomia integrativa

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

A maioria dos anfíbios anuros apresenta duas fases distintas ao longo de sua vida, uma larval aquática denominada girino e uma adulta terrestre conhecida popularmente como sapo, rã e perereca (Pough et al., 2008). Atualmente 6.744 espécies da ordem Anura já foram descritas (Frost, 2017) e 95% desta diversidade apresenta uma fase larval (Altig & McDiarmid, 1999). Apesar dos girinos serem relativamente abundantes e apresentarem distribuição limitada aos corpos d'água, cerca de 40% das espécies neotropicais não apresentam o girino descrito (Rossa-Feres et al., 2015). Alagoas é o segundo menor estado brasileiro com aproximadamente 28 mil km², apesar disso 6% da diversidade de anfíbios brasileiros já foi registrada no estado, sendo seis espécies ameaçadas, oito topotípicas e quatro endêmicas (Almeida et al., 2016). Atualmente, 30 espécies de anfíbios anuros já foram registradas para a Caatinga alagoana e suas áreas de transição, sendo quatro endêmicas da Caatinga e uma somente com registro em áreas de transição (Almeida et al., 2016). Embora historicamente tenha sido considerado um domínio pobre e pouco diverso (Mares et al., 1985), estudos recentes vem revelando que na verdade existe um grande déficit de conhecimento e que certamente sua diversidade ainda é subestimada (Albuquerque et al., 2012; Roberto et al., 2013; Pedrosa et al., 2014; Almeida et al., 2016). O conhecimento incipiente acerca das características diagnósticas dos girinos, somada a presença de muitas espécies crípticas e a escassez de chaves de identificação dificultam a sua identificação utilizando apenas a morfologia externa (Altig & McDiarmid, 1999; Andrade et al., 2007). Entretanto, o método de DNA *barcode* (código de barras genético) no qual utiliza um fragmento do gene mitocondrial 16SrRNA e um dendrograma vêm auxiliando a identificação de espécies de anuros em Borneo, Madagascar, Espanha, Peru e sudeste do Brasil (Moravec et al., 2014; Lyra et al., 2016). Este método auxiliou a identificação de alguns girinos coletados no estado de Alagoas (Correia et al., 2014), mas ainda é necessário estudos adicionais com maior abrangência taxonômica e geográfica para que a eficiência desta técnica possa ser melhor validada. Desse modo, os objetivos do presente estudo são: 1. Caracterizar morfologicamente e molecularmente os girinos coletados na Caatinga alagoana. 2. Elaborar chaves de identificação de girinos para as espécies das famílias Bufonidae, Microhylidae e Odontophrynidae com ocorrência no estado.

Metodologia:

Oito expedições para coleta de girinos foram realizadas entre novembro de 2015 a maio de 2017 em cinco municípios situados na Caatinga e em seis municípios em áreas de transição entre a Mata Atlântica e a Caatinga alagoana. As coletas foram realizadas com o auxílio de um puçá e os girinos coletados foram armazenados em sacos plásticos contendo água da própria poça e transportados até o Laboratório de Biologia Integrativa, onde foram eutanasiados em cloridrato de lidocaína e separados em lotes de acordo com sua morfologia externa. De um a três espécimes por morfotipo por localidade tiveram um pedaço da musculatura caudal retirada e armazenada em álcool 92% para posterior análise molecular. Os demais espécimes do lote receberam um número de campo e foram armazenados em formol 10%. Para a caracterização morfométrica foram utilizados um paquímetro digital e um microscópio estereoscópio equipado com uma ocular milimetrada. Vinte e um caracteres morfométricos foram aferidos de cada girino seguindo o protocolo padronizado pela rede

temática Girinos de anuros da Mata Atlântica, da Amazônia, do Pantanal, do Cerrado e de Zonas de transição: Caracterização morfológica, distribuição espacial e padrões de diversidade (SISBIOTA BRASIL N°47/2010). O estágio de desenvolvimento dos girinos foi determinado seguindo a tabela de Gosner (1960) e a nomenclatura taxonômica seguiu Frost (2017). Para a elaboração das chaves de identificação, um total de 24 caracteres merísticos e quatro morfométricos foram analisados. Girinos entre os estágios de desenvolvimento de Gosner 26-40 coletados neste projeto, somados aos que se encontram disponíveis na Coleção Herpetológica do Museu de História Natural da UFAL (MHN-UFAL) e alguns artigos científicos de descrição foram utilizados. Para a abordagem molecular, o DNA genômico total de pelo menos um representante de cada morfotipo foi extraído através do método de fenol/clorofórmio. Após, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de um fragmento de 560 pares de base (pb) do gene mitocondrial 16SrRNA foi realizada. As amostras funcionais foram purificadas e enviadas ao Laboratório Central (LabCen) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para serem sequenciadas unidirecionalmente utilizando o método de Sanger após a reação do *Big Dye® terminator*. As sequências obtidas foram editadas e em seguida alinhadas no software BioEdit 7 com mais 52 sequências representantes de 24 espécies que apresentam registro para a Caatinga alagoana e suas áreas de transição e que se encontram disponíveis no banco de dados GenBank. Dois dendrogramas foram gerados através do método de Neighbour-Joining utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros no software MEGA 7, um apenas com as sequências de espécies das famílias Hylidae e Phyllomedusidae (por representar mais da metade da diversidade do Estado) e outro com as demais famílias. Esses agrupamentos foram validados através do método de *bootstrap* com 1.000 pseudoréplicas.

Resultados e Discussão:

Um total de 370 girinos representantes de oito gêneros e quatro famílias (Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae) foram coletados em sete municípios. Estes foram separados em 28 lotes e através da morfologia externa foi possível identificar 20 lotes a nível específico e oito apenas a nível genérico com o auxílio da literatura disponível. Estágio de desenvolvimento e caracteres morfométricos aferidos (de no mínimo um e no máximo vinte indivíduos por lote) foram aferidos.

Em Delmiro Gouvêia, oito morfotipos representantes de cinco gêneros e quatro famílias foram coletados em quatro dias de coleta. A maioria dos girinos foi encontrado em poças temporárias ao longo de formações rochosas e em açudes permanentes. A família Leptodactylidae foi a mais abundante sendo encontrado na maioria dos locais amostrados, sendo comumente encontrada em poças temporárias ao longo de estradas. Microhylidae foi representada apenas por uma espécie *Dermatonotus muelleri* sendo encontrada apenas em áreas de brejo com grande deposição de matéria orgânica vegetal. Os girinos desta espécie se encontravam no meio da coluna d'água. A presença de girinos nessas áreas pode estar associada ao comportamento semifossorial dos adultos e de se enterrar durante o período seco (Fabrezi et al., 2012). *Rhinella jimi* e *R. granulosa* foram as espécies mais abundantes (37% dos lotes coletados) sendo estas coletadas nos municípios de Arapiraca, Jaramataia, Traipu, Batalha e Delmiro Gouvêia. Estes bufonids foram encontrados principalmente em poças temporárias rasas formadas pelas chuvas ao longo do leito de rios secos e pequenos açudes formados em remanescentes. Ambas espécies são consideradas generalistas e reproduzem ao longo de todo o ano com um pico reprodutivo na estação chuvosa (Lima et al., 2005). Os girinos foram encontrados em cardumes na superfície da coluna d'água, geralmente associados a regiões com presença de gramíneas onde foi possível visualizar desovas envolvidas por um cordão gelatinoso, característica do gênero (Rodríguez e Duellman, 1994).

A. Chave de identificação de girinos da família Bufonidae para o estado de Alagoas:

1. Nadadeiras fusionadas no final da cauda e fórmula dentária 2(2) /3.....	2
1'. Nadadeiras não fusionadas.....	<i>Frostius pernambucensis</i>
2. Terceira fileira inferior de denticulos de comprimento menor ($p_3 < p_2 = p_1$).....	<i>Rhinella granulosa</i>
2'. Fileiras de denticulos inferiores de mesmo tamanho ($p_3 = p_2 = p_1$).....	3
3. Inserção da nadadeira dorsal na junção corpo/cauda.....	4
3'. Inserção da nadadeira dorsal no corpo.....	<i>Rhinella jimi</i>
4. Mandíbula superior em formato de arco amplo.....	<i>Rhinella crucifer</i>
4'. Mandíbula superior em formato de M.....	<i>Rhinella hoogmoedi</i>

B. Chave de identificação de girinos da família Microhylidae de Alagoas:

1. Abas semicirculares no lábio anterior desenvolvidas.....	2
1'. Abas semicirculares no lábio anterior pouco desenvolvidas.....	<i>Chiasmocleis alagoanus</i>
2. Inserção da nadadeira dorsal no fim do corpo.....	<i>Stereocyclops incrassatus</i>
2'. Inserção da nadadeira dorsal na cauda.....	<i>Dermatonotus muelleri</i>

C. Chave de identificação de girinos da família Odontophrynidae para o estado de Alagoas:

1. Abertura das narinas reniforme.....	2
1'. Abertura das narinas circular.....	<i>Macrogenioglottus alipioi</i>
2. Segunda fileira superior de denticulos com interrupção central.....	3
2'. Segunda fileira superior de denticulos não interrompida.....	<i>Odontophrynus carvalhoi</i>
3. Um par de reentrâncias no lábio posterior.....	<i>Proceratophrys renalis</i>
3'. Lábio posterior sem reentrâncias.....	<i>Proceratophrys cristiceps</i>

Para a análise molecular, 20 amostras representantes de 13 morfotipos foram selecionadas. Estas amostras foram identificadas morfológicamente como: *Scinax* sp.1 (AL659), *Boana* sp.1 (AL665), *B. sp.2* (AL675), *B. sp.3* (AL805), *B. crepitans* (AL829), *Dendropsophus* sp.1 (AL676), *D. minutus* (AL680, AL687), *Rhinella granulosa* (AL770, AL831, AL836), *R. jimi* (AL777, AL796, AL800, AL824, AL814), *Dermatonotus muelleri* (AL784), *Leptodactylus* sp.1 (AL476), *L. sp.2* (AL792) e *L. sp.3* (AL811). As amostras AL800, AL805 e AL811 não amplificaram com sucesso o gene almejado, por se tratarem das únicas representantes de seus respectivos morfotipos foi realizada uma segunda PCR, porém novamente não foi verificada a presença de amplicons. AL665 apresentou picos sobrepostos no eletroferograma impedindo assim sua confiabilidade e posterior análise.

O ponto de corte para distinguir espécies utilizando o método de *DNABarcode* deve ser baixo suficiente para distinguir todas as espécies inclusive as recém-emergentes e alto suficiente para incorporar toda a divergência intraespecífica (Fouquet et al., 2007). Três pontos de corte para divergência intraespecífica no gene 16SrRNA já foram sugeridos para anfíbios: 0% a 1% (Vences et al., 2005a), 5% (Vences et al., 2005b) e 3% (Fouquet et al., 2007; Vieites et al., 2009). No entanto ainda não há um consenso sobre qual ponto de corte deve ser utilizado. Assim, foram verificados todos os pontos de corte sugeridos e o ponto de corte entre 0% a 5% foi utilizado, pois as espécies aqui analisadas apresentam ampla distribuição geográfica (por exemplo *Leptodactylus fuscus* e *Dendropsophus minutus* ocorrem em quase toda a extensão da América do Sul).

Uma das principais características para distinguir espécies dentro do gênero *Dendropsophus* é a altura e o formato das nadadeiras dos girinos. O espécime AL676 apresentou a cauda danificada o que inviabilizou a sua identificação específica, sendo este indivíduo identificado apenas a nível genérico como *D. sp.1*. Sua sequência apresentou haplótipo idênticos com AL680 e AL687 identificados morfológicamente como *D. minutus*. Estas por sua vez se agruparam com coespecíficos importadas do GenBank apresentando menor distância genética (DG) de 1,1% com o espécime do Maranhão e corroborando suas identificações morfológicas.

O gênero *Boana* apresenta seis espécies com distribuição confirmada para Alagoas, muitas destas espécies são consideradas crípticas. O gênero é caracterizado por apresentar narinas reniformes com apófise grande e corpo elíptico em vista dorsal. O conhecimento incipiente acerca dos caracteres diagnósticos das espécies dificulta a sua identificação utilizando apenas a morfologia externa. Com o auxílio da abordagem molecular o espécime AL675 identificado morfológicamente apenas a nível genérico (*B. sp.2*) teve sua identificação específica revelada, apresentando haplótipos idênticos com a sequência de *B. albomarginata* proveniente de Pernambuco.

Micro-habitats similares geram características convergentes mesmo em espécies taxonomicamente não relacionadas, e a falta de conhecimento acerca de caracteres diagnósticos pode causar identificações equivocadas. Por exemplo, AL829 identificado morfológicamente como *Boana crepitans* apresentou DG nula com espécimes de *Corythomantis greeningi* do estado de Alagoas. *Corythomantis greeningi* não apresenta representantes disponíveis no acervo do MHN-UFAL o que inviabilizou a comparação direta entre os espécimes. Por meio de informações obtidas na literatura (Magalhães, 2014) verificamos que características como formato e altura das nadadeiras, formato do corpo em vista dorsal e lateral, posição do espiráculo, olhos, narinas e aparato oral são compartilhadas pelas espécies. As principais variações estão presentes no aparato oral, por exemplo, a fórmula dentária que em *C. greeningi* 6(6)/7-8(1) e em *B. crepitans* 2(2)/4(1), tal característica não pôde ser analisada devido ao avançado estágio de desenvolvimento dos espécimes do lote (estágios 42-43) no qual as fileiras de denticulos já estão desaparecendo. Através da análise molecular os indivíduos tiveram sua identificação revelada e este lote representa os primeiros representantes de *Corythomantis greeningi* no acervo do MHN-UFAL.

O espécime AL659 foi identificado morfológicamente como *Scinax* sp.1, porém apesar de se agrupar com sequências de cogenéricos não apresentou DG <5% com nenhuma das espécies com registro para a Caatinga alagoana e áreas de transição (24,6%-26,8%). Adicionalmente foi gerado outro dendrograma incluindo todas as espécies de *Scinax* com registro para o Estado (que apresentam sequências disponíveis no GenBank). AL659 se agrupou com sequências de *S. nebulosus* apresentando haplótipo idêntico com o espécime do Ceará e DG de 1,5% e 1,8% com os espécimes do Piauí e Guiana respectivamente. Após a obtenção dos dados foi realizada uma comparação morfológica direta entre o AL659 e girinos de *S. nebulosus* provenientes da Mata Atlântica alagoana depositados no MHN-UFAL e de fato, estes girinos de Limoeiro de Anadia são representantes de *S. nebulosus*, sendo este o primeiro registro para áreas de transição no estado de Alagoas. *Scinax nebulosus* é o único representante do grupo *Scinax rostratus* com ocorrência para o estado, sendo este caracterizado pela presença do braço labial, uma das sinapomorfias do grupo (Gomes et al., 2014).

Leptodactylus é um gênero de rãs com seis espécies com distribuição confirmada para Alagoas, destas, cinco já foram registradas para a Caatinga. A identificação específica dos leptodactylídeos é dificultada pela grande similaridade morfológica principalmente no aparato oral entre as espécies, que na maioria dos gêneros apresenta características espécie-específicas. A abordagem molecular auxiliou a identificação específica de dois espécimes identificados morfológicamente apenas a nível genérico. AL476 (*L. sp.1*) se agrupou com sequências de *L. fuscus* apresentando menor DG com um espécime de Pernambuco e maior com um espécime de Roraima (1,5% e 2,4% respectivamente). AL792 (*L. sp.2*) apresentou DG de 1,5% com o espécime de *L. macrosternum* proveniente de Roraima. A abordagem molecular corroborou também a identificação morfológica a nível específico de mais sete espécimes.

AL784 identificado morfológicamente como *Dermatonotus muelleri* se agrupou com sequências de

seus coespecíficos apresentando haplótipos idênticos com o espécime do Maranhão e DG de 3,0% com o espécime de Goiás. *Dermatonotus muelleri* apresenta uma ampla distribuição geográfica ocorrendo da Argentina, Paraguai, Bolívia até a região norte/nordeste do Brasil, isso explica a grande DG entre as populações.

Os espécimes identificados como *Rhinella granulosa* (AL831, AL836, AL770) e *R. jimi* (AL777, AL796, AL824) se agruparam com sequências de seus coespecíficos. *Rhinella granulosa* apresentou DG entre 0,6% e 1,2% entre si e DGs entre 4,9% e 5,5% com o espécime do Brasil. *Rhinella jimi* apresentou haplótipos idênticos com o espécime do Maranhão.

Conclusões:

A chave de identificação para as espécies pertencentes às famílias Bufonidae, Microhylidae e Odontophrynidae com registro no estado de Alagoas facilitará a identificação de girinos do nordeste brasileiro, além de contribuir significativamente para o conhecimento acerca dos caracteres diagnósticos destas espécies. Todos os lotes coletados e identificados utilizando as chaves de identificação elaboradas no presente estudo tiveram sua identificação morfológica corroborada pelo método de *DNAbarcode*.

A integração da abordagem molecular revelou a identificação específica de cinco espécimes (*Dendropsophus minutus*- AL676, *Boana albomarginata*- AL675, *Scinax nebulosus*- AL659, *Leptodactylus fuscus*- AL476, *L. macrosternum*- AL792) identificados morfológicamente apenas a nível genérico, e corroborou a identificação morfológica de outros nove espécimes AL680, AL687 (*Dendropsophus minutus*); AL784 (*Dermatonotus mulleri*); AL831, AL836, AL770 (*Rhinella granulosa*) e AL777, AL796, AL824 (*Rhinella jimi*), além de revelar a identificação de um espécime morfológicamente identificado de forma equivocada (AL829 - *Corythomantis greeningi*).

A caracterização e identificação de girino possibilitou registrar a ocorrência de uma espécie ainda não registrada para áreas de transição no estado de Alagoas (*Scinax nebulosus*- AL659), e reforça a importância do conhecimento acerca da fase larval dos anfíbios como ferramenta para inventários de fauna.

A integração de uma abordagem morfológica e molecular se mostrou eficaz para a identificação de girinos da Caatinga e suas áreas de transição no estado de Alagoas.

Referências bibliográficas

- ALBUQUERQUE, U.P.; LIMA ARAÚJO, E. de; EL-DEIR, A.C.A.; LIMA, A.L.A. de; SOUTO, A.; BEZERRA, B.M.; FERRAZ, E.M.N.; FREIRE, E.M.X.; SAMPAIO, E.V.D.S.B.; LAS-CASAS, F.M.G.; MOURA, G.J.B. de; PEREIRA, G.A.; MELO, J.G. de; RAMOS, M.A.; RODAL, M.J.N.; SCHIEL, N.; LYRA-NEVES, R.M. de; ALVES, R.R.N.; AZEVEDO-JÚNIOR, S.M. de; TELINOJÚNIOR, W.R.; SEVERI, W. 2012. Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. *The Scientific World Journal* 2012 (205182): 1-18.
- ALTIG, R.; MCDIARMID, R.W. 1999. Body plan. Development and morphology. Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. The University of Chicago Press, Chicago.
- ANDRADE, G. V., ETEROVICK, P. C., ROSSA-FERES, D. C., SCHIESARI, L. 2007. Estudos sobre girinos no Brasil: histórico, conhecimento atual e perspectivas. *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. vol. 1, p. 127-146.
- CORREIA, L.L.; RODRIGUES, G.D.V.; NASCIMENTO, F.A.C.; LANDELL, M.; MOTT, T. 2014. An integration of molecular and morphological data to identify tadpoles from Área de Proteção Ambiental do Catolé e Fernão Velho, Maceió, Alagoas, northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Resumo no II International Symposium on Evolutionary Biology*. V. 35.
- FABREZI, M., QUINZIO, S., GOLDBERG, J., DE SÁ, R. O. 2012. The development of *Dermatonotus muelleri* (anura: Microhylidae: Gastrophryninae). *Journal of Herpetology*, 46(3), 363-380.
- FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M.; & GEMMELL, N. J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, 2(10), e1109.
- FROST, D. R. 2017. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. > Acesso em 04 de agosto de 2017
- GOMES, M. D. R., ALVES, A. C. R., PEIXOTO, O. L. 2014. O girino de *Scinax nebulosus* (Amphibia Anura, Hylidae). *Iheringia, Sér. zool.* 184-188.
- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16.
- MARES, M.A.; WILLIG, M.R.; LACHER JR, T.E. 1985. The Brazilian Caatinga in South American zoogeography: tropical mammals in a dry region. *Journal of Biogeography* 12: 57-69.
- MORAVEC J.; LEHR E.; CUSI J. C.; CÓRDOVA J. H.; GVOŽDÍK V. 2014. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. *ZooKeys*, 371, 35.
- PEDROSA, I. M. M. de C.; COSTA, T. B.; FARIA, R. G.; FRANÇA, F. G. R.; LARANJEIRAS, D. O.; OLIVEIRA, T.C. S. P. de; PALMEIRA, C. N. S.; TORQUATO, S.; MOTT, T.; VIEIRA, G. H. C.; GARDA, A. A. 2014. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga III: The Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. *Biota Neotropica* 14(4): e20140046, 2014.
- POUGH F. H.; JANIS C. M.; HEISER J. B. 2008. *A Vida dos Vertebrados*. 4ª edição. Editora Atheneu.
- ROBERTO, I.J.; RIBEIRO, S.C.; LOEBMANN, D. 2013. Amphibians of the state of Piauí, Northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Biota Neotropica* 13(1): 322–330.
- ROSSA-FERES, D. DE C.; VENESKY, M.; NOMURA, F.; ETEROVICK, P. C.; CANDIOTI, M. F. V.; MENIN, M.; JUNCÁ, F. A.; SCHIESARI, L. C.; HADDAD, C. F. B.; GAREY, M. V.; ANJOS, L. A. DOS; WASSERSUG, R. 2015. Trazendo a biologia de girinos para o século 21: resultados e metas do Primeiro Workshop Internacional sobre Girinos. *Herpetologia Brasileira*. 4: 2, 35-47.
- VENCES M., THOMAS M., BONETT R. M., VIEITES D. R. 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462):1859-1868.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI Y.; VIEITES D. R. 2005b. Comparative performance e of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. Londres.
- VIEITES, D. R.; WOLLENBERG, K. C.; ANDREONE, F.; KOHLER, J.; GLAW, F.; VENCES, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (106) 20: 8267-8272.