



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL - REDE BIONORTE

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE POPULAÇÕES
RECONHECIDAS COMO *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) e *Scinax constrictus*
(Lima, Bastos & Giaretta, 2004) (Anura, Hylidae) ATRAVÉS DE
FERRAMENTAS MOLECULARES**

Tatiana Maria Barreto de Freitas

SÃO LUÍS-MA

2020

TATIANA MARIA BARRETO DE FREITAS

AVALIAÇÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE POPULAÇÕES RECONHECIDAS COMO *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) e *Scinax constrictus* (Lima, Bastos & Giaretta, 2004) (Anura, Hylidae) ATRAVÉS DE FERRAMENTAS MOLECULARES

Tese de doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências (Área de concentração: Biodiversidade e Conservação) pelo Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- Rede Bionorte pela Universidade Federal do Maranhão.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Magalhães Piorski
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Norberto Weber

SÃO LUÍS-MA

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Barreto de Freitas, Tatiana Maria.
AVALIAÇÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE POPULAÇÕES
RECONHECIDAS COMO *S. nebulosus* Spix, 1824 e *S. constrictus*
Lima, Bastos & Giaretta, 2004 Anura, Hylidae ATRAVÉS DE
FERRAMENTAS MOLECULARES / Tatiana Maria Barreto de
Freitas. - 2020.
91 f.

Coorientador(a): Luiz Norberto Weber.
Orientador(a): Nivaldo Magalhães Piorski.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2020.

1. Dados moleculares. 2. Filogenia. 3. Scinax. 4.
Status taxonômico. I. Magalhães Piorski, Nivaldo. II.
Weber, Luiz Norberto. III. Título.

TATIANA MARIA BARRETO DE FREITAS

AVALIAÇÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE POPULAÇÕES RECONHECIDAS COMO *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) e *Scinax constrictus* (Lima, Bastos & Giaretta, 2004) (Anura, Hylidae) ATRAVÉS DE FERRAMENTAS MOLECULARES

Este trabalho será julgado para obtenção do Grau de Doutora em Ciências com ênfase em Biodiversidade e Conservação do programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- Rede Bionorte

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nivaldo Magalhães Piorski -UFMA

Profa. Dra. Lígia Tchaika - UEMA

Prof. Dr. Jorge da Silva Nunes - UFMA

Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta - UEMA

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo - UFMA

Dedicatória

Dedico esta tese a meus pais,
E a minha filha,
Marina Barreto.

Agradecimentos

Escrever esses agradecimentos me faz lembrar do início... o quanto lutei para chegar até aqui. Muitos obstáculos apareceram e por vários momentos pensei em desistir. Mas não... não me deixaram desistir e estou aqui chegando ao fim do meu doutorado. Antes de tudo agradeço a Deus por ter permitido concretizar esse sonho e para isso tem colocado apenas pessoas especiais na minha vida e que de alguma forma contribuíram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Por me dar o equilíbrio necessário para finalizar essa etapa.

Agradeço à Universidade Federal do Maranhão e ao programa de Pós-Graduação - Rede Bionorte pela oportunidade de estudar, pesquisar e concluir o doutorado. A FAPEMA pela concessão da bolsa.

Agradeço aos meus orientadores, prof. Dr. Luiz Weber e prof. Dr. Nivaldo Piorski, ambos aceitaram minha proposta de trabalho, que foi modificada ao longo do tempo por motivos de força maior, mas que nunca deixaram de confiar no meu potencial. Agradeço imensamente a paciência de vocês, agradeço as palavras de apoio nos momentos em que eu achava que não iria conseguir. Ao prof. Luiz que mesmo distante se fazia presente sempre e ao prof. Nivaldo pela orientação nos momentos finais da tese.

Agradeço ao Etielle e Johnny pelas coletas em campo. Ao Laboratório de Herpetologia por oferecer condições para que essas coletas fossem realizadas.

Agradeço aos prof. Dr. Miguel Trefault (USP), profa. Dra. Ana Prudente (MPEG), Prof. Adrian Garda (UFRN), Prof. Hussam Zaher (USP), ao Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) pelas amostras cedidas para execução do meu trabalho.

Agradeço a profa. Dra. Iracilda Sampaio e a UFPA- Campus de Bragança pela parceria para execução da parte prática do meu trabalho. Assim como o auxílio da Luciana Watanabe, Lyca nas atividades no laboratório de Genética e Biologia Molecular no Campus de Bragança.

Agradeço a profa. Dra. Silma Regina por abrir as portas do seu laboratório para mim desde quando cheguei a São Luís para fazer um estágio, depois mestrado e também o doutorado sempre confiando no meu trabalho. Obrigada por permitir que eu utilizasse as dependências do Laboratório de Genética e Biologia Molecular para executar meu projeto. Luís, muito obrigada por sua mão de obra no laboratório!! Obrigada Santana, nossa mãe no laboratório!

Agradeço ao prof. Emmanuel Luz, meu orientador de Iniciação Científica na graduação, com o incentivo dele iniciei minha vida no âmbito da pesquisa.

Agradeço ao meu amigo, João Braúllio, pela parceria nas análises computacionais. Sua ajuda foi essencial para que eu chegasse até aqui. Pelas sugestões, leituras e orientações em todos os momentos desse doutorado. A minha querida amiga “Maria” Pinon pela amizade em todas as horas. Esse casal é DEZ!!

Agradeço a minha amiga, Ivana, pelos conselhos científicos. Você mora no meu coração.

Um agradecimento especial aos meus pais. Minha mãe querida, que amo mais que tudo, obrigada por estar ao meu lado em absolutamente todos os momentos da minha vida. Obrigada, mãe! Meu pai, que sempre tem as palavras certas para os momentos mais dolorosos. A pessoa que mais acreditou que eu chegaria até o fim. A pessoa que mais me incentivou. Que mais me deu forças. Talvez a única pessoa que sempre soube que esse dia chegaria. Obrigada, pai! Minha base são vocês!! Serei eternamente grata pela existência de vocês na minha vida.

E no meio desse doutorado eis que Deus me concedeu a graça de ser mãe. Através dela conheci o amor incondicional. Percebi que amor se dá sem pedir nada em troca. Depois de chegada da minha Marina aprendi a orar com mais fé, a pedir com mais vontade e a agradecer com mais frequência. Obrigada por existir na minha vida. Por tirar de mim um sorriso nos dias tristes. Por ser minha companhia todos os dias e todas as horas. Por ser a origem da minha força para lutar por dias melhores. Marina, minha princesa... é para você essa tese. É para você esse título.

Agradeço a todos os meus familiares, que de certa forma acompanharam essa trajetória e torceram por mim. A todos que porventura não tenha mencionado aqui, o meu coração é grato.

Epígrafe

“Posso, tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus
Desejou pra mim...”
Tudo posso, Pe. Fábio de Melo

RESUMO

O gênero *Scinax* Wagler, 1830, pertencente à subfamília *Scinaxinae*, família Hylidae é representado por 126 espécies descritas que ocupam áreas desde o México, Argentina e Uruguai, incluindo ainda Trinidad, Tobago e Santa Lucia. Devido à alta conservação morfológica e a contínua descoberta de novas espécies não descritas, o gênero atualmente é considerado um problema taxonômico. A espécie *Scinax constrictus* foi descrita como espécie distinta de *Scinax nebulosus*, porém sem muitas evidências morfológicas. Com isso, investigamos o status taxonômico de populações atualmente identificadas como *Scinax nebulosus* e *Scinax constrictus*, através da análise filogenética do gênero *Scinax*. A análise filogenética pode nos mostrar que *Scinax* permanece com sua característica monofilética mantida em todos os marcadores analisados e em todas as análises. A validade genética de *S. constrictus* e *S. nebulosus* também foi recuperada com valor de suporte elevado. As distâncias genéticas obtidas nos três marcadores indicam que *S. constrictus* e *S. nebulosus* são espécies distintas. As análises moleculares ajudaram na diferenciação de populações diagnosticadas como *S. constrictus* e *S. nebulosus*, apesar das semelhanças morfológicas de ambas as espécies. Além disso podemos sugerir através de análises de divergência genética sugerir que *S. nebulosus* pode se apresentar como um grupo de espécies crípticas devido às características genéticas encontradas. A existência de um mosaico de habitats heterogêneos pode explicar a divergência genética encontrada, o que justifica a existência de espécies crípticas neste grupo.

PALAVRAS-CHAVE: *Scinax*, status taxonômico, filogenia, espécies crípticas e marcadores moleculares.

ABSTRACT

The genus *Scinax* Wagler, 1830, belonging to the subfamily *Scinaxinae*, family Hylidae, is represented by 126 species that occupy areas from Mexico, Argentina and Uruguay, including Trinidad, Tobago and Santa Lucia. Resulting from high morphological conservation and the continuous discovery of new non-originated species, the genus is currently considered a taxonomic problem. A species of *Scinax constrictus* was found as a distinct species from *Scinax nebulosus*, however without much morphological evidence. Thus, we investigated the taxonomic status of populations identified as *Scinax nebulosus* and *Scinax constrictus*, through the phylogenetic analysis of the genus *Scinax*. Phylogenetic analysis can show us that *Scinax* remains with its monophyletic characteristic maintained in all analyzed markers and in all analyzes. The genetic validity of *S. constrictus* and *S. nebulosus* was also recovered with a high support value. The genetic distances obtained in the three markers indicate that *S. constrictus* and *S. nebulosus* are distinct species. Molecular analyzes helped to differentiate populations diagnosed as *S. constrictus* and *S. nebulosus*, despite the morphological similarities of both species. Furthermore, we can suggest, through genetic divergence analyzes, that *S. nebulosus* may present itself as a group of cryptic species due to the genetic characteristics found. The existence of a mosaic of heterogeneous habitats may explain the genetic divergence found, which justifies the existence of cryptic species in this group.

KEY WORDS: *Scinax*, taxonomic status, phylogeny, cryptic species and molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1- Árvore filogenética da família Hylidae, incluindo subfamílias e gêneros através de uma análise de máxima verossimilhança de 7 genes (CytB, CXCR4, H3A, NCX1, POMC, RAG1, Rho, SAI, SLC8a3 e Tyr). Em destaque as novas subfamílias descritas e os novos gêneros descritos. Retirado de Duellman et al. (2016).....17
- Figura 2: Hipótese filogenética da família Hylidae, proposta por Faivovich et al. (2005). Consenso das quatro árvores mais parcimoniosas das subfamílias Hylidae, e os quatro principais clados de Hylinae.....20
- Figura 3: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com destaque na subfamília *Scinaxinae*. Retirado de Duellmann et al., 2016.....22
- Figura 4: Árvore consenso modificada de Faivovich, 2002 ilustrando a divisão do gênero em dois Clados.....24
- Figura 5: Mapa de distribuição geográfica das espécies *S. nebulosus* e *S. constrictus* produzido com base em informações fornecidas pelo website [amphibiaweb](http://amphibiaweb.org).....26
- Figura 6: Esquema representativo da organização do genoma mitocondrial de vertebrados. Fonte: http://www.infoescola.com/genetica/dna-mitocondrial/acessado_em_16/10/2017.....29

CAPÍTULO II

- Figura 1: Amostragem dos espécimes de *S. nebulosus* e *S. constrictus* utilizadas nas análises filogenéticas.....35
- Figura 2: Árvore obtida a partir do gene 16S com valores de bootstrap significativos das análises IB e ML, respectivamente. Destacado em cores os clados monofiléticos e em preto outgroup e grupos parafiléticos. *S. crospedospilus* (cinza), *S. nebulosus* (vermelho), *S. constrictus* (azul), *S. acuminatus* (verde), *S. garbei* (preto), *S. proboscideus* (verde-claro), *S. jolyi* (preto), *S. kennedyi* (laranja), *S. rostratus* (azul-claro), *S. boulengeri* (preto), *S. fuscomarginatus* (verde), *S. squalirostris* (verde-claro), *S. boesemani* (roxo), *S. elaeochroa* (laranja), *S. wandae* (preto), *S. nasicus* (azul), *S. ruber* (rosa), *S. fuscovarius* (marrom), *S. signatus* (rosa-claro), *S. cruentomma* (marrom), *S. perereca* (laranja), *S. iquitorum* (verde-escuro), *S. chiquitanus* (rosa pink), *S. eurydice* (Lilás).....45
- Figura 3: Árvore obtida a partir do gene COI com valores de bootstrap significativos das análises IB e ML. Destacado em cores os clados monofiléticos e em preto outgroup e grupos parafiléticos. *S. nebulosus* (vermelho), *S. constrictus* (azul), *S. acuminatus* (verde), *S. cf. kennedyi* (laranja), *S. rostratus* (azul-claro), *S. fuscomarginatus* (verde), *S. maderae* (azul-claro), *S. wandae* (rosa), *S. nasicus* (azul), *S. ruber* (nude), *S. fuscovarius*

(marrom), <i>S. x-signatus</i> (rosa-claro), <i>S. alter</i> (ferrugem), <i>S. ruber</i> (rosa), <i>S. crospeospilus</i> (cinza) e <i>S. eurydice</i> (rosa).....	47
Figura 4: Árvore de espécies do gênero <i>Scinax</i> a partir do banco de dados concatenado com 16S e Rodopsina.....	48

CAPÍTULO III

Figura 1: Mapa identificando as localidades de origem dos espécimes de <i>S. nebulosus</i> utilizados nesse estudo.....	62
Figura 2. Rede de haplótipos para populações de <i>Scinax nebulosus</i> . As cores representam as seguintes populações: Branco: Maranhão, Azul: Alagoas, Amarelo: Pará; Verde: Mato Grosso, Vermelho: Goiás, Laranja: Rio Grande do Norte.....	64
Figura 3. Árvore de inferência bayesiana para o gene 16S das populações amostradas de <i>Scinax nebulosus</i> . As barras pretas representam os resultados das análises de delimitação de duas linhagens. Números em ramos indicam valores de probabilidade posteriores.....	67
Figura 4. Relógio molecular relaxado para o gene 16S das populações amostradas de <i>Scinax nebulosus</i>	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Origem das amostras e locais de coleta de indivíduos utilizados no presente estudo.....	35
Tabela 2: Distâncias genéticas entre pares de espécies <i>Scinax</i> , com base no COI.....	39
Tabela 3: Distâncias genéticas entre pares de espécies <i>Scinax</i> , com base no 16S.....	41
Tabela 4: Distâncias genéticas entre pares de espécies <i>Scinax</i> , com base na Rodopsina.....	43
Tabela 5: Modelos evolutivos utilizados para as reconstruções filogenéticas, aplicando os métodos de BI e ML.....	43

CAPÍTULO III

Tabela 1: Índices de diversidade genética obtidos para o gene 16S de populações de <i>Scinax nebulosus</i> usados no presente estudo. N = número de indivíduos, Hap = número de haplótipos, h = diversidade de haplótipos, π = diversidade de nucleotídeos.....	65
Tabela 2: Distância genética estimada (distância-p) para o gene 16S para populações de <i>Scinax nebulosus</i> nos locais listados abaixo. PA= Pará, MT= Mato Grosso, MA= Maranhão, AL= Alagoas, RN= Rio Grande do Norte, GO= Goiás.....	65
Tabela 3: Valores de AMOVA de populações de <i>Scinax nebulosus</i> usados no presente estudo.....	66
Tabela 4: Fst pareado estimado para o gene 16S para as populações de <i>Scinax nebulosus</i> usadas no presente estudo. PA= Pará, MT= Mato Grosso, MA= Maranhão, AL= Alagoas, RN= Rio Grande do Norte, GO= Goiás.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Anfíbios anuros: Importância biológica e distribuição	17
2.2. Problemáticas da família Hylidae Rafinesque, 1815	18
2.3. <i>Scinax</i> Wagler, 1830: distribuição e problemática taxonômica.....	21
2.4. Sistemática filogenética e o uso de marcadores moleculares para estudos com anfíbios anuros.....	26
CAPÍTULO I- Identificação do status taxonômico de <i>Scinax nebulosus</i> e <i>Scinax constrictus</i> (Scinaxnae, Anura) com base em marcadores moleculares	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1.Amostragem e Procedimentos moleculares	35
2.2. Amplificação e sequenciamento	36
2.3. Análises filogenéticas	37
3. RESULTADOS	37
4. DISCUSSÃO	48
5. REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO II- Dados moleculares revelam linhagens de <i>Scinax nebulosus</i> (Spix, 1824) (Anura: Hylidae) com diversificação Plio-pleistoceno em diferentes regiões brasileiras	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1.Amostragem de amostras e extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	61
2.2. Análise De dados.....	62
3. RESULTADOS	64
4. DISCUSSÃO	68
5. REFERÊNCIAS	70
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande número de espécies e à variação morfológica, os anfíbios anuros apresentam relações filogenéticas ainda não completamente estabelecidas, sendo objeto de estudo de vários trabalhos ao longo dos anos, provocando diversas mudanças taxonômicas dentro dos grupos (Guayasamin et al., 2009, Soares, 2018).

Segundo Frost (2020), a ordem Anura possui atualmente mais de 7 mil espécies identificadas. É um grupo de indivíduos com uma especialização no corpo para o salto, sendo esta uma característica esquelética muito evidente nos anuros. Os membros posteriores e os músculos associados formam um sistema de alavanca para impulsionar o animal, e especializações morfológicas estão associadas a esse tipo de locomoção: as pernas traseiras são alongadas com a tíbia e a fíbula fundidas (Lima et al., 2019).

A família Hylidae é uma das famílias mais diversificadas e amplamente distribuídas no mundo (Duellman et al., 2016), sendo constituída por sete subfamílias e com distribuição nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia, com 730 espécies descritas (Frost, 2020). Os representantes desse grupo variam em tamanho, e geralmente têm discos adesivos nas pontas dos dedos, que auxiliam na escalada (Faivovich et al., 2005).

Tendo em vista essa grande diversidade entre os anuros, um dos principais problemas na estimativa dessa diversidade são as espécies crípticas, ou seja, quando duas ou mais espécies são tratadas como apenas uma, devido à similaridade morfológica (Pfenninger & Schwenk, 2007). Para uma identificação adequada, a utilização de diversas metodologias (morfologia, bioacústica, anatomia interna e dados moleculares), se tornam imprescindíveis, pois a complexa biologia das espécies requer uma abordagem integrativa (Dayrat, 2005; Padial & De la Riva, 2009).

Dados moleculares possuem um grande potencial na taxonomia, principalmente marcadores padronizados como 16S e COI (Che et al., 2012; Funk et al., 2011). A identificação das linhagens, permite posteriormente uma análise mais detalhada de morfologia, bioacústica, osteologia, etologia, resultando na descrição de novas espécies (Elmer & Cannattella, 2008; Padial & De la Riva, 2009). Enquanto os genes nucleares possibilitam caracterizar com maior confiabilidade o relacionamento filogenético entre

diferentes níveis hierárquicos, bem como lançar mão de conceitos de espécies baseados em linhagens (Gamble et al., 2008).

Duellman et al. (2016) fizeram uma análise filogenética utilizando 19 genes em 503 táxons e seus resultados mostraram uma nova classificação possuindo 4 gêneros com 133 espécies descritas e a definição de uma nova subfamília, *Scinaxinae* (Figura 1).

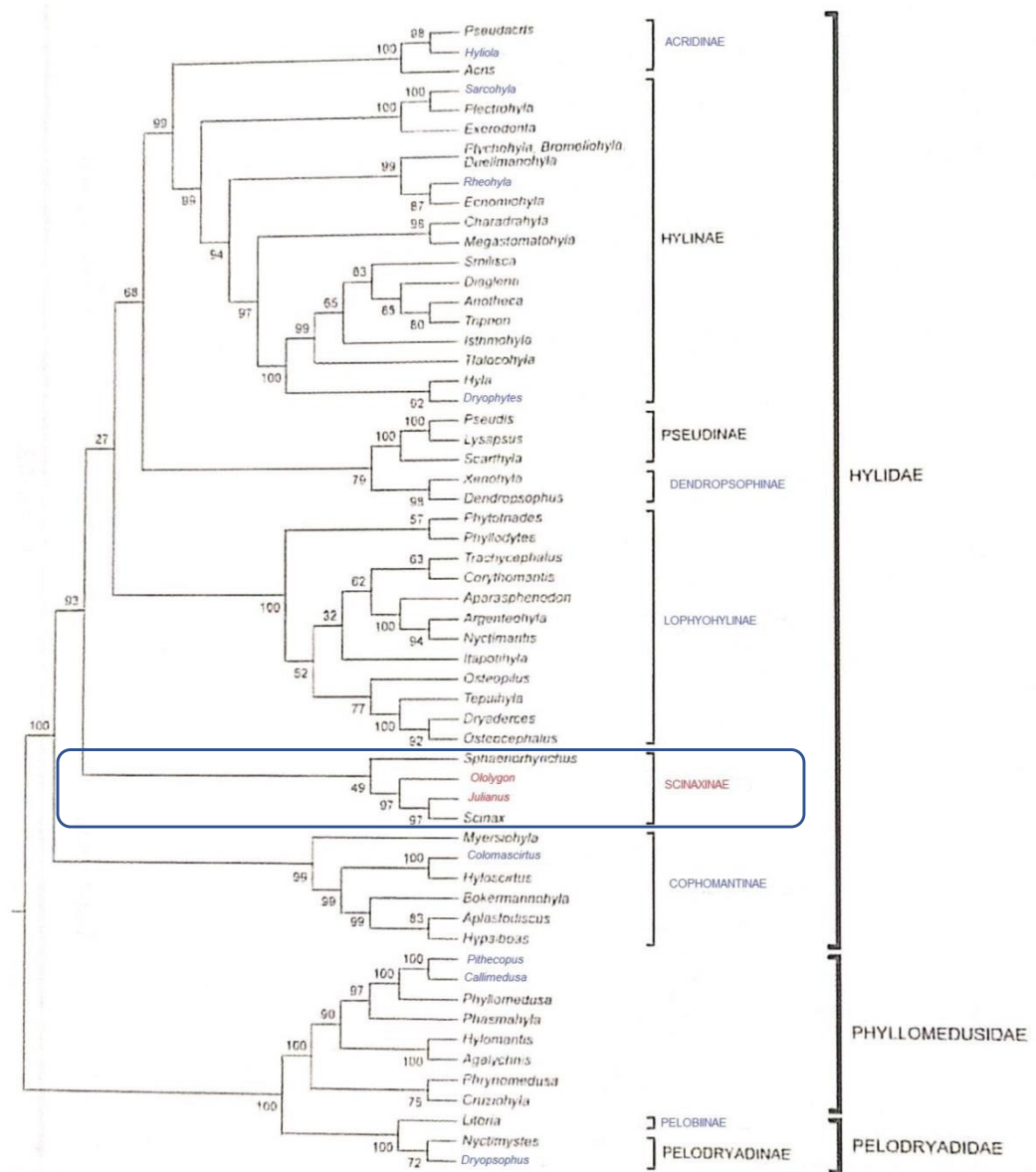


Figura 1: Árvore filogenética da família Hylidae, incluindo subfamílias e gêneros através de uma análise de máxima verossimilhança de 7 genes (CytB, CXCR4, H3A, NCX1, POMC, RAG1, Rho, SAI, SLC8a3 e Tyr). Em destaque as novas subfamílias descritas e os novos gêneros descritos. Retirado de Duellman et al. (2016).

Dentro do gênero *Scinax* identificamos as espécies *Scinax nebulosus* e *Scinax constrictus* com problemas na identificação taxonômica devido a grande semelhança

morfológica podendo apresentar-se como um complexo de espécies. Assim, nesta tese pretendemos investigar o status taxonômico de populações dessas espécies, através da análise filogenética do gênero *Scinax*, que corresponde ao primeiro artigo publicado na revista Brazilian Journal of Biology.

E no segundo artigo, identificamos que *S. nebulosus* pode apresentar variações interpopulacionais associadas a eventos climáticos do Plio-Pleistoceno, para isso, testamos essa hipótese utilizando dados moleculares, realizando uma análise da diversidade genética. Este artigo foi aceito para publicação na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anfíbios anuros: Importância biológica e distribuição

Os anfíbios são um grupo que apresenta alta diversidade de espécies, contabilizando aproximadamente 8.168 espécies de anfíbios descritos (Frost, 2020). Com distribuição geográfica ocorrendo em todos os continentes, exceto a Antártida. A maior diversidade e abundância ocorrem nas regiões de matas úmidas neotropicais, tais como as Florestas Amazônica e Atlântica. São espécies dependentes da água, principalmente durante a estação reprodutiva, agregam-se em brejos, lagoas ou poças temporárias durante esse período de seus ciclos vitais estabelecendo suas assembleias (Nunes et al., 2012).

Com essa imensa riqueza de espécies neotropicais, a taxonomia de anuros, principalmente em biomas brasileiros, necessita de estudos mais robustos, uma vez que, muitos dos atuais complexos de espécies ainda são baseados, principalmente, em estudos anteriores envolvendo poucos exemplares, com pouca cobertura das distribuições dos táxons analisados e que em muitos casos foram delimitadas baseados em poucas evidências morfológicas, levando muitos autores a propor que possivelmente o número de táxons reconhecidos é bem menor do que a atual diversidade, além de incertezas taxonômicas dentro de alguns grupos de espécies (Fouquet et al., 2007; Verdade & Rodrigues 2007; Cruz et al., 2012; Gehara et al., 2013).

Os registros sobre a validade taxonômica de muitas espécies de anuros seguem uma abordagem morfológica descritiva, geograficamente restrita a poucas e pequenas áreas, e nesse aspecto, variações em características morfológicas qualitativas e quantitativas são úteis em indivíduos poligenéticos por mostrarem uma plasticidade

oculta em relação aos fatores ambientais (Lougheed et al., 2006). Estudos que quantifiquem e entendam a distribuição espacial de características biológicas, como as proporções do corpo, são de ampla relevância, uma vez que o tamanho do corpo é uma característica altamente variável e que pode ser afetada por inúmeros aspectos como a idade, gênero, ambiente e ao mesmo tempo por numerosas influências ecológicas e evolutivas e, portanto, é uma propriedade fundamental em qualquer táxon por estar intimamente correlacionado com sua história de vida (Morrison & Hero, 2003; Nabil et al, 2011).

Espécies com ampla distribuição geográfica são modelos mais adequados de comparações morfométricas em níveis interespecíficos, por estarem expostas as diversas condições climáticas diferentes, estando sujeitas a diversos fatores que combinados resultam em muitos dos diferentes tipos de fitofisionomias ou variações morfométricas encontradas intra e interespecíes (Morrison & Hero, 2003; Bidau et al., 2011).

2.2. Problemática da família Hylidae Rafinesque, 1815

Dentre os anfíbios anuros, a família Hylidae Rafinesque, 1815 está entre as mais diversificadas e bem sucedidas que ocorrem em áreas da Europa, norte da África e da Ásia, América do Sul e Central, oeste da Índia, Austrália e Nova Guiné (Salducci et al., 2002; Duellmann et al., 2016). É constituída por aproximadamente 730 espécies, agrupadas em sete subfamílias (Frost, 2020).

De natureza arborícola, os hílideos possuem cabeça e olhos grandes e frequentemente membros alongados com cintura afinada. São extremamente variáveis no tamanho, atingindo de 1,7 a 14 cm de comprimento. A aparência externa dos hílideos também é variável, porém a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos é uma característica comum descrita na maioria das espécies, o que os diferencia facilmente das demais famílias (Lima et al., 2006; Soares, 2018).

A família Hylidae foi inicialmente dividida em quatro subfamílias: Amphignathodontinae, Hemiphractinae, Hylinae e Phyllomedusinae por Duellman (1970). Após os estudos de Trueb (1974) observou-se grande similaridade entre os indivíduos das subfamílias Amphignathodontinae e Hemiphractinae sugerindo, portanto, que fossem incluídas em uma mesma subfamília, a Hemiphractinae, reduzindo as subfamílias a três: Phyllomedusinae; Pelodyadinae e Hylinae (Figura 2). Nesta

classificação a subfamília Hylinae apresentou a maior quantidade de espécies dividida em tribos: Cophomantini, Lophiohylini, Hylini e Dendropsophini (Faivovich et al., 2005).

Após a revisão da sistemática dos hílideos baseada em análises cladísticas realizadas a partir de dados de sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais a tribo Cophomantini passou a abrigar os gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas* e *Myersiophyla* (Faivovich et al., 2005).

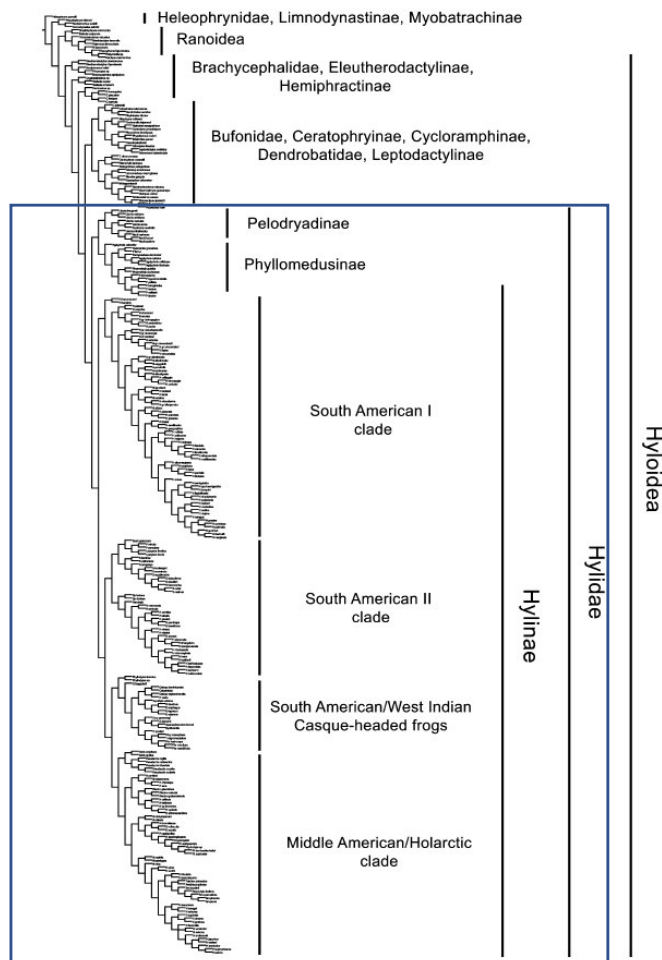


Figura 2: Hipótese filogenética da família Hylidae, proposta por Faivovich et al. (2005). Consenso das quatro árvores mais parcimoniosas das subfamílias Hylidae, e os quatro principais clados de Hyliinae.

A tribo Dendropsophini passou a agrupar os gêneros *Dendropsophus*, *Lysapsus*, *Pseudis*, *Scarthyla*, *Scinax*, *Sphaenorhynchus* e *Xenohyla*. Contudo, revisões moleculares demonstraram que o gênero *Pseudis* possui origem parafilética em relação ao gênero

Lysapsus, portanto, os espécimes de *Lysapsus* foram sinonimizadas ao grupo *Pseudis* (Aguilar Jr. et al., 2007).

A tribo Hylini contempla os gêneros *Acris*, *Duellmanohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Smilisca*, *Triprion*, *Bromeliohyla*, *Charadrahyla*, *Ecnomiohyla*, *Isthmohyla*, *Megastomatohyla* e *Tlalocohyla* (Smith et al., 2007; Faivovich et al., 2005). Na tribo Lophiohylini, estão os gêneros *Aparasphenodon*, *Argenteohyla*, *Corythomantis*, *Itapotihyla*, *Nyctimantis*, *Osteopilus*, *Phyllodytes*, *Tepuihyla*, *Osteocephalus* e *Trachycephalus*.

Salducci et al., (2002), Salducci et al. (2005) e Frost et al. (2006) realizaram uma análise filogenética de Hilídeos. Os dois primeiros utilizaram indivíduos da Guiana Francesa, e o terceiro traz uma nova classificação taxonômica de anfíbios combinando sequências de DNA mitocondrial e genes nucleares. Salducci et al. (2005) analisaram especificamente dois gêneros da subfamília Hyliinae, *Hyla* e *Scinax*, através de genes mitocondriais e nucleares, e Frost et al., (2006) utilizaram além de marcadores moleculares dados morfológicos.

Wiens et al., (2006) reconstruíram a filogenia 124 espécies de Hilídeos estimando tempos de divergência e taxas de diversificação dos clados utilizando três genes mitocondriais e cinco genes nucleares, analisando hilídeos da América do Sul e de regiões temperadas. Os resultados obtidos através desse estudo representam os mesmos clados principais encontrados por Faivovich et al. (2005) e Wiens et al. (2005). Em 2010, Wiens e colaboradores utilizaram na sua pesquisa 362 táxons de Hilídeos, incluindo 70 táxons adicionais reconstruindo a filogenia com 11 genes (4 mitocondriais e 7 nucleares), com isso através da análise de Máxima Verossimilhança obtiveram a mesma organização filogenética e bem suportada.

Recentemente a filogenia molecular da família Hylidae foi revisada por Duellman et al. (2016), apresentando uma nova classificação com novos gêneros e subfamílias baseada em 503 táxons em 19 genes. Atualmente Hylidae é constituída por sete subfamílias, 49 gêneros e até a sua publicação, 676 espécies descritas.

Das subfamílias pertencentes a ela, *Scinaxinae* Duellman, Marion and Hedges (2016) merece destaque, primeiramente por ter sido descrita recentemente e também dada sua diversidade com 133 espécies, o que se faz uma interessante característica para investigação de monofiletismo dos táxons atualmente reconhecidos e examinados, com

base no arranjo taxonômico aceito recentemente (Figura 3). Com quatro gêneros, dentre estes o novo gênero *Julianus* e *Scinax* sendo o gênero tipo.

Nesta nova classificação foram realizadas análises de Máxima Verossimilhança com 19 genes de 503 táxons que finalizou com a descrição desta nova subfamília. A família Hylidae, recebe essa nova unidade taxonômica englobando quatro gêneros, três destes com alto valor de suporte (97%) – *Julianus*, *Oloolygon* e *Scinax* – e o gênero *Sphaenorhynchus* com valor de suporte baixo (49%), tendo assim suas relações equívocas. Ainda neste trabalho, espécies do grupo *Catharinae* que pertencia ao gênero *Scinax*, passou a fazer parte do gênero *Oloolygon*.

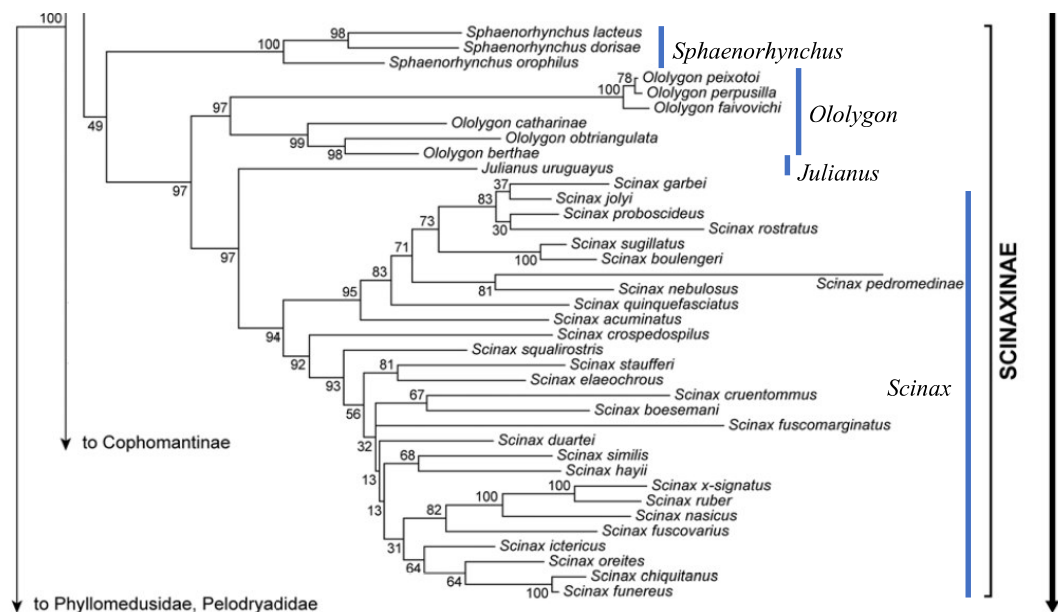


Figura 3: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com destaque na subfamília *Scinaxinae*. Retirado de Duellmann et al., 2016.

2.3. *Scinax* Wagler, 1830: distribuição e problemática taxonômica

Dentro desse contexto, o gênero *Scinax* Wagler, 1830 configura-se como um grupo de taxonomia controversa, com a classificação duvidosa de alguns táxons e várias incertezas taxonômicas resultantes do seu grande número de espécies crípticas, alta variabilidade morfológica intraespecífica, que em muitos casos ocupam extensos espaços ecológico-geográficos representando, na definição de Heyer & Reid (2003), ‘complexos’ de espécies.

Wagler (1830) propôs a criação do gênero *Scinax* baseado na análise de três espécies: *Hyla aurata* Wied, 1821; *Hyla varilosa* Spix, 1824 e *Hyla bipunctata* Spix, 1824. Posteriormente, Dunn (1933) reconheceu quatro espécies na América Central do gênero *Hyla* grupo *rubra*, o que mais tarde foi ampliado através de pesquisas realizadas por Cochran (1955, 1970), Duellman (1970, 1972a), Lutz (1968, 1973), Melin (1941), e Savage & Heyer (1967). Bokermann (1964) sugeriu uma relação do grupo *H. catharinae* com o grupo de espécies *H. rubra*.

Duellman & Wiens (1992) revalidaram o gênero *Scinax* sugerindo três sinapomorfias que apoiaram o monofiletismo de *Scinax* agrupando quase todas as espécies conhecidas em sete grupos de espécies (os grupos de *Scinax rubra*, *S. rostrata*, *S. catharinae*, *S. x-signata*, *S. perpusilla*, *S. rizibilis* e *S. Staufferi*). Todas as espécies do grupo *x-signata* foram transferidas para o grupo *rubra*, baseado na existência de semelhanças na morfologia e vocalizações (Pombal & Haddad, 2005). Os autores sugeriram, ainda, que as variações morfológicas, vocacionais e reprodutivas, indicam a presença de, pelo menos, dois grupos distintos dentro do atual gênero *Scinax*.

Faivovich (2002) em análise cladística, baseada em hipóteses filogenéticas e caracteres morfológicos, propôs a reorganização do gênero, sugerindo que os grupos denominados de *rubra* e *staufferi* seriam pobremente suportados. Dessa forma, resumiram o gênero a dois clados somente: O clado *catharinae* que abrange todos os representantes do grupo de *S. catharinae*, alguns indivíduos do grupo de *S. staufferi* (*Scinax agilis* e *Scinax berthae*) e um único representante do grupo de *S. perpusilla*; e o clado *ruber*, contendo todos os representantes do grupo de *S. rostrata*, do grupo de *S. rubra* e três espécies do grupo de *S. staufferi* (*S. squalirostris*, *S. staufferi* e *S. fuscomarginata*) (Figura 4).



Figura 4: Árvore consenso modificada de Faivovich, 2002 ilustrando a divisão do gênero em dois Clados.

Embora o reconhecimento e a identificação das espécies não sejam simples, novas espécies foram e são frequentemente descritas. A maioria das espécies do grupo *catharinae* ocorre no Brasil, com exceção de *S. berthae* Barrio, 1962, que também ocorrem em áreas abertas da Argentina, Uruguai e Paraguai (Brusquetti & Lavilla 2006; Carnaval & Moritz, 2008). No Brasil, espécies do grupo são distribuídas em manchas da Floresta Atlântica e no Cerrado, especialmente em matas de galeria (Caramaschi & Cardoso, 2006; Pombal et al.2010).

Faivovich et al. (2005) validaram a monofilia de *Scinax* com base em análises cladísticas usando dados moleculares e cinco sinapomorfias morfológicas. Nesse trabalho, mantiveram os clados *S. catharinae* e *S. ruber*. No entanto, reforçou a relação do grupo de *S. perpusilla* com o clado de *S. catharinae*, desfez os agrupamentos de *S.*

rubra e de *S. staufferi* deixando 45 espécies não associadas a nenhum grupo dentro do clado, e adicionou as espécies do grupo de *S. uruguayus* (Kolenc et al. 2004) ao clado *ruber*.

Além disso, os resultados confirmaram que o gênero pode ser dividido em dois cladogramas: o primeiro formado por espécies endêmicas da Mata Atlântica (*S. catharinae*) e o segundo clado formado por espécies com ampla distribuição na região Neotropical (*S. ruber*) (Faivovich et al. 2005). No entanto, *Scinax canastrensis* (Cardoso & Haddad, 1982), *Scinax centralis* (Pombal & Bastos, 1996), *Scinax luizotavioi* (Caramaschi & Kisteumacher, 1989), *Scinax machadoi* (Bokermann and Sazima, 1973), *Scinax pombali* (Lourenço et al., 2013) e *Scinax skaios*, (Pombal et al., 2010) pertencentes ao clado *S. catharinae*, já foram descritas para o cerrado brasileiro, habitando florestas de galeria (Cardoso & Pombal, 2010).

Ainda no estudo realizado por Faivovich et al (2005), foram descritas mais dez espécies de *Scinax*, nove descritas para o clado *ruber*, *S. cabralensis* Drummond et al., 2007, *S. cretatus* Nunes & Pombal, 2011, *S. imbegue* Nunes et al., 2012, *S. iquitorum* Moravec et al., 2009, *S. juncae* Nunes & Pombal, 2010, *S. rogerioi* Pugliese et al., 2009, *S. tigrinus* Nunes et al., 2010, *S. tymbamirim* Nunes et al., 2012 – e uma espécie incluída no grupo *rostratus* – *S. constrictus* Lima et al., 2004.

O grupo de espécies de *Scinax rostratus*, um dos grupos incluídos no clado *ruber* do gênero *Scinax*, foi reconhecido pela primeira vez por Duellman (1972b) sob o título de *Hyla rostrata*. Este grupo era constituído por seis espécies (*Hyla rostrata*, *H. proboscidea*, *H. boulengeri*, *H. garbei*, *H. epacrorrhina* e *H. egleri*). Fouquette & Delahoussaye (1977) julgaram o grupo de *S. rostratus* um agrupamento válido apoiado no formato dos espermatozoides que possuíam, segundo eles, uma cabeça de diâmetro praticamente uniforme ao longo do comprimento, aparentando um aspecto ou formato torpediforme ou de cigarro que diferia dos espermatozoides observados para os demais grupos.

Scinax nebulosus é uma espécie do clado *ruber*, grupo *rostratus*, que foi descrita por Spix em 1824, sob a designação de *Hyla nebulosa*. Desde sua descrição, a espécie foi caracterizada e renomeada diversas vezes, sendo reconhecida como *Hyla cynocephala*

para espécimes da Guiana (Duméril & Bibron, 1841); *Hyla egleri* para indivíduos coletados em Belém-PA (Lutz, 1968); foi redescrita como *Ololygon egleri* (Fouquette & Delahoussaye, 1977), bem como *Ololygon nebulosus* (Hoogmoed & Gruber, 1983) e *Scinax nebulosa* (Duellman & Wiens, 1992); até o status atual definido sob o nome de *Scinax nebulosus* (Köhler & Böhme, 1996). Este anuro com característica arborícola se distribui do sudeste da Venezuela, através das Guianas e da região do baixo Amazonas até Alagoas no nordeste do Brasil, com registros de ocorrência também para a Amazônia Boliviana (Duellman et al., 2016) (Figura 4).

Descrita recentemente por Lima, Bastos & Giaretta (2004), *S. constrictus* diverge do restante do grupo, por conta de sua distribuição geográfica atípica, que se sucede no bioma Cerrado, principalmente, nos municípios de Palmeiras (localidade-tipo), Guapó, Jussara, Mossâmedes, Pirenópolis, Pontalina, Porangatu e Uirapuru, todos no Estado de Goiás, além de Porto Alegre de Tocantins, no Estado do Tocantins (Figura 5).

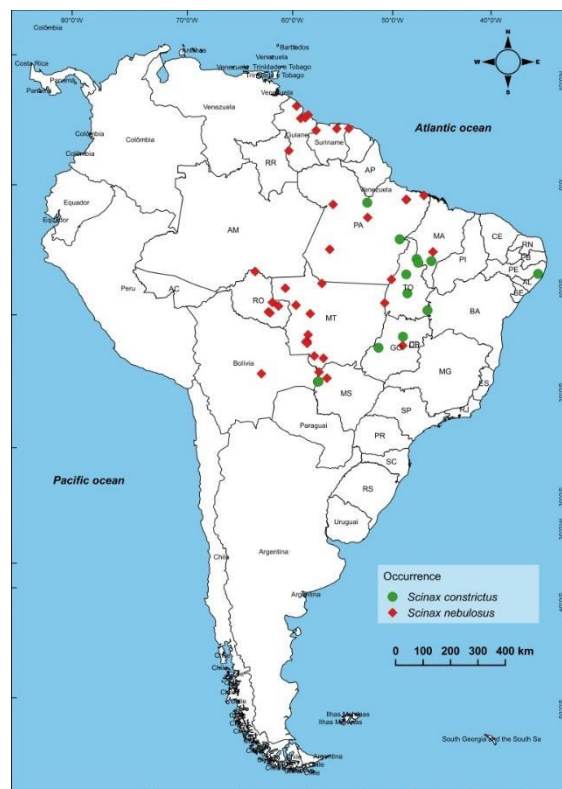


Figura 5: Mapa de distribuição geográfica das espécies *S. nebulosus* e *S. constrictus* produzido com base em informações fornecidas pelo website amphibiaweb.

2.4. Sistemática filogenética e o uso de marcadores moleculares para estudos com anfíbios anuros

A sistemática filogenética tem como objetivo explicar a diversidade da vida ao descobrir relações evolutivas entre espécies (Grant et al., 2006). A partir dos resultados destes estudos, é possível investigar efeitos filogenéticos relacionados à evolução taxonômica, sendo também muito importante na busca de conhecimento para conservação das espécies bem como para subsidiar medidas efetivas para esta finalidade.

Com o advento da biologia molecular estudos filogenéticos com anuros passaram a se tornar frequentes (Wiens et al., 2010; Pyron & Wiens, 2011), o que permite o uso de extenso número de táxons em comparação às análises morfológicas, abrangendo níveis cada vez mais amplos de classificação, como em Pyron & Wiens (2011).

Com relação à filogenia de Hylidae, houve progressos consideráveis. Faivovich et al. (2005) apresentaram uma filogenia para 226 espécies de hilídeos com base em cinco genes nucleares e três genes mitocondriais, e apresentaram uma classificação extensivamente revisada para esta família. Wiens et al. (2005) apresentaram uma filogenia para 169 táxons de Hylidae, com base em um conjunto de dados sobrepostos de táxons e caracteres a partir de dois genes nucleares, dois genes mitocondriais e dados morfológicos. Através dos resultados obtidos, os seguintes arranjos foram propostos: (1) as três subfamílias de hilídeos (Hylinae, Pelodyadinae, Phyllomedusinae), (2) um clado consistindo Pelodyadinae e Phyllomedusinae, e (3) vários grandes clados geralmente não reconhecidos taxonomicamente, mas reconhecidos como tribos dentro Hylinae, por Faivovich et al. (2005), dentre outros detalhados anteriormente.

Esta diversidade de anfíbios anuros necessita de estudos robustos, uma vez que muitos dos atuais complexos de espécies ainda são baseados em estudos envolvendo poucos exemplares, com pouca cobertura das distribuições dos táxons analisados e que em muitos casos, tais espécies foram delimitadas baseadas em poucas evidências morfológicas, levando muitos autores a supor que haja um número superestimado de táxons reconhecidos e algumas incertezas taxonômicas (Fouquet et al., 2007; Verdade & Rodrigues 2007; Cruz et al., 2012; Gehara et al., 2013).

Com o advento de técnicas moleculares associadas ao desenvolvimento de programas computacionais, estudos utilizando sequenciamento de genes mitocondriais e

nucleares (Bossuyt & Milinkovitch, 2000; Sá et al., 2005; Gvozdik et al., 2010; Faivovich et al., 2010) e microssatélites (Hikosaka & Kawahara, 2004; Conte, 2009) vêm ganhando espaço crescente em discussões sobre sistemática, taxonomia e biogeografia de diversas espécies de anfíbios. A utilização dessas técnicas tem se mostrado muito eficiente para detecção de espécies crípticas em populações de anuros, especialmente naquelas com ampla área de distribuição e para as quais análises morfológicas não apresentam conclusões significativas (Wynn & Heyer, 2001; Almeida et al., 2001).

O genoma mitocondrial (mtDNA) (Figura 6) compreende um conjunto de genes, amplamente utilizados em uma série de estudos, como análises filogenéticas, filogeográficas e populacionais, em estudos para detectar linhagens evolutivas e reconstruir relações filogenéticas. Estes também são utilizados para resolver genealogias entre organismos estreitamente relacionados, uma vez que apresenta algumas vantagens como a facilidade de isolamento em laboratório, apresentar ausência de recombinação e por apresentar rápida evolução em comparação ao DNA nuclear (Avice, 2000).

A taxa evolutiva das regiões codificadoras do DNAm, de acordo com estudos de evolução molecular, é cerca de quatro vezes maior do que as do DNA nuclear, podendo este número chegar a 10 vezes em regiões menos conservadas que acumulam substituições rapidamente e que não são codificantes, como por exemplo a região controle. E associados aos marcadores mitocondriais, a utilização de regiões variáveis no genoma nuclear vem sendo amplamente adotada nesses tipos de estudos por serem marcadores de contribuição biparental e de evolução mais lenta (Peixoto et al., 2003).

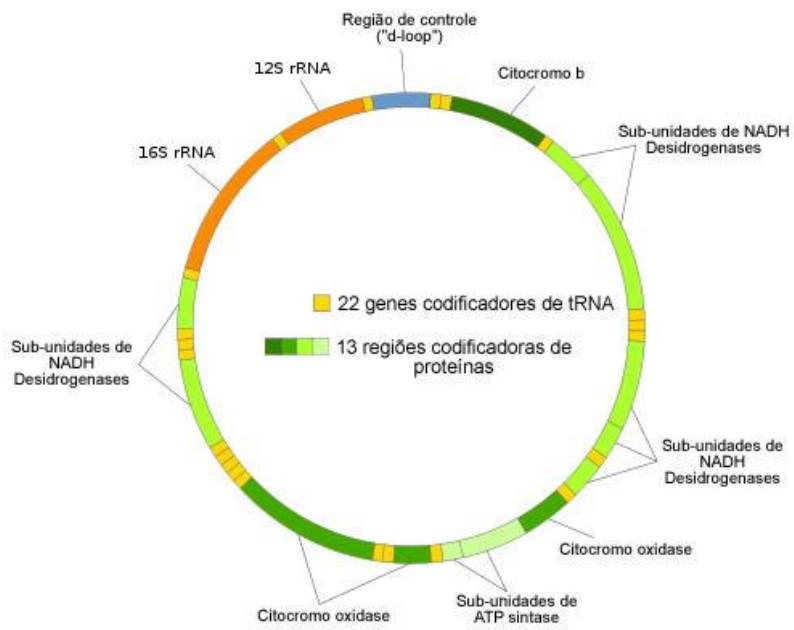


Figura 6: Esquema representativo da organização do genoma mitocondrial de vertebrados. Fonte: <http://www.infoescola.com/genetica/dna-mitocondrial/> acessado em 16/10/2019.

CAPÍTULO I

Identificação do status taxonômico de *Scinax nebulosus* e *Scinax constrictus* (Scinaxinae, Anura) com base em marcadores moleculares

Identification of the taxonomic status of *Scinax nebulosus* and *Scinax constrictus* (Scinaxinae, Anura) based on molecular markers

Artigo publicado na revista Journal Brazilian of Biology (artigo em anexo)

RESUMO

A validação de muitas espécies de anuros é baseada em uma análise morfológica e descritiva de um pequeno número de espécimes com uma distribuição geográfica limitada. O gênero *Scinax* Wagler, 1830 é um grupo controverso com muitos táxons duvidosos e incertezas taxonômicas devido ao grande número de espécies crípticas. Um exemplo são as espécies, *Scinax constrictus* (Lima, Bastos & Giaretta, 2004) e *Scinax nebulosus* (Spix, 1824), que compartilham uma morfologia similar. *Scinax constrictus* é restrito ao Cerrado brasileiro, enquanto *S. nebulosus* é amplamente distribuído pelo Norte da América do Sul. Apesar da validação de muitas espécies de anuros, a discriminação baseada apenas em características morfológicas é bastante difícil, devido à alta morfologia conservadora de alguns grupos. Neste contexto, o presente estudo utiliza genes mitocondriais e nucleares para fornecer um diagnóstico mais consistente e para testar a validade de *S. constrictus* como uma espécie distinta de *S. nebulosus*, bem como avaliar a posição destes táxons dentro do gênero *Scinax*. As topologias obtidas confirmaram o status monofilético de *Scinax* com base em todos os marcadores moleculares, em todas as abordagens analíticas, com altos níveis de suporte estatístico.

Palavras-chave: Anuros, espécies crípticas, filogenia, *Scinax*.

ABSTRACT

The validation of many anuran species is based on a strictly descriptive, morphological analysis of a small number of specimens with a limited geographic distribution. The *Scinax* Wagler, 1830 genus is a controversial group with many doubtful taxa and taxonomic uncertainties, due a high number of cryptic species. One example is the pair of species *Scinax constrictus* (Lima, Bastos & Giaretta, 2004) and *Scinax nebulosus* (Spix, 1824), which share a similar morphology. *Scinax constrictus* is restricted to the Brazilian Cerrado savanna, while *S. nebulosus* is widely distributed throughout northern South America. Despite the validation of many anuran species, discriminations based only on morphological traits is quite difficult due to the high conservative morphology of some groups. In this context, the present study uses mitochondrial and nuclear genes to provide a more consistent diagnosis and test the validity of *S. constrictus* as a distinct species from *S. nebulosus*, as well as evaluate the position of these taxa within the *Scinax* genus. The topologies obtained herein uphold the monophyletic status of *Scinax* based on all molecular markers assessed in this study, in all analytical approaches, with high levels of statistical support.

Key words: Anurans, Cryptic species, Phylogeny, *Scinax*.

1. INTRODUÇÃO

A sistemática filogenética busca evidências sobre as relações evolutivas entre as espécies, a fim de compreender os padrões de diversidade (Lourenço et al. 2015). Os anfíbios neotropicais são caracterizados por uma estruturação filogeográfica considerável e níveis profundos de divergência genética, que requerem muito tempo para a evolução das diferenças fenotípicas (Sá et al. 2014; Suk et al. 2019).

Os anfíbios neotropicais apresentam características morfológicas relativamente conservadas e, em muitos casos, traços diagnósticos confiáveis são difíceis de identificar (Nogueira et al. 2016), o que muitas vezes implica na existência de espécies crípticas, que têm sido cada vez mais identificadas nos últimos anos (Guarnizo et al. 2015; Pinto et al. 2019). Isso significa que a diversidade em nível de espécie é muito subestimada. Nesse contexto, as análises moleculares podem ser extremamente úteis para a identificação de variações crípticas em populações morfológicamente idênticas (Lima, 2011; Takazone, 2015; Bessa-Silva et al. 2016).

A família Hylidae Rafinesque, 1815 é um dos grupos de anuros mais diversos, encontrados na Europa, norte da África e Ásia, América do Sul e Central, oeste da Índia, Austrália e Nova Guiné (Salducci et al., 2002). É atualmente uma das mais diversas famílias de anuros, compreendendo cerca de 735 espécies. Quase metade dessas espécies (338 espécies em 27 gêneros) são encontradas no Brasil (Frost et al., 2020).

Recentemente, Duellman et al. (2016) propôs que o gênero *Scinax* Wagler, 1830 fosse excluído da subfamília Hyliinae e atribuído a uma nova subfamília, Scinaxinae, que contém 141 espécies descritas (Frost et al., 2020). Esta análise também apoiou um novo arranjo para espécies pertencentes ao gênero *Scinax*, que eram originalmente categorizadas em dois grupos, os clados *Scinax ruber* e *Scinax catharinae*. Nessa nova classificação, todo o clado *catharinae* foi reclassificado no gênero *Ololygon* (Duellman et al., 2016).

Apesar da revisão de Duellman et al. (2016), a validade de alguns táxons e sua posição no gênero *Scinax* permanecem sem solução. *Scinax nebulosus* Spix, 1824 e *Scinax constrictus* Lima et al., 2004 fazem parte do grupo *rostratus*, bem como *Scinax rostratus* Peters, 1863, *Scinax boulengeri* Cope, 1887, *Scinax garbei* Miranda-Ribeiro, 1926, *Scinax kennedyi* Pyburn, 1973, *Scinax jolyi* Lescure & Marty, 2000, *Scinax pedromedinae* Henle, 1991, *Scinax proboscideus* Brongersma, 1933, e *Scinax sugillatus*

Duellman, 1973. *Scinax nebulosus* é encontrado desde o sudeste da Venezuela, através das Guianas e da baixa bacia amazônica até o estado de Alagoas, no nordeste do Brasil, com alguns registros de ocorrência para a Amazônia boliviana (Faivovich et al., 2005). *Scinax constrictus* é encontrado exclusivamente em áreas de cerrado do Cerrado, com ampla distribuição no estado de Goiás.

Os caracteres diagnósticos tradicionalmente usados para identificar *S. nebulosus* e *S. constrictus* são inadequados para a diferenciação confiável dessas espécies, levando ao status taxonômico incerto de alguns espécimes de populações historicamente identificadas como pertencentes a uma das duas espécies. O uso crescente de dados moleculares reforçou a natureza enigmática da evolução da morfologia dos anfíbios (Menezes et al. 2016; Ferrão et al. 2016) e revitalizou o estudo da taxonomia. Muitos grupos de anfíbios são morfologicamente conservadores e isso, juntamente com seu alto grau de convergência, resultou em inúmeras interpretações errôneas da filogenia dos anuros quando baseadas exclusivamente em características morfológicas (Bossuyt & Milinkovitch, 2000; Guarnizo et al. 2015).

Como os caracteres morfológicos não são adequados para distinguir com segurança essas espécies, a validade genética de populações definidas como *S. constrictus* ou *S. nebulosus* foi testada no presente estudo usando dados nucleares e mitocondriais, uma vez que a falta de dados genéticos para essas espécies reforça a necessidade dessas análises, permitindo avaliações sobre o arranjo das espécies dentro do gênero *Scinax*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras e procedimentos moleculares

Os espécimes de *S. nebulosus* e *S. constrictus* foram obtidos por meio de doações e trocas com instituições científicas, e novos espécimes também foram obtidos através de coleta em campo (Figura 1, Tabela 1). Sua coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através da licença permanente número 52593-3. A amostragem abrange uma ampla variedade de localidades dentro da distribuição geográfica das espécies (Figura 1). As amostras foram complementadas pelas sequências de outras espécies do gênero *Scinax* para inferência filogenética de acordo com a nova classificação de Duellman et al., 2016, disponíveis no GenBank.

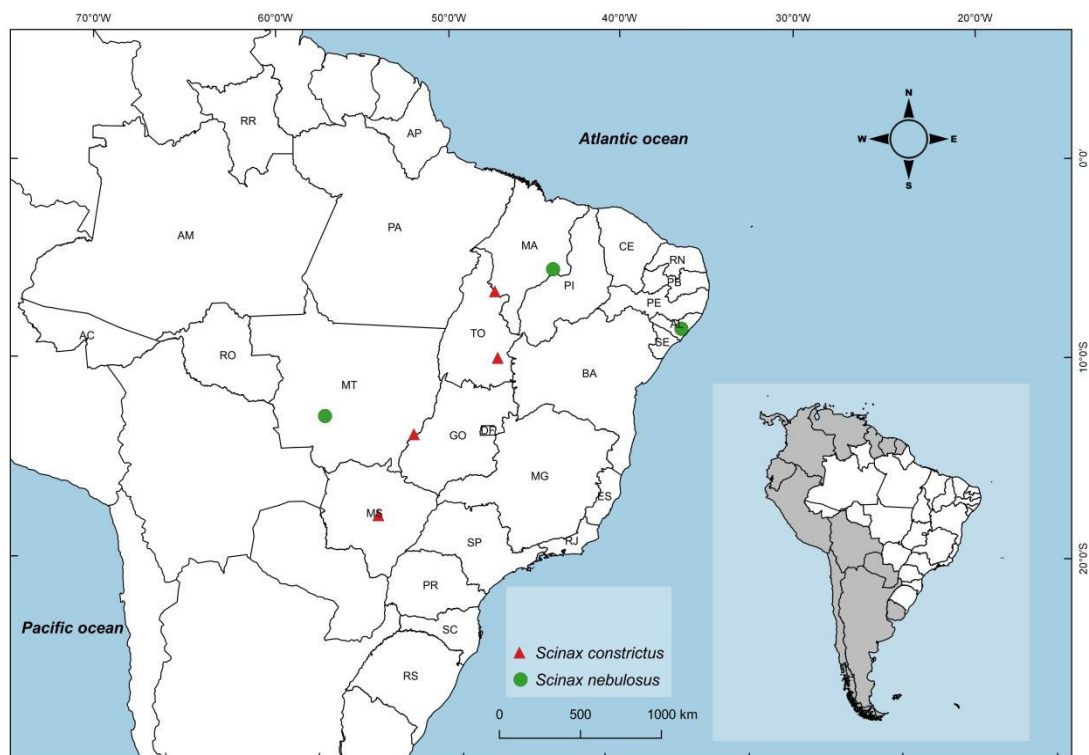


Figura 1: Locais de amostragem dos espécimes de *S. nebulosus* e *S. constrictus* incluídos nas análises filogenéticas.

No caso das amostras recém-coletadas, as amostras de tecido muscular foram extraídas dos membros posteriores e conservadas em álcool absoluto em microtubos de 1,5 ml. Os espécimes foram fixados em formalina a 10% e armazenados em etanol a 70% e posteriormente catalogados e depositados no acervo científico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Tabela 1: Origem das amostras e localidades das quais as amostras foram coletadas para análise no presente estudo

Coleção/Local de Coleta	Quantidade*
Coleção Herpetológica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)	14 amostras
Coleção Herpetológica da USP	16 amostras
Museu de Zoologia da USP (MZUSP)	15 amostras
Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ)	7 amostras

São Luís-MA	17 espécimes
Raposa-MA	12 espécimes
Mirador-MA	7 espécimes
São Luís-APA do Itapiracó-MA	1 espécime
Parauapebas-PA	3 espécimes
Total	92 amostras

Pseudis paradoxa, foi utilizado como grupo externo, representando um gênero hilídeo intimamente relacionado com base nas filogenias recentes publicadas para o gênero (Faivovich et al., 2005; Pyron e Wiens, 2011; Duellman et al., 2016). O DNA genômico foi isolado do tecido muscular usando um protocolo fenol-clorofórmio modificado por Sambrook & Russel (2001). Como observou-se a amplificação negativa de algumas amostras, foi aplicado um kit de purificação de DNA genômico Wizard®, usando o protocolo da cauda do mouse. A confirmação da extração do DNA e a determinação da quantificação e qualidade do material extraído foram baseadas em ensaios de eletroforese em géis de agarose a 1%.

3.2. Amplificação e sequenciamento

Dois genes mitocondriais (16S rRNA e Citocromo Oxidase I (COI)) e o gene nuclear Rodopsina (Rhod) foram analisados. Cada gene foi amplificado com um par de primers. Os primers descritos por Palumbi et al. (1991) foram utilizados para a região 16S, L1987-5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' e H2609-5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'. No caso do COI, foram utilizados os primers LCO-1490 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' e HCO-2198 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3' (Folmer et al., 1994) e, no caso da Rodopsina, os primers consistiram em Rhod1A 5'. ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC 3' e Rhod1C 5' CCAAGGGTAGCGAAGAARCCTTC 3', descrito por Bossuyt & Milinkovich (2000).

As reações de sequenciamento foram preparadas usando o kit ABI Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Uma vez

amplificadas, as amostras foram injetadas no sequenciador automático ABI 3500XL, resultando em um arquivo com sequências de bases e o cromatograma.

É importante ressaltar que, embora tenha sido feita extração o DNA genômico de todas as amostras e amplificado os três marcadores, em alguns casos, as condições das amostras ou o armazenamento de tecidos alteraram a qualidade do DNA extraído, o que refletiu na resolução da amplificação.

3.3. Análises filogenéticas

As sequências de DNA foram visualizadas usando o Codoncode 3.0 (Codoncode Corporation) e alinhadas no MAFFT (Katoh & Standley, 2013), seguidas de inspeção visual para detectar possíveis erros de identificação da base. Os loci variáveis foram verificados usando o software MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), e os valores de distância genética também foram calculados usando este programa.

Duas inferências filogenéticas foram aplicadas, inferência bayesiana (BI), através do software Mr. Bayes v.3.2 (Ronquist et al., 2012) e uma análise de máxima verossimilhança (ML), usando o programa PhyML v.3.0 (Guindon et al., 2010). O modelo evolutivo mais adequado para cada banco de dados foi identificado usando o jModeltest 2 (Darriba et al., 2012). Para a análise de ML, a confiabilidade de cada nó foi estimada usando um procedimento não paramétrico compreendendo 1000 repetições (Felsenstein, 1985). A Inferência Bayesiana foi baseada na amostragem MCMC em quatro séries simultâneas, cada uma com quatro cadeias com uma execução total de 10 milhões de gerações. As probabilidades bayesianas foram selecionadas com base em um consenso de 60%. Como medida conservadora, 25% das árvores iniciais foram descartadas. As pontuações de probabilidade de log foram plotadas no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2009) para confirmar a validade do período inicial de descarte das árvores usado no Sr. Bayes. As amostras restantes foram usadas para construir as árvores utilizadas no presente estudo.

Como o número de sequências obtidas para os diferentes marcadores variou, os resultados foram apresentados de duas maneiras diferentes: (i) árvores gênicas mitocondriais e (ii) uma árvore combinando os genes 16S e Rodopsina. Neste último

caso, apenas amostras de *S. constrictus* e *S. nebulosus* nas quais os genes 16S e Rodopsina foram amplificados foram incluídas nas análises.

Inconsistências entre árvores gênicas e análises de espécies baseadas em múltiplos loci são relativamente comuns em estudos evolutivos (Nichols, 2001). No presente estudo, as reconstruções filogenéticas foram comparadas usando o software BEAST v. 1.6.2 (Rambaut & Drummond, 2007), a fim de avaliar as relações entre as amostras (*BEAST) (Heled & Drummond 2010). Foram realizadas execuções de 80 milhões de gerações, com amostras sendo recuperadas a cada 10.000 gerações, das quais 10% foram descartadas. As execuções foram analisadas para possíveis cortes, utilizando o Tracer v.1.6, disponível no programa BEAST (Rambaut & Drummond, 2007), para verificar se o Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) era adequado, em todos os casos. Todas as árvores geradas no presente estudo foram editadas no Figtree v.1.3.1.

4. RESULTADOS

O banco de dados incluiu 477 pares de bases (bps) para o gene 16S, 615 bps para COI e 295 bps para Rodopsina. O banco de dados 16S + Rhod concatenado continha 772 bps. A maior distância genética foi registrada para o marcador COI (Tabela 2), com divergência de 12,7% entre *S. nebulosus* e *S. constrictus*. No caso do gene 16S (Tabela 3), a divergência foi de 4,7%, enquanto no gene da rodopsina, a distância genética entre as duas espécies foi de apenas 1% (Tabela 4).

Tabela 2: Distâncias genéticas entre pares de espécies Scinax, com base no COI. Os códigos de espécies são os seguintes: Sco (*Scinax constrictus*), Sne (*S. nebulosus*), Sru (*S. ruber*), Swa (*S. wandae*), Sal (*S. alter*), Scfke (*S. cf. kennedyi*), Sro (*S. rostratus*), Sac (*S. acuminatus*), Sna (*S. nasicus*), Sfv (*S. fuscivarius*), Sfm (*S. fuscocomarginatus*), Scr (*S. crospeospitus*), Seu (*S. eurydice*), Sma (*S. maderae*), Ssq (*S. squalirostris*), Sxs (*S. x-signatus*).

	Sco	Sne	Sru	Swa	Sal	Scfke	Sro	Sac	Sna	Sfv	Sfm	Scr	Seu	Sma	Ssq
Sne	0.127														
Sru	0.266	0.292													
Swa	0.260	0.262	0.248												
Sal	0.309	0.311	0.249	0.237											
Scfke	0.234	0.252	0.270	0.258	0.263										
Sro	0.222	0.227	0.262	0.239	0.235	0.079									
Sac	0.239	0.251	0.241	0.215	0.262	0.180	0.179								
Sna	0.252	0.295	0.186	0.224	0.238	0.266	0.272	0.273							
Sfv	0.264	0.294	0.209	0.227	0.264	0.267	0.252	0.238	0.220						
Sfm	0.280	0.310	0.236	0.231	0.213	0.265	0.252	0.229	0.264	0.256					
Scr	0.277	0.275	0.258	0.237	0.196	0.292	0.264	0.262	0.245	0.260	0.235				
Seu	0.283	0.304	0.257	0.224	0.227	0.245	0.238	0.227	0.234	0.213	0.224	0.224			

Sma	0.302	0.308	0.252	0.224	0.233	0.263	0.263	0.239	0.280	0.195	0.274	0.212
Ssq	0.264	0.279	0.254	0.219	0.218	0.273	0.267	0.255	0.254	0.230	0.271	0.222
Sxs	0.230	0.273	0.217	0.230	0.240	0.242	0.222	0.214	0.150	0.237	0.262	0.211
												0.281
												0.250

Tabela 3: Distâncias genéticas entre pares de espécies Scinax, com base no 16S. Os códigos de espécies são os seguintes: Sne (*S. nebulosus*),

Sco (*Scinax constrictus*), Scr (*S. crospeospilus*), Sel (*S. elaeochroa*), Swa (*S. wandae*), Siq (*S. iquitum*), Sch (*S. chiquitanus*), Ske (*S. kennedyi*), Sro (*S. rostratus*), Sac (*S. acuminatus*), Sna (*S. nasicus*), Sfm (*S. fuscomarginatus*), Sbo (*S. boesemani*), Sbou (*S. boulengeri*), Sjo (*S. jolyi*), Scro (*S. crospeospilus*), Seu (*S. eurydice*), Sga (*S. garbei*), Sfv (*S. fuscivarius*), Spro (*S. proboscideus*), Spe (*S. perereca*), Sru (*S. ruber*), Sxs (*S. x-signatus*), Sst (*S. staufferi*), Ssq (*S. squalirostris*)

	Sne	Sco	Scr	Sel	Swa	Siq	Sch	Ske	Sro	Sac	Sna	Sfm	Sbo	Sbou	Sjo	Scro	Seu	Sga	Sfv	Spro	Spe	Sru	Sxs	Sst
Sco		0.047																						
Scr	0.197	0.187																						
Sel	0.16	0.165	0.154																					
Swa	0.175	0.172	0.167	0.102																				
Siq	0.157	0.156	0.107	0.104	0.12																			
Sch	0.198	0.207	0.179	0.146	0.151	0.114																		
Ske	0.126	0.11	0.179	0.198	0.21	0.189	0.214																	

Tabela 4: Distâncias genéticas entre pares de espécies Scinax, com base na Rodopsina. Os códigos de espécies são os seguintes: Sne (*S. nebulosus*), Sco (*Scinax constrictus*), Sru (*S. ruber*), Seu (*S. eurydice*), Sga (*S. garbei*), Sst (*S. staufferi*), Ssq (*S. squalirostris*), Sna (*S. nasicus*), Sfv (*S. fuscovarius*), Sbou (*S. boulengeri*), Sac (*S. acuminatus*).

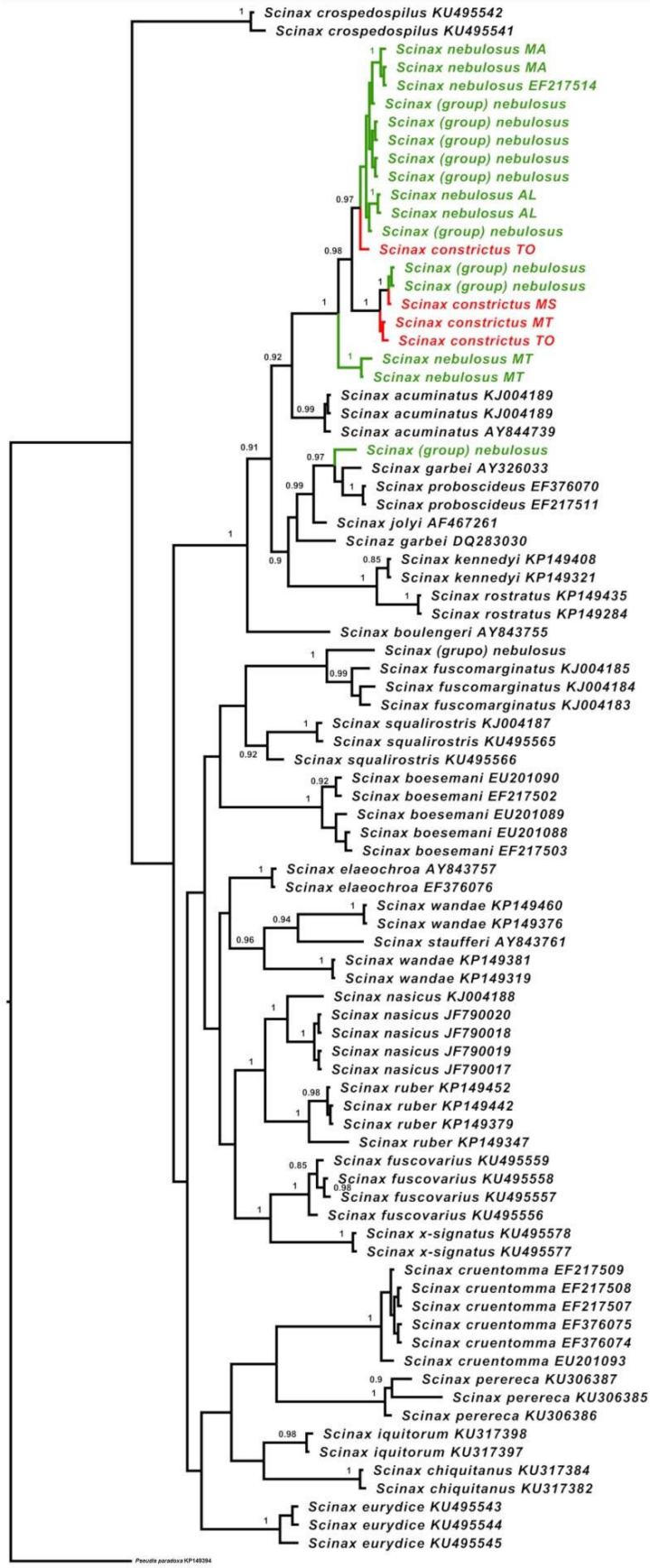
	Sne	Sco	Sru	Sel	Sga	Sst	Ssq	Sna	Sfv	Sbou
Sco	0.01									
Sru	0.02	0.02								
Sel	0.02	0.02	0.01							
Sga	0.02	0.02	0.02	0.02						
Sst	0.02	0.03	0.02	0.01	0.02					
Ssq	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01				
Sna	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01			
Sfv	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
Sbou	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	
Sac	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0.01	0.02	0.01

O mesmo modelo evolutivo foi selecionado pelo jModelTest 2 para os genes COI e Rodopsina, e para o gene 16S foi selecionado um modelo diferente (Tabela 5). Como as topologias recuperadas pelas duas abordagens analíticas (IB e ML) eram altamente consistentes e muito semelhantes umas às outras, apenas as árvores de IB são apresentadas aqui. As árvores ML podem ser fornecidas mediante solicitação.

Tabela 5: Modelos evolutivos utilizados para as reconstruções filogenéticas, aplicando os métodos de BI e ML.

Marker	AIC Evolutionary model (ML)	BIC Evolutionary model (BI)	-lnL values (ML/IB)
16S	TIM2+I+G	TIM2+I+G	4014.5271/ 4014.5271
COI	TrN+I+G	TrN+I+G	6761.4570 /6761.4570
Rhod	TrN+I+G	TrNef+G	791.6834/ 798.3193

Scinax se mostrou monofilético em todas as topologias derivadas de todos os diferentes marcadores genéticos e em todas as abordagens analíticas. Em relação à árvore filogenética de IB obtida para o marcador 16S, várias espécies *Scinax* também formaram grupos monofiléticos bem suportados. Nesta topologia, *S. nebulosus* e *S. constrictus* formam um clado bem suportado, no qual ambas as espécies tendem a formar grupos naturais (Figura 2). Espécimes mal identificados (rotulados como *S. gr. nebulosus*) foram agrupados com *S. nebulosus* ou *S. constrictus*. Alguma estruturação foi observada para amostras de *S. nebulosus*. Espécimes do nordeste (Alagoas e Maranhão) e centro (Goiás) do Brasil foram separados com alto apoio das análises de IB (0,97) e ML (98%), assim como os espécimes de duas porções do Cerrado central brasileiro, Mato Grosso e Tocantins (IB = 1,00, ML = 99%) e Mato Grosso sozinho (IB = 1,00, ML = 99%).



0.2

Figura 2: Árvore obtida a partir da análise do gene 16S com bootstrap significativo nas análises de BI e ML, respectivamente. Nome da espécie + comprovante GenBank. Os números nas ramificações representam os valores Bayesian (BI) e de bootstrap (ML), respectivamente. Cada cor representa um clado monofilético. Os grupos externos e grupos parafiléticos são mostrados em preto, com *S. nebulosus* em verde e *S. constrictus* em vermelho.

Scinax constrictus aparece como uma espécie irmã de *S. nebulosus* nas análises de IB e ML. Achados semelhantes foram obtidos nas árvores de COI (Figura 10), nas quais *S. constrictus* e *S. nebulosus* aparecem como espécies geneticamente distintas, com altos valores de suporte para as análises filogenéticas (IB = 0,98, ML = 100%). Como nas árvores 16S, a árvore de COI recuperou *S. nebulosus* como uma espécie polifilética, formada por pelo menos três grupos, com *S. constrictus* como um grupo irmão. Um grupo continha a amostra de Roraima, o segundo grupo compreendeu as amostras de Mato Grosso, enquanto o terceiro grupo incluiu as sequências de Alagoas, Pará e Maranhão.

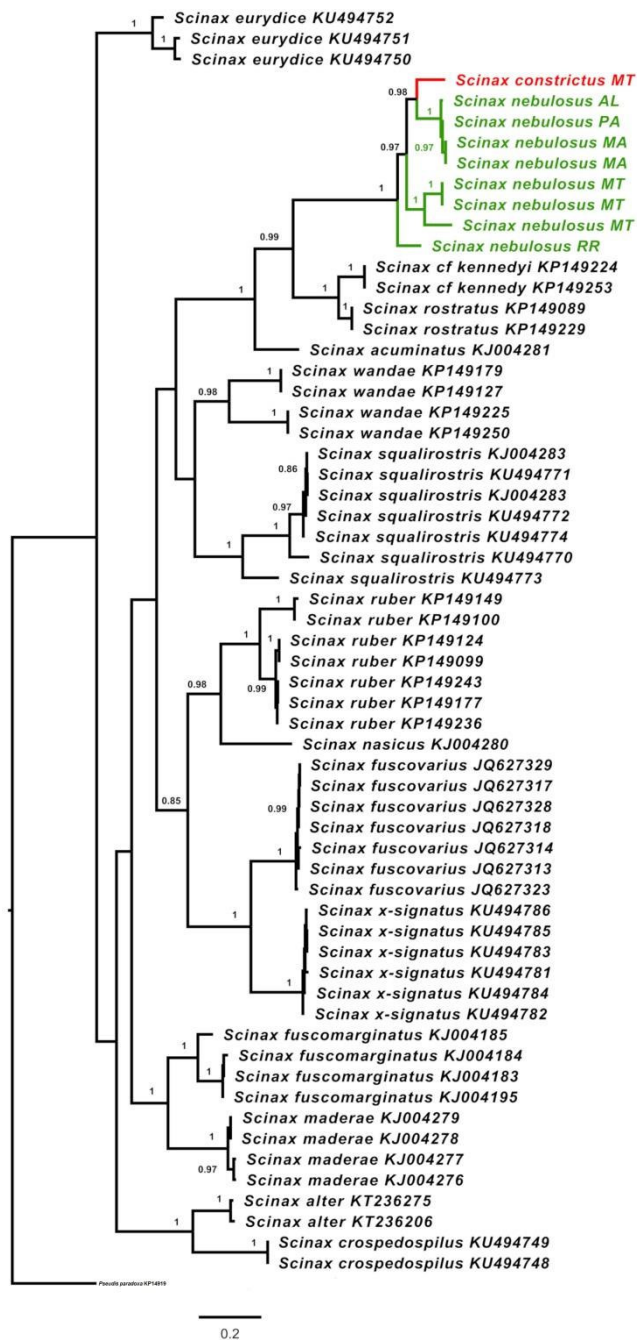


Figura 3: Árvore obtida a partir da análise do gene COI com bootstrap significativo nas análises de BI e ML, respectivamente. Nome da espécie + comprovante GenBank. Os números nas ramificações representam os valores Bayesian (BI) e de bootstrap (ML), respectivamente. Cada cor representa um clado monofilético. Os grupos externos e grupos parafiléticos são mostrados em preto, *S. nebulosus* em verde e *S. constrictus* em vermelho.

A árvore de espécies obtida do BEAST também indica que *S. constrictus* e *S. nebulosus* são linhagens genéticas separadas, com altos valores de suporte (1). A análise, no entanto, confirmou a estreita relação filogenética entre as duas espécies (Figura 4).

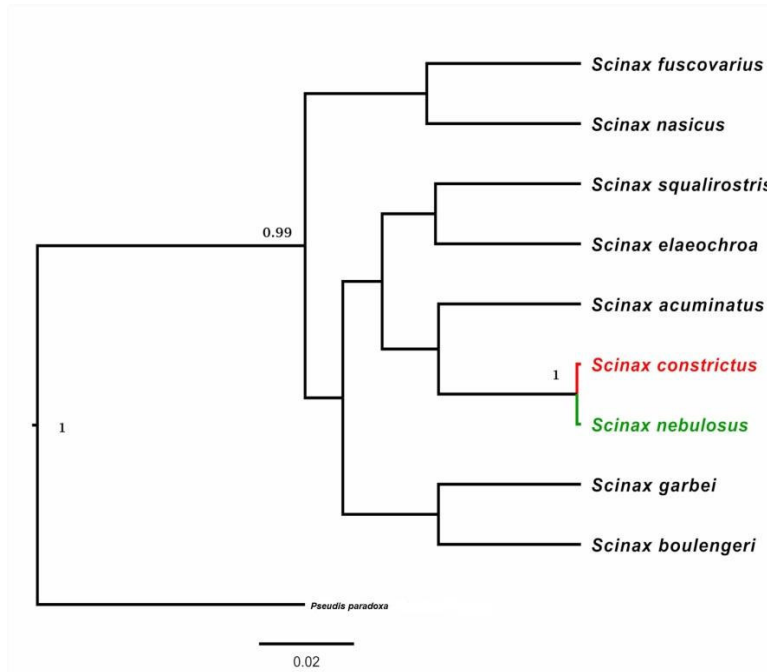


Figura 4: Árvore de espécies para o gênero *Scinax*, com base nos dados concatenados dos genes 16S e Rodopsina. Os valores localizados nos nós representam probabilidades posteriores, com apenas valores iguais ou superiores a 0,99 mostrados.

5. DISCUSSÃO

As distâncias genéticas obtidas nos três marcadores indicam que *S. constrictus* e *S. nebulosus* são espécies distintas. O valor da divergência registrado para o gene COI foi superior a 10%, um valor comparativamente alto para diferenças entre espécies de anfíbios (Vences et al., 2005a; Guarnizo et al. 2015). Essa diferenciação também foi apoiada por marcadores mais conservadores utilizados em outros estudos (Nair et al., 2012; Nogueira et al., 2016) e no presente estudo, ou seja, 16S e Rodopsina.

Com base em uma análise experimental, Vences et al. (2005b) concluíram que o gene mitocondrial 16S rRNA atende aos pré-requisitos para um marcador universal de código de barras de DNA para anfíbios e pode ser superior às sequências de COI para a identificação de clados de vertebrados. Este estudo observou que, enquanto o COI variou consideravelmente em anfíbios, o 16S foi altamente conservado nesses vertebrados. Os

autores recomendam, assim, o uso do 16S como um marcador adicional para o código de barras do DNA de vertebrados.

Xia et al. (2012) também apoiam o uso do gene 16S rRNA para código de barras de DNA de anfíbios, uma vez que os autores indicaram que as distâncias genéticas baseadas no modelo de 2 parâmetros Kimura (K2P) revelaram que a distância intraespecífica média foi de 1,4% no gene COI, mas apenas 0,3% no rRNA 16S. O nível de variação do 16S rRNA obtido no presente estudo foi superior ao valor acima mencionado, indicando um alto grau de variação genética entre as espécies estudadas, reforçando sua validade taxonômica.

Desde a descrição de *S. constrictus* (Lima et al. 2004), muitos espécimes de ambas as espécies têm sido difíceis de classificar de forma confiável, dada a falta de precisão na abordagem morfológica tradicional para diferenciação de táxons. Em geral, os táxons com variações morfológicas incertas são considerados complexos de espécies, com formas enigmáticas. Provavelmente este é o caso de *S. nebulosus* e *S. constrictus*, que apresentam altos níveis de diferenciação genética em formas morfológicamente semelhantes. Nesses casos, a abordagem molecular é essencial para a diferenciação confiável de espécies, como no caso do complexo de espécies *Rhinella marina*, compreendendo linhagens distintas compostas por espécies enigmáticas (Bessa-Silva et al. 2015).

Além de confirmar o gênero *Scinax* como um grupo monofilético, as topologias aqui obtidas suportam a validação de *S. constrictus* e *S. nebulosus* como espécies distintas. A maioria das amostras incongruentes foram espécimes recentemente designados para o grupo *S. nebulosus*, provavelmente como consequência da definição morfológica não confiável das espécies. *Scinax constrictus* pode ser diferenciado de *S. nebulosus* por seu tamanho menor, pela presença de um retalho anal discreto no sexo masculino (ausente em *S. nebulosus*) e pela presença de uma fileira de pequenos tubérculos na margem inferior da mandíbula, ausentes ou indistinto em *S. nebulosus* (Lima et al. 2004). A vocalização de *S. constrictus* também é bastante distinta em relação à frequência dominante e ao número de notas (Lima et al. 2004), embora essas características variem consideravelmente em *S. nebulosus*. Apesar desses diagnósticos, a análise de espécimes anteriormente descritos como *S. nebulosus* ou *S. constrictus* indica que essas

características não são adequadas para a distinção confiável de espécies (Weber, L.N. comunicação pessoal).

É, portanto, claro, que as análises morfológicas são extremamente vulneráveis a erros e identificação errônea de taxa, tornadas aparentes por ferramentas moleculares. As distribuições geográficas de ambos os táxons parecem apoiar o diagnóstico molecular, uma vez que *S. constrictus* parece estar restrito à savana do Cerrado no Brasil central, enquanto *S. nebulosus* é mais amplamente distribuído e podendo até ser simpátrico a *S. constrictus*.

Análises genéticas têm sido amplamente aplicadas para validar espécies de anuros descritas com base em características morfológicas. Bruschi et al. (2013), por exemplo, avaliaram o status taxonômico de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) aplicando dados citogenéticos e moleculares para diferenciar essa espécie de *Phyllomedusa azurea*. Seus resultados contribuíram para a ampliação da área geográfica.

Análises genéticas têm sido amplamente aplicadas para validar espécies de anuros descritas com base em características morfológicas. Bruschi et al. (2013), por exemplo, avaliaram o status taxonômico de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) aplicando dados citogenéticos e moleculares para diferenciar essa espécie de *Phyllomedusa azurea*. Seus resultados contribuíram para a extensão da faixa geográfica de *P. hypochondrialis* e confirmaram sua simpatria com *P. azurea*, uma vez que a identificação incorreta das amostras parecia ter resultado em inconsistências na definição original de distribuição geográfica de *P. azurea*. No presente estudo, a análise do gene 16S (Figura 9) indicou o agrupamento de espécimes de *S. nebulosus* e *S. constrictus* com espécimes de *S. constrictus* atribuídos originalmente ao grupo *nebulosus*, o que parece ser identificação incorreta das espécies. No caso de *Phyllomedusa Bruschi* et al. (2013) e *Scinax* (presente estudo), análises moleculares indicaram claramente uma posição monofilética dentro da família Hylidae.

Brusquetti et al. (2014) revisaram a taxonomia de *Scinax fuscumarginatus* (Lutz, 1925) e avaliaram espécies morfológicamente semelhantes exibindo taxonomia controversa, como *S. fuscumarginatus*, *S. parkeri*, *S. trilineatus*, *S. lutzorum* e *S. pusillus*,

por análises moleculares, com clados parafiléticos sendo recuperados para *S. fuscomarginatus* em comparação com as outras espécies, semelhante ao parafiletismo entre *S. nebulosus* e *S. constrictus* relatado no presente estudo (Figuras 9 e 10). Duellman et al. (2016) posteriormente redistribuíram as espécies *Scinax* e entre as espécies analisadas por Brusquetti et al. (2014), apenas *S. fuscomarginatus* foi mantido no gênero.

Nas análises filogenéticas e biogeográficas da família Hylidae, Duellman et al. (2016) propuseram grandes mudanças no arranjo do gênero *Scinax*, variando de uma nova subfamília à redistribuição de espécies. *Scinax nebulosus* e *S. constrictus* permaneceram no gênero, e os resultados do presente estudo confirmam seu status como linhagens válidas do gênero *Scinax*.

Várias espécies descritas no gênero *Scinax* (Anura: Hylidae) requerem validação genética, e a aplicação de marcadores moleculares não apenas contribuiu para a identificação de novas espécies, mas também na diferenciação de linhagens crípticas (Nunes et al. , 2012; Lourenço et al., 2013; Sturaro et al., 2014; Nogueira et al., 2016).

A filogenia molecular de Fouquet et al. (2006) indica que o *Scinax ruber*, encontrado na região da Guiana Francesa, é representado por seis linhagens divergentes. A filogenia molecular obtida por Lourenço et al. (2013) confirmaram que os espécimes *Scinax* coletados no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, no Brasil central, que são morfologicamente semelhantes às espécies do grupo *S. catharinae* (*sensu* Faivovich et al. 2005), representam de fato um novo espécies. Nogueira et al. (2016) enfatizam a necessidade de análises comparativas adicionais entre essas espécies, integrando dados morfológicos e bioacústicos.

Nesse contexto, muitos pesquisadores destacaram a importância de uma abordagem múltipla, ou seja, integrar dados moleculares, morfológicos, bioacústicos e ecológicos, nas avaliações taxonômicas de anuros, para facilitar a identificação das espécies (Padial et al., 2014). No geral, análises moleculares ajudaram na diferenciação de populações diagnosticadas como *S. constrictus* e *S. nebulosus*, apesar das semelhanças morfológicas de ambas as espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BESSA-SILVA, A. R., VALLINOTO, M., SODRÉ, D., CUNHA, D. B., ASP, N.E., SAMPAIO, I., SCHNEIDER, H., SEQUEIRA, F. 2016. Patterns of Genetic Variability in Island Populations of the Cane Toad (*Rhinella marina*) from the Mouth of the Amazon. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0152492.
- BOSSUYT, F. AND MILINKOVICH, M.C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6585–6590.
- BRUSCHI, D.P., BUSIN, C.S., TOLEDO, L.F., VASCONCELLOS, G.A., WEBER, L.N., LIMA, A.P., LIMA, J.D. AND RECCO-PIMENTEL, S.M. 2013. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. *BMC Genetics* 14:70
- BRUSQUETTI, F., MARTIN, J., BARRIO-AMORÓS, C., SEGALLA, M. AND HADDAD, C.B.F. 2014. Taxonomic review of *Scinax fuscomarginatus* (Lutz, 1925) and related species (Anura; Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 171, 783–821.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R. AND POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- DONNELLAN, S.C. AND APLIN, K.P. 1989. Resolution of cryptic species in the New Guinean lizards, *Sphenomorphus joviensis* (Scincidae) by electrophoresis. *Copeia* 81-88.
- DUELLMAN, W.E., MARION, A.B. AND HEDGES, S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104 (1)
- DUELLMANN, W.E. AND WIENS, J.J. 1992. The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. *Occasional Papers of The Museum of Natural History, The University of Kansas* 51: 1–23.
- FAIVOVICH, J., HADDAD, C.F.B., GARCIA, P.C.A., FROST, D.R., CAMPEBELL, J.A. AND WHELLER, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with

special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of The American Museum of Natural History*, 294: 1-240.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* (39): 783-791.

FERRÃO, M., COLATRELI, O., FRAGA, R., KAEFER, I., MORAVEC, J., LIMA, A. L. 2016. High Species Richness of *Scinax* Treefrogs (Hylidae) in a Threatened Amazonian Landscape Revealed by an Integrative Approach. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0165679

FOLMER, O.M., BLACKM W. AND HOEH, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-297.

FROST, D.R. Amphibians species of the world 3.0 – an online reference. American Museu of Natural History. Disponível em Available in <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php> Accessed in 12. 11. 17

GUARNIZO, C.E., PAZ, A., MUNOZ-ORTIZ, A., FLECHAS, S.V., MENDEZ-NARVAEZ, J., CRAWFORD, A.J. 2015. DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. *PlosOne*. DOI:10.1371/journal.pone.0127312

GUINDON, S. J. F, DUFAYARD, V., LEFORT, M. AND ANISIMOVA, W. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.

HELED, J.AND DRUMMOND, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular biology and evolution* 27: 570-580.

KATOH, K. AND STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780

KUMAR S, STECHER, G. AND TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870–1874 *Leptodactylidae*): Phylogeny, the Relevance of Non-molecular Evidence, and

- LIMA, L.P., BASTOS, R.P. AND GIARETTA, A.A. 2004. A new *Scinax* Wagler, 1830 of the rostratus group from Central Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional*. 62: 505- 512.
- LIMA, M.G. 2011. Variação geográfica de *Scinax argyreornatus* (Miranda- Ribeiro, 1926) (Anura: Hylidae). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco.
- LOURENÇO, A.C.C., CARVALHO, A.L.G., BAÊTA, D., PEZZUTI, T.L. AND LEITE, F.S.F. 2013. A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae) from Serra da Canastra, southwestern state of Minas Gerais, Brazil. *Zootaxa*, 3613(6), 573–588.
- LOURENÇO, L. B. 2015. Phylogeny of frogs the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92:204-216).
- MENEZES, L., CANEDO, C., BATALHA-FILHO, H., GARDA, A.A., GEHARA, M., NAPOLI, M.F. 2016. Multilocus Phylogeography of the Treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) Reveals a Plio-Pleistocene Diversification in the Atlantic Forest. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0154626
- NAIR, A., GOPALAN, S.V., GEORGE, S., KUMAR, K.S., TEACHER, A.G.F. AND MERILA, J. 2012. High cryptic diversity of endemic *Indirana* frogs in the Western Ghats biodiversity hotspot. *Animal Conservation*. 15: 489-498.
- NOGUEIRA, L., SOLÉ, M., SIQUEIRA, S., AFFONSO, P.R.A.M., STRÜSMANN, C. AND SAMPAIO, I. 2016. Genetic analysis reveals candidate species in the *Scinax catharinae* clade (Amphibia: Anura) from Central Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 39(1): 49-53.
- NUNES, I., KWET, A. AND POMBAL, J.R. 2012. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). *Copeia*. 554–569.
- PADIAL, J., GRANT, T. AND FROST, D.R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825 (1).
- PALUMBI, S., MARTIN, A., ROMANO, S., MACMILLAN, W.O., STICE, L. AND GRABOWSKI, G. 1991. The simple fool's guide to PCR, Version 2.0. Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.

PINTO, B.J., COLLI, G.R., HIGHAM, T.E., RUSSEL, A.P., SCANTLEBURY, D.P., VITT, L.J., GAMBLE, T. 2019. Population genetic structure and species delimitation of a widespread, Neotropical dwarf gecko. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 133: 54–66

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

RAMBAUT, A. AND DRUMMOND, A.J. 2007. *Tracer v. 1.4*. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

RAMBAUT, A. AND DRUMMOND, A.J. 2009. Tracer version 1.5 [computer program] <http://beast.bio.ed.ac.uk> .

RONQUIST , TESLENKO, M., MARK, P.V., AYRES. D.L., DARLING, A., HOHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A. AND HUELSENBECK, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol*. May; 61(3): 539–542.

SÁ, R.O., GRANT, T., CAMARGO, A., HEYER, R.W., PONSSA, M.L. AND STANLEY, E. 2014. Systematics of the Neotropical Genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): Phylogeny, the relevance of non-molecular evidence, and species accounts. *Brazilian Society of Herpetology*.

SALDUCCI, M., MARTY, C., CHAPPAZ, R. AND GILLES, A. 2002. Molecular phylogeny of French Guiana Hylinae : implications for the systematic and biodiversity of the Neotropical frogs. *C. R. Biologies* 325. 141-153.

SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D.W. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In: *Molecular cloning, a laboratory manual* (Sambrook J and Russel DW, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 631-632.

SILVA, P.H. 2017. Investigação taxonômica em populações de *Scinax perereca* Pombal Jr, Haddad & Kasahara, 1995 (Anura: Hylidae). Master Dissertation. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. *Species Accounts South American Journal of Herpetology* 9:S1-S100.

STURARO, M.J. AND PELOSO, P.L.V. 2014. New Species of *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) From the Middle Amazon River Basin, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 54(2) :9-23.

SUK, H.Y., BAE, H.G., KIM, D.Y., WON, H., BAEK, H.J., LEE, C.H., KIM, D.Y., GO, Y.M., SONG, J.Y., LEE, H., MIN, M.S. 2019. Genetic and phylogenetic structure of *Hynobius quepjaertensis*, an endangered endemic salamander species on the Korean Peninsula. *Genes & Genomics*.

TAKAZONE, A.M.G. 2015. Estudo Taxonômico de *Scinax nebulosus* (SPIX, 1824) E *Scinax constrictus* (LIMA, BASTOS E GIARETTA, 2004) (ANURA, HYLIDAE) com base em parâmetros morfológicos, acústicos e de distribuição geográfica. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Maranhão.

VENCES, M., THOMAS, M., BONETT, R.M. AND VIEITES, D.R. 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1859–1868.

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

VIEIRA, D.M.L. 2010. Taxonomia e Filogenia de *Rhinella margaritifera* (Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia brasileira. Dissertação (mestrado)-INPA/UFAM-
Manaus.

XIA, Y., GU, H., PENG, R., CHEN, Q., ZHENG, Y., MURPHY, R.W. AND ZENG, X. 2012. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Molecular Ecology Resources*. 12: 48–56.

CAPÍTULO II

Dados moleculares revelam múltiplas linhagens de *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) (Anura: Hylidae) com diversificação Plio-Pleistoceno em diferentes regiões brasileiras

Molecular data reveal multiple lineages of *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) (Anura: Hylidae) with Plio-Pleistocene diversification in different Brazilian regions

Artigo em anexo

Artigo aceito na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências

RESUMO

Para entender a história dos animais, podemos começar avaliando a complexidade do bioma onde ocorrem. Neste estudo, utilizamos uma região do genoma mitocondrial, o rRNA 16S, para avaliar a diferenciação genética em *Scinax nebulosus* juntamente com sua distribuição geográfica destacando importantes biomas brasileiros como Restinga, Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica. Foi observada uma divergência genética geograficamente estruturada dentro da espécie *S. nebulosus*. Os valores do índice de fixação (Φ_{st}) e do F_{st} foram elevados e significativos em relação a esta estruturação. Além disso, a rede de haplótipos corrobora com esses resultados apresentando um arranjo de haplótipos encontrados ao separar as populações de *S. nebulosus* em dois grandes grupos: Norte e Nordeste. As análises de delimitação de linhagens indicam a ocorrência de várias linhagens com divergência principalmente entre as amostras do grupo Nordeste. Assim, podemos sugerir que *S. nebulosus* pode se apresentar como um grupo de espécies crípticas devido às características genéticas encontradas. A existência de um mosaico de habitats heterogêneos pode explicar a divergência genética encontrada, o que justifica a existência de espécies crípticas neste grupo. No entanto, essa hipótese precisa de mais detalhes em estudos moleculares, incluindo grandes tamanhos de amostra e outras análises populacionais e demográficas.

Palavras-chave: Anuros, Biomas, Biologia molecular, Estruturação populacional.

ABSTRACT

To understand the organism's history, we can start assessing the complexity of the biome where they occur. In this study, we used a region of the mitochondrial genome, the rRNA 16S, to evaluate the genetic differentiation in *Scinax nebulosus* along with its geographical range highlighting important Brazilian biomes as Restinga, Cerrado, Amazon, and Atlantic Forest. Geographically structured genetic divergence was observed within the species *S. nebulosus*. The values of the fixation index (Φ_{st}) and the pairwise *Fst* index were high and significant regarding this structuring. Besides, the haplotype network corroborates these results with the haplotypes arrangement found by separating the *S. nebulosus* populations in two major groups: North and Northeast. The lineage delimitation analyses indicate the occurrence of several lineages with divergence mainly between the samples from the Northeast group. Thus, we can suggest that *S. nebulosus* may present itself as a group of cryptic species due to the genetic characteristics found. The existence of a mosaic of heterogeneous habitats may explain the genetic divergence found, which justifies the existence of cryptic species in this group. However, this hypothesis needs more detail in molecular studies, including large sample sizes and other population and demographic analyses.

Key words: Anurans, Biomes, Molecular biology, Population structuring.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) foi incluído na subfamília *Scinaxinae* após uma nova revisão taxonômica e filogenética da família Hylidae (Duellman et al. 2016). O gênero compreende 126 espécies distribuídas por todo o continente americano, ocorrendo do sul do México à Argentina, Uruguai, Trinidad e Tobago e Santa Lúcia (Nunes et al. 2012, Duellman et al. 2016, Frost 2020). A sua ampla distribuição e diversidade estão associadas a diferentes habitats onde estas espécies podem ser encontradas, em áreas abertas e de vegetação escassa, florestas decíduas, semidecíduas e ombrófilas, mata ciliar e mata ciliar (Faivovich 2002).

Algumas espécies de *Scinax* ainda não estão bem definidas devido a possibilidade de complexos crípticos entre elas (Fouquet et al. 2007, Ferrão et al. 2016, 2017), especialmente aquelas conhecidas como *Scinax nebulosus* (Spix, 1824). Desde a sua descoberta, a espécie foi nomeada várias vezes. Primeiramente, reconhecida como *Hyla egleri* (Lutz, 1968) para espécimes coletados em Belém, Estado do Pará (Lutz, 1968). Mais tarde, foi redescrito como *Ololygon egleri* (Fouquette & Delahoussaye 1977), depois *O. nebulosus* (Hoogmoed & Gruber 1983), depois *S. nebulosa* (Duellman & Wiens 1992), até a atual designação de *S. nebulosus* (Köhler & Böhme 1996).

Scinax nebulosus apresenta estilo de vida arbóreo e ampla distribuição geográfica. É encontrado no Brasil, Bolívia, Guianas, Suriname e Venezuela. No Brasil, é encontrado na Bacia Amazônica, Centro-Oeste e Nordeste (Dias et al. 2015). Em geral, a espécie está associada a corpos d'água temporários na floresta tropical. Também é encontrada em áreas abertas do Cerrado, bem como em habitats antropogênicos como pastagens e jardins (La Marca et al. 2004, Dias et al. 2015). Essas associações podem impulsionar a distribuição de espécies com características de mobilidade limitada, como os anfíbios (Lourenço et al. 2009, Sturaro & Peloso, 2014).

Lutz (1973) descreveu morfologicamente *S. nebulosus* como uma espécie com grande número de glândulas em todo o dorso (na cabeça, pálpebras superiores, margens dos membros). No entanto, essas características não são suficientes para diferenciar *S. nebulosus* de outras espécies do gênero, como *S. pedromedinae* (Henle 1991) ocorrendo na Amazônia brasileira e norte do Peru. Além disso, as comparações do registro de vocalização de *S. nebulosus* com outros congêneres simpátricos sugere a necessidade

de uma avaliação cuidadosa do status taxonômico desta espécie junto com sua distribuição geográfica (Lima et al. 2004).

No entanto, *S. nebulosus* ainda é considerado uma espécie válida com distribuição na região central e norte da América do Sul (Dias et al. 2015). Em geral, os organismos terrestres espalhados por esta área podem ter descontinuidades em sua distribuição em resposta às mudanças climáticas e eventos geológicos que ocorreram durante o Plio-Pleistoceno (Bell et al. 2012, Menezes et al. 2016).

Bell et al. (2012) investigaram como os refúgios do Pleistoceno interferiram na diferenciação genética em populações continentais e insulares, e o papel da fragmentação florestal nessa diferenciação. Os eventos biogeográficos do Pleistoceno têm sido tradicionalmente relacionados ao processo de estruturação populacional e especiação de vertebrados (Avise et al. 1998). Menezes et al. (2016) avaliaram a estrutura genética de *Scinax eurydice* (Bokermann, 1968) e observaram eventos de segregação de linhagens que ocorreram no final do Plioceno ao Pleistoceno. As flutuações climáticas do Pleistoceno desempenharam um papel fundamental na distribuição da diversidade e endemismo nos biomas brasileiros. Para anfíbios, essas flutuações podem indicar novas linhagens abrangendo regiões climáticas distintas.

A ampla distribuição geográfica de *S. nebulosus* é um tema constante de discussão, questionando a correta identificação das populações, que tem sido feita apenas a partir de dados de vocalização e morfologia (Duellman et al. 2016). Assim, esta espécie pode apresentar variações interpopulacionais associadas a eventos climáticos do Plio-Pleistoceno. Nesse contexto, testamos essa hipótese utilizando dados moleculares, realizando uma análise da diversidade genética de *S. nebulosus* a partir de marcadores mitocondriais para aumentar o nível de conhecimento sobre seu status taxonômico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem de amostras e extração de DNA, PCR e sequenciamento

Os espécimes de *S. nebulosus* foram coletados em trabalho de campo e obtidos através de trocas com coleções zoológicas, totalizando 52 espécimes analisados em 13 localidades (Figura 1, Tabela 1, Material Complementar). Após a coleta retiramos amostras de tecido muscular dos membros posteriores, colocadas em microtubos de 1,5

ml e armazenadas em etanol 100%. Os espécimes foram fixados em solução de formaldeído a 10%, armazenados em etanol 70%, e depositados no acervo herpetológico da Universidade Federal do Maranhão (CHUFMA).



Figura 1. Mapa de identificação dos locais de origem dos espécimes *Scinax nebulosus* usados neste estudo.

O isolamento do DNA genômico seguiu o protocolo de Sambrook & Russell (2001). Utilizamos o marcador rRNA 16S nas análises; realizamos amplificação por PCR, utilizando os primers descritos por Palumbi et al. (1991): L1987–5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' e H2609–5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3', sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 ° C por 5 min, 25 ciclos de 1 min a 94 ° C, 1 min em 50 ° C e 2 min a 72 ° C e extensão final a 72 ° C por 5 min. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante, e então injetadas no sequenciador automático ABI 3500.

2.2. Análise de dados

As sequências foram alinhadas no BioEdit (Hall 1999) usando o alinhamento automático ClustalW (Thompson et al. 1994), seguido por inspeção visual para detectar erros de identificação. Para estimar a variabilidade genética das possíveis populações, os índices de diferenciação genética par a par (F_{st}), índice de fixação (Φ_{st}), Análise de Variância Molecular (AMOVA) e o número de haplótipos foram calculados no software Arquelelin v. 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O índice de diversidade de haplótipos (h) e a diversidade de nucleotídeos (π) foram calculados no DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009). Testamos as hipóteses de neutralidade seletiva usando os testes D (Tajima 1989) e a expansão demográfica por meio da estatística F_s (Fu 1997).

Estimamos a distância genética dentro e entre as populações no MEGA v. 7 (Kumar et al. 2016) usando o modelo evolutivo K2P (Kimura, 1980). Posteriormente, a relação genealógica entre haplótipos foi obtida por meio de uma rede de haplótipos criada no software Haploviewer (Salzburger et al. 2011) usando o algoritmo de máxima verossimilhança determinado no jModelTest 2 (Darriba et al. 2012).

A árvore de inferência bayesiana foi construída no Mr. Bayes no CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos foi escolhido a partir da análise realizada no jModeltest2 (Darriba et al. 2012), em que o GTR + G foi indicado como o melhor modelo para se ajustar ao conjunto de dados. Como *S. nebulosus* apresenta dúvidas quanto à sua correta identificação e distribuição geográfica, em que há mais de uma espécie ou identificação incorreta de populações com base em dados morfológicos e de vocalização (Lima et al. 2004, Hoogmoed & Avila-Pires 2011, Dias et al. 2015), escolhemos duas análises usando distância genética para classificação e identificação de linhagem: Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al. 2012) e Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons et al. 2006).

A análise ABGD (Puillandre et al. 2012) foi realizada na interface web (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) seguindo as instruções, conforme Ferrão et al. (2016), modelo de substituição de nucleotídeo do parâmetro Kimura 2 (K2P), dez passos, largura de gap de 1,0 e valor de divergência intraespecífica de 0,03 (3%). Em geral, uma divergência de 3% no gene 16S em rãs neotropicais, nesta análise, é recomendada para identificar diferentes linhagens (Vences et al. 2005,

Fouquet et al. 2007). A análise GMYC (Pons et al. 2006) foi implementada no pacote SPLITS no R (R Core Team 2019). Esta análise requer uma árvore genealógica ultramétrica, estimada em BEAST 2.3.6. (Bouckaret et al. 2014), disponível em CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). Para obter a árvore genealógica ultramétrica, foi construído um relógio lognormal relaxado com taxa de substituição de 0,00735 (Ferrão et al. 2016), com 50 milhões de gerações e burn-in de 10%.

3. RESULTADOS

As sequências do marcador rRNA 16S apresentaram 543 pb. A rede haplotípica gerada (Figura 2) mostrou uma subestrutura da amostra em dois grandes grupos: Norte e Nordeste. A presença de haplótipos exclusivos corrobora a alta diversidade haplotípica (h) e de nucleotídeos (π) (Tabela 1). Os testes de neutralidade seletiva (F_s e D) não foram significativos para as populações amostradas. Populações de Alagoas e Goiás apresentaram apenas um haplótipo, o que não foi suficiente para fazer inferências de quaisquer índices.

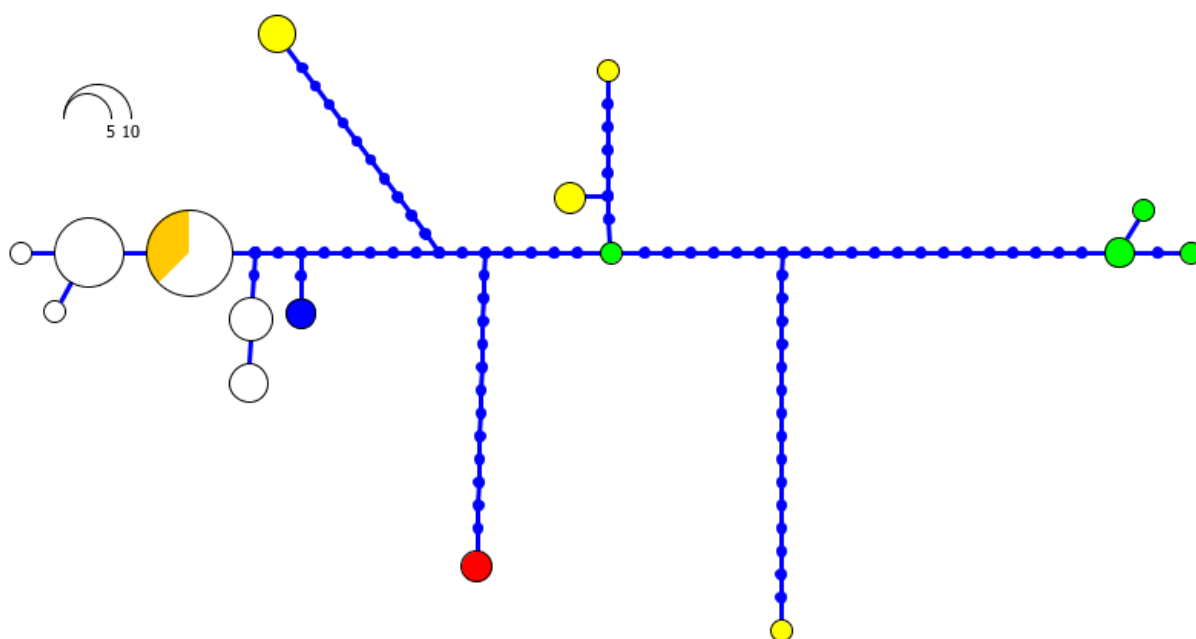


Figura 2. Rede de haplótipos para populações de *Scinax nebulosus*. As cores representam as seguintes populações: Branco: Maranhão, Azul: Alagoas, Amarelo: Pará; Verde: Mato Grosso, Vermelho: Goiás, Laranja: Rio Grande do Norte.

Tabela 1: Índices de diversidade genética obtidos para o gene 16S de populações de *Scinax nebulosus* usados no presente estudo. N = número de indivíduos, Hap = número de haplótipos, h = diversidade de haplótipos, π = diversidade de nucleotídeos.

População	N	Hap	(h) (sd)	(π) (sd)	D Tajima	Fs Fu
Pará	7	4	0.809 (0.8 ± 0.1)	0.028 (0.006)	0.069	4.467
Mato Grosso	5	4	0.900 (0.8 ± 0.1)	0.018 (0.007)	-1.239	1.537
Maranhão	29	6	0.756 (0.8 ± 0.1)	0.003 (0.000)	0.499	0.018
Alagoas	2	1	-	-	-	-
Rio Grande do Norte	7	2	0.285 (0.8 ± 0.1)	0.045 (0.007)	-1.748	13.294
Goiás	2	1	-	-	-	-
Total	52	18	0.863 (0.8 ± 0.1)	0.027 (0.003)	-1.823	3.143

As distâncias genéticas obtidas indicam a estrutura da amostra com alto índice de divergência entre os grupos Norte e Nordeste, bem como a rede de haplótipos. As maiores distâncias genéticas foram calculadas entre as amostras do Rio Grande do Norte (RN) x Mato Grosso (MT), RN x Pará (PA) e RN x Goiás (GO) (6,9%, 5,9% e 5,9% de divergência, respectivamente), GO e MT (5,7%) e MT e Maranhão (MA) (5,1%), enquanto a distância entre as amostras de Alagoas (AL) e MA foi de apenas 1% (Tabela 2). O Rio Grande do Norte apresentou maior distância genética quando comparado a MA e AL.

Tabela 2: Distância genética estimada (distância-p) para o gene 16S para populações de *Scinax nebulosus* nos locais listados abaixo. PA = Pará, MT = Mato Grosso, MA = Maranhão, AL = Alagoas, RN = Rio Grande do Norte, GO = Goiás.

	MA	AL	PA	MT	GO
MA					
AL	0.010				
PA	0.041	0.037			
MT	0.051	0.046	0.048		
GO	0.043	0.040	0.045	0.057	
RN	0.028	0.032	0.059	0.069	0.059

Os resultados da AMOVA (Tabela 3) mostraram que a variância genética acumulada entre os grupos foi maior do que dentro dos grupos. No entanto, uma estrutura significativa ($\Phi_{st} = 0,62$) foi observada na amostra. A comparação dos valores

de F_{st} (Tabela 4) manteve os valores elevados entre todos os pares populacionais, sendo menores apenas entre as amostras de RN e as demais localidades.

Tabela 3: Valores de AMOVA de populações de *Scinax nebulosus* usados no presente estudo.

	MA	AL	PA	MT	GO
MA					
AL	0.722				
PA	0.761	0.363			
MT	0.891	0.699	0.458		
GO	0.938	1.000	0.534	0.780	
RN	0.222	-0.070	0.314	0.471	0.428

Tabela 4: F_{st} pareado estimado para o gene 16S para as populações de *Scinax nebulosus* usadas no presente estudo. PA = Pará, MT = Mato Grosso, MA = Maranhão, AL = Alagoas, RN = Rio Grande do Norte, GO = Goiás.

Varição	% de variação	Φ_{st}
Dentro das populações	62.50	0.62503
Entre as populações	37.50	

As análises de delimitação de linhagens indicam a ocorrência das linhagens 7 (ABGD) e 12 (GMYC), com divergências principalmente entre as amostras do grupo Nordeste (Figura 3). No ABGD, as amostras de AL, MA e RN são consideradas pertencentes a uma única linhagem, enquanto o GMYC delimitou 4 linhagens para essas amostras. Como *S. nebulosus* é um grupo com dúvidas quanto à correta identificação e distribuição e não possuímos dados morfológicos ou vocalização para comparar com nossos resultados, optamos por seguir o resultado mais conservador dessas análises, considerando que temos 7 linhagens. em nossa amostra.

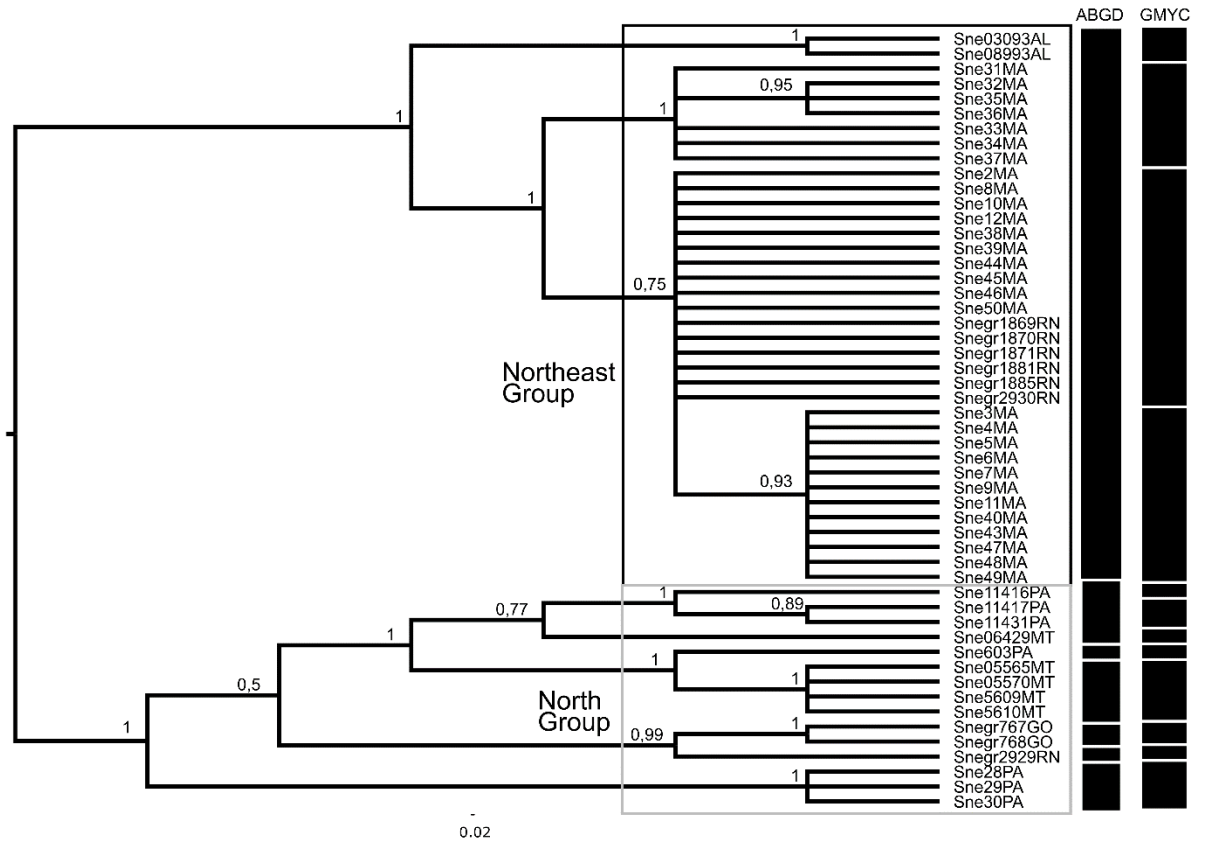


Figura 3. Árvore de inferência bayesiana para o gene 16S das populações amostradas de *Scinax nebulosus*. As barras pretas representam os resultados das análises de delimitação de duas linhagens. Números em ramos indicam valores de probabilidade posteriores.

A análise do relógio molecular (Figura 4) identificou que uma única amostra do RN apresenta divergência de 8,7 Ma das demais e as amostras GO apresentam divergência de 4,3 Ma. Dentre as demais amostras, identificamos uma separação entre Norte e Nordeste com grupos de 2,7 Ma, e dentro desses grupos, separações posteriores mais recentes.

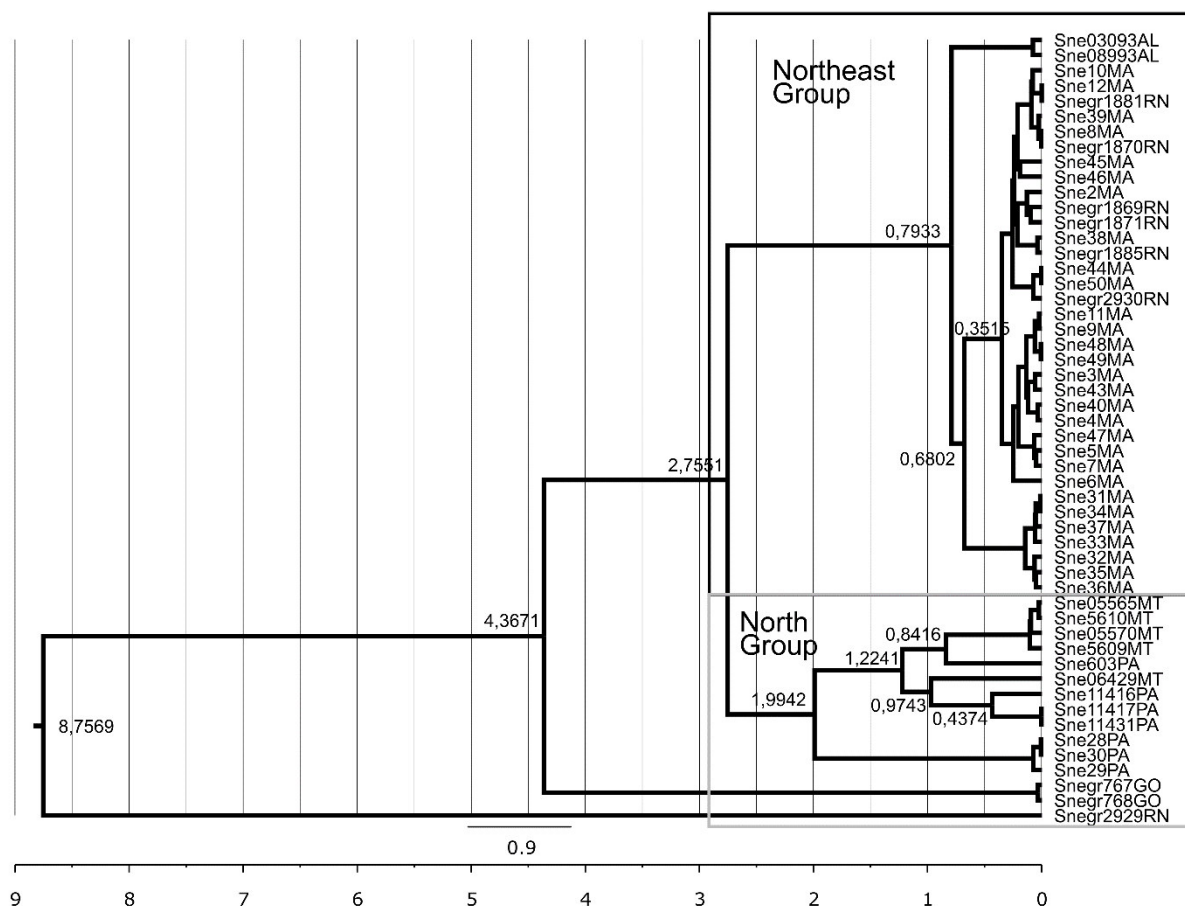


Figura 4. Relógio molecular relaxado para o gene 16S das populações amostradas de *Scinax nebulosus*.

4. DISCUSSÃO

Scinax nebulosus é uma espécie com ampla distribuição geográfica, desde a Venezuela à Guiana, Suriname, Bolívia e Brasil (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) (Dias et al. 2015, Frost 2020). Esta ampla distribuição geográfica tem sido fonte de controvérsia sobre a correta identificação das populações desta espécie, onde alguns autores acreditam que as populações do nordeste do Brasil constituem uma espécie diferente das populações do norte e oeste do Brasil e da Bolívia, com base em dados morfológicos e de vocalização (Lima et al. 2004, Hoogmoed & Avila-Pires 2011, Dias et al. 2015).

Nossos resultados indicaram a ocorrência de estruturação genética nas populações amostradas, a partir desses dados também é possível inferir uma maior proximidade genética dos indivíduos do Nordeste (MA, AL e RN) em relação às populações PA, GO e MT. Isso corrobora a hipótese de que os grupos Nordeste e Norte constituem espécies

distintas. São Pedro (2014) realizando uma análise filogeográfica de *Phyllomedusa* (= Pithecopus) (Anura, Hylidae) com o objetivo de reconhecer as espécies crípticas, bem como os elementos envolvidos nos processos de diversificação, observaram alta diversidade haplotípica, alto índice F_{st} entre as linhagens, e os cálculos da distância genética indicaram uma diferença entre e dentro das linhagens, cujos resultados são semelhantes aos encontrados no presente artigo.

Alta diversidade genética e estrutura populacional também foram encontradas em outras espécies de anuros brasileiros como *Proceratophrys boiei* (Lynch 1971; Prado & Pombal 2008) (Odontophrynidae) e *Ischnocnema* gr. *ramagii* (Boulenger, 1888) (Brachycephalidae) no enclave das terras altas do Nordeste (Carnaval & Bates 2007); espécies de *Phyllomedusa* gr. *burmeisteri* (Boulenger, 1882) (Phyllomedusidae) na Mata Atlântica e nos Pampas brasileiros (Brunes et al. 2010), *Rhinella* gr. *crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) (Bufonidae) na Mata Atlântica (Thomé et al. 2010) e *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Hylidae) no Cerrado (Prado et al. 2012).

Brunes et al. (2014) e São Pedro (2014) destacam que a diferenciação genética encontrada em diversos estudos sobre anuros tem sua origem relacionada a eventos vicariantes ocorridos nos períodos Neógeno e Quaternário, especificamente desde o final do Plioceno e durante o Pleistoceno. A hipótese dos refúgios do Pleistoceno, proposta pela primeira vez para explicar a diversidade da Amazônia, atribui o processo de especiação à dinâmica do bioma de expansão e retração durante o período de transição Plio-Pleistoceno (Haffer 1969, Haffer & Prance 2002).

Embora esses eventos não sejam suficientes para explicar a estrutura entre as populações de *S. nebulosus*, eles parecem ser a chave para explicar a diversificação dessa espécie. Por isso Menezes et al. (2016), em uma análise de *Scinax eurydice* (Bokermann, 1968) (Anura, Hylidae), utilizou dados moleculares para revelar a diversificação do Plio-Pleistoceno proposta pela teoria dos refúgios do Pleistoceno. *S. eurydice* apresenta elevadas divergências genéticas nas linhagens analisadas e a formação de dois grandes clados correspondentes aos grupos Nordeste e Sudeste (Menezes et al. 2016), assim como nossas populações de *S. nebulosus* também apresentaram essa estrutura para os grupos Nordeste e Norte.

Bell et al. (2012) investigaram como os refúgios do Pleistoceno influenciaram a diversificação genética em algumas espécies do grupo *Scinax perpusillus*. Por meio da

análise de marcadores mitocondriais, eles obtiveram linhagens estruturadas e alta diversidade genética nas populações desta espécie. Segundo esses autores, essa estrutura é explicada pela separação das populações entre ilha e continente, por se tratar de um fragmento de Mata Atlântica. Além disso, eles também enfatizam que essa barreira filogeográfica não é conhecida, mas ocorre de forma consistente. Conforme apresentado por Bell et al. (2012), não foi possível identificar a barreira responsável pela estruturação encontrada no presente estudo em *S. nebulosus*. Essas diferenças apenas demonstram que a variação das espécies pode ocorrer em resposta a uma história climática compartilhada e indicam que mais estudos são necessários para compreender os papéis dos refúgios do Pleistoceno e das barreiras biogeográficas na diversificação dos anfíbios anuros.

Assim, podemos sugerir a existência de um mosaico de habitats heterogêneos que podem ser de grande importância para as espécies de anuros, embora essa hipótese necessite de maiores detalhes em estudos moleculares, incluindo grandes tamanhos de amostra e outras análises populacionais e demográficas.

Além disso, os anfíbios podem ter um interesse particular na investigação dos processos de diversificação devido a uma tendência a apresentar uma forte estrutura genética (Johns & Avise 1998), sendo assim considerados excelentes modelos em estudos filogeográficos (Zeisset & Beebee 2008, Nuñez et al. 2011). Além disso, eles são mais propensos à existência de espécies crípticas (Bickford et al. 2007, Fouquet et al. 2007), como já observado para alguns taxa no Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Prado et al. 2012, Fouquet et al. al. 2013, Viega-Menoncello et al. 2014).

5. REFERÊNCIAS

- AVISE JC, WALKER D & JOHNS GC. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proc. R. Soc. Lond B* 265:1707–1712
- BELL RC, BRASILEIRO CA, HADDAD CFB & ZAMUDIO KR. 2012. Evolutionary history of *Scinax* treefrogs on land-bridge islands in south-eastern Brazil. *J Biogeog* 39:1733–1742.
- BICKFORD D, LOHMAN DJ, SODHI NS, NG PK, MEIER R, WINKER, K, & DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22(3):148-155.
- BOUCKAERT R, HELED J, KÜHNERT D, VAUGHAN T, WU CH & XIE D. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Comput Biol* 10:e1003537.

- BRUNES TO, SEQUEIRA F, HADDAD CFB & ALEXANDRINO J. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic forest and the origin of a polyploid species. *Mol Phylogenet Evol* 57:1120–1133.
- BRUNES TO, ALEXANDRINO J, BAÊTA D, ZINA J, HADDAD CFB & SEQUEIRA F. 2014. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). *Zool Scr* 43:586–604.
- CARNAVAL AC & BATES JM. 2007. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution* 61:2942–2957.
- DARRIBA D, TOBOADA GL, DOALHO R & POSADA D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and high performance computing. *Nat Methods* 9(8):772.
- DIAS EJR, ALMEIDA RPS, XAVIER MA, MOTA, ML, LIMA AC & ROSÁRIO IR. 2015. *Scinax nebulosus* (Spix, 1824) (Amphibia: Hylidae): review of distribution and new record from Sergipe, Brazil. *Check List* 11(3):1660.
- DUELLMAN WE & WIENS JJ. 1992. The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. *Occas Pap Mus Nat Hist* 51:1–23.
- DUELLMAN WE, MARION AB & HEDGES SB. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104(1):1-109.
- EXCOFFIER L & LISCHER HEL 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567.
- FAIVOVICH J. 2002 A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* 18:367–393.
- FERRÃO M, COLATRELI O, FRAGA R, KAEFER IL, MORAVEC J & LIMA AP. 2016. High species richness of *Scinax* Treefrogs (Hylidae) in a threatened Amazonian Landscape revealed by an integrative approach. *PLoS ONE* 11(11):e0165679.
- FERRÃO M, MORAVEC J, FRAGA R DE, ALMEIDA AP, KAEFER IL & LIMA AP. 2017. A new species of *Scinax* from the Purus-Madeira interfluve, Brazilian Amazonia (Anura, Hylidae). *ZooKeys* 706:137–162.
- FOUQUET A, VENCES M, & SALDUCCI MD. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Mol Phylogenet Evol* 43:567– 582.
- FOUQUET A, CASSINI CS, HADDAD FBC, PECH N & TREFAUT MR. 2013. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *J Biogeog* 41:855-870.
- FU YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–92.
- FROST DR. 2020. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 [June, 2020]. Accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

- HAFFER F. 1969 Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165:3889.
- HAFFER J & Prance GT. 2002. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação genética. *Estud Av* 16:46.
- HALL TA. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Ác Symp Series* 41:95-98.
- HOOGMOED MS & GRUBER U. 1983. Spix and Wagler type specimens of reptiles and amphibians in the Natural History Musea in Munich (Germany) and Leiden (the Netherlands). *Spixiana. Supplement. München* 9: 319–415.
- HOOGMOED MS & AVILA-PIRES TCS. 2011. On the presence of *Scinax pedromedinae* (Henle, 1991) (Amphibia: Anura: Hylidae) in Amazonian Brazil and northern Peru. *Bol Mus Para Emílio Goeldi Cienc Naturais* 6(3):263–271.
- JOHNS GC & AVISE JC. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Biol Evol* 15:1481-1490.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- KÖHLER J & BÖHME W. 1996. Anuran amphibians from the region of Pre-Cambrian rock outcrops (inselbergs) in northeastern Bolivia, with a note on the gender of *Scinax* Wagler, 1830 (Hylidae). *Rev Fr Aquariol, Herpétol* 23:133–140.
- KUMAR S, STECHER G & TAMURA K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874.
- LA MARCA E, REYNOLDS R & AZEVEDO-RAMOS C. 2004. *Scinax nebulosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55981A11390516.
- LIBRADO P & ROZAS J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- LIMA LP, BASTOS RP & GIARETTA AA. 2004. A new *Scinax* Wagler, 1830 of the rostratus group from Central Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq Mus Nac* 62:505-512.
- LOURENÇO ACC, NASCIMENTO LB & PIRES MRS. 2009. A new species of the *Scinax catharinae* species group (Anura: Hylidae) from Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Herpetologica* 65(4):468-479.
- MENEZES L, CANEDO C, BATALHA-FILHO H, GARDA AA, GEHARA M & NAPOLI MF. 2016. Multilocus Phylogeography of the Treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) Reveals a Plio-Pleistocene Diversification in the Atlantic Forest. *PLOS ONE* 11(6):e0154626.
- MILLER MA, PFEIER W & SCHWARTZ T. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. IEEE, New Orleans, p. 1-8
- NUNES I, KWET A & POMBAL JP Jr. 2012. Taxonomic revision of the *Scinax alter* species complex (Anura: Hylidae). *Copeia* 2012(3):554–569.

- NUÑEZ JJ, WOOD NK, RABANAL FE, FONTANELA FM & SITES JW Jr. 2011. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Mol Phylogenet Evol* 58:343-352.
- PALUMBI S, MARTIN A, ROMANO S, MACMILLAN WO, STICE L & GRABOWSKI G. 1991. The simple fool's guide to PCR, Version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu.
- PONS J, BARRACLOUGH TG & GOMEZ-ZURITA J. 2006. Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst Biol* 55:595–609.
- PRADO CPA, HADDAD CFB & ZAMUDIO KR. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Mol Ecol* 21:921-941.
- PULLANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S. & ACHAZ G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol* 21:1864-1877.
- CORE TEAM R. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- SALZBURGER W, EWING GB & VON HAESELER A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol Ecol* 20:1952-1963.
- SAMBROOK J & RUSSEL DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (J. Sambrook & D.W. Russel, eds) p. 631-632.
- SÃO PEDRO VA. 2014. Filogeografia de anfíbios da diagonal de áreas abertas da América do Sul. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- STURARO MJ & PELOSO PL. 2014. New Species of *Scinax* Wagler, 1830 (Anura: Hylidae) From the Middle Amazon River Basin, Brazil. *Pap Av Zool* 54(2):9-23.
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- THOMÉ MTC, ZAMUDIO KR, GIOVANELLI JGR, HADDAD CFB, BALDISSERA FA & ALEZANDRINO J 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol* 55:1018–1031.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG & GIBSON TJ. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- VEIGA-MENONCELLO ACP, LOURENÇO LB, STRÜSMANN C, ROSSAFERES DC, ANDRADE GV, GIARETTA AA & RECCO-PIMENTEL SM .2014. A phylogenetic analysis of *Pseudopaludicola* (Anura) providing evidence of progressive chromosome reduction. *Zool Scr* 43:261–272.
- VENCES M, THOMAS M, VAN DER MEIJDEN A, CHIARI Y & VIEITES D. 2005. Comparative performance of the 16SrRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool*. 2:5.

ZEISSET I & BEEBEE TJC. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Nature* 101:109-119.

6. CONCLUSÃO

A metodologia dos marcadores moleculares é bastante eficiente na complementariedade de informações junto a dados morfológicos e de vocalização na descrição de novas espécies. Confirmamos através da reconstrução da filogenia do gênero, que *Scinax* se apresenta como um grupo monofilético, validando *S. constrictus* e *S. nebulosus* como espécies distintas.

Importante destacar que o 16S rRNA atendeu os requisitos para um marcador universal de código de barras de DNA para anfíbios conforme sugerido por Vences et al. (2005b) e Xia et al. (2012), deste modo recomenda-se o uso deste como marcador adicional para código de barras do DNA de vertebrados.

Além disso, identificamos também a ocorrência de estruturação genética nas populações amostradas de *S. nebulosus*, indicando que possam existir espécies distintas entre o Nordeste e Norte do Brasil.

Há uma indicação de que essa diferenciação tenha ocorrido no período de transição Plio-Pleistoceno, porém é necessário que sejam realizados novos estudos e mais aprofundados para explicar a estrutura entre as populações de *S. nebulosus*.

Por fim, sugerimos a existência de um mosaico de habitats heterogêneos que podem ser de grande importância para as espécies de anuros, embora essa hipótese necessite de maiores detalhes em estudos moleculares, incluindo uma amostragem abrangendo toda distribuição da espécie e outras análises populacionais e demográficas.

7. REFERÊNCIAS

- Aguiar Jr, O.; Bacci Jr, M.; Lima, A. P.; Rossa-Feres, D. C.; Haddad, C. F. B.; Recco-Pimentel, S. M. 2007. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences (Amphibia, Anura, Bufonidae). Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. 305p.
- Alford, R. A., Richards, S. J., and McDonald, K. R. 2007. Biodiversity of Amphibians. Pages 1–12 in Levin, S. A., editor. *Encyclopedia of Biodiversity*, 2^a edition. Academic Press.
- Alves, A. S.; Alves, R. S.; Ribeiro-Filho, O. P. ; Arruda, L. C. 2012. Estudos biogeográficos auxiliando na compreensão das relações entre mudança climática global e declínio das populações de anfíbios anuros. *REVISTA GEONORTE*, Edição Especial, V. 1, N.4, p. 175 – 183
- Ashton, K. G.; Tracy, M. C. & De Queiroz, A., 2000. Is Bergmann's rule valid for mammals?. *American Naturalist*. 156: 390–415.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Vall, R. M.; Bermigan JR, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Rebb, C. A.; Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489-522.
- Babik, W. & Rafinski, J., 2000. Morphometric differentiation of the moor frog (*Rana arvalis* Nilss.) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 38: 239–247.
- Ballard, J.W.O.; Whitlock M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Bernarde, P. S. e R. A. Machado. 2000. Riqueza de espécies, ambientes de reprodução e temporada de vocalização da anurofauna em Três Barras do Paraná, Brasil (Amphibia: Anura). *Cuadernos de Herpetología* 14: 93-104.
- Berneck, B. V. M.; Haddad, C. F. B.; Lyra, M.L.; Cruz, C. A. G.; Faivovich, J. 2016. The Green Clade grows: A phylogenetic analysis of *Aplastodiscus* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 97- 213–223
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS et al. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148–155.
- Bidau, C. J.; Martí, D. A. & Baldo, D., 2011. Inter- and Intraspecific geographic variation of Body size in South American Redbelly Toads of the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*.45(1): 66-74.

- Bokermann, W. C. A. 1964. Uma nova espécie de *Hyla* da Serra do Mar em São Paulo (Amphibia, Salientia). *Revista Brasileira de Biologia* 24: 429–434.
- Bortolus, A. 2008. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *Ambio*. Mar;37(2):114–8.
- Bossuyt, F., Milinkovitch, M.C., 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6585–6590.
- Brown, J.H. & Lomolino, M.V. 2006. *Biogeografia*. 2a edição. Funpec. Ribeirão Preto. 692p.
- Bruschi, D. P.; Busin, C. S.; Toledo, L. F.; Vasconcellos, G. A.; Weber, L. N.; Lima, A. P.; Lima, J. D.; Recco-Pimentel, S. M. 2013. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. *BMC Genetics* 14:70
- Brusquetti, F.; Martin, J., Barrio-Amorós, C., Segalla, M.; Haddad, C. B. F. 2014. Taxonomic review of *Scinax fuscomarginatus* (Lutz, 1925) and related species (Anura; Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171, 783–821.
- Caramaschi, U., Cardoso, M.C.S. 2006. Taxonomic status of *Hyla camposseabrai* Bokermann, 1968 (Anura: Hylidae). *J. Herpetol.* 40: 552-555.
- Cardoso, A. J., G. V. Andrade e C. F. B. Haddad. 1989. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 49: 241-249.
- Carnaval, A. C.; Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*. Volume 35, Issue 7 Pages 1187–1201
- Chek, A.A., Loughheed, S.C., Bogart, J.P., Boag, P.T., 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* Anura: Hylidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 370–385
- Chiari, Y., Vences, M., Vieites, D.R., Rabemananjara, F., Bora, P., Ravao-hangimalala, O.R., Meyer, A., 2004. New evidence for parallel evolution of colour patterns in Malagasy poison frogs (Mantella). *Mol. Ecol.* 13, 3763–3774.
- Cochran, D.M. 1955. Frogs of southeastern Brazil. *Bull. U.S. Natl. Mus.* (206): 1–423.
- Cochran, D.M., & Goin, C.J. 1970. Frogs of Colombia. *United States National Museum Bulletin.* (288): 1-655.
- Conte, M. 2009. Desenvolvimento de microssatélites e análise populacional de espécies de *Physalaemus* do grupo "*cuvieri*" (Anura, Leiperidae). Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de doutor em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Cruz, C. A. G.; Nunes, I. Juncá, F. A., 2012. Redescription of *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883) (Amphibia, Anura, Odontophrynidae), with description of two new species without eyelid appendages from northeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*. 7(2): 110-122.

Dubois, A., 2003. The relationships between taxonomy and conservation biology in the century of extinctions. *C. R. Biologies*. 326: 9-21.

Duellman, W. E. 1970. Hylid frogs of Middle America. Monografía (Historia Natural) University of Kansas Museum of Natural History. N° 1.

Duellman, W. 1972a. A new species of *Hyla* from Amazonian Ecuador. *Copeia*, 265-271.

Duellman, W. E. (1972b). South American frogs of the *Hyla rostrata* group (Amphibia, Anura, Hylidae). *Zoologische Mededelingen Leiden*, 47, 177–192.

Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

Duellman, W. E.; De La Riva, I. & Wild, E. R. 1997. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. *Scientific Papers of the Natural History Museum of the University of Kansas* 3:1-41.

Duellman, W.E. 1999. Distribution patterns of amphibians in South America. In: Duellman, W.E. (Ed.), *Patterns of Distribution of Amphibians, A Global Perspective*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, pp. 255–328.

Duellman, W. E.; Marion, A. B.; Hedges, S. B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104 (1)

Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18, 367–393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2002.tb00157.x>

Faivovich, J.; Garcia, P. C. A.; Ananias, F.; Lanari, L.; Basso, N. G. & Wheeler, W. C. 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:938-950.

Faivovich, J., Haddad, C.F.B., García, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240.

Faivovich, J.; Haddad, C. F. B.; Baetac, D.; Jungferd, K.; Aivarese, G. F. R.; Brandaoe, R. A.; Sheif, C.; Barrientosg, L. S.; Barrio-Amoro, C. L.; Cruzc, C. A. G.; Wheeler, W. C. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistics*. 26 227–261.

Ferrão, M, Moravec J, Fraga, R, Almeida, AP, Kaefer, I.L., Lima, A.P. 2017. A new species of *Scinax* from the Purus-Madeira interfluve, Brazilian Amazonia (Anura, Hylidae) *ZooKeys*. 706:137–162. doi: 10.3897/zookeys.706.14691.

- Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M.; 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43 567–582.
- Fouquet, Antoine; Vences, Miguel; Salducci, Marie-Dominique; Meyer, Axel; Marty, Christian; Blanc, Michel; Gilles, André. 2007. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes : Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43 567–582
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C., 2006. The Amphibian tree of life. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 297, 1–370.
- Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 5.5. (Janeiro 2011). Electronic Database. New York, USA: American Museum of Natural History.
- Frost, D.R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.1 (10 October, 2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York
- Gaston, K. J. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405(6783), 220-227.
- Gehara, M.; Canedo, C.; Haddad, C. F. B. Vences, M., 2013. From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conserv. Genet.* Springer.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, B.D., Noonan, B.P., Schargel, W. & Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura, Athesphatanura, Dendrobatidae) *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299, 1–262.
- Guayasamin, J. M.; Castroviejo-Fisher, S.; Trueb, L.; Ayarzagüena, J.; Rada, M.; Vila, C. 2009. Phylogenetic systematics of Glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon *Allophryne ruthveni*. *Zootaxa* 2100
- Gvozdik, V.; Moravec, J.; Klutsch, C; Kotlik, C. 2010. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 1146–1166.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131 — 137
- Hanken, J., 1999. Why are there so many new amphibian species when amphibians are declining? *TREE*. 14(1): 7-8.

Hass, C.A., Dunski, J.F., Maxson, L.R., Hoogmoed, M.S., 1995. Divergent lineages within the *Bufo margaritifer* complex (Amphibia, Anura, Bufonidae) revealed by albumin immunology. *Biotropica* 27, 238–249.

Hedges, S.B., Duellman, W.E. & Heinicke, M.P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737, 1–182.

Heyer, W. R., Rand, A. S., Cruz, C. A. G., Peixoto, O. L. & Nelson, C. E. 1990. Frogs (Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 29(1): 1-6.

Heyer, W. R.; Reid, Y. R. 2003. Do advertisement calls define species boundaries in the genetically diverse frog taxon currently known as *Leptodactylus fuscus* (Amphibia: Leptodactylidae)? *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 75: 39–54.

Hickerson, M.J.; Carstens, B. C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K. A.; Graham, C. H. Johnson, J. B.; Rissler, L. Vitoriano, P. F.; Yoder, A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. [Mol Phylogenet Evol.](#) Jan;54(1):291-301. doi: 10.1016/j.ympev.2009.09.016.

Hikosaka, A.; Kawahara, A. 2004. Lineage-specific tandem repeats riding on transposable element MITE in *Xenopus* evolution: a new mechanism for creating simple sequence repeats. *Journal Molecular Evolution*, v 59, p. 738-746.

Joly, C. A.; Haddad, C. F. B.; Verdade, L. M.; Oliveira, M. C.; Bolzan, V. S.; Berlinck, R. G. S. 2011. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*, São Paulo, n.89, p. 114-133, março/maio.

[Köhler, J., and W. Böhme . 1996.](#) Anuran amphibians from the region of Pre-Cambrian rock outcrops (inselbergs) in northeastern Bolivia, with a note on the gender of *Scinax* Wagler, 1830 (Hylidae). [Revue Française d'Aquariologie, Herpétologie](#) 23: 133-140

Kolenc, F., C. Borteiro, and M. Tedros. 2004. La larva de *Hyla uruguayana* Schmidt 1944 (Anura: Hylidae), con comentarios sobre su biología en Uruguay y su status taxonómico. *Cuadernos de Herpetología* 17(1-2): 87-100.

Lima, L. P.; Bastos, R. P.; Giaretta, A. A., 2004. A new *Scinax* Wagler, 1830 of the *rostratus* group from Central Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional*. 62: 505-512.

Lima, A. P. et al. 2006. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. Ed. Attema. Manaus, AM.

Lingnau, R. 2009. Distribuição Temporal, Atividade Reprodutiva E Vocalizações Em Uma Assembleia De Anfíbios Anuros De Uma Floresta Ombrófila Mista Em Santa Catarina, Sul Do Brasil. Tese de doutorado. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

- Lips, K.R., Burrowes, P.A., Mendelson, J.R. & Parra-Olea, G. 2005. Amphibian population declines in Latin America: a synthesis. *Biotropica* 37(2):222-226.
- Lougheed, S.C.; Austin, J.D.; Bogart, J.P.; Boag, P.T.; Chek, A.A. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology*, 6:23-38.
- Lutz, B. 1968. New Brazilian forms of *Hyla*. *Pearce-Sellards Series. Texas Memorial Museum. Austin*, 10, 3–18.
- Lutz, B. 1973. *Brazilian Species of Hyla*. University of Texas Press, Austin, 260 pp.
- Marjanovic, D.; Laurin, M. 2007. Fossils, molecules, divergence times, and the origin of Lissamphibians. *Systematic Biology* 56: 369–388.
- Martin, P. R.; Mckay, J. K., 2004. Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. *Evolution*. 58(5): 938-945.
- Morrison, C. Hero, J.-M., 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*. 72: 270-279.
- Müller, P. 1973. Dispersal Centres of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm. *Biogeographica*, 2. The Hague: Dr. W. Junk.
- Nabil, A.; Sarra, F.; Slim, B.-Y.; Merella, P. & Khaled, S., 2011. Morphological variation of the african green toad, *Bufo boulengeri* (Amphibia: Anura) in Tunisia. *Pakistan J. Zool.* 43(5): 921-926.
- Narvaes, P., 2003. Revisão taxonômica das espécies de *Bufo* do complexo *granulosus* of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*, 31(4), 231–410.
- Oliveira, H. H. P. 2012. Diversidade genética de hílídeos do Brasil central [manuscrito] / Hugo Henrique Pádua de Oliveira. - xv, 72 f. : il., figs, tabs.
- Padial, J. M.; Miralles, A. De La Riva, I.; Vences, M. 2010. Review The integrative future of taxonomy. . *Frontiers in Zoology*, 7:16
- Padial, J. M.; Grant, T.; Frost, R. D. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825 (1)
- Peixoto, O.L., Caramaschi, U. & Freire, E.M.X. 2003. Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the state of Alagoas, Northeastern Brazil. *Herpetologica*, 59, 2, 235-246.
- Pombal Jr., J.P.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S., 1995. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from Southeastern Brazil, with Comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 29 (1): 1-6.
- Pombal, J.R., J.P. 2010. A posição taxonômica das “variedades” de *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) descritas por MirandaRibeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, 526: 1-12.

- Pyron, R. A.; Wiens, J. J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 543-583.
- Pyron, R. A.; Wiens, J. J. 2017. Large-scale phylogenetic analyses reveal the causes of high tropical amphibian diversity. *Proc R Soc B* 280: 20131622. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1622>
- Richards, C.M.; Moore, W.S., 1996. A phylogeny for the African treefrog family Hyperoliidae based on mitochondrial rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 522–532.
- Sá, R. O.; Heyer, W. R.; Camargo, A. 2005. A Phylogenetic analysis of *Vanzolinius HEYER, 1974 (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)*: taxonomic and life history implications. *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, v.63, n.4, p.707-726, out./dez.
- Salducci, M.; Marty, C.; Chappaz, R.; Gilles, A. 2002. Molecular phylogeny of French Guiana Hylinae : implications for the systematic and biodiversity of the Neotropical frogs. *C. R. Biologies* 325. 141-153.
- Salducci, M.-D., Marty, C., Fouquet, A., Gilles, A., 2005. Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana. *C. R. Biol.* 328, 1009–1024.
- São Pedro, V. A. 2014. Filogeografia de anfíbios da diagonal de áreas abertas da América do Sul. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Savage, J. M. & Heyer, W. R. 1967. Variation and distribution in the tree-frog genus *Phyllomedusa* in Costa Rica, Central America. *Beitrage zur Neotropischen Fauna*, 5, 111–131.
- Sclater, P.L. 1858. On the general geographical distribution of the members of the class Aves. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London. Zoology*, 2(7), 130-136.
- Smith, S. A.; Oca, A. N. M.; Reeder, T. W. Wiens, J. J. 2007. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in middle American treefrogs: why so few species in lowland tropical rainforests? *Evolution* 61-5: 1188–1207
- Stuart, B.L., Inger, R.F., Voris, H.K., 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biol. Lett.* 2, 470–474.
- Turchetto-Zolet, A. C.; Pinheiro, F.; Salgueiro, F.; Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. [Mol Ecol](https://doi.org/10.1111/mec.12164). Mar;22(5):1193-213. doi: 10.1111/mec.12164
- Vences, M., Kosuch, J., Boistel, R., Haddad, C.F.B., La Marca, E., Lötters, S., Veith, M., 2003. Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical

poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Organ. Divers. Evol.* 3, 215–226.

Vences, M., Wake, D.B. 2007. Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian Biology*, v.6, Systematics (ed. by H. H. Heatwole and M. Tyler), pp. 2313–2669. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, NSW.

Verdade, V. K. Rodrigues, M. T., 2007. Taxonomic Review of *Allobates* (Anura, Aromobatidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Journal of Herpetology*. 41(4): 566-580.

Wiens, J. J., and C. H. Graham. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:519–539.

Wiens, J. J., C. H. Graham, D. S. Moen, S. A. Smith, and T. W. Reeder. 2006. Evolutionary and ecological causes of the latitudinal diversity gradient in hylid frogs: treefrog trees unearth the roots of high tropical diversity. *American Naturalist* 168:579–596.

Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X. & Moen, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 55, 871–882.

Wolstenholme, D. R. 1992. Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *International Review of Cytology*, 141: 173-216.