



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

William Pinheiro da Costa

ASPECTOS FILOGEOGRÁFICOS DO GRUPO *Physalaemus*
deimaticus (*sensu* Nascimento, Caramaschi e Cruz 2005)
(AMPHIBIA: ANURA)

CAMPINAS

(2017)

William Pinheiro da Costa

ASPECTOS FILOGEOGRÁFICOS DO GRUPO *P. deimaticus* (sensu Nascimento, Caramaschi e Cruz 2005) (AMPHIBIA: ANURA)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Animal, na área de Concentração Biodiversidade Animal.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO WILLIAM PINHEIRO DA COSTA E ORIENTADO PELA Prof^a. Dr^a. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço

CAMPINAS

(2017)

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9436-1856>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823a Costa, William Pinheiro da, 1982-
Aspectos filogeográficos do grupo *Physalaemus deimaticus* (sensu Nascimento, Caramaschi e Cruz 2005) (Amphibia: Anura) / William Pinheiro da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço Morandini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Filogeografia. 2. Anuro - Espinhaço, Serra do (MG e BA). 3. Anfíbio - Distribuição geográfica. I. Lourenço, Luciana Bolsoni, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phylogeographic aspects of *Physalaemus deimaticus* group (sensu Nascimento, Caramaschi e Cruz 2005) (Amphibia: Anura)

Palavras-chave em inglês:

Phylogeography

Anura - Espinhaço Mountains (Brazil)

Amphibians - Geographical distribution

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Doutor em Biologia Animal

Banca examinadora:

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini [Orientador]

André Rinaldo Senna Garraffoni

Cristiano de Campos Nogueira

Daniel Pacheco Bruschi

Fabio Pinheiro

Data de defesa: 25-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 25 de Agosto 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Prof. Dr. André Rinaldo Senna Garraffoni

Prof. Dr. Cristiano de Campos Nogueira

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Prof. Dr. Fabio Pinheiro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*Dedico o presente trabalho a minha
família. Fonte de inspiração, incentivo e afeto.*

Muito Obrigado.

AGRADECIMENTOS

A cada ciclo que se encerra, aflora um misto de alegria, tristeza e esperança.

A alegria, oriunda da sensação de dever cumprido, vem quando olhamos o trabalho finalizado e ao ler cada palavra, vírgula, ponto, emerge a lembrança do tempo dispendido para tal, das horas de leitura, das viagens, dos momentos com as pessoas que tiveram algum grau de envolvimento e por fim, do quanto esse tipo de desafio nos transforma. Entramos mestres na inexperiência e saímos doutores no que está por vir.

É justamente nesse tal estar por vir que reside o confronto entre a tristeza e a esperança.

A tristeza decorre de ter que deixar o convívio de alguns entes queridos, o desconforto de ter que mudar de cidade, a angústia de passar a ser apenas mais um visitante esporádico no local que nos últimos anos lhe serviu, não apenas de ambiente de trabalho, mas também por vezes atuou como segunda casa. Aquela desconfiança, quase que ciumenta, de ter que deixar para quem chega o espaço que lhe é tão caro e que lhe trouxe tanto conhecimento. Ainda assim, tudo faz parte desse ciclo de renovação, e lembrar que um dia também cheguei, uma vez que meus predecessores estavam de partida me conforta. Ao fim e ao cabo, a mim me resta acreditar no que foi realizado e na esperança de que cresçam os frutos dessa fase marcante.

E que essa tal esperança seja a força que me motive a continuar seguindo em frente, ainda que em meio a uma série de dificuldades, traçar esse caminho parece valer a pena. Pois é, quem disse que seria fácil ser doutor em Biologia Animal num país onde sobra riqueza e diversidade, mas falta recursos que permitam explora-las com a devida dedicação e profundidade que lhes são merecidas. Fazer Ciência é mágico, Viver da Ciência pode levar ao desengano. Consciente disso, seguirei em busca do que acredito e que, em algum lugar, um novo ciclo tenha início.

Bem, ainda que recaia sobre mim o mérito de ter realizado esse trabalho, nada seria possível se nas entrelinhas, ou melhor, nos bastidores, não estivesse a mão de outras pessoas que me serviram de companhia e esteio nesses últimos anos. Por esse motivo, focarei meus agradecimentos a essas pessoas, que me ajudaram tanto, ora de forma consciente ora inconscientemente me estenderam a mão, a eles chamarei de **AMIGOS**.

Sendo assim,

Agradeço ao Sr. Ednilson Pinheiro, a Sra. Cidinha Pinheiro e a Angeline Pinheiro; meu pai, minha mãe e minha irmã.

Ah, mais por que você atribui a sua família os agradecimentos encaminhados aos que você chamou de **AMIGOS**? Porque esses foram os meus primeiros e principais amigos. Quando criança pai, mãe, irmã nos protegem ou por nós são protegidos, nos ensinam, nos provém em nossas necessidades afetivas e emocionais. Quando adultos, eles nos completam, permitem que enxerguemos mais longe. Não estão ali só para ensinar e proteger, estão ali para compartilhar experiências que nos ajudam, não mais crescer em estatura, mas a crescer em sabedoria. Para mim, essas são virtudes compartilhada apenas entre **AMIGOS** de verdade.

Agradeço a Helena S. Marcon, minha noiva.

Para além do amor, carinho e paciência que permeiam um relacionamento, construímos ao longo de tantos anos aquilo que me faz acreditar que seguiremos mais tantos juntos, a amizade e cumplicidade que apenas pessoas maduras e que viveram altos e baixos podem entender. Estar ao seu lado é bom, e sei que se estenderá por longos dias.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini, minha orientadora.

A relação orientador/orientado tende a dar certo quando amizade e profissionalismos caminham de mãos dadas, um não se sobrepondo ao outro, gerando vínculos que podem durar anos. Contigo sinto que aprendi não apenas o conhecimento técnico e teórico, mas também, o equilíbrio necessário que me servirá de espelho no momento que a mim for requerido tamanha responsabilidade. Obrigado por abrir as portas do seu laboratório e por ter me ensinado tantos valores nesse tempo. Fui mesmo privilegiado, pois os orientadores que a vida acadêmica me proporcionou foram, sem dúvidas, os mesmos gigantes citados por Isaac Newton. Sem vocês, dificilmente enxergaria para além de minha própria ignorância.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Shirlei Maria Recco-Pimentel, exemplo uma vida dedicada a carreira acadêmica.

Poder fazer parte do grupo consolidado pelos seus anos de dedicação a universidade gera espontaneamente uma mistura de orgulho, respeito e senso de responsabilidade. Isso porque, no início da carreira de todo recém doutor, ainda quando buscamos nosso lugar ao Sol, por vezes somos reconhecidos mais pelo grupo no qual fomos formados e pelos orientadores que nos conduziram do que pelo nome que carregamos. Nesse sentido, se a mim foi concedida a oportunidade de amadurecer dentro desse núcleo tão respeitado, cabe agora a responsabilidade

de fazer não menos que o melhor, não mais que a excelência. Esses anos compartilhando seu convívio foi por si só um grande aprendizado.

Agradeço ao Dr. Silvio César de Almeida, meu **AMIGO** de tantos trabalhos.

O tempo passa, e quando acho que aprendi alguma coisa a mais sobre sapos, cobras e lagartos, chega ele e me mostra que ainda tenho muito que aprender. Se hoje obtenho esse título, é porque busquei seguir seus passos, aprendendo a cada dia, me esforçando para chegar mais a frente.

Agradeço a Ms. Karin Seger, minha **AMIGA** de tantas discussões e longas conversas.

A pessoa que me ajudou a dar os primeiros passos nas técnicas de laboratório envolvendo genética molecular. Cheguei sabendo muito pouco, porém saio depois de ter aprendido tanto contigo. Que você é fundamental para o bom andamento do laboratório, isso todo mundo sabe, entretanto, que você foi fundamental para o bom andamento de tudo que eu consegui fazer, isso talvez estejam sabendo agora. Perdi as contas de quantas vezes fui até você com alguma dúvida ou questionamento e só de chegar perto e falar “Ooo Karin...” já me vinha a resposta na cabeça. Para mim, esse chamado virou quase sinônimo de Eureka!!! Bem, faço questão de deixar aqui esse registro, espero que seu futuro seja brilhante e que nele tenha espaço para mim sempre que precisar chamar “Ooo Karin!”

Agradeço ao Ms. Kaleb Pretto Gatto, vulgo Juninho, meu **AMIGO** de campo, de prosa, de copos, de paiero e de tantas divagações históricas, políticas e teóricas.

Nesses anos, sua presença sempre marcou os melhores momentos de descontração e amizade dentro e fora do laboratório. Nos trabalhos de campo, a pessoa mais bem-disposta que poderia ter me acompanhado, carecendo apenas de três aspectos pouco relevantes para uma ajuda mais efetiva nesse tipo de trabalho, ouvir os bichos, achar os bichos e identificar os bichos. Brincadeiras à parte, não trocaria sua companhia pela dos melhores especialistas na área. Sem dúvidas, dos citogeneticistas que eu conheço, você é um dos que mais confio e que acredito ter uma longa caminhada promissora pela frente. Espero continuar a aprender muito contigo.

Agradeço a Alessandra, ora **AMIGA** ora técnica do laboratório responsável por colocar ordem na moçada. Não fossem seus olhos atentos, a bronca comeria solta,

principalmente durante o processo de adaptação a dinâmica do laboratório. Só com o tempo, percebe-se o quanto esse olhar atento reflete na qualidade do trabalho concebido.

Agradeço aos **AMIGOS** com quem convivi esses anos compartilhando o mesmo laboratório sendo esses: Ana Veiga, Daniel Bruschi, Ariane Campos, Lenita Tallarico, Juan Martin, Maurício Arruda, Stenio Vitorazzi, Júlio Santos, Maria Rodrigues, Débora Rodrigues, Juliana Nascimento, Cíntia Targueta, Renata Tenório, Renata Alitto, Livia Teixeira, Jessika Lisboa, Tobias Nondilo, Denise Pedrosa, Isabela Corbo, Marcos Manfrin, João Mattos e Letícia Dias. Foram inúmeras reuniões e discussões das quais resultou boa parte do conhecimento que adquiri ao longo desses anos. Não fossem a colaboração de todos vocês, com certeza, tanto menos saberia.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo C. A. Garcia (UFMG) e, em nome de seu grupo, a figura de Fernando Leal. Ao professor, agradeço pela concessão de boa parte do material biológico utilizado nesse estudo. Ao Fernando e seus colegas, agradeço pelo empenho em atuar de forma ativa na obtenção de dados que a mim serão complementares, mas que em conjunto, permitirão traçar um perfil robusto acerca da história natural, em suas diferentes facetas, do grupo *Physalaemus deimaticus*. Sem o esforço e colaboração indispensável de todos vocês, esse trabalho não teria avançado até esse ponto.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Maria Rita S. Pires (UFOP) e ao aluno Filipe R. Moura pelo acolhimento e apoio ao trabalho de campo realizado na região de Ouro Preto.

Agradeço aos coordenadores e a todos os funcionários envolvidos com o programa de pós-graduação em Biologia Animal da UNICAMP, dada sua dedicação e auxílio ao longo dos últimos anos.

Agradeço a CAPES, pelos recursos que viabilizaram minha permanência em Campinas.

*“A ciência pode determinar o que é,
Não o que deveria ser.”*

Albert Einstein

RESUMO

A partir do momento em que a Filogeográfica desponta como a ciência integrativa a unir Biogeografia, Genética de Populações e Filogenias, sob sua perspectiva, abriu-se uma nova janela para o estudo da distribuição das espécies ao longo do tempo e do espaço. A heterogeneidade ecológica observada em ambientes de montanhas associado a seu elevado grau de endemismo, as torna grandes laboratórios para a análise de processos filogeográficos. Tal contexto se aplica integralmente ao grupo *Physalaemus deimaticus*, que, formado pelas espécies *P. deimaticus*, *P. erythros* e *P. rupestris*, tem como característica o endemismo e a distribuição restrita à Serra do Espinhaço e Serra da Mantiqueira. Aqui, foi investigada a história do grupo *P. deimaticus* e sua relação com a Serra do Espinhaço. Para tanto, foram avaliados oito marcadores moleculares, sendo esses utilizados em inferências filogenéticas e análises da estrutura populacional e da demografia histórica do grupo. Ainda com base nesses marcadores, foram avaliados cenários para a distribuição das espécies/populações simulando eventos de vicariância, dispersão e consequente especiação ao longo de toda a área de distribuição via *Approximate Bayesian Computation* (ABC). Em resposta, corroborou-se o monofiletismo do grupo, e foram encontradas evidências da presença de uma espécie ainda não descrita, tratada como *Physalaemus* sp. Em *P. deimaticus* foram observados os maiores valores de diversidade genética e estrutura populacional bem definida, aspectos que se contrapõem aos encontrados na sua espécie irmã, *P. erythros*, que se apresentou geneticamente bastante homogênea e pouco diversa. O cenário filogeográfico mais provável para o grupo apontou eventos de vicariância como responsáveis pela separação das principais linhagens que então resultariam nas espécies atuais, salvo *P. erythros* que haveria surgido via evento de colonização do Quadrilátero Ferrífero. Tais eventos de separação teriam se concentrado entre o Plioceno e o Médio Pleistoceno, tendo esse último também influenciado na separação entre as populações de *P. deimaticus*. Para as populações de *P. deimaticus*, eventos de vicariância também foram os mais influentes. A ocorrência, na Serra do Cipó, de *Physalaemus* sp., clado irmão de *P. rupestris*, que ocorre na Serra da Mantiqueira, reforça o elo ligando a história dessas duas cadeias de montanhas. No caso dos cenários envolvendo as espécies do grupo *P. deimaticus* e as populações de *P. deimaticus*, observou-se que os principais eventos de separação das linhagens foram antigos. Nesse sentido, as oscilações climáticas do Pleistoceno parecem ter tido pouca influência na dinâmica do grupo e mesmo das populações de *P. deimaticus*. Os eventos de cladogênese se deram durante o final do Plioceno/início do Pleistoceno, período em que as espécies estabeleceram-se junto aos campos rupestres nos ambientes de altitude e, uma vez nessas localidades, os ciclos climáticos posteriores não favoreceram a origem de novos

táxons. Em relação à espécie *P. deimaticus*, as populações atuais estabeleceram-se em suas respectivas localidades durante o médio Pleistoceno, e há evidências de contato secundário entre a população que ocorre na região de Jaboticatubas e aquela encontrada no Pico do Itambé.

Palavra chave: Filogeografia, grupo *Physalaemus deimaticus*, Serra do Espinhaço, vicariância, colonização, especiação.

ABSTRACT

From the moment when Phylogeography arose as the integrative science to unite Biogeography, Population Genetics and Phylogenetics, a new window has been opened for the study of the distribution of species over time and space. The ecological heterogeneity observed in mountain environments, which are recognized areas of endemism, makes them great laboratories for the analysis of phylogeographic processes. This context applies integrally to the group *Physalaemus deimaticus*, which is composed of the species *P. deimaticus*, *P. erythros* and *P. rupestris*, and is characterized by endemism and distribution restricted to Serra do Espinhaço and Serra da Mantiqueira. Here, we investigated the history of the *P. deimaticus* group and its relationship with the Serra do Espinhaço. Therefore, eight molecular markers were evaluated, which were used in phylogenetic inferences and analysis of population structure and historical demography. Different scenarios were built for evaluating the evolution of the distribution of species/populations using Approximate Bayesian Computation (ABC). In response, the monophyly of the group was corroborated, and evidences for an undescribed species, referred to as *Physalaemus* sp., emerged. *Physalaemus deimaticus* showed high values of genetic diversity and well-defined population structure, in contrast to its sister species, *P. erythros*, which was genetically quite homogeneous and not very diverse. The most probable phylogeographic scenario for the group pointed to events of vicariance as responsible for the separation of the main lineages that would then result in the present species, except for *P. erythros* that would have arisen through the event of colonization of the Quadrilátero Ferrífero. These separation events would have been concentrated between the Pliocene and the Middle Pleistocene, the latter having also influenced the separation of *P. deimaticus* populations. For populations of *P. deimaticus*, vicariance were also the most important events. The occurrence, in the Serra do Cipó, of *Physalaemus* sp., the sister clade of *P. rupestris*, which occurs in the Serra da Mantiqueira, reinforces the link connecting the history of these two mountain ranges. In the case of the scenarios involving *P. deimaticus* species group as well as the populations of *P. deimaticus* species, the main events of separation of the lineages were inferred to be ancient, suggesting that the climatic oscillations of the Pleistocene had little influence on this process. The cladogenesis events occurred during the late Pliocene/beginning of the Pleistocene, when the species settled near the rupestrian fields in high altitude environments and, once in those localities, the later climatic cycles did not favor the origin of new taxa. The present populations of the species *P. deimaticus* settled in their respective localities during the middle Pleistocene, and evidence of secondary contact between the population from Jaboticatubas and that from the Itambé Peak was obtained.

Key words: Phylogeography, *Physalaemus deimaticus* group, Serra do Espinhaço, vicariance, colonization, speciation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Cadeia do Espinhaço e influência de três dos principais domínios fitogeográficos brasileiros (ver legenda) (Retirado de Bitencourt 2013).

Figura 2: (A) Relação intergenérica na subfamília Leiuperinae apresentando os dois cladogramas relacionados ao gênero *Physalaemus*. (B) Relações interespecíficas no clado *Physalaemus signifer*. Em destaque, o grupo *Physalaemus deimaticus*. (modificado a partir de Lourenço et al. 2015).

Figura 3: *Physalaemus deimaticus* Sazima & Caramaschi 1986 em vista lateral. Foto Ivan Sazima.

Figura 4: *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli & Feio 1991 em vista lateral. Foto Juliana Toledo (Oliveira et al. 2009).

Figura 5: *Physalaemus erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto 2003 em vista lateral. Foto Pombal Jr. (Baêta e Silva 2009).

Figura 6: Área de distribuição das espécies do grupo *Physalaemus deimaticus*. Pontos em verde: *P. deimaticus*. Pontos em vermelho: *P. erythros*. Pontos em azul: *P. rupestris*. Ponto amarelo: *Physalaemus* sp. **1**: Diamantina. **2**: Itambé. **3**: Jaboticatubas. **4**: Barão de Cocais. **5**: Catas Altas. **6**: Ouro Preto. **7**: Cipó. **8**: Lima Duarte. **9**: Rio Preto.

Figura 7: Exemplo de cenário filogeográfico. **T origem**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Figura 8: Árvore de consenso estrito resultante da análise filogenética de Máxima Parcimônia realizada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Os números abaixo dos ramos indicam valores de *bootstrap*.

Figura 9: Árvore resultante da análise filogenética por Inferência Bayesiana realizada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

Figura 10: Rede de haplótipos (Nº de hap = 37) gerada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Tons de verde correspondem a *P. deimaticus*, tons de vermelho correspondem a *P. erythros*, amarelo corresponde a *Physalaemus* sp. e tons de azul correspondem a *P. rupestris*.

Figura 11: Rede de haplótipos do gene POMC envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

Figura 12: Rede de haplótipos do gene β -crys envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

Figura 13: Rede de haplótipos do gene RHOD envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

Figura 14: Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos mitocondriais (genes mitocondriais concatenados) (**A**) e dos haplótipos do gene nuclear POMC (**B**) de espécies do grupo *P. deimaticus*, realizadas pelo BAPS.

Figura 15: Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos do gene nuclear β -crys (**A**) e dos haplótipos do gene nuclear RHOD (**B**) de espécies do grupo *P. deimaticus*, realizadas pelo BAPS. A análise de atribuição resgatou 3 *clusters* ($K = 3$). Observa-se que para β -crys um *cluster* agrupou os indivíduos de *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., enquanto no caso do gene RHOD um *cluster* (rosa) agrupou indivíduos de *P. deimaticus* e *P. erythros*.

Figura 16: Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos obtidos para *P. deimaticus* com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais, realizadas pelo BAPS. A análise atribuição resgatou 3 *clusters* ($K = 3$), tendo sido quatro indivíduos da localidade Jaboticatubas atribuídos ao *cluster* contendo indivíduos da localidade Itambé.

Figura 17 Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos obtidos para *P. erythros* com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais, realizadas pelo BAPS. A análise atribuição resgatou 1 *cluster* ($K = 1$) agrupando todos os indivíduos independente de sua localidade.

Figura 18: Teste de Mantel para a correlação entre distância genética estimada a partir da matriz concatenada dos genes mitocondriais e distância geográfica para *Physalaemus deimaticus* (**A**) e *Physalaemus erythros* (**B**).

Figura 19: Análises demográficas realizadas para o grupo *P. deimaticus* e para as espécies do grupo com base na matriz mitocondrial concatenada. Linhas coloridas representam as frequências das diferenças observadas nas comparações par-a-par dos haplótipos encontrados (*mismatch distribution* observada). Linhas pretas representam a *mismatch*

distribution esperada diante de um cenário de expansão populacional. **SSD**: *Sum of Square Deviation*.

Figura 20: Análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSBP) do comportamento demográfico ao longo do tempo para as espécies *Physalaemus deimaticus* (A), *Physalaemus erythros* (B) e *Physalaemus* sp.

Figura 21: Árvore resultante da análise filogenética por Inferência Bayesiana realizada no BEAST com base no gene 16S e calibrada com a taxa de mutação de 0.0028 mutação/sítio/milhões. Valores abaixo dos ramos são referentes a estimativas de tempo (em milhões de anos). Barras azuis representam o intervalo de confiança.

Figura 22: Cenários filogeográficos para a espécie *Physalaemus deimaticus* testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). **T origem**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Figura 23: Cenários filogeográficos para *Physalaemus rupestris* e *Physalaemus* sp. testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). **T origem**: Tempo de origem. **T1**: Tempo de separação. **T1-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Figura 24: Cenários filogeográficos para o grupo *Physalaemus deimaticus* testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). **T origem**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Figura 25: Avaliação dos cenários (*a priori*) em relação aos dados observados e dados simulados realizada pela Análise de Componente Principal (PCA). Cada cenário foi avaliado com base em 1000000 de simulações. (1) Cenários do grupo *Physalaemus deimaticus*. (2) Cenários 1-5 da espécie *P. deimaticus*. (3) Cenários 1-3 das espécies *P. rupestris* e *Physalaemus* sp.

Figura 26: Cenário filogeográfico e resultados a posteriori dos *priors* utilizados para a simulação do modelo para *Physalaemus deimaticus* com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). (A) Esquema do cenário 2, no qual o primeiro evento de separação se deu entre Diamantina e as demais localidades (**T origem**), seguido por novo evento entre Itambé e Jaboticatubas (**T1**). (B) representação do cenário 2 gerada no programa DiyABC (as cores diferem do esquema do cenário por ter sido geradas pelo programa). (C) resultado gráfico dos *priors* estimados para o melhor cenário filogeográfico. **T origem** ou **t**: Tempo de origem. **T1**: Tempo de separação. **T atual = 0**: Presente. **N1 = pop1**: Tamanho efetivo da localidade de Diamantina. **N2 = pop2**: Tamanho efetivo da localidade de Itambé. **N3 = pop3**: Tamanho efetivo da localidade de Jaboticatubas. **K1 seq_1**: Estimativa do valo de *K*. **useq_1**: Estimativa

da taxa de mutação genes mitocôndrias. **useq_2**: Estimativa da taxa de mutação genes nucleares.

Figura 27: Cenário filogeográfico e resultados a posteriori dos *priors* utilizados para a simulação do modelo para o grupo *Physalaemus deimaticus* com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). (A) Esquema do cenário 5, no qual *P. erythros* teria se originado de um evento de colonização proveniente de *P. deimaticus* da Cadeia do Espinhaço. (B) Representação do cenário 5 gerada no programa DiyABC. (C) Resultado gráfico dos *priors* estimados para o melhor cenário filogeográfico. **T origem** ou **t**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual = 0**: Presente. **db**: Intervalo para o tempo de colonização. **N1 = pop1**: Tamanho efetivo de *P. deimaticus*. **N2 = pop2**: Tamanho efetivo de *P. erythros*. **N3 = pop3**: Tamanho efetivo de *Physalaemus* sp. **N4 = pop4**: Tamanho efetivo de *P. rupestres*. **Nanc**: Tamanho efetivo da espécie ancestral. **N3b**: Tamanho efetivo da espécie ancestral de *Physalaemus* sp. e *P. rupestris*. **N2m**: Tamanho efetivo do grupo que deu origem a *P. erythros*. **K1 seq_1**: Estimativa do valo de *K*. **useq_1**: Taxa de mutação dos genes mitocondriais. **useq_2**: Taxa de mutação do gene nuclear Rhod. **useq_3**: Taxa de mutação do gene nuclear POMC. **useq_4**: Taxa de mutação do gene nuclear β -crys.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localidades amostradas e número de espécimes coletados (*N*) dos táxons de interesse. Todas as localidades pertencem ao estado de Minas Gerais. *localidades-tipo.

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação (*) e sequenciamento (#) dos segmentos mitocondriais e nucleares das espécies do grupo *Physalaemus deimaticus*. F= *forward*. R= *reverse*.

Tabela 3. Distâncias genéticas (*p-distance*) entre as espécies que formam o grupo *P. deimaticus* estimadas com base em 627 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI) e 1414 pb do DNAr 16S (16S). Valores expressos em %. Valores em negrito na transversal correspondem a distâncias intra-específicas.

Tabela 4 Índices de diversidade dos genes analisados. **N**: número de sequências; **S**: número de sítios polimórficos; **h**: número de haplótipos; **Is**: sítios parcimoniosamente informativos; **Hd (Sd)**: diversidade haplotípica e desvio padrão; **π (Sd)**: diversidade nucleotídica e desvio padrão.

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) e grau de fixação (*Fst*) relativos aos genes mitocondriais de *P. deimaticus*. Além de comparações entre as três populações reconhecidas pelo programa BAPS, foram também realizadas comparações entre o grupo de haplótipos encontrados em Diamantina e o grupo de haplótipos encontrados em Jaboticatubas e Itambé.

Tabela 6: Estatísticas sumárias dos testes de expansão populacional realizados para os membros do grupo *P. deimaticus*. **SSD**: *Sum of Square Deviation*. **RI**: *Raggedness index*.

Tabela 7: Estimativa do TMRCA com base nos genes mitocondriais 16S. **95% HPD**: Densidades probabilísticas mais altas no intervalo de 95%. **Ma**: milhões de anos.

Tabela 8: Valores *a posteriori* dos *priors* estimados com base no melhor cenário obtido para a espécie *P. deimaticus*: **N1**: Diamantina, **N2**: Itambé, **N3**: Jaboticatubas, **T**: Tempo de origem, **T1**: Tempo de separação, **useq_1**: grupo mitocondrial, **useq_2**: grupo nuclear, **k1seq_1**: valores.

Tabela 9: Valores *a posteriori* dos *priors* estimados com base no melhor cenário obtido para para o grupo *P. deimaticus*. **N1**: *P. deimaticus*, **N2**: *P. erythros*, **N3**: *Physalaemus* sp., **N4**: *P. rupestris*, **Nanc**: tamanho efetivo da espécie ancestral, **N3b**: tamanho efetivo da espécie ancestral de *Physalaemus* sp. e *P. rupestris*, **N2m**: tamanho efetivo do grupo que deu origem a *P. erythros*, **T**: Tempo de origem, **T1** e **T2**: Tempo de separação, **db**: intervalo para o

tempo de colonização, **useq_1**: grupo mitocondrial, **useq_2**: gene nuclear RHOD, **useq_3**: gene nuclear POMC, **useq_4**: gene nuclear β -crys, **k1seq_1**: valores de K.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo.....	
Abstract.....	
Introdução.....	23
A Filogeografia.....	23
Filogeografia: Modelo de estudo e implicações.....	25
Filogeografia: Montanhas.....	27
Serra do Espinhaço e Diversidade	28
O grupo <i>Physalaemus deimaticus</i> (<i>sensu</i> Nascimento, Caramaschi & Cruz).....	30
Hipóteses	35
Objetivos	36
Material e Métodos.....	37
Amostragem.....	37
Análise molecular	38
Extração de DNA e Obtenção das sequências.....	38
Análises filogenéticas	40
Rede de Haplótipos, Diversidade Genética e Estrutura Populacional.....	41
Estimativa de tempo do mais recente ancestral comum (TMRCA) e Demografia histórica.....	42
Cenários Filogeográficos das espécies do grupo <i>P. deimaticus</i>	43
Resultados.....	46
Análises Filogenéticas	46
Análise por Máxima Parcimônia (MP), Inferência Bayesiana (IB) e Distância genética.....	46
Diversidade genética e rede de haplótipos.....	49
Estrutura populacional e análise de variância molecular	53

Demografia Histórica e Tempo do Mais Recente Ancestral Comum (TMRCA).....	61
Grupo P. <i>deimaticus</i> e os cenários de ocupação Filogeográficos	65
Discussão.....	73
Grupo <i>Physalaemus deimaticus</i> : relações filogenéticas.....	73
Filogeografia do grupo <i>Physalaemus deimaticus</i>	74
Considerações Finais.....	79
Referências Bibliográficas.....	80
Anexos I	95
Anexos II	98
Anexos III.....	101
Anexos IV.....	105
Anexos V.....	106
Anexos VI.....	107

INTRODUÇÃO

A FILOGEOGRAFIA

Desde o momento em que as bases da biologia evolutiva foram apresentadas em obras assinadas por Charles Robert Darwin, Alfred Russel Wallace, seus contemporâneos e futuros propagadores, abriu-se uma janela para naturalistas e biólogos avaliarem a natureza em sua ampla diversidade, restritas particularidades, discretas nuances e exacerbados exageros. Diante de uma nova perspectiva que proporcionaria ampliar a compreensão do universo biológico, fomenta-se a busca pelas leis e processos envolvendo os aspectos evolutivos contidos na história das espécies. Deveras cativante e inspirador o resultado dessa busca, tão logo no meio científico ficaria famosa a frase proferida por Theodosius Dobzhansky com a qual sintetiza esses avanços afirmando que: “Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da evolução” (Dobzhansky 1973).

Munidas de novos conceitos e ferramentas, áreas da ciência biológica como Sistemática, Taxonomia, Ecologia, Genética, Biogeografia entre outras tiveram importante avanço. Entre as áreas que debruçaram sobre questões envolvendo a evolução das espécies, a Biogeografia foi e é aquela que almeja compreender como os aspectos geográficos interferiram no processo evolutivo ao longo do tempo e do espaço (revisão em Sanmartín 2012). A Biogeografia, o longo do século XX, foi impactada por novas teorias e propostas metodológicas, e é tradicionalmente dividida em Biogeografia Histórica e Biogeografia Ecológica. A Biogeografia Histórica, ao avaliar a história evolutiva do grupo, busca explicar sua distribuição geográfica, enquanto a Biogeografia Ecológica se dispõe a avaliar os fatores ambientais locais e sua implicação na distribuição dos organismos (Wiens e Donoghue 2004, Sanmartín 2012). Vale ressaltar os métodos cladísticos propostos por Hennig (1966), que auxiliaram estudos da Biogeografia Histórica, a teoria da tectônica de placas conceitualmente atribuída a Alfred Wegener (Deriva Continental) durante os anos de 1915 porém confirmada ao longo das décadas de 50 e 60 (Trewick 2017), as sínteses apresentadas por Croizat (1958, 1964), dando forma à Panbiogeografia (Colacino 1997, Sanmartín 2012.), e a teoria de biogeografia de ilhas (MacArthur e Wilson 1967), tópicos frequentemente discutidos em Biogeografia Ecológica (Wiens e Donoghue 2004).

Em meio a ideias inovadoras, emergiu, ao final do século XX e início do século XXI, uma ciência integrativa capaz de auxiliar no esclarecimento do padrão de distribuição das populações e/ou espécies. Essa ciência, a Filogeografia, foi proposta por Avise e colaboradores

(1987) que, reunindo elementos observados numa escala microevolutiva (reservados à genética de populações) e macroevolutiva (avaliada pela sistemática e paleontologia), permitiriam resultados favoráveis à compreensão das linhagens genéticas e seus arranjos espaciais.

O propósito de relacionar as espécies a seus contextos geográficos é antigo, e muito foi discutido por Alfred Russel Wallace em seu livro *The Geographical Distribution of Animals* (1876), uma das primeiras obras a discorrer cientificamente sobre o tema. Com o tempo, essa sub-área da Biogeografia foi se favorecendo dos avanços nos tipos de marcadores moleculares, na capacidade de processamento de dados e nas bases teóricas afim de testar e sustentar de forma mais verossímil hipóteses de distribuição espacial (Avise 2009, Hickerson et al. 2010). Consequências dessa abordagem permitiram também avaliar a história demográfica, níveis de diversidade biológica, além da suscetibilidade dos organismos a mudanças geográficas e climáticas (Avise 2000).

Entre as bases teóricas que sustentam diversas dessas análises filogeográficas, ressalta-se a importância da teoria de coalescência (Kingman 1982, Hudson 1990), que atenta para a possibilidade de se traçar, a partir de sequências gênicas, a história das diferentes linhagens retroagindo no tempo (número de gerações). Para tanto, parte-se do princípio que as mutações são neutras e, ao se acumularem, podem ser rastreadas até coalescerem no mais recente ancestral comum (*MRCA*). Suportado por essa teoria e seus modelos matemáticos, passa a ser explorada uma série de informações obtidas diretamente dos marcadores genéticos favorecendo a filogeografia tanto em seus aspectos mais simples, quanto em contextos mais elaborados possíveis através do uso de cenários e suas simulações (Knowles e Maddison 2002).

Outro ganho proporcionado pela teoria de coalescência veio com o incremento da dimensão Tempo às análises filogeográficas favorecendo, entre outros aspectos, *i*) uma estimativa do período em que se aprofundaram as divergências entre clados irmãos em uma filogenia, *ii*) análises de como as espécies, populações e subpopulações responderam demograficamente ao longo do tempo dadas as condições geo-climáticas a que foram submetidas e *iii*) o estabelecimento de novas correlações com estudos paleoclimáticos confrontando e testando hipóteses, tal como a Teoria dos Refúgios (Haffer 1969), em diferentes domínios morfoclimáticos espalhados pelo mundo.

Dada a relevância de suas informações, essa ciência vem envolvendo um número cada vez maior de adeptos e entusiastas, ganhando com isso espaço nas discussões acadêmicas e contribuindo para questões importantes como na reflexão sobre a perda de diversidade biológica e conservação. A exemplo dessa popularização, hoje ao se buscar por artigos científicos que tenham o termo *Phylogeography* no título em base de dados como *Web of*

Science ou *Google Scholar*, é possível se deparar com cerca de 1400 e 2170 itens a tratar diretamente do tema (busca realizada usando o intervalo de 2010 e 2017).

FILOGEOGRAFIA: MODELO DE ESTUDO E IMPLICAÇÕES

Estudos filogeográficos podem ser realizados com qualquer organismo ou grupo de organismos intimamente relacionados (Avice 2009). A depender do modelo analisado, é possível obter inferências de cunho continental (ex. Gehara et al. 2014), específico para determinados domínios morfoclimáticos (ex. Carnaval 2009, Werneck et al. 2012, Thomé e Carstens 2016, Prates et al. 2016) ou restrito a uma dada região (ex. Fusinatto et al. 2013, Kok et al. 2017). Para tanto, ao se dispor a realizar pesquisas dessa natureza, a relevância das respostas e proposição de novas perspectivas refletirá, em grande parte, a acurácia do desenho experimental que, uma vez idealizado, deve levar em consideração característica como plasticidade ambiental, disponibilidade de amostras e cobertura espacial das mesmas, favorecendo assim a robustez dos resultados e o suporte das hipóteses.

Considerando as características apontadas anteriormente, por exemplo plasticidade ambiental e cobertura espacial, os anfíbios representam uma valiosa fonte para trabalhos em filogeografia dada sua riqueza e diversidade. A propósito, uma das primeiras sínteses a destacar a importância dos anfíbios em estudos dessa natureza foi apresentada por Heyer e Maxson (1982) envolvendo grupos pertencentes, à época, aos gêneros *Leptodactylus* e *Cycloramphus*. Os autores levantaram alguns motivos pelos quais consideram anfíbios como bons modelos de estudo e, com base em seus resultados, discutiram sobre temas importantes como dispersão e vicariância, determinismo ecológico, modelo de ilhas, bem como outros que até hoje proporcionam debates. Passados pouco menos que 30 anos após essa publicação, Zeisset e Beebee (2008) revisitam novamente o tema e trazem, numa abordagem propriamente filogeográfica, as implicações dos estudos com anfíbios na compreensão tanto dos aspectos históricos da distribuição das espécies no hemisfério Norte quanto no Sul.

Brevemente, o que permite aos anfíbios trazerem consigo informações acerca desses aspectos históricos é, em geral, a baixa mobilidade dos indivíduos restringindo-os por gerações a uma mesma localidade (forte padrão filopátrico) (Beebee 1996). Consequência disso é o nível de estruturação genética observado nas populações ao longo da distribuição geográfica da espécie, sendo que, a depender do padrão de estruturação dos grupos e das zonas de quebra de fluxo gênico entre os mesmos, é possível confrontá-los com barreiras atuais ou inferir barreiras não aparentes (Zeisset e Beebee 2008). Para além dessa característica, anfíbios são

relativamente fáceis de serem amostrados, correspondem a um dos maiores e mais antigos grupos de vertebrados terrestres e têm ampla distribuição pelo mundo estando ausentes apenas nos círculos polares e algumas ilhas oceânicas (Dullman e Trueb 1986, Zeisset e Beebee 2008, Frost 2017).

No Brasil, muitos são os trabalhos realizados com anfíbios, principalmente anuros (sapos, rãs e pererecas). A grande extensão do território e o elevado número de espécies, 1039 segundo Segalla e colaboradores (2016), despertaram o interesse de diferentes núcleos de pesquisa sobre a história do grupo em seus mais variados aspectos. A filogeografia é um deles, e áreas como a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica foram as primeiras a receberem atenção quanto a essa questão.

Em linhas gerais, os fatores que mais podem ter influenciado na história geográfica não só de anfíbios, mas dos demais grupos de organismo seja no Brasil ou em países vizinhos na América do Sul, foram os ciclos de aridez e incursões marítimas ao longo do Terciário e também as oscilações climáticas durante o Pleistoceno, influência indireta dos ciclos glaciais e interglaciais mais evidentes no hemisfério norte (Zeisset e Beebee 2008). Consequência dessas oscilações climáticas dos Pleistoceno foram os eventos de expansão e retração que influenciaram no tamanho das áreas florestadas e de savanas, favorecendo-as ou não em função dos períodos em que predominou um clima frio e seco intercalados por períodos quentes e úmidos (Vuilleumier 1971, Zeisset e Beebee 2008).

Diante desses cenários, as principais hipóteses biogeográficas testadas em diferentes trabalhos pela perspectiva da filogeografia são: *i*) a influência de movimentos tectônicos e flutuações do nível do mar na disponibilidade de terras e mudanças da paisagem (hipótese paleogeográfica), *ii*) o efeito de grandes rios, como o rio Amazonas, ao atuarem como potenciais barreiras geográficas (hipótese dos rios), *iii*) a formação de refúgios durante as oscilações climáticas isolando grupos de espécies (hipótese dos refúgios), *iv*) a combinação entre hipótese dos rios e dos refúgios (hipótese clima/rio) e *v*) a interação competitiva entre espécies durante os períodos frios do Pleistoceno (hipótese distúrbio-vicariância (DV)) (Zeisset e Beebee 2008, Haffer 2008).

Trabalhos realizados com anfíbios da Amazônia, como os de Lougheed e colaboradores (1999), Funk e colaboradores (2007), Fouquet e colaboradores (2012a), entre outros, exploraram questões como a importância dos rios como barreiras ou mesmo a sub-regionalização de certas áreas ao norte e ao sul da floresta. A Mata Atlântica também vem sendo constantemente avaliada, principalmente quanto ao teste da Teoria dos Refúgios e/ou acerca da importância do neotectonismo na estruturação das espécies e grupos de espécies que ocupam

toda sua distribuição. Trabalhos como o de Carnaval e colaboradores (2009), Thomé e colaboradores (2010), Brunes e colaboradores (2014) são exemplos desse esforço. Essa mesma abordagem vem ganhando novas regiões como a porção sul do país (ex. Langone et al. 2016), o Cerrado e a Caatinga (ex. Prado et al. 2012, Thomé et al. 2016) tornando-se mais frequente. Todo esse esforço vem agregando informações relevantes quanto ao padrão de filogeográfico de anuros no Brasil, auxiliando na compreensão dos eventos ocorridos durante o Terciário-Quaternário que ajudaram a moldar a distribuição das espécies observadas atualmente.

FILOGEOGRAFIA: MONTANHAS

Em grande parte dos estudos citados anteriormente, as áreas avaliadas compreendem amplas zonas geográficas ocupadas por populações ou um conjunto de espécies associadas a domínios morfoclimáticos específicos. Entretanto, eventos complexos podem ocorrer numa escala regional, desde que essa apresente algum nível de estratificação espacial, de nicho, ou sofra influência de determinadas variações do clima. Se somarmos a essas poucas características gerais o fato da presença de um elevado nível de endemismo, podemos reconhecer nos ambientes de montanhas todos os aspectos favoráveis para a avaliação de processos filogeográficos complexos.

Chaverri-Polini (1998) associa a riqueza e diversidade em áreas de montanhas a três fatores principais: *i*) efeito do clima e história geológica no desenvolvimento biótico, *ii*) impactos ambientais no mecanismo adaptativo das biotas e *iii*) contínua capacidade de dispersão da fauna e flora. Tais pontos foram aprofundados no estudo acerca da relevância de áreas montanhosas conduzido por Grahan e colaboradores (2014), no qual inter-relacionam esses fatores e sugerem formas de avaliar o padrão de riqueza das espécies na área de interesse, de explorar a relação da diversidade ambiental e avaliar seus padrões filogenéticos. Todo esse contexto faz das montanhas, em especial nas regiões tropicais, ecossistemas tipicamente bem diversificados e ricos em biodiversidade (Sarmiento 2002).

No Brasil, essa biodiversidade foi tema abordado por Martinelli (2007), que caracterizou a importância dos ecossistemas de montanhas e ressaltou necessidade da criação de mecanismos de conservação dessas regiões no âmbito nacional. Segundo o autor, duas regiões deveriam ter atenção especial quanto aos aspectos relacionados a conservação, sendo elas, regiões da Amazônia (distribuídas pelos estados do Amapá, Pará, Amazonas e Roraima) e a Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica), ambas por se tratarem das áreas onde se encontram os maiores gradientes altitudinais do país. Ainda assim, o mesmo observa, à época, que muitos

trabalhos vinham sendo realizados principalmente em regiões de altitude distribuídas ao longo da Mata Atlântica (“*Campos de Altitude*”) e dentro do Cerrado (“*Campos Rupestres*”), tal como a Serra do Espinhaço.

SERRA DO ESPINHAÇO E DIVERSIDADE

A Serra do Espinhaço (SE) é a maior cadeia de montanha encontrada na porção mais interiorana do Brasil (Giulietti et al. 1997, Almeida-Abreu e Renger 2002). Estende-se entre os estados de Minas Gerais e Bahia podendo ser dividido em duas porções, Meridional (predominantemente em Minas Gerais) e Setentrional (predominantemente na Bahia) (Knauer 2013), com altitude média superior a 900 m (Giulietti et al. 1997, Benites et al. 2003, Alves e Kolbek 2010). Uma característica marcante dessa cadeia de montanhas é o fato de estar em uma zona de contato compreendendo Cerrado e Mata Atlântica em sua porção sul, e na porção norte sofrer influência da Caatinga (Leite et al. 2008) (Figura 1).

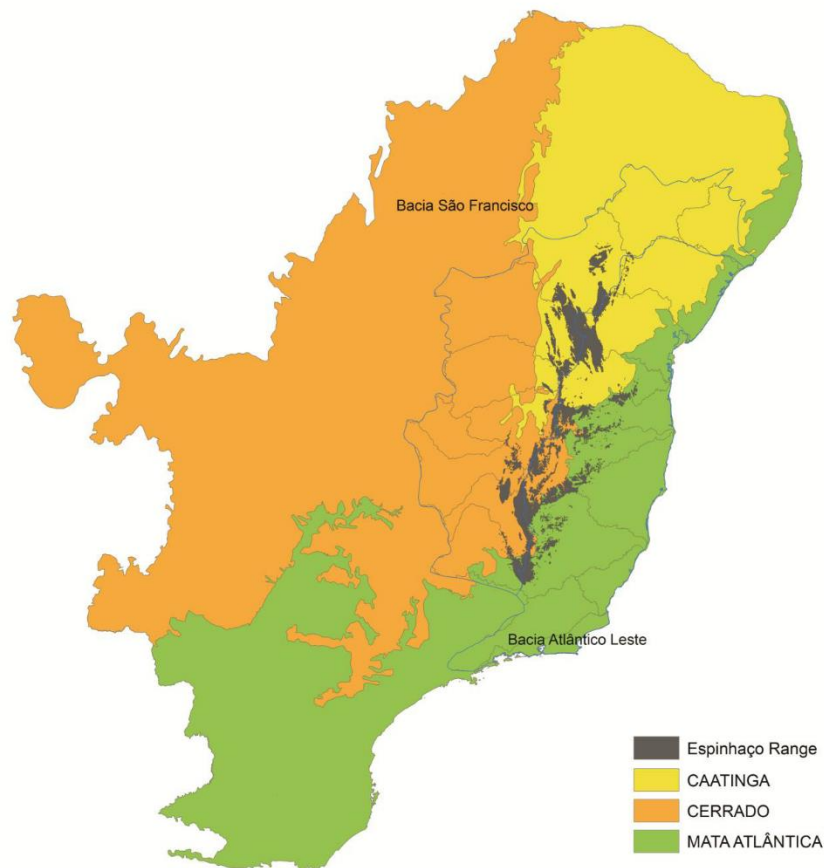


Figura 1. Distribuição da Cadeia do Espinhaço e influência de três dos principais domínios fitogeográficos brasileiros (ver legenda) (Retirado de Bitencourt 2013).

Do ponto de vista geomorfológico, a delimitação física da Serra do Espinhaço encontra-se bem estabelecida, porém, a consideração do Quadrilátero Ferrífero (QF) como limite sul da SE ainda é alvo de discussões (Renger et al. 1994, Almeida-Abreu 1995, Knauer 2007, Gontijo 2008, Echternacht et al. 2011), uma vez que o QF difere do restante da SE em relação à origem geológica. Enquanto o QF faz parte do Supergrupo Minas, com datações que resgatam sua origem ao éon Arqueano e o éon Proterozoico (Machado et al. 1992, Renger et al. 1994), grande parte da Serra do Espinhaço Meridional compõe o Supergrupo Espinhaço, sendo reconhecidas rochas que remetem ao éon Arqueano e Neoproterozóico, porém com especial predominância de rochas Paleo e Mesoproterozóica (Knauer 2007). Nessa discussão, um contraponto é apresentado com base nos aspectos biológicos, pois ambas as áreas apresentam grande similaridade em relação à fauna e à flora envolvendo diferentes grupos, levando alguns pesquisadores a tratar SE e QF como uma mesma unidade (ver Giulietti et al. 1997, Rapini et al 2002, Echternacht et al. 2011, São Pedro e Feio 2011).

Como característico de áreas de montanhas, a Serra do Espinhaço apresenta elevado grau de endemismo, tanto em função da complexidade de seu terreno quanto por ter sofrido ao longo do tempo influências distintas dos domínios morfoclimáticos vizinhos (Leite et al. 2008). Esse endemismo elevado atinge diferentes grupos (ex. da Silva 1997, Azevedo et al. 2008, Alves et al. 2008, Silva et al. 2008, Vasconcelos et al. 2011, Nogueira et al 2011, Costa e Rodrigues 2012, Carvalho et al. 2012, Passos et al. 2013, Bungler et al. 2014) sendo um dos principais o dos anfíbios anuros (ver Drummond et al. 2005, Cruz e Feio 2007, Pimenta et al. 2008, Eterovick et al. 2009).

O relevo acidentado e a dificuldade de acesso a vários pontos da cadeia de montanhas permitiram com que algumas áreas se mantivessem preservadas, favorecendo a conservação das mesmas, mas criando dificuldades quanto ao levantamento preciso de diferentes espécies, incluindo anuros (Leite 2012). Apesar dos desafios impostos pelo terreno, a Serra do Espinhaço e sua fauna de anfíbios despertaram o interesse de antigos exploradores, entre eles, os dinamarqueses Johannes Reinhardt e Cristian Lütken, que estiveram na região de Lagoa Santa no século XIX, sendo os primeiros a descreverem os anfíbios da região (São Pedro 2008).

Apesar de seu potencial científico, localidades ao longo da SE permaneceram durante década vagamente exploradas e apenas a partir da década de 50 do século passado, com campanhas lideradas por pesquisadores como o professor Werner Bokermann e Ivan Sazima, retomou-se o interesse pela anurofauna existente na região. Nesse contexto, somaram-se aos seus esforços o gradativo aumento de pesquisadores que elegeram essas montanhas como

cenário de suas pesquisas, resultando assim na descrição de novas espécies (ex. Sazima e Caramaschi 1986, Caramaschi et al. 2003, Cassini et al. 2010, Leite et al. 2012, Juncá et al. 2015), no aumento do número de inventários (ex. Feio e Caramaschi 1995, Afonso e Eterovick 2007, São Pedro e Feio 2011, Mascarenhas et al. 2016), chegando aos trabalhos que levantaram aspectos relacionados estritamente ao mecanismo de conservação de espécies do SE (ver Eterovick et al. 2005, Barata et al. 2016). Todo esse esforço deu uma nova dimensão para a Serra do Espinhaço, sendo hoje considerada uma das principais áreas de proteção ambiental recebendo da UNESCO em 2005 o título de Reserva da Biosfera.

*O GRUPO *Physalaemus deimaticus* (sensu Nascimento, Caramaschi & Cruz 2005).*

Ao longo desse período no qual se intensificou os estudos envolvendo espécies da Serra do Espinhaço, duas espécies de *Physalaemus* foram descritas para a região e atribuídas a suas áreas de altitude (“*campos rupestres*”): *Physalaemus deimaticus* Sazima & Caramaschi 1986 e *Physalaemus erythros* Caramaschi Feio & Guimarães-Neto 2003. Ainda nesse período, uma terceira espécie, relacionada às duas anteriores e restrita à Serra da Mantiqueira foi descrita, *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli & Feio 1991. Juntas, as três formam um grupo monofilético denominado grupo *Physalaemus deimaticus* (Nascimento et al. 2005, Lourenço et al. 2015), grupo esse que poderia trazer luz sobre o processo de ocupação ao longo da Serra do Espinhaço, bem como sobre conexões pretéritas entre Serra do Espinhaço e Serra da Mantiqueira, servindo de mote para a elaboração da presente proposta de trabalho.

Formalmente, o grupo *Physalaemus deimaticus* foi proposto por Nascimento e colaboradores (2005) a partir de uma extensa revisão do gênero *Physalaemus* que, entre outras propostas, corroborou a sugestão apresentada por Caramaschi e colaboradores (2003) acerca da possível existência desse grupo. Os fundamentos levantados por Nascimento e colaboradores para o reconhecimento do mesmo foram baseados principalmente em caracteres morfológicos, tais como, tamanho relativamente pequeno e padrão de coloração do dorso, além de aspectos ecológicos (todos os membros ocorrem em ambiente de altitude).

Apesar do reconhecimento do grupo, a carência de sinapomorfias que sustentassem seu monofiletismo poderia ainda levantar dúvidas quanto a essa classificação. Porém, passados dez anos, Lourenço e colaboradores (2015) apresentaram uma proposta filogenética com foco nas espécies do gênero *Physalaemus* Fitzinger 1826, a saber, o gênero mais diversificado dentro da subfamília Leiuperinae com 47 espécies (Frost 2017). Os autores avaliaram sequências de

41 das 47 espécies descritas e, dentre os resultados, resgataram o monofiletismo do grupo em questão, estando o mesmo, inserido no grande clado *Physalaemus signifer* (Figura 2).

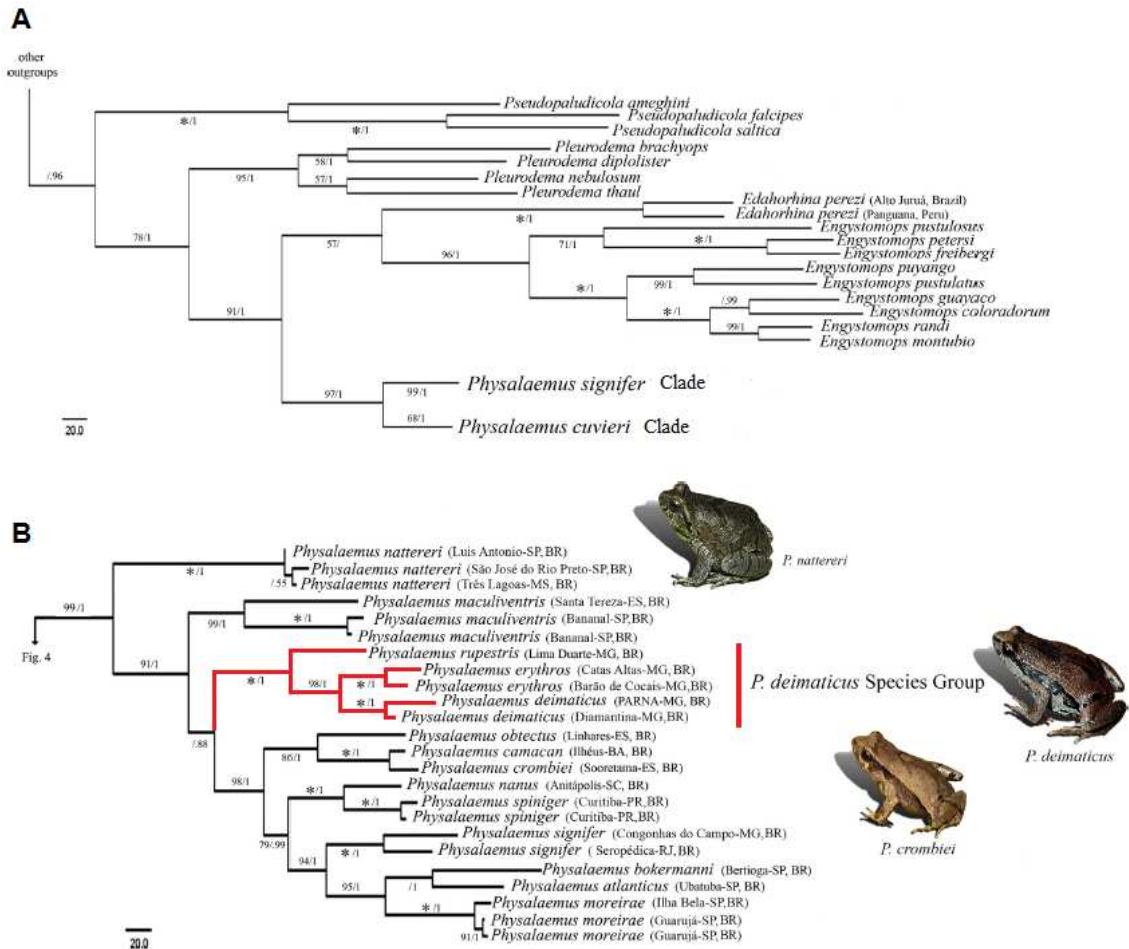


Figura 2. (A) Relação intergenérica na subfamília Leiuperinae apresentando os dois clados relacionados ao gênero *Physalaemus*. (B) Relações interespecíficas no clado *Physalaemus signifer*. Em destaque, o grupo *Physalaemus deimaticus*. (modificado a partir de Lourenço et al. 2015).

Physalaemus deimaticus Sazima & Caramaschi 1986 (Figura 3) restringe-se à Serra do Cipó – Conceição do Mato Dentro/Jaboticatubas – MG, sendo seus exemplares geralmente encontrados em pequenas elevações, ocultos entre as pedras e lajes que formam um terreno irregular, solo arenoso e úmido em campos rupestres (Sazima e Caramaschi 1986). Após sua descrição, poucas informações foram obtidas acerca da espécie, dentre elas a descrição de seu cariótipo (Lourenço et al 2015). Dada essa carência de informação, atribuiu-se à espécie o *status* de dados deficientes (DD) pela IUCN (Caramaschi et al. 2004).



Figura 3. *Physalaemus deimaticus* Sazima & Caramaschi 1986 em vista lateral. Foto Ivan Sazima.

Physalaemus rupestris Caramaschi, Carcerelli & Feio 1991 (Figura 4) foi descrita a partir de indivíduos coletados na região da Serra do Ibitipoca – Lima Duarte – MG, extensão do complexo de montanhas que compreende a Serra da Mantiqueira. Os espécimes se distribuía às margens de pequenas poças temporárias em ambiente de altitude, em regiões compostas por rochas, na presença de arbustos e gramíneas em solo arenoso (Caramaschi et al. 1991). Na descrição, os autores apontaram semelhanças compartilhadas entre *P. rupestris* e *P. deimaticus*, porém distinguindo-os em função do tamanho menor e presença de glândula inguinal reduzida em *P. rupestris*. Posteriormente, canto, girino e ninhada foram descritos para essa espécie e sua distribuição foi ampliada para Serra Negra – Distrito de Funil – Rio Preto - MG (Nascimento et al. 2001, Oliveira et al. 2009).



Figura 4. *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli & Feio 1991 em vista lateral. Foto Juliana Toledo (Oliveira et al. 2009).

Por fim, a última espécie descrita do grupo foi *Physalaemus erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto 2003 (Figura 5), então encontrada na Serra de Itacolomi – Ouro Preto – MG. A espécie ocorre no mesmo tipo de ambiente ocupado pelas demais do grupo, diferindo de *P. deimaticus* e *P. rupestris* pelo tamanho maior, forma alongada do focinho, arredondado em vista dorsal e protuberante de perfil, além do padrão de coloração (Caramaschi et al. 2003). Novas informações sobre a espécie surgiram com a descrição do canto e do girino por Baêta e colaboradores (2007), que observaram diferenças tanto no girino quanto na estrutura do canto comparado a *P. rupestris* (Nascimentos et al. 2001). A área de distribuição conhecida atualmente para essa espécie inclui também Catas Altas – MG (Baêta e Silva 2009).



Figura 5. *Physalaemus erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto 2003 em vista lateral.
Foto Pombal Jr. (Baêta e Silva 2009).

HIPÓTESES

Entre os diferentes tipos de ambientes que nos permitem desenvolver trabalhos filogeográficos, montanhas neotropicais proporcionam excelentes possibilidades para o teste de hipóteses que relacionem a geração de biodiversidade com mudanças paleogeográficas e climáticas (Rull 2014). Os ciclos climáticos, compostos por períodos glaciais e interglaciais, acarretam a alternância entre condições propícias ou não à dispersão de espécies, especialmente daquelas que ocorrem em áreas de montanhas (Vuilleumier 1971). Como resultado dos ciclos glaciais, espera-se que animais de montanhas tenham sofrido recorrentes contrações (períodos interglaciais) e expansões (períodos glaciais) populacionais, o que teria favorecido eventos de especiação alopátrica e fluxo gênico, respectivamente (Vuilleumier 1971, Rull 2014).

Dadas as características do grupo *P. deimaticus* e sua associação com os campos rupestres, poderíamos esperar que o comportamento das espécies tenha sofrido alguma influência desses ciclos climáticos, ora ocupando novas áreas em resposta ao clima mais frio se propagando pelas áreas mais baixas, ora retornando aos ambientes de altitude em períodos mais quentes e úmidos. Com isso, as regiões mais baixas circunvizinhas às atuais localidades onde encontram-se as espécies/populações do grupo poderiam ter atuado como barreira para a dispersão das mesmas em períodos mais quentes, o que poderia ter favorecido os eventos de cladogênese nesse grupo. Sinais de expansão populacional, referentes a períodos de máximos glaciais, e de retração e/ou estagnação durante os períodos interglaciais poderiam apoiar tal hipótese. Levando em conta que o Pleistoceno é marcado pela regularidade de ciclos climáticos (Haffer 1969, Vuilleumier 1971, Haffer 1997, Hewitt 2000, Morando et al. 2004), é possível supor que esse período tenha promovido eventos de cladogênese no grupo *P. deimaticus*, hipótese que foi testada no presente trabalho. Também foram avaliadas hipóteses relativas à ocupação da Serra do Espinhaço por esse grupo de anuros, especialmente em relação à ocupação do Quadrilátero Ferrífero.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo a análise de alguns aspectos filogeográficos do grupo *Physalaemus deimaticus*, endêmico da Cadeia do Espinhaço.

Objetivos Específicos

1. Inferir as relações filogenéticas das espécies do grupo *P. deimaticus*.
2. Analisar a diversidade genética no grupo *P. deimaticus*.
3. Comparar as inferências filogenéticas geradas, a diversidade genética das espécies do grupo *P. deimaticus* e os padrões geográficos recentes e históricos da Cadeia do Espinhaço, com o intuito de reconhecer possíveis processos envolvidos na diversificação histórica desse grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

O trabalho utilizou 83 amostras de tecidos de espécimes do grupo *Physalaemus deimaticus*, obtidas junto ao Banco de Tecidos da Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Coleção de Tecidos Shirlei Maria Recco Pimentel (SMRP), mantida no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, e à Coleção de Tecidos do Setor de Herpetologia do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) (Anexo 1). As 83 amostras contemplam todas as áreas registradas para as espécies conhecidas até o momento (Figura 6, Tabela 1).

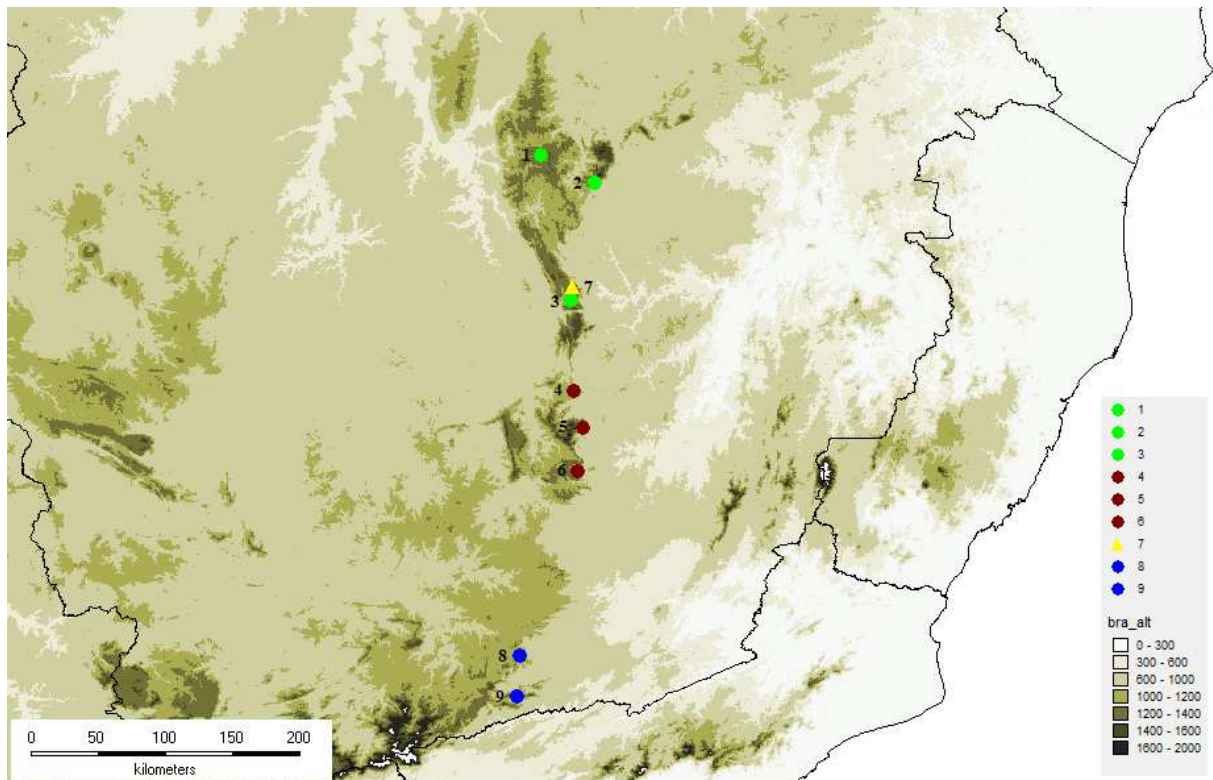


Figura 6. Área de distribuição das espécies do grupo *Physalaemus deimaticus*. Pontos em verde: *P. deimaticus*. Pontos em vermelho: *P. erythros*. Pontos em azul: *P. rupestris*. Ponto amarelo: *Physalaemus* sp. **1:** Diamantina. **2:** Itambé. **3:** Jaboticatubas. **4:** Barão de Cocais. **5:** Catas Altas. **6:** Ouro Preto. **7:** Cipó. **8:** Lima Duarte. **9:** Rio Preto.

Tabela 1: Localidades amostradas e número de espécimes coletados (*N*) dos táxons de interesse. Todas as localidades pertencem ao estado de Minas Gerais. *localidades-tipo.

Táxon	Município	N de indivíduos analisados	Coordenadas Lat/Lon
<i>Physalaemus deimaticus</i>	*Jaboticatubas	15	-19.279°/ -43.519°
	Diamantina	10	-18.281°/ -43.738°
	Pico do Itambé	9	-18.460°/ -43.369°
<i>Physalaemus erythros</i>	*Ouro Preto	13	-19.884°/ -43.514°
	Catas Altas	4	-20.134°/ -43.454°
	Barão dos Cocais	8	-20.433°/ -43.491°
<i>Physalaemus rupestris</i>	*Lima Duarte	2	-21.700°/ -43.883°
	Rio Preto	2	-21.975°/ -43.902°
<i>Physalaemus</i> sp.	Cipó	20	-19.166°/ -43.527°

Foram utilizados como grupo externo cinco espécies do gênero *Physalaemus*: *P. cuvieri*, *P. albifrons* e *P. feioi*, representando o Clado *Physalaemus cuvieri*; e *P. signifer* e *P. spiniger*, representando o clado irmão do grupo *P. deimaticus* (conforme inferências filogenéticas propostas por Lourenço et al. 2015).

ANÁLISES MOLECULARES

EXTRAÇÃO DE DNA E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

DNA genômico foi extraído de amostras de tecidos (fígado e/ou músculo) preservados em etanol 95% utilizando o método de TNES, seguindo o mesmo procedimento utilizado por Lourenço e colaboradores (2015).

Foram obtidos cinco segmentos gênicos mitocondriais, sendo esses correspondentes a regiões de DNAr 12S, DNAr 16S, e a genes para RNAt^{Val}, Citocromo Oxidase I (COI) e NADH Dehydrogenase - subunidade 2 (ND2). Além dos genes mitocondriais, foram obtidos três lócus nucleares, sendo esses Rodopsina exon 1 (RHOD), Pró-opiomelanocortina C (POMC) e β -cristalina (β -crys). Os fragmentos de interesse foram isolados utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os *primers* descritos na tabela 2, sendo os produtos avaliados após eletroforese em gel de agarose 1%.

No processo de amplificação dos fragmentos de interesse, após desnaturação inicial do DNA (entre 5-10 min a 94°C), foram realizados 39 ciclos, compostos pelos seguintes passos: (i) desnaturação do DNA (entre 30s - 1 min a 94°C), (ii) anelamento dos *primers* (1 min a 48 - 57°C a depender dos *primers* utilizados) (Tabela 2), (iii) extensão das cadeias polinucleotídicas

(1 min - 2,30 min a 72° C). Por fim, as amostras foram mantidas por 8 min a 72° C para a completa extensão dos fragmentos polimerizados.

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação (*) e sequenciamento (#) dos segmentos mitocondriais e nucleares das espécies do grupo *Physalaemus deimaticus*. F= forward. R= reverse.

Locos	Primers	Sequências	Temperatura de anelamento no PCR	Referências
Fragmento H1 (porção inicial)	*#MVZ59 (F)	ATAGCACTGAAAATGCTGAGATG	57° C	Graybeal 1997
	*#MVZ50 (R)	TTTCGGTGTAAGCGAAAGGCTT		Graybeal 1997
	*#Titus I (R)	GGTGGCTCGTTGAAGGGC		Titus e Larson 1996
Fragmento H1 (porção final)	*H1KF (F)	GGAGCCTGTCCTATAATCGAT	51° C	Presente trabalho
	#H1KR (R)	TACTAAGCTCGTTAGGT		Presente trabalho
	*#12SL13 (F)	TTAGAAGAGGCAAGTCGTAACATG GTA		Feller e Hedges 1998
	#16SL2a (F)	CCAAACGAGCCTAGTGATAGCTGG TT		Hedges 1994
	#16SH10 (R)	TGATTACGCTACCTTTGCACGGT		Hedges 1994
	#16Sar (F)	CGCCTGTTTATCAAAAACCAT		Palumbi et al. 1991
	*#16Sbr (R)	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		Palumbi et al. 1991
COI	*#AnF1 (F)	HAA YCAYAAAGAYATYGG	48° C	Lyra et al. 2016
	*#AnR1 (R)	CCRAARAATCARAADARRTGTTG		Lyra et al. 2016
ND2	*#ND2-B1 (F)	GCTAACAAAGCTATCGGGCCCAT	55,7° C	Carnaval et al. 2009
	*#MVZ38 (R)	TTCTTAGGGCTTTGAAGGCTC		Carnaval et al. 2009
	*#NDw1-f (F)	CCGAGCCATTGAAGCAGCCACT		Presente trabalho
	*#NDw1-r (R)	TGGGGGCAAGGGTGAGGGATA		Presente trabalho
RHOD	*#Rhod1A (F)	ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC	55° C	Bossuyt e Milinkovitch 2000
	*#Rhod1D (R)	GTAGCGAAGAARCTTCAAMGTA		Bossuyt e Milinkovitch 2000
POMC	*#POMC1 (F)	GAATGTATYAAAGMMTGCAAGAT GGWCCT	56° C	Wiens et al. 2005
	*#POMC2 (R)	TAYTGRCCCTTYTTGTGGGCRTT		Wiens et al. 2005
β-crys	*#CRYB1LS (F)	CGCCTGATGTCTTTCCGCC	55,3° C	Dolman e Phillips 2004
	*#CRYB2LS (R)	CCAATGAAGTTCTCTTTCTCAA		Dolman e Phillips 2004

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizada a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix) ou o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), seguindo as

especificações dos fabricantes. O material resultante das purificações foi encaminhado para sequenciamento, realizado com o kit BigDye™ v.3.1 (Applied Biosystems). No processo de sequenciamento (amplificação assimétrica) dos fragmentos, além do *primers* utilizados nas reações de PCR, foram também utilizados os *primers* Titus I, 16SL2a, 16SH10, 16Sar e H1k-f (Tabela 2).

As sequências obtidas foram editadas com auxílio do programa BioEdit v. 7.2.5. (Hall 1999). O alinhamento das sequências foi feito com o aplicativo Muscle integrado ao programa MEGA v.7.0 (Kumar et al. 2016). No caso dos genes nucleares, os alelos de indivíduos heterozigotos foram resolvidos utilizando o algoritmo PHASE (Stephens e Donnelly 2003) implementado no programa DnaSp v.5.10 (Librado e Rozas 2009), utilizando 1000 iterações para *burn-in*, 1000 iterações após *burn-in* e mantendo intervalo para *thinning* igual a 1. Foram excluídos da análise os alelos faseados com probabilidade posterior inferior a 0.9.

Da amostra dos 83 indivíduos do grupo, foram obtidas sequências para os genes mitocondriais que resultaram em matrizes contendo 831 pares de base (pb) do fragmento que inclui DNAr 12S + RNAt^{Val}, 1413 pb de DNAr 16S, 627 pb de COI e 726 pb de ND2. A matriz mitocondrial concatenada, que incluiu o grupo externo, foi composta de 3556 pb e 88 indivíduos. No caso dos genes nucleares, do gene POMC foram obtidos 600 pb (68 indivíduos), de RHOD, 310 pb (79 indivíduos) e de β -crys, 121 pb (31 indivíduos).

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas foram realizadas com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais composta por 88 indivíduos, somando-se o grupo externo e os representantes do grupo *P. deimaticus*. A partir dessa matriz, as inferências foram obtidas partindo do princípio de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB).

Inferências por MP foram realizadas no programa TNT v.1.1 (Goloboff et al. 2008). As árvores mais parcimoniosas foram obtidas via busca heurística, realizada através da opção *New Technology Search*, incluindo *sectorial searches*, *ratchet*, *tree drifting* e *tree fusing*. O menor número de passos foi atingido 100 vezes. As inserções/deleções (*indels*) foram testadas em duas análises separadas, uma considerando *indels* como quinto estado de caráter, outra como *missing data*. O grau de confiabilidade dos ramos das árvores foi obtido através do teste de reamostragem (*bootstrap*) (Felsenstein 1985), com 10000 pseudo-réplicas, usando *Traditional Search*.

As relações filogenéticas inferidas por IB foram geradas pelo programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist 2001). Nessa análise, a matriz concatenada foi particionada, sendo cada partição referente a um gene e seus respectivos modelos evolutivos. A avaliação dos modelos evolutivos que mais se ajustam aos genes foi feita seguindo critérios de Akaike (AIC), utilizando o programa MrModeltest 2.3 (Nylander 2004), e os modelos evolutivos que melhor se ajustaram aos genes foram: GTR+G (16S e COI) e GTR+I+G (ND2 e 12S). Realizada a seleção dos modelos, a análise transcorreu utilizando *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) avaliando 5 milhões de gerações, tendo sido amostrada uma árvore a cada 100 gerações. A topologia consenso e a probabilidade posterior foram obtidas descartando-se 25% das primeiras árvores geradas. Para checar a qualidade das corridas, estacionalidade e convergência das cadeias, foi utilizado o programa TRACER 1.6 (Rambaut et al. 2014).

A distância genética dentro e entre os clados correspondente às espécies do grupo *P. deimaticus* foi estimada utilizando o programa MEGA vs. 7.0. (Kumar et al. 2016). Nesses casos, apenas os genes 16S e COI foram utilizados, e valores de *p-distance* foram calculados, sendo os sítios portadores de *gaps* de alinhamento desprezados nas comparações par-a-par.

REDES DE HAPLÓTIPOS, DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL

Para cada gene nuclear e mitocondrial, foi gerada uma rede de haplótipos na perspectiva de observar a distribuição e conectividade entre as diferentes linhagens. Uma rede de haplótipos mitocondriais foi também obtida, considerando todos os genes mitocondriais concatenados. Os haplótipos foram obtidos com auxílio do programa DnaSp v.5.10 (Librado e Rozas 2009), desconsiderando sítios com *gaps/missing data*. No caso dos genes nucleares, os alelos de indivíduos heterozigotos foram resolvidos utilizando o algoritmo PHASE (Stephens e Donnelly 2003) implementado no programa DnaSp v.5.10 (Librado e Rozas 2009). As redes foram construídas usando o método de *Median-joining network* (Bandelt et al. 1999), implementado no programa PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) v. 1.7 (disponível em <http://popart.otago.ac.nz>).

As análises de diversidade genética foram conduzidas tanto para o grupo *P. deimaticus* quanto para cada espécie. Foram calculados, para cada gene em análise, o número de sítios polimórficos (**S**), o número de haplótipos (**h**), o número de sítios parcimoniosamente informativos (**Is**), a diversidade haplotípica (**Hd**) e a diversidade nucleotídica (π), com o auxílio

do programa DnaSp v.5.10 (Librado e Rozas 2009), seguindo os parâmetros de *default* do programa.

O grupo *P. deimaticus* foi submetido a uma análise bayesiana para avaliar quantos agrupamentos estruturados poderiam ser resgatados a partir das amostras de todos os indivíduos, independentemente das espécies. Para tanto utilizou-se o programa BAPS vs 6.0 (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (Corander e Tang 2007, Corander et al. 2008) tomando como base a matriz concatenada dos genes mitocondriais, as matrizes individuais de cada gene nuclear e a coordenada geográfica das localidades. Os testes foram repetidos três vezes e feitos com valores de *k* variando de 1 a 5, 1 a 10 e 1 a 15, sendo *k* o número dos possíveis agrupamentos. O mesmo teste foi realizado para *P. deimaticus* e *P. erythros* em virtude dessas espécies apresentarem o maior número de indivíduos e localidade.

Dada a ocorrência de estrutura populacional em *P. deimaticus*, foram realizados testes para quantificar a variação genética dentro e entre os agrupamentos reconhecidos nessa espécie. Para tanto, foram utilizados os princípios da estatística-F (F_{ST}) e uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) estimada no programa Arlequin 3.5. (Excoffier et al. 2005). As análises foram feitas apenas para os dados dos genes mitocondriais, devido ao fato de serem genes com quantidade maior de polimorfismos comparado aos genes nucleares utilizados no presente estudo.

Aprofundando nas análises de *P. deimaticus* e *P. erythros*, foi realizado o teste de MANTEL a fim de verificar o nível de correlação entre os dados genéticos e a distribuição geográfica. A análise foi realizada no programa *Alleles in Space* vs 1.0 (Miller 2005) e para tanto, foi utilizada a matriz concatenada dos genes mitocondriais de ambas as espécies.

ESTIMATIVAS DE TEMPO DO MAIS RECENTE ANCESTRAL COMUM (TMRCA) E DEMOGRAFIA HISTÓRICA

Para estimar os valores do TMRCA (*time to the most recent common ancestor*) e subsequente divergência entre as espécies foi utilizado o gene 16S, para qual a taxa de mutação/sítio/milhões de anos disponível na literatura corresponde a 0.0028. (Lemmon et al. 2007). A estimativa dos tempos de divergência foi feita no programa BEAST vs 1.8.0 (Drummond et al. 2012), utilizando “*Yule speciation process*” como modelo de especiação a priori e *uncorrelated relaxed clock* como base para o relógio molecular (Drummond et al. 2006). Às taxas de mutação, foi aplicado o modelo *LogNormal Distribution* com *ucl.d. mean* 0.0028 para 16S, tendo sido os demais parâmetros mantidos na configuração padrão do

programa. O algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) foi executado com 500 milhões de gerações e amostras foram obtidas a cada 50000 gerações. O desempenho da corrida foi checado com o programa TRACER 1.6 (Rambaut et al. 2014), cujos parâmetros apresentaram $ESS > 200$. A árvore consenso foi calculada usando o TreeAnnotator v. 1.8. (Rambaut e Drummond 2014) e editada no FigTree vs 1.4.3 (Rambaut 2016).

Na perspectiva de avaliar possíveis mudanças demográficas, foram utilizados os testes de neutralidade D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997), que levam em conta a frequência de mutações e a distribuição haplotípica, respectivamente. Ambos os testes foram realizados no programa Arlequin 3.5. (Excoffier et al. 2005), a partir de 10000 simulações, usando o modelo de seleção neutra e a matriz de genes mitocondriais concatenados.

Outra estratégia na tentativa de avaliar possíveis mudanças demográficas foi calcular o *Harpending's raggedness index* (Harpending et al. 1993) e o modelo de *sum of squared deviations* (SSD) com base no teste de *goodness-of-fit*. Nesse caso, SSD é calculado comparando a *mismatch distribution* observada e a esperada/simulada sob o modelo de expansão em cada espécie, com base na matriz de genes mitocondriais concatenados. Para tanto foi utilizado o método de Schneider e Excoffier (1999) no programa Arlequin 3.5. (Excoffier et al. 2005). O conjunto de dados permitiu a obtenção dos gráficos de *mismatch distribution*.

Por último, foi realizada a análise de *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBS), método para inferências não-paramétrico que toma como base a teoria de coalescência e permite identificar mudanças no tamanho populacional ao longo do tempo com dados multilocos (Heled e Drummond 2008). Por se tratar de uma análise multilocos, todos os genes foram avaliados independentemente levando em consideração seus respectivos modelos evolutivos. A taxa de substituição/sítio/milhões de ano aplicada à análise foi aquela referente ao gene ND2 (0.00957 em Crawford 2003), tendo sido as taxas dos demais genes estimadas em relação à do ND2. Para essa análise foi utilizado o *strict molecular clock* por se tratar de análises restritas a cada espécie, simplificando o modelo de coalescência e auxiliando na convergência da análise. A análise utilizou MCMC, com cadeia contendo 100 milhões de gerações, amostrada a cada 10000 gerações. Como em análises anteriores, o desempenho da análise foi checado com o programa TRACER 1.6 (Rambaut et al. 2014), cujos parâmetros mostraram $ESS > 200$.

CENÁRIOS FILOGEOGRÁFICOS DAS ESPÉCIES DO GRUPO *P. DEIMATICUS*

Ao considerar as possíveis hipóteses de diversificação e ocupação do Espinhaço, utilizou-se da abordagem *Approximate Bayesian Computation* (ABC), implementada com o

programa DiyABC vs 2.1 (Cornuet et al. 2014), para construção e teste de cenários. Nesses, os eventos de vicariância e colonização foram representados, respectivamente, por rupturas abruptas em determinado tempo (Ex. T_{origem} e $T1$, Figura 7) e pela representação de um pequeno grupo colonizador que chega a uma nova área (Ex. $T2$ e $T2-db$, onde db é o tempo estimado para a fixação de uma nova colônia, Figura 7).

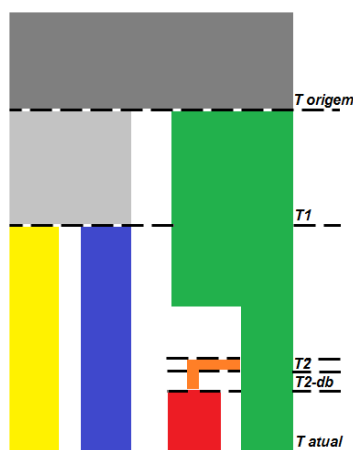


Figura 7. Exemplo de cenário filogeográfico. T_{origem} : Tempo de origem. $T1$ e $T2$: Tempo de separação. $T2-db$: Tempo de colonização. T_{atual} : Presente.

Os cenários foram avaliados em duas etapas, sendo a primeira composta por 100000 simulações/cenário de onde obteve-se as melhores estatísticas sumárias a partir da análise de PCA realizada no próprio programa (*Pre-evaluate scenario prior combination*).

Uma vez concluída essa fase, foram realizadas 1000000 de simulações por cenário, considerando apenas as estatísticas selecionadas na etapa anterior. Novamente, análises de PCA *a priori* e também a *posteriori* foram realizadas, além da análise de probabilidade do melhor cenário e as estimativas, a posteriori, do tamanho efetivo dos subgrupos e seus respectivos tempos de divergência.

Os *priors* utilizados como parâmetros para os modelos foram: tamanho efetivo (N) uniforme (variando entre 100 a 2000000); tamanho efetivo em cenários envolvendo efeito fundador ($N \times b$) uniforme (variando entre 100 a 100000); tempo (T) uniforme (variando entre 1000 a 6000000, considerando 1 ano como o tempo de uma geração, seguindo Fouquet e colaboradores (2012b)); intervalo de tempo para colonização (db_x) uniforme (variando entre 1000 e 150000).

Todos os genes mitocondriais e nucleares foram utilizados para a simulação dos cenários, agrupados em dois conjuntos: conjunto dos genes mitocondriais e conjunto dos genes nucleares. Devido a limitações do programa quanto à disponibilidade dos modelos evolutivos,

para a análise da matriz de genes mitocondriais foi utilizado o modelo HKY1985 com distribuição uniforme e taxa de mutação variando entre 10^{-9} e 10^{-7} . Para a análise dos genes nucleares, o modelo utilizado foi JC1969, com distribuição uniforme e taxa de mutação variando entre 10^{-11} e 10^{-9} (Prates et al. 2016).

RESULTADOS

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

ANÁLISE POR MÁXIMA PARCIMÔNIA (MP), INFERÊNCIA BAYESIANA (IB) E DISTÂNCIA GENÉTICA

A análise de Máxima Parcimônia (MP) resgatou três árvores igualmente parcimoniosas com 2070 passos e as diferenças entre as árvores se limitavam apenas à topologia de alguns indivíduos de uma mesma localidade. Em todas essas árvores, os 83 indivíduos de grupo *Physalaemus deimaticus* foram distribuídos em quatro clados bem suportados segundo a análise de *bootstrap* (Figura 8). Desses clados, destaca-se aquele referente aos indivíduos coletados próximo ao Parque Nacional da Serra do Cipó (tratado como *Physalaemus* sp.), município de Morro do Pilar – MG, sendo esse bem estruturado e filogeneticamente mais próximo a *Physalaemus rupestris* ainda que geograficamente ocorra em área “vizinha” daquela de *P. deimaticus*.

Topologia semelhante foi obtida com a Inferência Bayesiana, que também recuperou os três clados referentes às espécies do grupo já descritas e o clado de *Physalaemus* sp. (Figura 9). Também nessas análises, os clados resgatados apresentaram elevado valor de probabilidade corroborando o suporte obtido pela análise de *bootstrap*.

Por fim, ao observar a relação estabelecida entre as espécies, *Physalaemus deimaticus* compartilha um ancestral direto e exclusivo com *Physalaemus erythros* enquanto *Physalaemus rupestris* é irmão do clado *Physalaemus* sp. (Cipó).

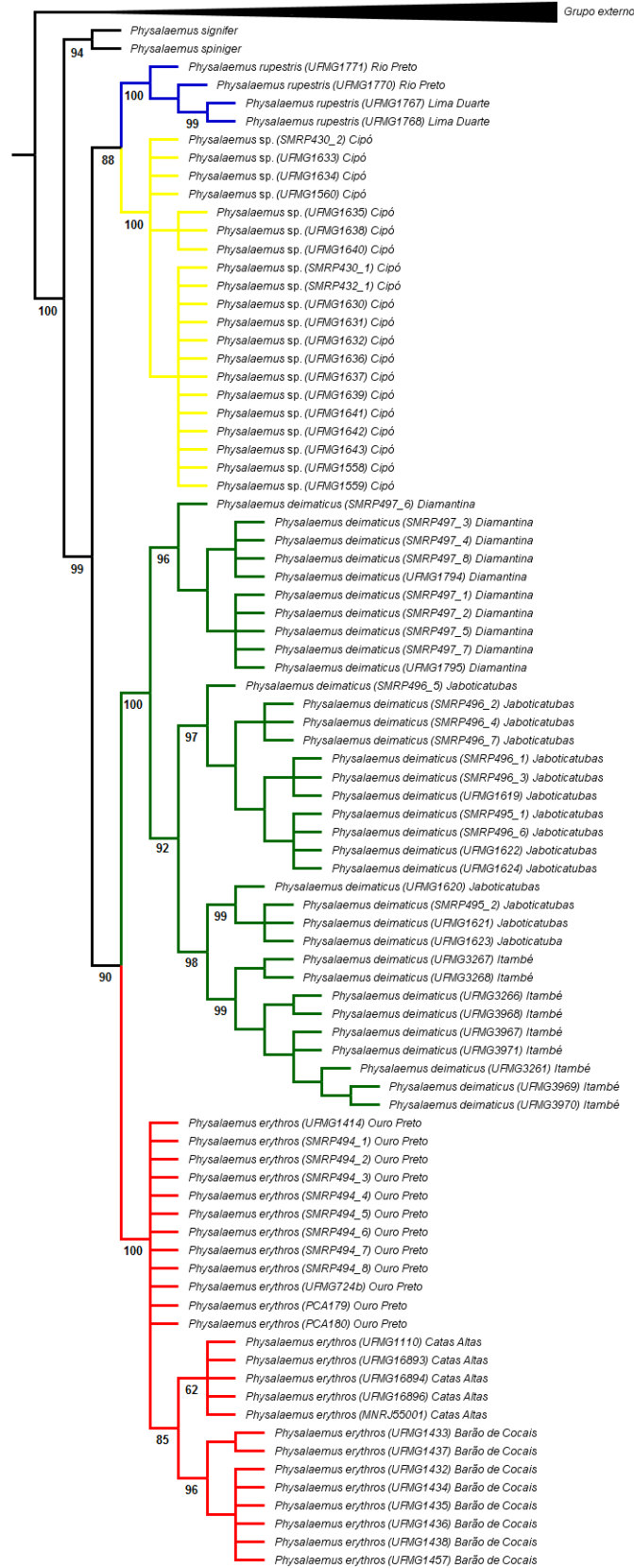


Figura 8. Árvore de consenso estrito resultante da análise filogenética de Máxima Parcimônia realizada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Os números abaixo dos ramos indicam valores de *bootstrap*.

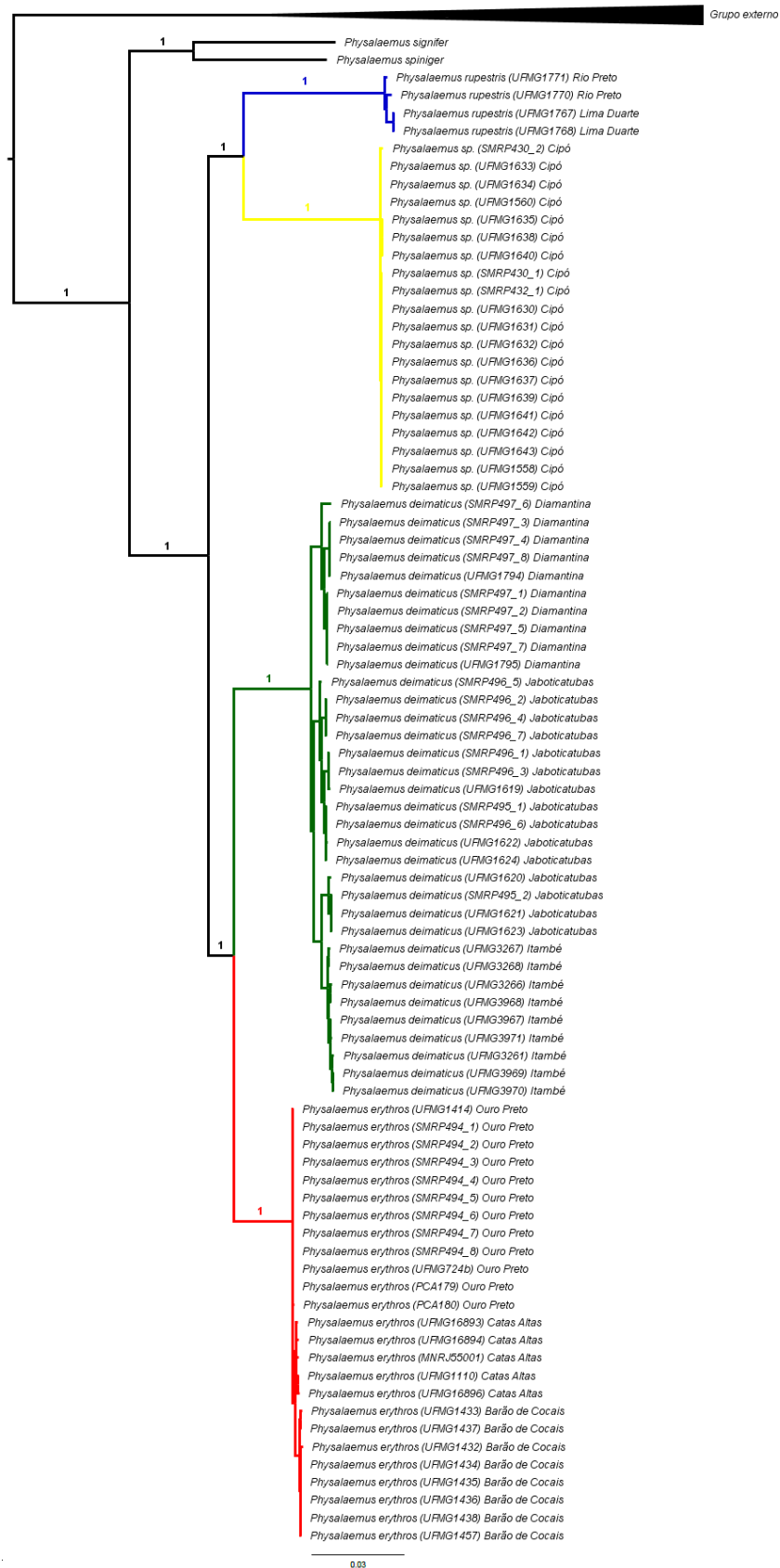


Figura 9. Árvore resultante da análise filogenética por Inferência Bayesiana realizada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior.

Na análise de distância genética baseada nas sequências dos genes 16S e COI, os valores estimados entre os clados do grupo *P. deimaticus* foram elevados (valores de *p-distance* superiores a 3% e 6%, respectivamente), enquanto as distâncias genéticas observadas dentro de cada clado não ultrapassaram 0,3% no caso do gene 16S e 1,3% para COI (Tabela 3).

Tabela 3. Distâncias genéticas (*p-distance*) entre as espécies que formam o grupo *P. deimaticus* estimadas com base em 627 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI) e 1414 pb do DNAr 16S (16S). Valores expressos em %. Valores em negrito na transversal correspondem a distâncias intra-específicas.

COI	<i>P. deimaticus</i>	<i>P. erythros</i>	<i>P. rupestris</i>	<i>Physalaemus</i> sp.
<i>P. deimaticus</i>	1,02			
<i>P. erythros</i>	6,51	0,11		
<i>P. rupestris</i>	9,84	9,21	0,59	
<i>Physalaemus</i> sp.	9,31	9,15	8,44	0,04
16S				
<i>P. deimaticus</i>	0,33			
<i>P. erythros</i>	3,49	0,16		
<i>P. rupestris</i>	5,74	5,85	0,20	
<i>Physalaemus</i> sp.	4,97	5,35	6,25	0,04

DIVERSIDADE GENÉTICA E REDE DE HAPLÓTIPOS

A análise dos índices de diversidade mostrou que *P. deimaticus* foi a espécie a apresentar maior diversidade haplotípica dos genes mitocondriais, que apresentaram valores em torno de 0,9 (Tabela 4).

Há de se considerar que *P. deimaticus* foi também a espécie da qual se obteve número maior de indivíduos, todavia o número de haplótipos (**h**) e o número de sítios parcimoniosamente informativo (**Is**) para os genes mitocondriais são superiores ao dobro daqueles encontrados nas demais espécies, especialmente *P. erythros* e *Physalaemus* sp. Ainda avaliando tais características, *P. rupestris*, apesar do tamanho amostral ser baixo, apontou valores de diversidade haplotípica e nucleotídica em geral superiores aos obtidos para *P. erythros* e *Physalaemus* sp. (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de diversidade dos genes analisados. **N**: número de sequências; **S**: número de sítios polimórficos; **h**: número de haplótipos; **Is**: sítios parcimoniosamente informativos; **Hd (Sd)**: diversidade haplotípica e desvio padrão; π (**Sd**): diversidade nucleotídica e desvio padrão.

	Fragmento	Tamanho pb	N	S	Is	h	Hd (Sd)	π (Sd)
<i>P. deimaticus</i>	12S+RNAt ^{Val}	822	34	13	11	13	0,914 (0,023)	0,00520 (0,00031)
	16S	1364	34	17	12	15	0,939 (0,018)	0,00268 (0,00017)
	COI	635	34	20	17	10	0,895 (0,022)	0,01102 (0,00050)
	ND2	726	34	32	27	13	0,913 (0,024)	0,01382 (0,00063)
	RHOD	310	66	6	3	5	0,118 (0,054)	0,00142 (0,00069)
	POMC	600	56	9	6	9	0,663 (0,062)	0,00198 (0,00028)
	β -crys	121	24	0	0	1	0	0
<i>P. erythros</i>	12S+RNAt ^{Val}	821	25	1	0	2	0,080 (0,072)	0,00010 (0,00009)
	16S	1365	25	6	4	6	0,683 (0,069)	0,00130 (0,00012)
	COI	635	25	3	3	4	0,593 (0,088)	0,00121 (0,00024)
	ND2	726	25	6	3	6	0,717 (0,072)	0,00223 (0,00034)
	RHOD	310	42	2	2	2	0,093 (0,060)	0,00060 (0,00038)
	POMC	600	40	2	1	3	0,099 (0,064)	0,00025 (0,00017)
	β -crys	121	22	1	1	2	0,368 (0,100)	0,00304 (0,00083)
<i>P. rupestris</i>	12S+RNAt ^{Val}	821	4	1	0	2	0,500 (0,265)	0,00061 (0,00033)
	16S	1363	4	5	2	3	0,833 (0,222)	0,00208 (0,00057)
	COI	635	4	6	3	3	0,833 (0,222)	0,00578 (0,00153)
	ND2	716	4	4	1	3	0,833 (0,222)	0,00301 (0,00088)
	RHOD	310	8	1	0	2	0,250 (0,180)	0,00081 (0,00058)
	POMC	600	6	8	8	3	0,800 (0,122)	0,00711 (0,00142)
	β -crys	121	8	0	0	1	0	0
<i>Physalaemus</i> sp.	12S+RNAt ^{Val}	821	20	1	1	2	0,268 (0,113)	0,00035 (0,00015)
	16S	1362	20	1	1	2	0,479 (0,072)	0,00035 (0,00005)
	COI	635	20	1	1	2	0,268 (0,113)	0,00044 (0,00019)
	ND2	726	20	0	0	1	0	0
	RHOD	310	40	5	5	4	0,545 (0,058)	0,00391 (0,00064)
	POMC	600	34	6	6	5	0,658 (0,066)	0,00433 (0,00039)
	β -crys	121	8	1	0	2	0,250 (0,180)	0,00207 (0,00149)

A matriz dos genes mitocondriais concatenados contou com 37 haplótipos mitocondriais, sendo 21 referentes a *P. deimaticus*, 9 pertencentes a *P. erythros*, 4 de *Physalaemus* sp. e 3 de *P. rupestris*. Tais haplótipos, além de espécie-específicos, foram também exclusivos de cada localidade amostrada (Figura 10). Quando cada gene mitocondrial foi analisado isoladamente, também não houve compartilhamento de haplótipos entre as espécies e em *P. deimaticus* não foi observado compartilhamento de haplótipos entre as localidades amostradas (Anexo III). Um haplótipo do fragmento 12S+RNAt^{Val} de *P. rupestris* (hap 18) foi encontrado em mais de uma localidade, o mesmo ocorrendo em relação ao

haplótipo 14 desse mesmo segmento gênico e o haplótipo 12 do gene COI de *P. erythros* (Anexo III).

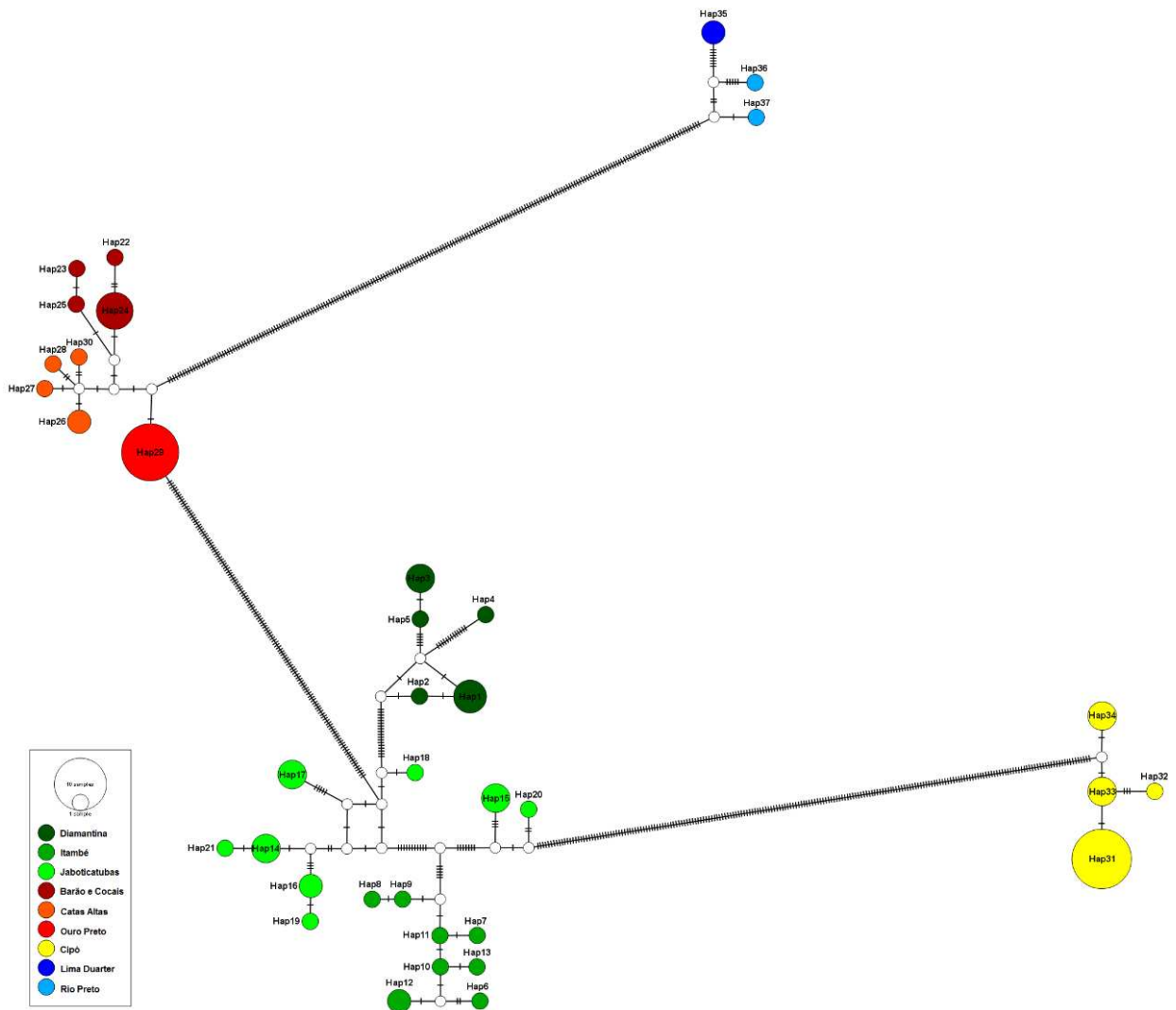


Figura 10. Rede de haplótipos (Nº de hap = 37) gerada com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais. Tons de verde correspondem a *P. deimaticus*, tons de vermelho correspondem a *P. erythros*, amarelo corresponde a *Physalaemus* sp. e tons de azul correspondem a *P. rupestris*.

Em relação aos genes nucleares, apenas o gene POMC apresentou alelos espécie-específicos (Figura 11). Dentre os demais, o haplótipo 8 de β -crys foi também resgatado em *Physalaemus* sp. (Figura 12), o haplótipos 1 de RHOD foi observado em *P. deimaticus* e *P. erythros*, o haplótipo 3 de RHOD foi compartilhado por *P. deimaticus* e *P. rupestris* e o haplótipo 4 de RHOD foi encontrado em *P. deimaticus* e *Physalaemus* sp. (Figura 13).

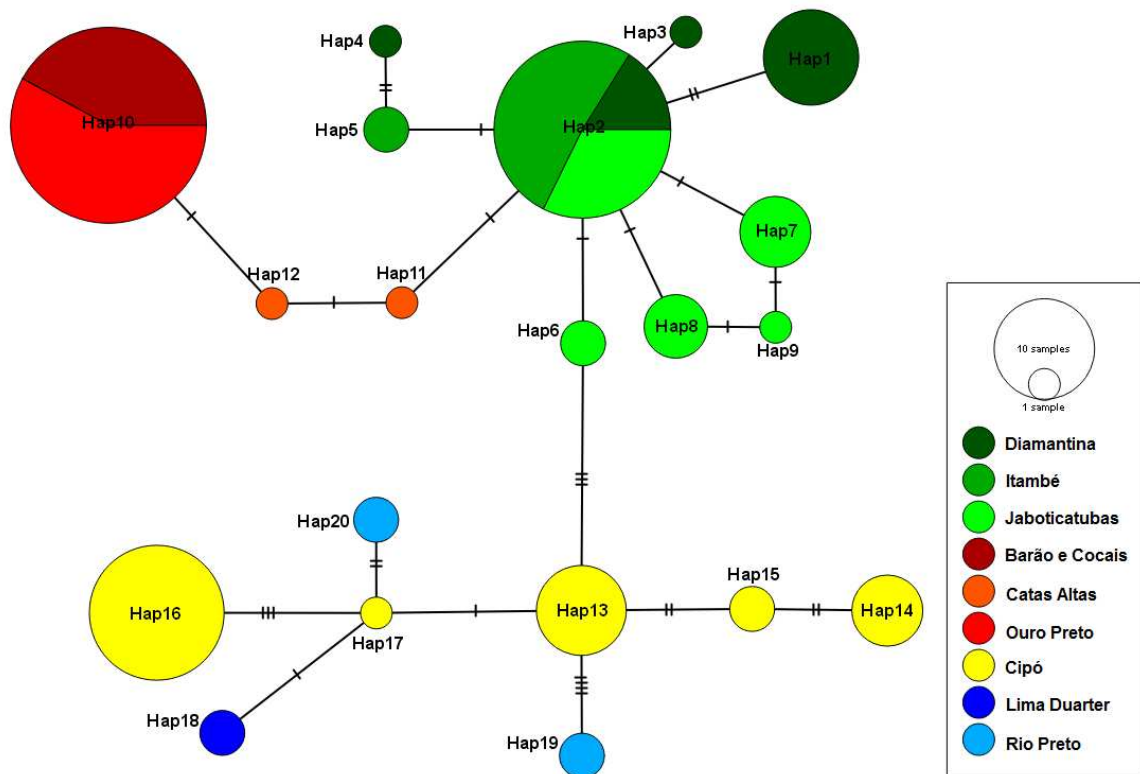


Figura 11. Rede de haplótipos do gene POMC envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

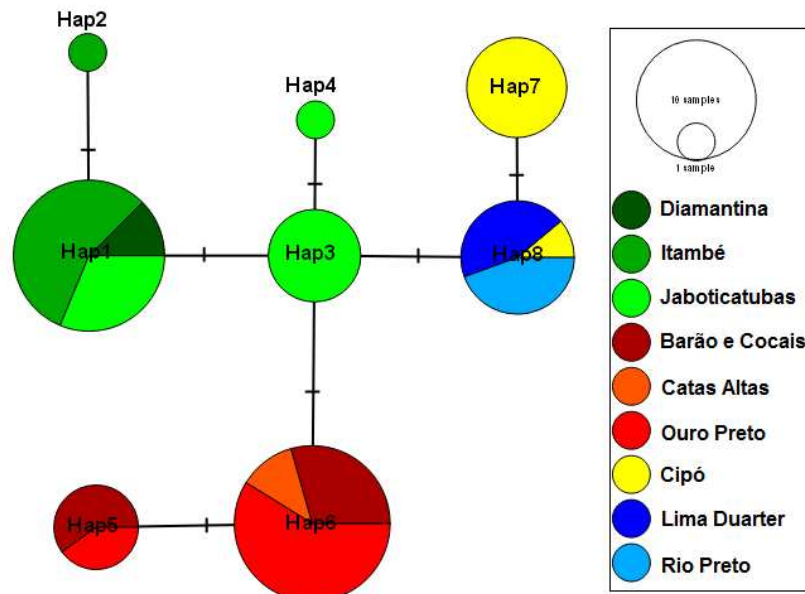


Figura 12. Rede de haplótipos do gene β -crystalina envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

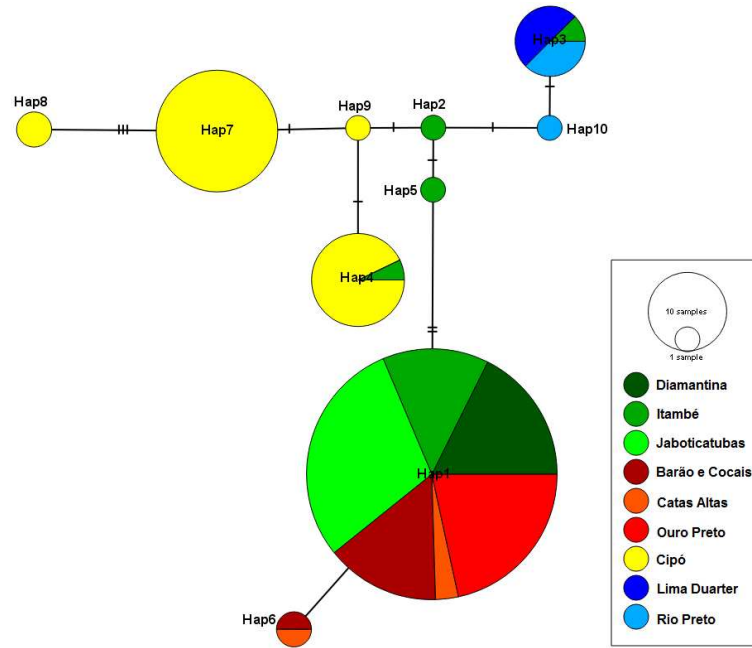


Figura 13. Rede de haplótipos do gene RHOD envolvendo integrantes do grupo *Physalaemus deimaticus*. *Physalaemus* sp., haplótipos em amarelo; *P. deimaticus*, haplótipos em tons de verde; *P. erythros*, haplótipos em tons de vermelho/laranja; *P. rupestris*, haplótipos em tons de azul.

ESTRUTURA POPULACIONAL E ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR

A análise bayesiana da estrutura populacional conduzida pelo BAPS resgatou para o grupo *P. deimaticus* 3 ou 4 melhores agrupamentos, a depender dos genes avaliados (Figuras 14 e 15).

No caso dos genes mitocondriais concatenados, o número ótimo de partições encontrado foi 4, e os grupos reconhecidos coincidiram com os quatro principais clados inferidos nas análises filogenéticas (Figura 14 A). A análise baseada no gene POMC reconheceu dois *clusters*, um deles formado pelos indivíduos de *P. rupestris* e alguns representantes de *Physalaemus* sp. (azul), e outro composto por parte dos indivíduos de *Physalaemus* sp. (amarelo) (Figura 14 B). As análises dos demais genes nucleares, β -crys e RHOD, resgataram 3 grupos, porém com diferenças quanto às suas estruturas. Na análise de β -crys, os grupos correspondentes a *P. deimaticus* e *P. erythros* foram reconhecidos, e haplótipos referentes a *P. rupestris* e *Physalaemus* sp. formaram um único *cluster* (Figura 15 A). No caso do gene RHOD, o que se observou foi um *cluster* composto pela maioria dos haplótipos de *P. deimaticus* e *P. erythros* (Figura 15 B). Ainda nesse *cluster*, observou-se que os alelos de 3 indivíduos de *P.*

deimaticus foram atribuídos a *P. rupestris* (UFMG 3261 e UFMG 3268) ou a *Physalaemus* sp. (UFMG 3967) (Figura 15 B).

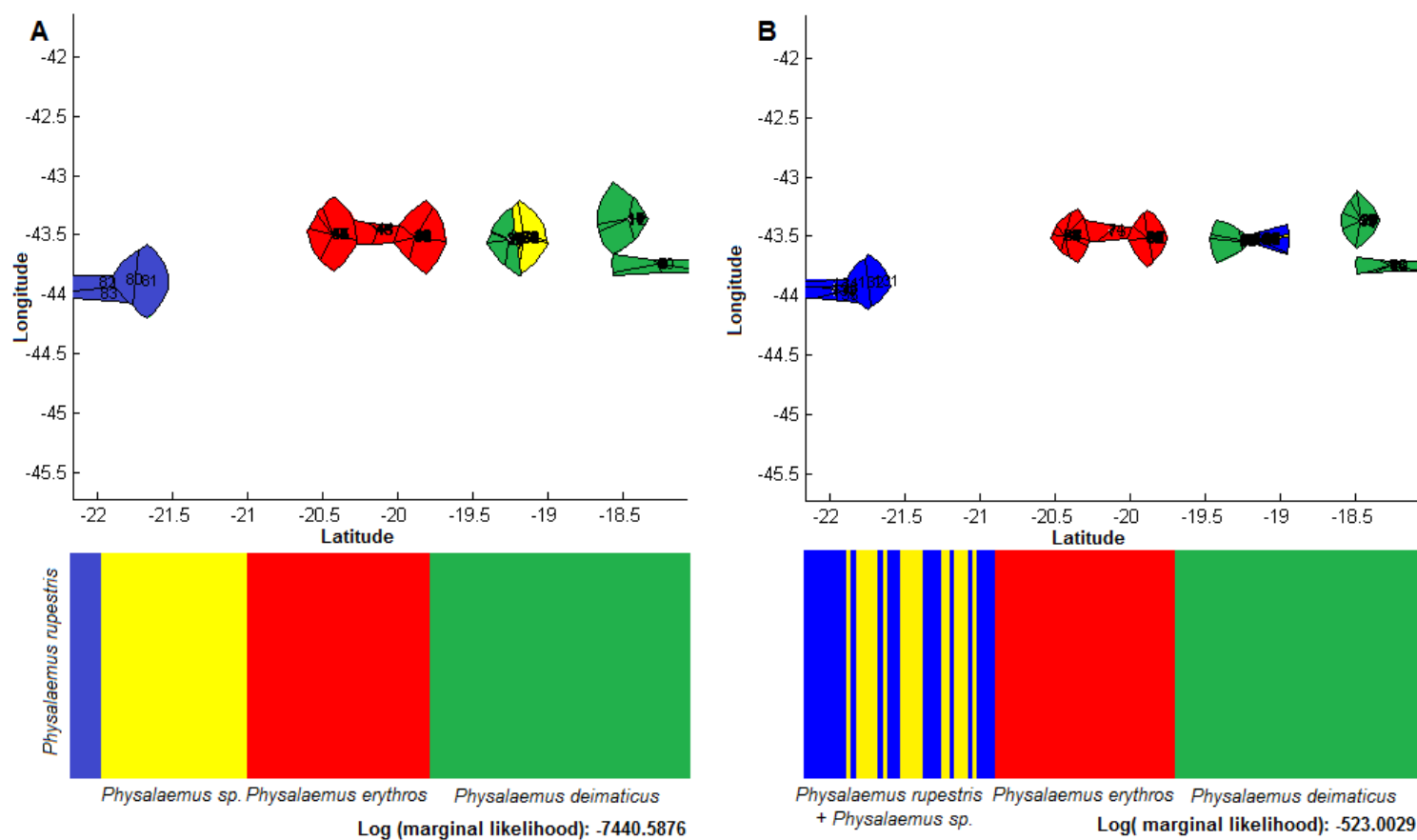


Figura 14. Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos mitocondriais (genes mitocondriais concatenados) (A) e dos haplótipos do gene nuclear POMC (B) de espécies do grupo *P. deimaticus*, realizadas pelo BAPS.

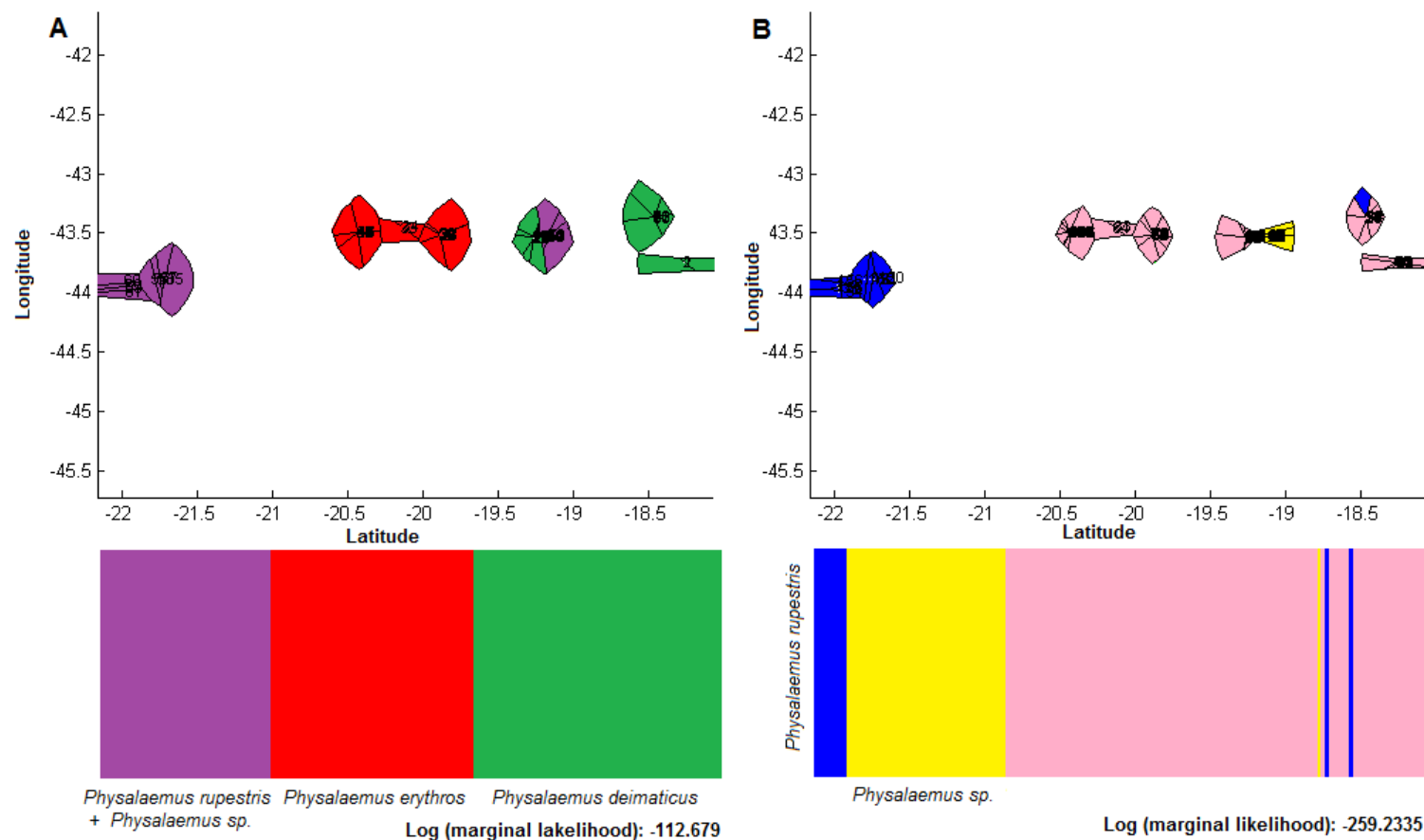


Figura 15. Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos do gene nuclear β -crys (A) e dos haplótipos do gene nuclear RHOD (B) de espécies do grupo *P. deimaticus*, realizadas pelo BAPS. A análise de atribuição resgatou 3 clusters ($K = 3$). Observa-se que para β -crys um cluster agrupou os indivíduos de *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., enquanto no caso do gene RHOD um cluster (rosa) agrupou indivíduos de *P. deimaticus* e *P. erythros*.

As análises BAPS realizadas isoladamente para as espécies *P. deimaticus* e *P. erythros* resgataram 3 (Figura 16) e 1 grupo (Figura 17), respectivamente. No caso de *P. deimaticus*, a localidade de Diamantina foi aquela melhor estruturada, enquanto quatro indivíduos da localidade de Jaboticatubas (SMRP 495_2, UFMG 1620, 1621, 1623) foram alocados no *cluster* contendo todos os demais indivíduos da localidade de Itambé (Figura 16).

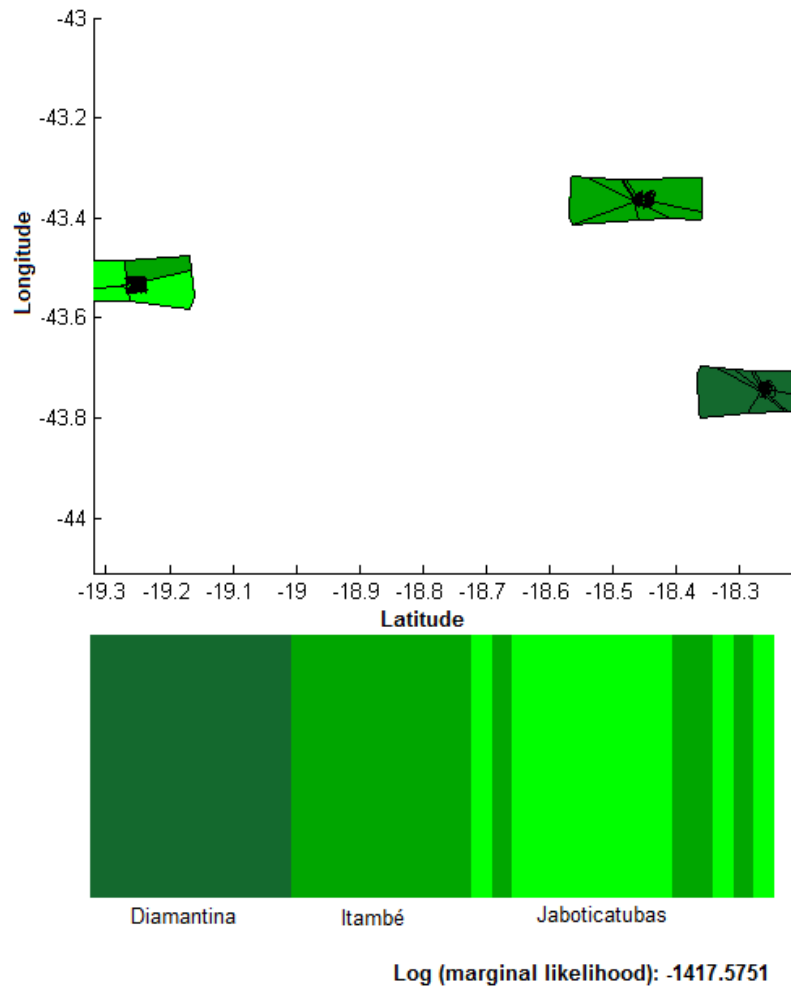


Figura 16. Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos obtidos para *P. deimaticus* com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais, realizadas pelo BAPS. A análise atribuição resgatou 3 clusters ($K = 3$), tendo sido quatro indivíduos da localidade Jaboticatubas atribuídos ao *cluster* contendo indivíduos da localidade Itambé.

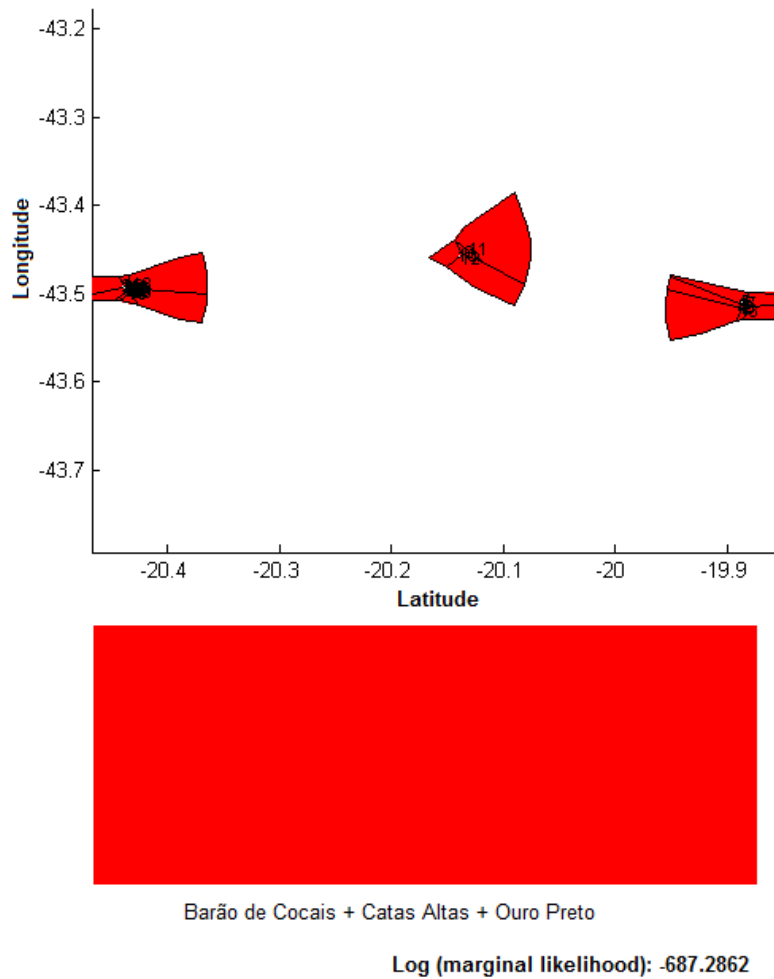


Figura 17. Análise de agrupamento espacial (gráficos na parte superior) e análise de atribuição (histogramas na parte inferior) dos haplótipos obtidos para *P. erythros* com base na matriz concatenada dos genes mitocondriais, realizadas pelo BAPS. A análise atribuição resgatou 1 *cluster* ($K = 1$) agrupando todos os indivíduos independente de sua localidade. Com a análise de

AMOVA e o cálculo dos valores de F_{st} obtidos para os genes mitocondriais de *P. deimaticus* observou-se que a maior porcentagem de variação foi encontrada entre populações, estando os valores de F_{st} entre 68% e 78%. O fragmento 12S+RNA^{val} foi aquele a apresentar o valor mais elevado, enquanto ND2 o menor valor de F_{st} , inferior a 70% (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) e grau de fixação (Fst) relativos aos genes mitocondriais de *P. deimaticus*. Além de comparações entre as três populações reconhecidas pelo programa BAPS, foram também realizadas comparações entre o grupo de haplótipos encontrados em Diamantina e o grupo de haplótipos encontrados em Jaboticatubas e Itambé.

Genes	AMOVA			
	<i>P. deimaticus</i>			
	Porcentagem de variação			
	Entre grupos	Entre pops	Dentro das pops	Fst
12S	36,76	41,20	22,03	0,77965*
16S	31,91	40,91	27,18	0,72821*
COI	19,30	54,64	26,06	0,73941*
ND2	32,81	34,81	32,38	0,67621*

* $P_{val} = 0$

O teste de MANTEL identificou uma correlação positiva entre a distância genética e distância geográfica das populações de *P. deimaticus* ($r^2=0.528$, $P \leq 0.0001$). No caso de *P. erythros*, foi verificada a ausência de correlação entre as distâncias genéticas e as geográficas ($r^2 = -0.031$, $P \leq 0.582$) (Figura 18).

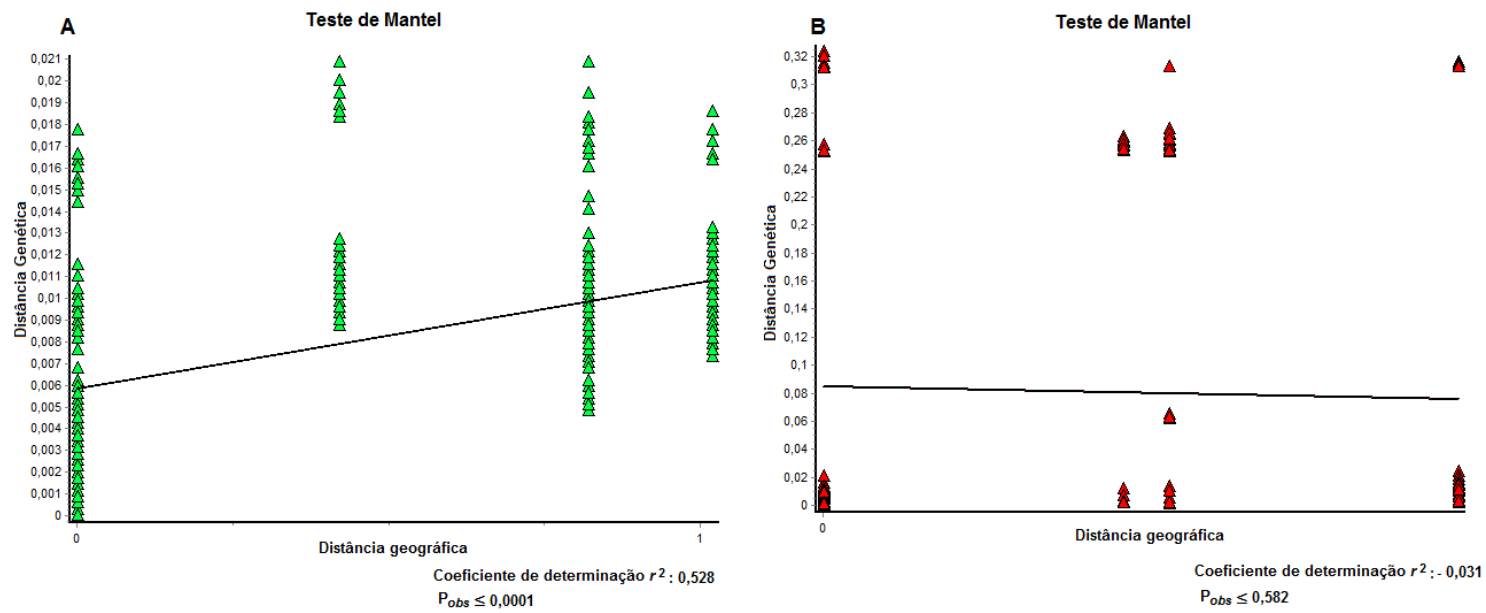


Figura 18. Teste de Mantel para a correlação entre distância genética estimada a partir da matriz concatenada dos genes mitocondriais e distância geográfica para *Physalaemus deimaticus* (A) e *Physalaemus erythros* (B).

*DEMOGRAFIA HISTÓRICA E TEMPO DO MAIS RECENTE ANCESTRAL
COMUM (TMRCA)*

Nos testes de neutralidade, os valores obtidos para *D* de Tajima e *Fu's* foram negativos para *P. erythros*, porém os valores de *P* não foram significativos para que fosse possível considerar algum evento de expansão demográfica. O teste *D* de Tajima também apresentou valores negativos para *Physalaemus* sp., ainda assim, os valores de *P* não foram significativos (Tabela 6).

Tabela 6: Estatísticas sumárias dos testes de expansão populacional realizados para os membros do grupo *P. deimaticus*. **SSD**: *Sum of Square Deviation*. **RI**: *Raggedness index*.

	Teste de neutralidade				Goodness-of-fit			
	<i>Fu's</i>	<i>P-value</i>	Tajima's <i>D</i>	<i>P-value</i>	SSD	<i>P-value</i>	RI	<i>P-value</i>
<i>Physalaemus deimaticus</i>	0,03119	P = 0,544	0,53617	P = 0,767	0,009	P = 0,303	0,014	P=0,083
<i>Physalaemus erythros</i>	-4,26360	P = 0,035	-0,58257	P = 0,305	0,042	P = 0,072	0,062	P=0,225
<i>Physalaemus rupestris</i>	2,47898	P = 0,828	0,51295	P = 0,747	0,148	P = 0,149	0,305	P=0,696
<i>Physalaemus</i> sp.	0,64691	P= 0,655	-0,70744	P = 0,269	0,409	P = 0	0,137	P=1

Entre os gráficos obtidos na análise *mismatch distribution* (Figura 19), apenas o de *P. deimaticus* mostrou uma distribuição com padrão unimodal característico de eventos de expansão. Todavia, o valor de SSD encontrado não foi significativo (*P* = 0.303), inviabilizando a hipótese de eventos de expansão para a espécie. No caso das demais espécies, tanto as curvas obtidas no *mismatch distribution* quanto os valores de SSD e RI não revelaram sinais de expansão ou de perda de diversidade (Figura 19, Tabela 6).

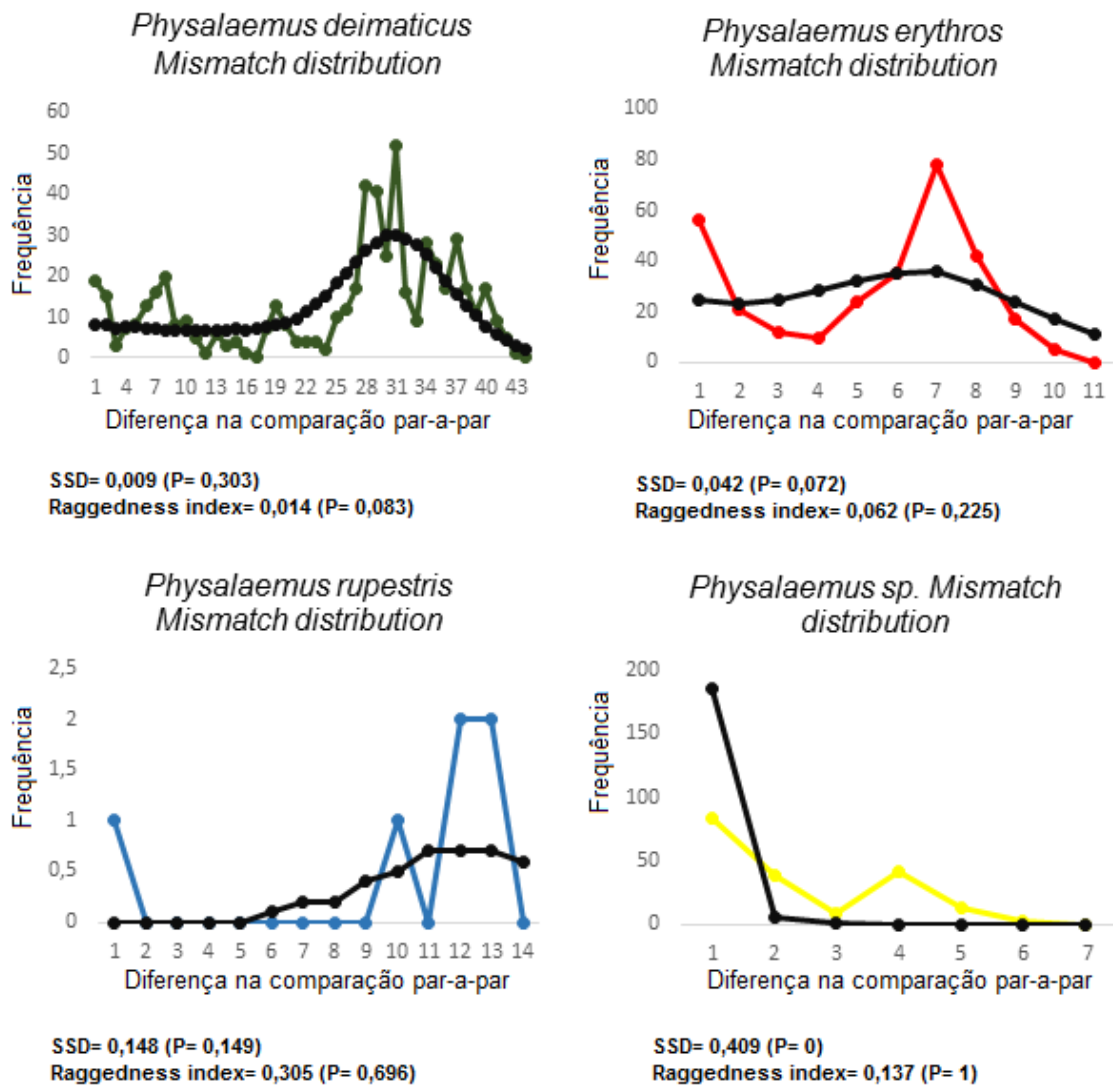


Figura 19. Análises demográficas realizadas para o grupo *P. deimaticus* e para as espécies do grupo com base na matriz mitocondrial concatenada. Linhas coloridas representam as frequências das diferenças observadas nas comparações par-a-par dos haplótipos encontrados (*mismatch distribution* observada). Linhas pretas representam a *mismatch distribution* esperada diante de um cenário de expansão populacional. **SSD**: *Sum of Square Deviation*.

Aprofundando mais nas análises de eventos demográficos, os gráficos obtidos pela *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) envolvendo todos os genes nucleares e mitocondriais apontaram a estabilidade das espécies ao longo dos últimos 800 mil anos (Figura 20), estabilidade essas que reforça os dados obtidos nas análises anteriores. Dada a limitação da amostra, não se considerou a análise para *P. rupestris*.

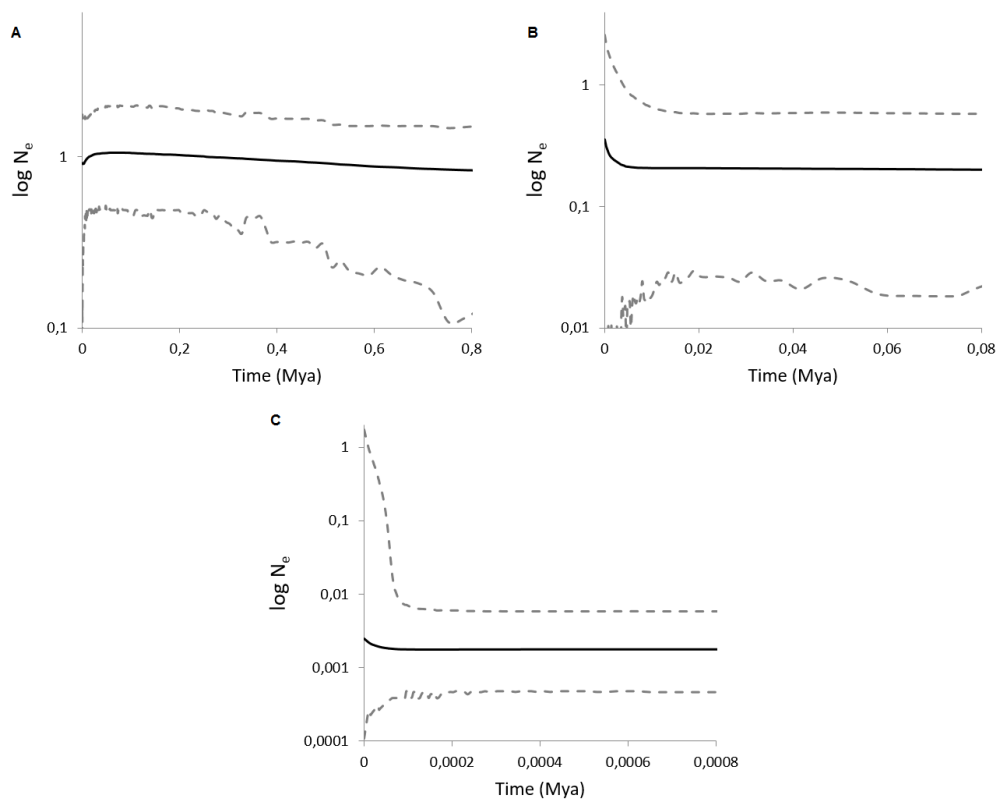


Figura 20. Análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBS) do comportamento demográfico ao longo do tempo para as espécies *Physalaemus deimaticus* (A), *Physalaemus erythros* (B) e *Physalaemus* sp. (C).

Quanto aos resultados obtidos para o tempo do mais recente ancestral comum (TMRCA), a estruturação do clado que resultaria no grupo *P. deimaticus* haveria se dado no início do Plioceno, há cerca de 4.29 Ma (16S) (Tabela 7, Figura 21). Entretanto, as espécies atuais teriam se fixado predominantemente ao longo do Pleistoceno, sendo *P. deimaticus*, *P. erythros* e *Physalaemus* sp. aquelas que apresentaram maior sobreposição quanto ao seu tempo de origem (Tabela 7, Figura 21).

Tabela 7: Estimativa do TMRCA com base nos genes mitocondriais 16S. **95% HPD**: Densidades probabilísticas mais altas no intervalo de 95%. **Ma**: milhões de anos

Clados	16S (Mean)	16S ($\pm 95\%$ HPD)
Grupo deimaticus	4.289 Ma	(2.89 – 5.79) Ma
<i>Physalaemus deimaticus</i>	1.657 Ma	(0.99 – 2.43) Ma
<i>Physalaemus erythros</i>	1.329 Ma	(0.68 – 2.06) Ma
<i>Physalaemus rupestris</i>	0.838 Ma	(0.22 – 1.62) Ma
<i>Physalaemus</i> sp.	1.093 Ma	(0.47 – 1.82) Ma

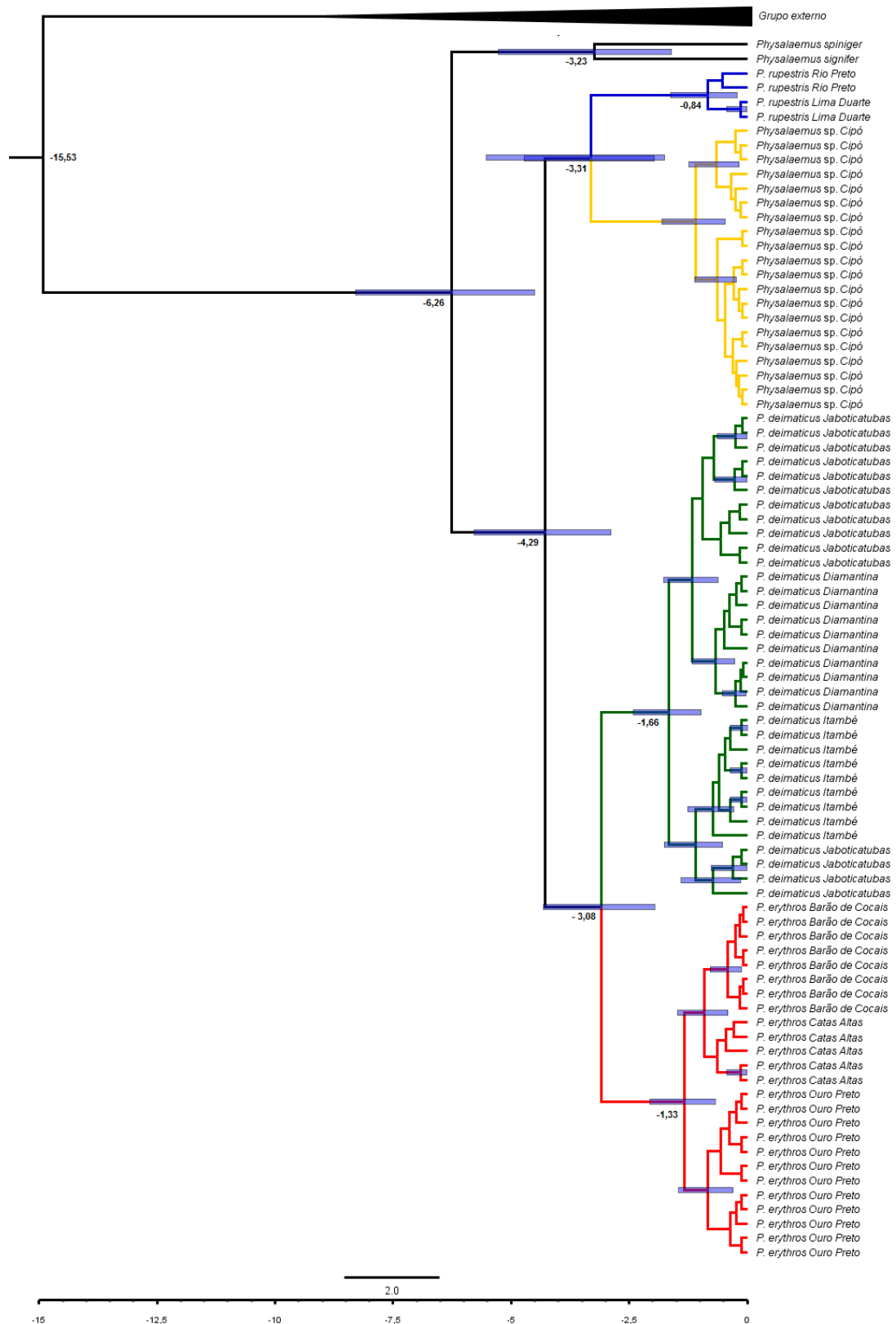


Figura 21. Árvore resultante da análise filogenética por Inferência Bayesiana realizada no BEAST com base no gene 16S e calibrada com a taxa de mutação de 0.0028 mutação/sítio/milhões. Valores abaixo dos ramos são referentes a estimativas de tempo (em milhões de anos). Barras azuis representam o intervalo de confiança.

GRUPO P. deimaticus E OS CENÁRIOS DE OCUPAÇÃO FILOGEOGRÁFICOS

A fim de explorar o processo de ocupação do Espinhaço, e tomando como base as árvores filogenéticas e a análise de estruturação das populações, alguns cenários envolvendo *P. deimaticus* e outros referentes ao grupo *P. rupestris* + *Physalaemus* sp. foram testados. A proposta de cenários para *P. erythros* foi suprimida devido à falta de estrutura genética mostrada pelos marcadores utilizados. Os casos de *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* foram testados em conjunto, uma vez que compõem um clado que apresenta representante tanto no Cadeia do Espinhaço quanto na Serra da Mantiqueira.

Sobre *P. deimaticus* foram testados 5 cenários que tinham como base eventos de vicariância e eventos de colonização. Foram eles: (Cenário 1) Uma população ancestral que se fragmentou em três, originando as populações de Diamantina, Jaboticatubas e Itambé, a partir de vicariância; (Cenário 2) O primeiro evento de fragmentação teria ocorrido entre Diamantina e Itambé + Jaboticatubas, seguido por outro evento entre Itambé e Jaboticatubas; (Cenário 3) Da região de Diamantina colonizadores chegaram em Itambé e da região de Itambé colonizadores chegaram a Jaboticatubas; (Cenário 4) Da região de Itambé colonizadores chegaram em Diamantina e da região de Itambé colonizadores chegaram a Jaboticatubas; (Cenário 5) Da região de Jaboticatubas colonizadores chegaram em Diamantina e da região de Jaboticatubas colonizadores chegaram a Itambé (Figura 22).

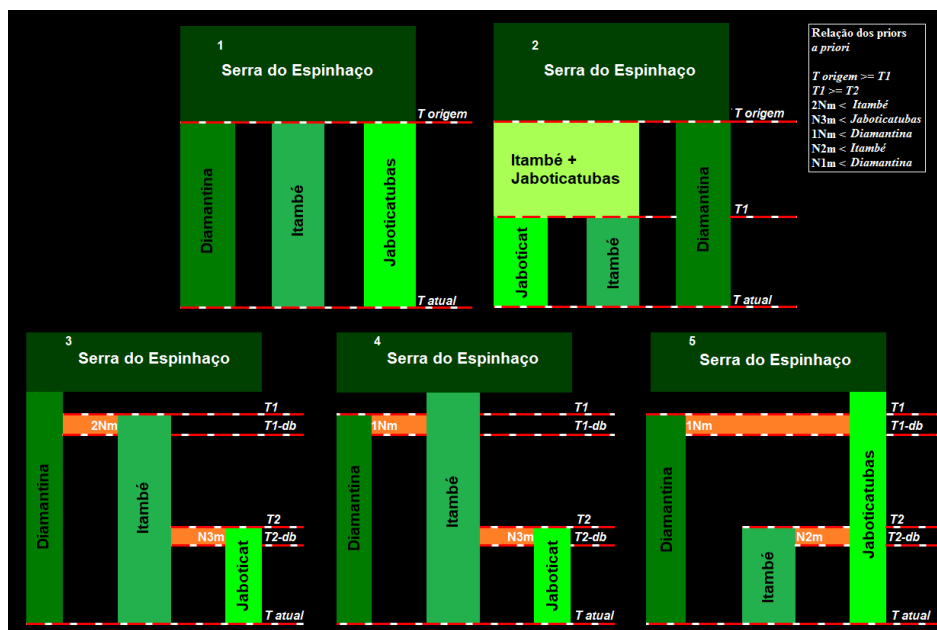


Figura 22. Cenários filogeográficos para a espécie *Physalaemus deimaticus* testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). **T origem**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Para *Physalaemus rupestris* e *Physalaemus* sp., os cenários testados foram: (1) uma população ancestral que se fragmentou em duas, dando origem às duas espécies (um evento de vicariância), (2) *Physalaemus* sp. se formando a partir de um evento de colonização oriunda de uma espécie ancestral residente no Sul (Serra da Mantiqueira), (3) *Physalaemus rupestris* se formando a partir de um evento de colonização oriunda de uma espécie ancestral residente na região Norte (Cadeia do Espinhaço) (Figura 23). Nessas simulações, a separação de *P. rupestris* + *Physalaemus* sp. em relação às demais espécies do grupo *P. deimaticus* considerou apenas eventos de vicariância, premissa assumida com base na descontinuidade observada entre a Cadeia do Espinhaço e a Serra da Mantiqueira. O melhor cenário resgatado por essa análise entrou na composição dos cenários propostos para o grupo *P. deimaticus* como um todo.

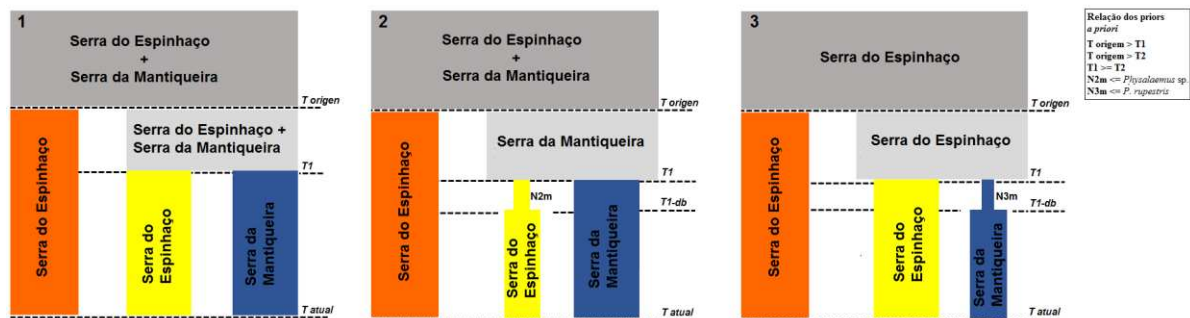


Figura 23. Cenários filogeográficos para *Physalaemus rupestris* e *Physalaemus* sp. testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). **T origem**: Tempo de origem. **T1**: Tempo de separação. **T1-db**: Tempo de colonização. **T atual**: Presente.

Por fim, três foram os cenários testados para o grupo *Physalaemus deimaticus*, sendo esses: (1) Uma população ancestral se fragmentou em duas (**T origem**), originando uma espécie (**N3b**) da qual derivaram *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* (**T1**), e outra (**N1a**) que deu origem a *P. deimaticus* e *P. erythros* (**T2**), também por eventos de fragmentação; (2) População ancestral se fragmentou em duas no **T origem**, evento sucedido por nova fragmentação no clado que deu origem a *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* (**T1**) e um evento de colonização que deu origem a *P. deimaticus* (**T2 e T2-db**); (3) População ancestral se fragmentou em duas no **T origem**, evento sucedido por nova fragmentação no clado que deu origem a *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* (**T1**) e um evento de colonização que deu origem a *P. erythros* (**T2 e T2-db**) (Figura 24).

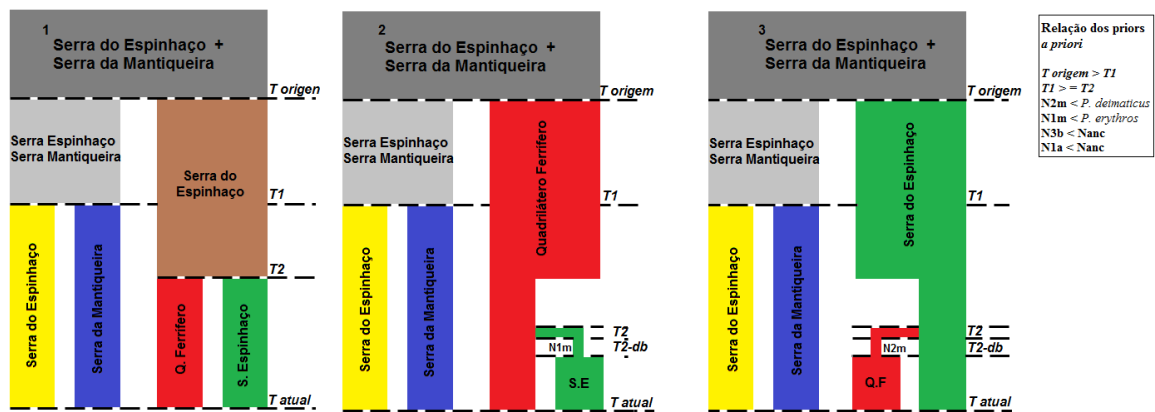


Figura 24. Cenários filogeográficos para o grupo *Physalaemus deimaticus* testados com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). T_{origem} : Tempo de origem. $T1$ e $T2$: Tempo de separação. $T2-db$: Tempo de colonização. T_{atual} : Presente

Pelas análises de componente principal (PCAs) verificou-se que, tanto para os cenários propostos para o grupo, quanto os possíveis cenários para as espécies, houve ajuste entre os dados observados e os simulados (Figura 25). As estatísticas sumárias que melhor contribuíram para esse ajuste, no caso da análise baseada nas **sequências mitocondriais**, foram: Tajima's D , sítios privados de segregação, média do número de nucleotídeos raros e locais de segregação e variância de nucleotídeos raros e locais de segregação, quando considerando os aspectos **intrapopulacionais**; F_{st} (Hudson 1992), no caso das análises **interpopulacionais**. Na análise baseada no grupo de **sequências nucleares**, destacaram-se as seguintes estatísticas sumárias: número de haplótipos, número de sítios segregantes, média da diferença par-a-par, variância da diferença par-a-par, Tajima's D , sítios privados de segregação, média do número de nucleotídeos raros e locais de segregação e variância de nucleotídeos raros e locais de segregação, dentre aquelas referentes a análises **intrapopulacionais**; número de haplótipos, número de sítios segregantes, média da diferença par-a-par (W), média da diferença par-a-par (B), F_{st} (Hudson 1992), dentre aquelas derivadas das análises **interpopulacionais**.

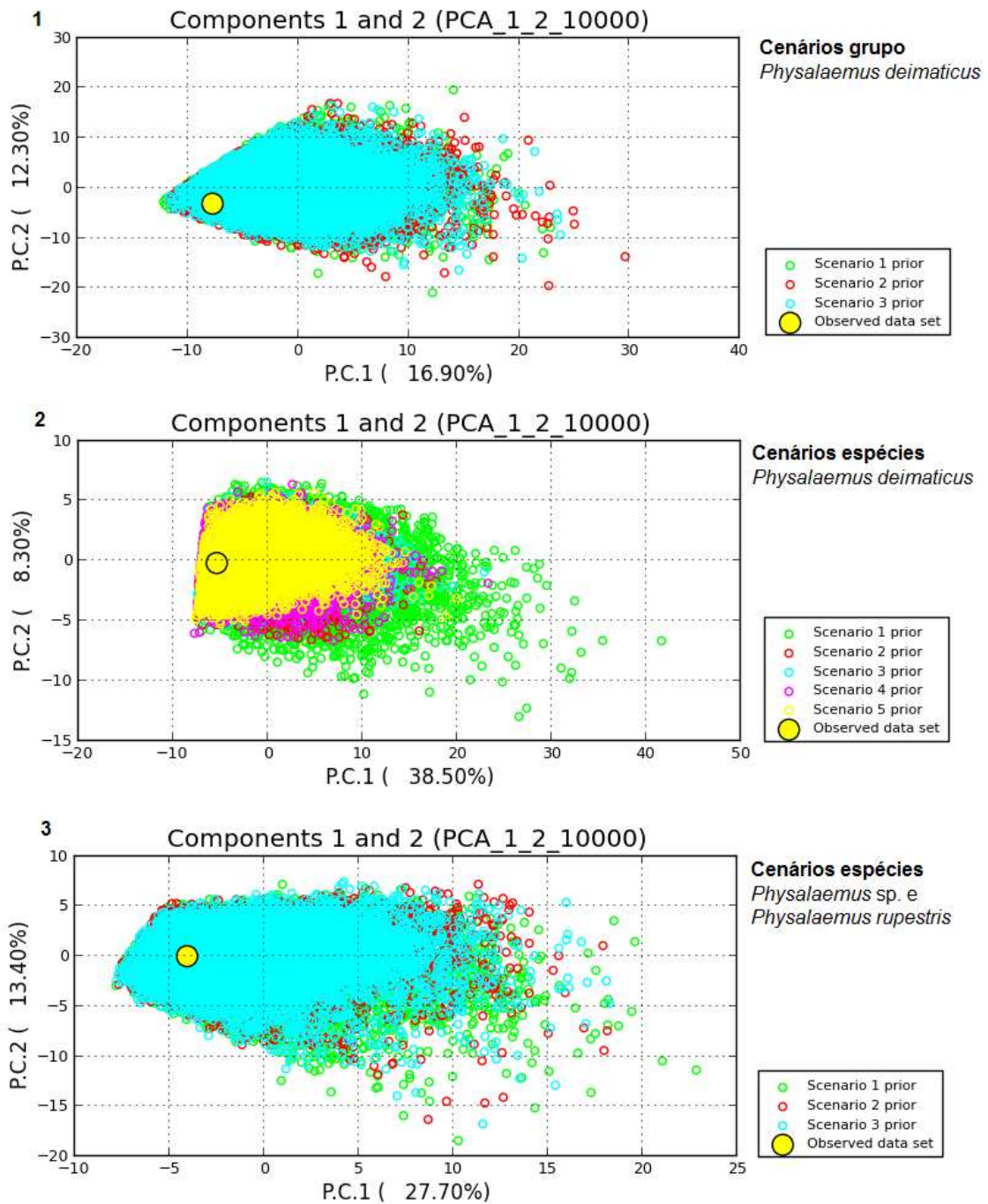


Figura 25. Avaliação dos cenários (*a priori*) em relação aos dados observados e dados simulados realizada pela Análise de Componente Principal (PCA). Cada cenário foi avaliado com base em 1000000 de simulações. **(1)** Cenários do grupo *Physalaemus deimaticus*. **(2)** Cenários 1-5 da espécie *P. deimaticus*. **(3)** Cenários 1-3 das espécies *P. rupestris* e *Physalaemus sp.*

Realizado o teste de probabilidade para identificar o melhor cenário (*Logistic regression*), verificou-se que, para a espécie *P. deimaticus*, o mais provável foi o **cenário 2** ($p = 0.3831$).

Nesse cenário, o primeiro evento de fragmentação ocorreu há 1,16 milhões de anos (T_{origem} , Figura 26; Tabela 8) e o segundo, há 919 mil anos ($T1$, Figura 26; Tabela 8). As estimativas de tamanho efetivo indicaram a população que ocupa hoje a região de Jaboticatubas como a de maior tamanho efetivo ($N3$, Figura 26; Tabela 8), seguida de Itambé ($N2$, Figura 26; Tabela 8) e Diamantina ($N1$, Figura 26; Tabela 8), com 1,08 milhões de indivíduos, 604 e 334 mil indivíduos, respectivamente.

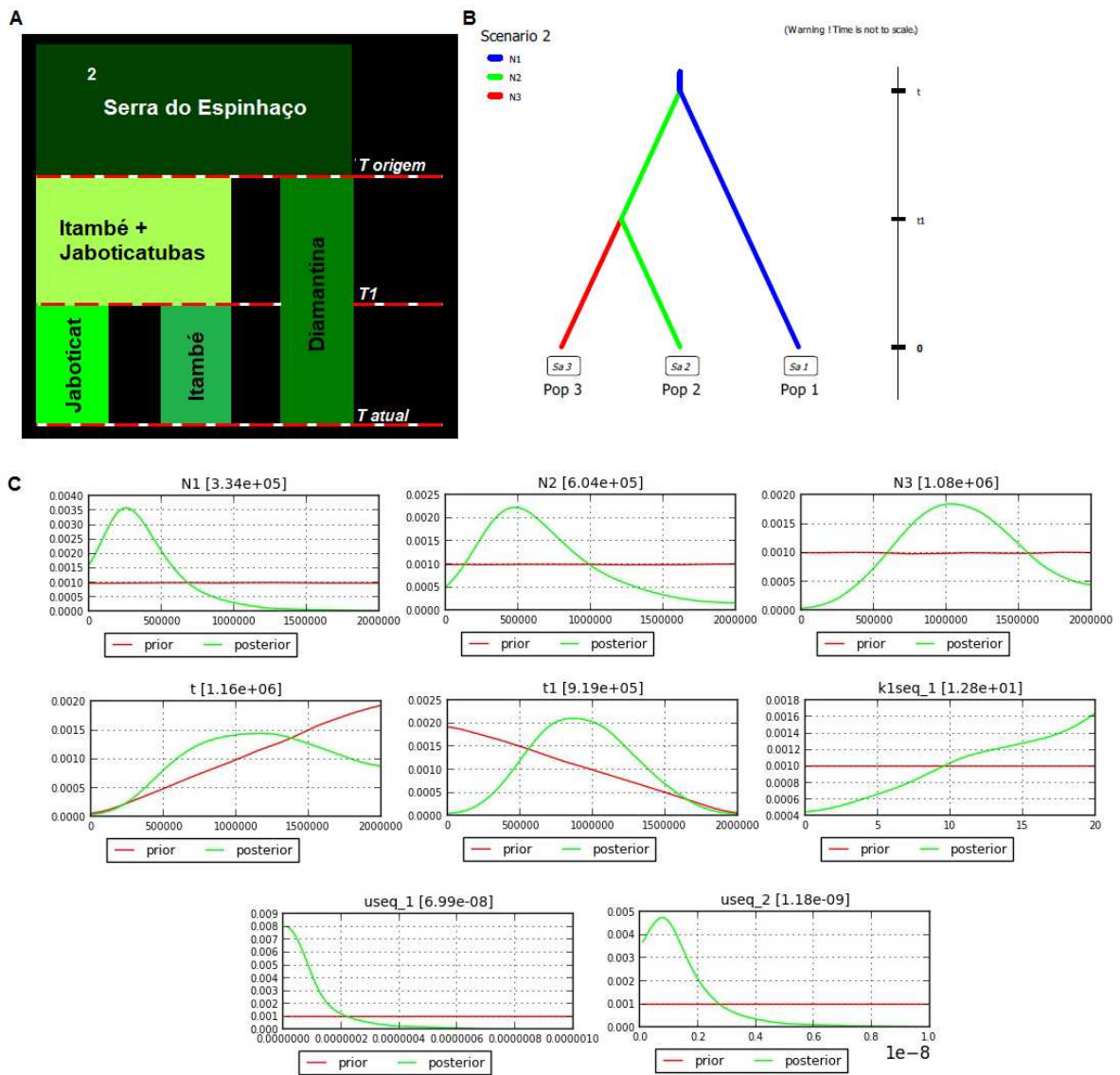


Figura 26. Cenário filogeográfico e resultados a posteriori dos *priors* utilizados para a simulação do modelo para *Physalaemus deimaticus* com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). (A) Esquema do cenário 2, no qual o primeiro evento de separação se deu entre Diamantina e as demais localidades (T_{origem}), seguido por novo evento entre Itambé e Jaboticatubas ($T1$). (B) representação do cenário 2 gerada no programa DiyABC (as cores

diferem do esquema do cenário por ter sido geradas pelo programa). (C) resultado gráfico dos *priors* estimados para o melhor cenário filogeográfico. **T origem** ou **t**: Tempo de origem. **T1**: Tempo de separação. **T atual = 0**: Presente. **N1 = pop1**: Tamanho efetivo da localidade de Diamantina. **N2 = pop2**: Tamanho efetivo da localidade de Itambé. **N3 = pop3**: Tamanho efetivo da localidade de Jaboticatubas. **K1 seq_1**: Estimativa do valo de *K*. **useq_1**: Estimativa da taxa de mutação genes mitocôndrias. **useq_2**: Estimativa da taxa de mutação genes nucleares.

Tabela 8: Valores *a posteriori* dos *priors* estimados com base no melhor cenário obtido para a espécie *P. deimaticus*: **N1**: Diamantina, **N2**: Itambé, **N3**: Jaboticatubas, **T**: Tempo de origem, **T1**: Tempo de separação, **useq_1**: grupo mitocondrial, **useq_2**: grupo nuclear, **k1seq_1**: valores de *K*.

<i>Cenário</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>moda</i>	95% CI (limite inferior)	95% CI (limite superior)
Cenário 2	N1	4.08 e+05	3.34 e+05	1.99 e+05	8.92 e+04	9.95 e+05
	N2	6.94 e+05	6.04 e+05	5.14 e+05	1.88 e+05	1.53 e+06
	N3	1.10 e+06	1.08 e+06	9.96 e+05	4.67 e+05	1.79 e+06
	T1	9.35 e+05	9.19 e+05	9.67 e+05	4.02 e+05	1.53 e+06
	T	1.16 e+06	1.16 e+06	1.23 e+06	4.52 e+05	1.88 e+06
	useq_1	1.19 e-07	6.99 e-08	3.27 e-08	1.97 e-08	4.12 e-07
	useq_2	1.62 e-09	1.18 e-09	6.99 e-10	3.56 e-10	4.49 e-09
	k1seq_1	1.22 e+01	1.28 e+01	2.00 e+01	2.31 e+00	1.96 e+01

O cenário 1 foi o mais provável para *P. rupestris* e *Physalaemus* sp. ($p = 0.6140$), sendo esse o utilizado na composição dos cenários para as espécies do grupo. Dos cenários propostos para o grupo *P. deimaticus*, o cenário 3 foi o mais provável ($p = 0.4245$). Esse cenário apoia que um evento de vicariância originou *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., e também que a colonização do Quadrilátero Ferrífero foi importante evento na origem a *P. erythros* (Figura 27). O primeiro evento de vicariância, ocorrido na população ancestral de todo o grupo *P. deimaticus*, teria ocorrido há 3,67 milhões de anos (**T origem**, Figura 27; Tabela 8), o evento de vicariância envolvido na origem de *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., há 2,03 milhões de anos (**T1**, Figura 27; Tabela 8) e o início do evento de colonização, há 1,20 milhões de anos, tendo ocorrido durante cerca de 64 mil anos (**T2** e **db**, Figura 27; Tabela 8). Outra estimativa passível de ser observada é a média do tamanho efetivo de cada uma das espécies. No caso de *P. deimaticus*, o valor estimado foi de 590 mil indivíduos (**N1**, Figura 27; Tabela 8), para *P. erythros* foi de 191 mil anos (**N2**, Figura 27; Tabela 8), para *Physalaemus* sp., 598 mil indivíduos (**N3**, Figura 27; Tabela 8) e para *P. rupestris*, 387 mil indivíduos (**N4**, Figura 27;

Tabela 8). Para além dessas, o tamanho efetivo da espécie ancestral da qual derivou o grupo foi estimado em 861 mil indivíduos (**Nanc**, Figura 27; Tabela 8), o da espécie que deu origem ao clado *P. rupestris* + *Physalaemus* sp. foi de 448 mil indivíduos (**N3b**, Figura 27; Tabela 8) e o do grupo que deu origem a *P. erythros* foi estimado em menos de 103 mil indivíduos ao longo do tempo de colonização e estabelecimento no Quadrilátero Ferrífero (**N2m**, Figura 27; Tabela 9).

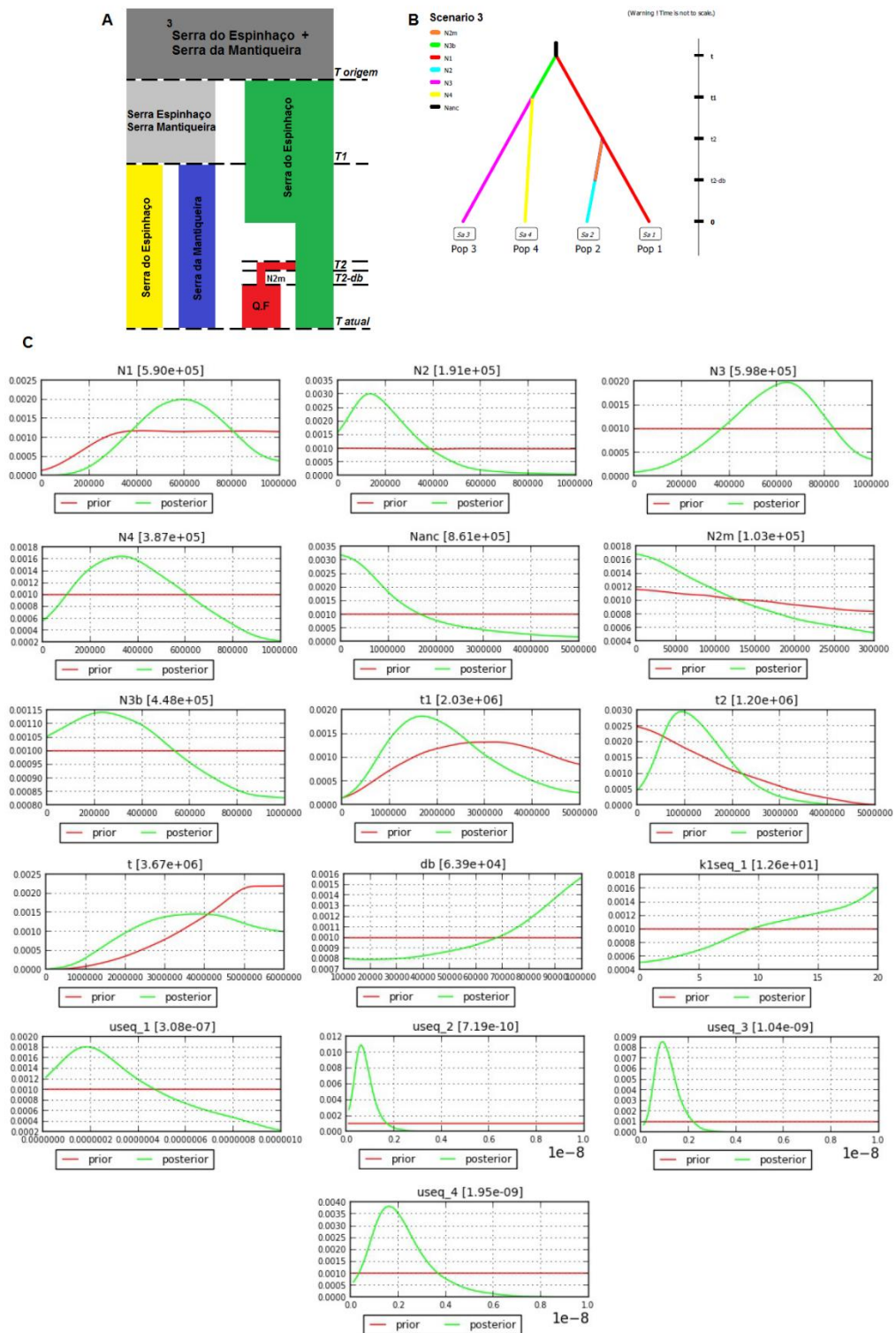


Figura 27. Cenário filogeográfico e resultados a posteriori dos *priors* utilizados para a simulação do modelo para o grupo *Physalaemus deimaticus* com base em *Approximate Bayesian Computation* (ABC). (A) Esquema do cenário 5, no qual *P. erythros* teria se originado de um evento de colonização proveniente de *P. deimaticus* da Cadeia do Espinhaço. (B) Representação do cenário 5 gerada no programa DiyABC. (C) Resultado gráfico dos *priors* estimados para o melhor cenário filogeográfico. **T origem** ou **t**: Tempo de origem. **T1** e **T2**: Tempo de separação. **T2-db**: Tempo de colonização. **T atual = 0**: Presente. **db**: Intervalo para o tempo de colonização. **N1 = pop1**: Tamanho efetivo de *P. deimaticus*. **N2 = pop2**: Tamanho efetivo de *P. erythros*. **N3 = pop3**: Tamanho efetivo de *Physalaemus* sp. **N4 = pop4**: Tamanho efetivo de *P. rupestris*. **Nanc**: Tamanho efetivo da espécie ancestral. **N3b**: Tamanho efetivo da espécie ancestral de *Physalaemus* sp. e *P. rupestris*. **N2m**: Tamanho efetivo do grupo que deu origem a *P. erythros*. **K1 seq_1**: Estimativa do valo de *K*. **useq_1**: Taxa de mutação dos genes mitocondriais. **useq_2**: Taxa de mutação do gene nuclear Rhod. **useq_3**: Taxa de mutação do gene nuclear POMC. **useq_4**: Taxa de mutação do gene nuclear β -crys.

Tabela 9: Valores a posteriori dos *priors* estimados com base no melhor cenário obtido para para o grupo *P. deimaticus*. **N1**: *P. deimaticus*, **N2**: *P. erythros*, **N3**: *Physalaemus* sp., **N4**: *P. rupestris*, **Nanc**: tamanho efetivo da espécie ancestral, **N3b**: tamanho efetivo da espécie ancestral de *Physalaemus* sp. e *P. rupestris*, **N2m**: tamanho efetivo do grupo que deu origem a *P. erythros*, **T**: Tempo de origem, **T1** e **T2**: Tempo de separação, **db**: intervalo para o tempo de colonização, **useq_1**: grupo mitocondrial, **useq_2**: gene nucleal RHOD, **useq_3**: gene nucleal POMC, **useq_4**: gene nucleal β -crys, **k1seq_1**: valores de *K*.

<i>Cenário e espécie</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>moda</i>	95% CI (limite inferior)	95% CI (limite superior)
Cenário 5 Grupo <i>Physalaemus deimaticus</i>	N1	5.89 e+05	5.90 e+05	6.26 e+05	2.96 e+05	8.85 e+05
	N2	2.32 e+05	1.91 e+05	1.04 e+05	4.45 e+04	5.59 e+05
	N3	5.82 e+05	5.98 e+05	6.57 e+05	2.35 e+05	8.78 e+05
	N4	4.12 e+05	3.87 e+05	3.30 e+05	9.30 e+04	8.17 e+05
	Nanc	1.27 e+06	8.61 e+05	2.53 e+05	8.90 e+04	3.82 e+06
	N3b	4.69 e+05	4.48 e+05	2.07 e+05	5.10 e+04	9.39 e+05
	N2m	1.18 e+05	1.03 e+05	1.68 e+04	8.56 e+03	2.71 e+05
	T	3.67 e+06	3.67 e+06	3.94 e+06	1.47 e+06	5.69 e+06
	T1	2.18 e+06	2.03 e+06	1.68 e+06	7.31 e+05	4.17 e+06
	T2	1.32 e+06	1.20 e+06	8.84 e+05	4.01 e+05	2.68 e+06
	db	6.09 e+04	6.39 e+04	9.89 e+04	1.54 e+04	9.76 e+04
	k1seq_1	1.20 e+01	1.26 e+01	2.00 e+00	2.02 e+00	1.97 e+01
	useq_1	3.65 e-07	3.08 e-07	1.87 e-07	6.52 e-08	8.32 e-07
	useq_2	8.22 e-10	7.19 e-10	6.02 e-10	3.05 e-10	1.66 e-09
	useq_3	1.14 e-09	1.04 e-09	8.94 e-10	4.80 e-10	2.10 e-09
useq_4	2.24 e-09	1.95 e-09	1.51 e-09	7.58 e-10	4.73 e-09	

DISCUSSÃO

GRUPO PHYSALAEMUS DEIMATICUS: RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

Uma das características mais marcantes da Serra do Espinhaço é sua diversidade biológica junto de seu elevado grau de endemismo. Tal endemismo vem sendo explorado e observado por diferentes grupos de pesquisadores (ex. Leite et al. 2008, Vasconcelos 2008, Echternacht et al. 2011, Miola et al. 2011, Carvahó et al. 2012, Bitencourt e Rapini 2013, Azevedo et al. 2016), e trabalho pós trabalho, destaca-se cada vez mais sua importância. Uma das marcas desse endemismo é o próprio grupo *P. deimaticus*, fato que em sua essência motivou a análise mais profunda de sua história filogenética e filogeográfica.

As análises filogenéticas aqui apresentadas corroboraram o monofiletismo do grupo *P. deimaticus* apontado por Lourenço e colaboradores (2015) e mostraram que espécimes da Serra do Cipó (tratada apenas como Cipó), localidade não incluída naquele trabalho, compõem o clado irmão de *P. rupestris* (clado *Physalaemus* sp.). A distância genética entre *Physalaemus* sp. e as demais espécies do grupo, inclusive *Physalaemus rupestris*, foi alta, sendo observados valores que superaram 6% e 8%, para os marcadores 16S e COI, respectivamente. Nesse caso, apesar das discussões que permeiam a utilização de distância genética para a identificação de potenciais espécies crípticas (Padial et al. 2009), a sugestão de Fouquet et al. (2007), que considera distâncias genéticas relativas ao gene 16S superiores a 3% como indicativas de espécies distintas (sendo valores inferiores característicos de variações intraespecíficas), tem auxiliado na descrição de várias espécies de anuros neotropicais (ex. Fouquet et al. 2014, Caminer et al. 2017). As distâncias genéticas observadas entre *Physalaemus* sp. e as demais espécies do grupo *P. deimaticus* excedem consideravelmente 3% para o marcador 16S, enquanto distâncias intraespecíficas foram inferiores a 1%. Logo, tal análise favorece a interpretação de que *Physalaemus* sp. represente uma espécie ainda não descrita.

A análise de agrupamento realizada pelo BAPS, baseada em sequências mitocondriais, identificou *Physalaemus* sp. como um grupo distinto daqueles das demais espécies do grupo *P. deimaticus*. A análise de estrutura genética com base no gene RHOD também apoia o reconhecimento de *Physalaemus* sp., embora na análise baseada nos demais genes nucleares (POMC e β -crys) a distinção entre *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* não tenha sido possível. Diferenças observadas entre os diferentes marcadores não é incomum, e podem ser atribuídas às taxas de mutação distintas e características de cada gene (Moore 1995) e/ou à

presença de polimorfismo ancestral como já observado em outros anfíbios (ex. Thomé et al. 2012, Brunes et al. 2014).

As evidências acima apresentadas, reunidas a análises de dados morfológicos e acústicos conduzidas por outros pesquisadores, fazem parte da proposta de descrição de uma nova espécie, que se encontra em fase final de preparação (Leal et al. in prep.). É interessante destacar que a espécie em descrição ocorre na Serra do Espinhaço (SE) e é mais próxima filogeneticamente de *P. rupestris*, uma espécie do complexo de montanhas da Serra da Mantiqueira (SM), do que das demais espécies do grupo *P. deimaticus*, que são endêmicas da SE.

FILOGEOGRAFIA DO GRUPO *PHYSALAEEMUS DEIMATICUS*

Tem sido atribuído ao Pleistoceno o potencial de moldar a composição de fauna e flora em montanhas brasileiras (ver Simpson 1979, Silva 1997, García-Moreno et al. 1999, Vasconcelos e Rodrigues 2010, Freitas et al. 2012, Barbosa e Fernandes 2016). Entretanto, a diversificação no grupo *P. deimaticus* parece ser anterior a esse período. Nossos resultados apontam que os eventos de cladogênese das espécies desse grupo (inclusive *Physalaemus* sp.) se deram entre 3.67 Ma. e 1.20 Ma, no final do Plioceno/início do Pleistoceno, e, após originadas, as espécies aparentemente não reagiram de forma marcante às oscilações climáticas do período. Verifica-se essa mesma característica quando se estima a divergência entre as linhagens que compõem a espécie *P. deimaticus*. Nesse caso, o tempo de separação entre suas populações varia entre 402 mil e 1.88 Ma, intervalo que praticamente se sobrepõe ao tempo de separação entre *P. deimaticus* e *P. erythros* (401 mil a 2.68 Ma).

O intervalo de tempo inferido para a ocorrência dos eventos de cladogênese no grupo *P. deimaticus* se assemelha aos encontrados em alguns grupos de plantas endêmicas dos campos rupestres (Antonelli et al. 2010, Bonatelli et al. 2014, Rando et al. 2016). Não são raros trabalhos que avaliam a congruência biogeográfica de grupos distintos, seja em escala continental seja restrito a um domínio fitogeográfico (ex. Lamoreux et al. 2006, Linder et al. 2012, Rueda et al. 2013, Azevedo et al. 2016), muitas vezes corroborando modelos de estabilidade climática em áreas de refúgio que contribuem para os padrões de endemismos, como observado no Cerrado (Werneck et al. 2012). Dada a sobreposição envolvendo plantas dos campos rupestres e o grupo *P. deimaticus*, é possível que eventos comuns tenham influenciado as histórias evolutivas desses grupos, porém, para uma avaliação mais profunda

desse tema, métodos comparativos apropriados devem ser incorporados a novos estudos envolvendo plantas de campo rupestre e o grupo *P. deimaticus*.

A estruturação dos campos rupestres se deu na porção final do Mioceno, antecedendo a expansão do Cerrado (Beerling e Osborne 2006, Ribeiro et al. 2012, Conceição et al. 2016). Com a expansão do Cerrado, as áreas onde hoje se concentram os campos rupestres serviram de refúgios para as espécies menos resistentes aos ciclos de fogo, bem como agregaram espécies advindas de áreas adjacentes (Ribeiro et al. 2012, Conceição et al. 2016). Alguns estudos têm mostrado que essa expansão no final do Mioceno teve influência, direta ou indireta, na formação e composição da biota de campos rupestres (Beerling e Osborne 2006, Ribeiro et al. 2012, Conceição et al. 2016). A estabilidade climática das áreas de ocorrência dos campos rupestres e a “fuga” do crescente avanço do Cerrado podem ter influenciado o processo de especiação no grupo *P. deimaticus*. Assim apresentado, abre-se a possibilidade de que o grupo *P. deimaticus* possa ter se formado a partir de sobreviventes relictuais de um grupo ancestral com ocorrência em áreas abertas distribuídas pelas porções mais baixas periféricas à Serra do Espinhaço.

Outra perspectiva pautada nos intervalos de separação do grupo *P. deimaticus* e de seus dois principais clados (*P. deimaticus* + *P. erythros* e *P. rupestris* + *Physalaemus* sp.) seria sua relação com o soerguimento do Escudo Brasileiro durante a crise tectônica do Terciário (Colli et al. 2005, Werneck et al. 2009). Esse período de intensa atividade geomorfológica tem se mostrado importante na determinação da diversidade de aves, répteis e anfíbios, entre outros (ver da Silva 1997, da Silva e Bates 2002, Werneck et al. 2009, Prado et al. 2012, Hoorn et al. 2010). No Cerrado, a alta quantidade de espécies endêmicas em regiões de platô quando comparadas às áreas baixas da depressão periférica é um indicativo que antigos gradientes altitudinais afetaram de alguma forma o processo de especiação e de intercâmbio entre localidades distintas (Nogueira et al. 2011). Nesses casos, espécies endêmicas poderiam ter surgido após esses eventos de soerguimento, sendo os efeitos das mudanças climáticas do Pleistoceno provavelmente dependentes dessa condição pré-existente envolvendo variação topográfica e presença de barreiras (Nogueira et al. 2011, Bush 1994). Uma vez que esses eventos geomorfológicos atuaram na remodelação da Serra do Espinhaço durante o Terciário (Giulietti 1997, Giulietti e Pirani 1988, Harley 1995) e parte dos picos mais altos da região derivaram de antigos processos de erosão da superfície (Harley 1995), é possível hipotetizar que a população ancestral que deu origem ao grupo *P. deimaticus* teria se fragmentado, resultando no ancestral do clado *P. deimaticus* + *P. erythros* e no ancestral do clado *Physalaemus* sp. + *P. rupestris*.

Em relação aos eventos mais recentes de cladogênese no grupo *P. deimaticus*, os testes de cenários apoiam a hipótese de que um evento de vicariância tenha resultado em *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., e um evento de colonização com posterior isolamento geográfico tenha originado *P. deimaticus* e *P. erythros*. Nesse modelo podemos atribuir à porção mais contínua da Serra do Espinhaço, separada do Quadrilátero Ferrífero, o provável local de onde partiram os ancestrais que deram origem a *P. erythros*. Já em relação à fragmentação que deu origem a *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., dentre as diversas possibilidades, devem ser consideradas tanto a hipótese de ruptura de uma população ancestral quanto a de um processo de segregação de nicho ocorrido nos domínios da Serra do Espinhaço.

Em estudos anteriores, quatro principais regiões de endemismo na porção meridional da Serra do Espinhaço foram reconhecidas: i) Quadrilátero Ferrífero, ii) Serra do Cipó, iii) platô de Diamantina e iv) Sul de Minas Gerais (Zona da Mata) (Leite 2012, Bitencourt e Rapini 2013). As áreas de endemismos supracitadas se sobrepõem à área de distribuição das espécies e/ou populações do grupo *P. deimaticus*, reforçando a importância dessas regiões para a manutenção e sobrevivência do grupo.

Entre as espécies *P. deimaticus*, *P. erythros* e *P. rupestris*, que ocorrem em mais de um local, *P. deimaticus* foi aquela com distribuição mais ampla ao longo do Espinhaço, sendo que seus três locais de ocorrência estão entre os centros de estabilidade climática e endemismo apontados por Leite (2012). Propostos os cenários de ocupação pela espécie *P. deimaticus*, o mais provável foi aquele que apontou fragmentação inicial entre Diamantina e as demais localidades, sendo a população de Diamantina a mais antiga, com 1,16 Ma (452 mil a 1,88 Ma) e as demais divergindo há cerca de 919 mil anos (402 mil a 1,53 Ma).

Explorando melhor os detalhes proporcionados por esse cenário, verificamos que a população de Diamantina se estabeleceu em sua respectiva localidade durante o Médio-Pleistoceno, sujeita a ciclos climáticos mais regulares (detalhes sobre clima do período em Daruka e Ditlevsen 2016). Apesar dos eventos do Pleistoceno na Serra do Espinhaço terem favorecido tanto a expansão populacional quanto a especiação em alguns grupos associados aos campos rupestres (ver Moraes et al. 2009, Ribeiro et al. 2011, França et al. 2013), nenhum sinal significativo de expansão foi resgatado pelos testes que avaliaram a história demográfica de *P. deimaticus*. Sendo assim, é possível que, uma vez estabelecido o campo rupestre no topo das montanhas, a população ancestral de *P. deimaticus* distribuída na região tenha se fragmentado ao se refugiarem nessas manchas de campos rupestres mantendo-se aparentemente isoladas, apresentando eventual contato secundário. Nesse sentido, é importante ressaltar a existência do vale da nascente do rio Doce, uma zona mais baixa entre Diamantina e Itambé, que pode ter

atuado como a principal barreira entre essas populações, que se mostraram geneticamente distintas. O fato desses indivíduos terem sido coletados na face a leste do morro poderia trazer um viés a essa interpretação porém, entre o ponto de coleta a leste e a vertente mais a oeste de “frente” para região de Diamantina, a distância chega a menos de 11 Km numa região sem barreiras aparentes, permitindo assim um intercâmbio entre indivíduos no sentido leste ↔ oeste entre as extremidades do Pico do Itambé.

Nossos dados também apresentaram evidência de contato secundário entre as populações de Jaboticatubas e Itambé, pois quatro indivíduos coletados em Jaboticatubas se mostraram geneticamente mais relacionados aos amostrados no Pico do Itambé. Tal hipótese pressupõe que condições climáticas favoráveis teriam em algum momento conectado as duas áreas, formando um corredor que permitisse o trânsito entre essas localidades. Corredores dessa natureza foram avaliados por Leite (2012), utilizando modelos paleo-climáticos na perspectiva de explorar a conectividade entre áreas de endemismo ao longo da Serra do Espinhaço. Seus resultados demonstraram que, durante a último máximo glacial (~21 Ka), a região do Cipó (que engloba Jaboticatubas) e o Pico do Itambé estiveram climaticamente conectadas. Tal observação estaria de acordo com nossa proposta de contato secundário entre as populações de Jaboticatubas e Itambé. No entanto, uma segunda via de interpretação dos dados relativos a essas populações é possível e envolve a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral.

A existência de corredores climáticos também apoia o cenário em que *P. erythros* teria derivado de um evento de colonização do Quadrilátero Ferrífero (QF) a partir de uma espécie ancestral distribuída pela Serra do Espinhaço. A conectividade entre QF e SE foi resgatada por Leite (2012), sugerindo que o acesso entre as regiões teria ocorrido tanto em eventos pretéritos quanto durante o Holoceno. Ao considerar o tempo de divergência entre *P. erythros* e *P. deimaticus*, infere-se que a população ancestral dessas espécies teria utilizado dessa rota entre SE e QF durante um período anterior ao médio Pleistoceno, tendo o grupo fundador da população do QF se restringindo a essa área, isolando-se da população ancestral. Tal restrição espacial pode justificar a baixa diversidade genética observada em *P. erythros* com base nos marcadores aqui avaliados.

Também merece destaque a possível relação entre o Espinhaço e a Serra da Mantiqueira, onde ocorre *P. rupestris*. Durante o Oligoceno médio, essas duas regiões estiveram interconectadas, e gêneros comuns da Mata Atlântica, como *Crossodactylus*, *Hylodes* e *Thoropa*, poderiam ser considerados testemunhos “relictuais” desse período (Maxson e Heyer 1982). O caso de vicariância envolvendo *P. rupestris* e *Physalaemus* sp., no entanto, se ajustaria melhor às condições relacionadas ao final do Terciário, quando foram originadas as duas

espécies, há cerca de 2,03 Ma (731 mil a 4,17 Ma), e não ao período em que as serras estiveram conectadas

Por fim, destacamos a baixa diversidade genética observada em *Physalaemus* sp. em relação aos demais membros do grupo, apresentando valores inferiores a 0,5 e 0,5% de diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica para marcadores mitocondriais. Trabalhos envolvendo espécies de plantas com distribuição regional na Serra do Espinhaço tais como as do gênero *Vellozia* (ver Franceshelli et al. 2006, Lousada et al. 2011) e *Chamaecrista* (ver Silva et al. 2007), também revelaram baixos níveis de diversidade genética intrapopulacional. Em geral, populações pequenas e isoladas tendem a perder diversidade genética por deriva genética (Otto e Barton 2001, Charlesworth 2009, Holsinger e Weir 2009) e quando as espécies são atribuídas a ambientes de montanhas, as restrições quanto à sua capacidade de dispersão interferem de forma ainda mais intensa nessa perda de diversidade (ver Ohsawa e Ide 2008). As análises demográficas aqui realizadas não resgataram sinais de bottleneck/efeito do fundador em *Physalaemus* sp. e, portanto, a origem da baixa diversidade genética encontrada nesse grupo em é uma questão que permanece em aberto. Ao contrário, grande diversidade genética foi encontrada em *P. rupestris*, embora o número de indivíduos dessa espécie tenha sido extremamente baixo em nossas análises. Sendo assim, também para *P. rupestris* futuras análises serão necessárias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os pontos discutidos nessa tese, resgatou-se o monofiletismo do grupo e evidenciou-se a presença de mais uma espécie endêmica da Serra do Espinhaço. Dada sua posição filogenética, tal espécie, juntamente com *P. rupestris*, compartilham um ancestral que representa um elo unindo Serra do Espinhaço e Serra da Mantiqueira, além de reforçar a importância dessas cadeias de montanhas frente aos processos de diversificação em anfíbios anuros.

Verificou-se que os principais eventos de separação das linhagens que deram origem às espécies ocorreram entre o Plioceno e o Pleistoceno. Essa constatação, fundamentada nas estimativas de tempo de divergência obtidas a partir da datação dos ramos na análise filogenética corroborada pelo tempo estimado dentro do mais provável cenário de distribuição geográfica, não dá suporte à hipótese de que as espécies teriam surgido a partir dos eventos de colonização favorecidos por oscilações nas condições climáticas ocorridas no Pleistoceno.

Avaliando a espécie *Physalaemus deimaticus*, constatou-se profunda estrutura genética e que a diversificação de suas populações data de períodos que remetem ao médio Pleistoceno. O melhor cenário filogeográfico demonstrou que evento de vicariância foi aquele que mais marcou a história da espécie. Algumas evidências sugerem o possível contato secundário entre as populações encontradas em Jaboticatubas e o Pico do Itambé.

Sobre as demais espécies do grupo, pode-se associar a origem de *P. erythros* ao processo de ocupação do Quadrilátero Ferrífero. Uma vez originada, essa espécie manteve-se na região com ausência de estrutura populacional e baixa diversidade genética.

De *Physalaemus* sp. e *P. rupestris* poucas informações filogeográficas contundentes puderam ser levantadas. Ainda assim, ambas abrem perspectivas interessante para se compreender a conectividade entre a Serra da Mantiqueira e a Serra do Espinhaço. Espera-se que num futuro próximo, novas populações possam ser encontradas de ambas as espécies proporcionando avaliações mais precisas trazendo novo elementos para a discussão de seus aspectos filogeográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso L.G., Eterovick P.C. 2007. Spatial and temporal distribution of breeding anurans in streams in southeastern Brazil. *J. Nat. Hist.*, 41(13-16): 949-963.
- Almeida-Abreu P.A. 1995. O Supergrupo Espinhaço: O rifte, a bacia e o orógeno. *Geonomos*, 3: 1-18.
- Almeida-Abreu P.A., Renger F.E. 2002. Serra do Espinhaço Meridional: um orógeno de colisão do Mesoproterozóico. *Braz. J. Geol.*, 32(1): 1-14.
- Alves C.B.M., Leal C.G., Brito M.F.G., Santos A.C.A. 2008. Biodiversidade e conservação de peixes do Complexo do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4: 177-196.
- Alves R.J.V., Kolbek J. 2010. Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? *Plant. ecol.*, 207: 67-79.
- Antonelli A., Verola C.F., Parisod C., Gustafsson A.L.S. 2010. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 100(3): 597-607.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography - the mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Boston: Harvard Univ. Press. 2000. 447p.
- Avise J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.*, 36(1): 3-15.
- Azevedo A.A., Silveira F.A., Aguiar C.M.L., Pereira V.S. 2008. Fauna de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia, Brasil): riqueza de espécies, padrões de distribuição e ameaças para conservação. *Megadiversidade*, 4(1-2): 126-157.
- Azevedo J.A., Valdujo P.H., Nogueira C. 2016. Biogeography of anurans and squamates in the Cerrado hotspot: coincident endemism patterns in the richest and most impacted savanna on the globe. *J. Biogeogr.*, 43(12): 2454-2464.
- Baêta D., Lourenço A.C.C., Nascimento L.B. 2007. Tadpole and advertisement call of *Physalaemus erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto, 2003 (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1623: 39-46.

Baêta D., Silva D.H.S. 2009. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Physalaemus erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto, 2003: Distribution extension. *Check List*, Campinas, 5(4): 812-814.

Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.

Barata I.M., Correia C.M., Ferreira G.B. 2016. Amphibian species composition and priorities for regional conservation at the Espinhaço mosaic, southeastern Brazil. *Herpetol. Conserv. Biol.*, 11(2): 293-303.

Barbosa N.P.U., Fernandes G.W. 2016. Rupestrian grassland: past, present and future distribution. G.W. Fernandes (Ed.), *Ecology and Conservation of Mountain-top Grasslands in Brasil*, Springer International, Switzerland (2016), pp. 531-541.

Beebee T. 1996. *Ecology and conservation of amphibians* (Vol. 7). Springer Science & Business Media

Beerling D.J., Osborne C.P. 2006. The origin of the savanna biome. *Glob. Chang. Biol.*, 12(11): 2023-2031.

Benites V.M., Caiafa A.N., Mendonça E.S., Schaefer C.E., Ker J.C. 2003. Solos e vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. *Floresta Ambient.* 10: 76-85.

Bitencourt C., Rapini A. 2013. Centres of endemism in the Espinhaço Range: identifying cradles and museums of Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Syst. Biodivers.*, 11:525–536.

Bitencourt C.C.C. 2013. Biogeografia das *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) na Cadeia do Espinhaço: o futuro incerto dos refúgios glaciais de Campos Rupestres. 64f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BH, 2013.

Bonatelli I.A., Perez M.F., Peterson A.T., Taylor N.P., Zappi D.C., Machado M.C., Koch I., Pires A.H.C., Moraes E.M. 2014. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Mol. Ecol.*, 23(12): 3044-306.

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.

Brunes T.O., Alexandrino J., Baeta D., Zina J., Haddad C.F., Sequeira F. 2014. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). *Zool. Scr.*, 43(6): 586-604.

Bünger M., Stehmann J.R., Oliveira-Filho A.T. 2014. Myrtaceae throughout the Espinhaço Mountain Range of central-eastern Brazil: Floristic relationships and geoclimatic controls. *Acta bot. bras.*, 28(1): 109-119.

Bush, M.B. 1994. Amazonian speciation: a necessarily complex model. *J. Biogeogr.*, 21: 5–17.

Caminer M.A., Milá B., Jansen M., Fouquet A., Venegas P.J., Chávez G., Lougheed S.C., Ron S.R. 2017. Systematics of the *Dendropsophus leucophyllatus* species complex (Anura: Hylidae): Cryptic diversity and the description of two new species. *PloS one*, 12(3): e0171785.

Caramaschi U., Carcerelli L.C., Feio R.N. 1991. A new species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Herpetologica*, 47: 148-151.

Caramaschi U., Feio R.N., Guimaraes-Neto A.S. 2003. A new brightly colored species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Herpetologica*, 59: 519-524.

Caramaschi U., Nascimento L.B., Silvano D. 2004. *Physalaemus deimaticus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T57251A11609332. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T57251A11609332.en>. Downloaded on 24 February 2017.

Carnaval A.C., Hickerson M.J., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T, Moritz. C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323: 785-789.

Carvalho F., De Souza F.A., Carrenho R., De Souza Moreira F.M., Da Conceição Jesus E., Fernandes G.W. 2012. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied. Soil. Ecology.*, 52: 9-19.

Cassini C.S., Goncalves Cruz C.A., Caramaschi U. 2010. Taxonomic review of *Physalaemus olfersii* (Lichtenstein & Martens, 1856) with revalidation of *Physalaemus lateristriga* (Steindachner, 1864) and description of two new related species (Anura: Leiuperidae). *Zootaxa*, (2491): 1-33.

Chaverri-Polini A. 1998. Mountains, biodiversity and conservation. *Unasylva*, 49: 47-54. Colacino C.1997. Léon Croizat's biogeography and macroevolution, or . . . “out of nothing, nothing comes”. *Philippine Scientist*, 34: 73–88.

Charlesworth B. 2009. Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Rev. Genet.*, 10: 195–205.

Colli G.R. 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação (ed. by A. Scariot, J.C. Souza-Silva and J.M. Felfili), pp. 247– 264. Distrito Federal, Brasília.

Conceição A.A., Rapini A., Do Carmo F.F., Brito J.C., Silva G.A., Neves S.P., Jacobi C.M. 2016. Rupestrian Grassland Vegetation, Diversity, and Origin. In *Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil* (pp. 105-127). Springer International Publishing.

Corander J., Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Math. Biosci.*, 205: 19-31.

Corander J., Marttinen P., Sirén J., Tang J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, 9(1): 539.

Cornuet J.M., Pudlo P., Veyssier J., Dehne-Garcia A., Gautier M., Leblois R., Marin J. Estoup A. 2014. DIYABC v2. 0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30(8): 1187-1189.

Costa L.M., Rodrigues M. 2012. Bird community structure and dynamics in the campos rupestres of southern Espinhaço Range, Brazil: diversity, phenology and conservation. *Rev. Bras. Ornitol.*, 20(2): 132-147.

Crawford A.J. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Ecol.*, 12: 2525-2540.

Croizat L. 1958. Panbiogeography or an introductory synthesis of zoogeography, phytogeography, and zoology. With notes on evolution, systematics, ecology, anthropology, etc. Vol. 1 - The New World. Vol. 2 - The Old World. Published by the author, Caracas, Venezuela.

Croizat L. 1964. Space, time, form: The biological synthesis. Published by the author, Caracas, Venezuela.

Cruz C.A.G., Feio R.N. 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. In: (Nascimento, L.B. & Oliveira, M.E., orgs) Herpetologia no Brasil II. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 1ª edição: 117-126.

Daruka I., Ditlevsen P.D. 2016. A conceptual model for glacial cycles and the middle Pleistocene transition. *Clim. Dyn.*, 46(1-2): 29-40.

Dobzhansky T. 1973. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. *The American Biology Teacher*, 35: 125-129.

- Dolman G., Phillips B. 2004. Single copy nuclear DNA markers characterized for comparative phylogeography in Australian wet tropics rainforest skinks. *Mol. Ecol. Notes*, 4(2): 185-187.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B.E.T.H., Pybus O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 22(5): 1185-1192.
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.*, 4: 699-710.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Mol. Biol. Evol.*, 29: 1969-1973.
- Duellman W.E., Trueb L. 1986. Biology of amphibians. JHU press.
- Echternacht L., Trovó M., Oliveira C.T., Pirani J.R. 2011. Areas of endemism in the Espinhaço range in Minas Gerais, Brazil. *Flora*, 206(9): 782-791.
- Eterovick P.C., de Queiroz Carnaval A.C.O., Borges-Nojosa D.M., Silvano D.L., Segalla M.V., Sazima I. 2005. Amphibian declines in Brazil: an overview. *Biotropica*, 37(2): 166-179.
- Eterovick P.C., Yazbeck G.M., Dergam J.A., Kalapothakis E. 2009. Small scale population structure in the treefrog *Bokermannohyla saxicola* (Bokermann, 1964) (Anura, Hylidae). *S. Am. J. Herpetol.*, 4(3): 235-244.
- Evans B., Supriatna J., Andayani N., Setiadi M.J., Cannatella D.C., Melnick D.J. 2003. Monkeys and toads define areas of endemism on Sulawesi. *Evolution*, 57: 1436–1443.
- Excoffier L.G.L., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, 1: 47-50.
- Feio R.N., Caramaschi U. 1995. Aspectos zoogeográficos dos anfíbios do médio rio Jequitinhonha, nordeste de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Ceres (Impr.)*, 42(239): 53-61.
- Feller A.E., Hedges S.B. 1998. Molecular evidence for the early history of living amphibians. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9: 509-516.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approaching using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell N.J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *Plos One*, 2: 1109.

Fouquet A., Noonan B.P., Rodrigues M.T., Pech N., Gilles A., Gemmell N.J., 2012a. Multiple quaternary refugia in the eastern Guiana Shield revealed by comparative phylogeography of 12 frog species. *Syst. Biol.*, 61(3): 461–489.

Fouquet A., Loebmann D., Castroviejo-Fisher S., Padial J.M., Orrico V.G., Lyra M.L., Roberto I.J., Kok P.J.R., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T. 2012b. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 65(2): 547-561.

Fouquet A, Cassini C.S., Haddad C.F.B., Pech N, Rodrigues M.T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *J. Biogeogr.*, 41: 855-870.

Franceschinelli E.V., Jacobi C.M., Drummond M.G., Resende M.F.S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Ann. Bot.*, 97: 585-592.

Freitas G. H., Chaves A.V., Costa L.M., Santos F R., Rodrigues M. 2012. A new species of *Cincludes* from the Espinhaço Range, southeastern Brazil: insights into the biogeographical history of the South American highlands. *Ibis*, 154(4): 738-755

Frost D.R. 2017. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (último acesso 09-06-2017) Electronic Data base accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Fu Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.

Funk W.C., Caldwell J.P., Peden C.E., Padial J.M., De la Riva I., Cannatella D.C. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44(2): 825-837.

Fusinatto L.A., Alexandrino J., Haddad C.F.B., Brunes T.O., Rocha C.F.D., Sequeira F. 2013. Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied Amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS One*, 8: 79504.

Garcia-Fernandez A., Segarra-Moragues J.G., Widmer A., Escudero A., Iriondo J.M. 2012. Unravelling genetics at the top: mountain islands or isolated belts? *Ann Bot.*, 110 (06): 1221–1232.

García-Moreno J., Arctander P., Fjeldså J. 1999. A case of rapid diversification in the Neotropics: phylogenetic relationships among *Cranioleuca spinetails* (Aves, Furnariidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 273–281.

Gehara M., et al. 2014. High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *PloS one*, 9(9): e103958.

Giulietti A.M., Pirani J.R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini, P.E. & Heyer, W.R. (Eds.), *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p.39-69.

Giulietti A.M., Pirani J.R., Harley R.M. 1997. Espinhaço range region, eastern Brazil. In: *Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for Their Conservation* (S.D. Davis, V.H. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos & A.C. Hamilton, eds.). Cambridge: IUCN Publication Unit. Vol. 3: 397-404.

Goloboff P.A., Farris J.S., Nixon K.C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.

Gontijo B. M. 2008. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4(1-2): 7-14.

Graham C.H., Carnaval A.C., Cadena C.D., Zamudio K.R., Roberts T.E., Parra J.L., et al. 2014. The origin and maintenance of montane diversity: integrating evolutionary and ecological processes. *Ecography*, 37: 711-719.

Graybeal A. 1997. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zool. J. of the Linnean Soc.*, 119: 297-338.

Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137.

Haffer, J., 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodivers. Conserv.*, 6: 451–476.

Haffer J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz. J. Biol.*, 68(4): 917-947.

Hall J.P. 1999. A revision of the genus *Theope*: its systematics and biology (Lepidoptera: Riodinidae: Nymphidiini). *Scientific Pub.*

Harley R.M. 1995. Introduction. In: Stannard, B.L.; Harvey, Y.B. & Harley, R.M. (Eds.), *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina – Bahia, Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew, p.1-42.

Harpending H.C., Sherry S.T., Rogers A.R., Stoneking M. 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.*, 34: 483-496.

Hedges S.B. 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91:2621-2624.

Heled J., Drummond A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Biol.*, 8(1): 289

Hennig W. 1966. Phylogenetic systematics. Chicago: University of Illinois Press; 1966. Translated by D. Dwight Davis and Rainer Zangerl.

Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.

Heyer W.R., Maxson L.R. 1982. Neotropical frog biogeography: paradigms and problems. *Am. Zool.*, 22(2): 397-410.

Hickerson M.J., Carstens B.C., Cavender-Bares J., Crandall K.A., Grahame C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A.D. 2010. Phylogeography's past present and future: 10 years after Avise 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54: 291–301.

Holsinger K.E., Weir B.S. 2009 Genetics in geographically structure populations: defining, estimating and interpreting Fst. *Nat Rev Genet.*, 10: 639–650.

Hoorn C., Wesselingh F.P., ter Steege H., Bermudez M.A., Mora A., Sevink J., Sanmartín I., Sanchez-Meseguer A., Anderson C.L., Figueiredo J.P., Jaramillo C., Riff D., Negri F.R., Hooghiemstra H., Lundberg J., Stadler T., Sarkinen T., Antonelli A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330: 927–931.

Hudson R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.*, 7(1): 44.

Hudson R.R. 1992. Gene trees, species trees, and the segregation of ancestral alleles. *Genetics* 131: 509-512.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.

Juncá F.A., Napoli M.F., Nunes I., Mercês E.A., Abreu R.O. 2015. A new species of the *Scinax ruber* clade (Anura, Hylidae) from the Espinhaço Range, Northeastern Brazil. *Herpetologica*, 71(4): 299-309.

Kingman J.F.C. 1982. The coalescent. *Stoch. Proc. Appl.*, 13(3): 235-248.

Knauer L.G. 2007. O Supergrupo Espinhaço em Minas Gerais: considerações sobre sua estratigrafia e seu arranjo estrutural. *Geonomos*, 15: 81–90.

Knauer L.G. 2013. O Supergrupo Espinhaço em Minas Gerais: considerações sobre sua estratigrafia e seu arranjo estrutural. *Revista Geonomos*, 15(1).

Knowles L.L., Maddison W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.*, 11(12): 2623-2635.

Kok P.J., Russo V.G., Ratz S., Means D.B., MacCulloch R.D., Lathrop A., Aubret F. Bossuyt, F. 2017. Evolution in the South American ‘Lost World’: insights from multilocus phylogeography of stefanias (Anura, Hemiphractidae, *Stefania*). *J. Biogeography*, 44(1): 170-181.

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.

Langone J.A., Camargo A., De Sá R.O. 2016. High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 95: 137-151.

Lamoreux J.F., Morrison J.C., Ricketts T.H., Olson D.M., Dinerstein E., McKnight M.W., Shugart H.H. 2006. Global tests of biodiversity concordance and the importance of endemism. *Nature*, 440, 212–214.

Leigh J.W., Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, 6(9): 1110-1116.

Leite F.S.F., Juncá F.A., Eterovick P.C. 2008. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade*, 4(1/2): 182-200.

Leite F.S.F. 2012. Taxonomia, biogeografia e conservação dos anfíbios da Serra do Espinhaço. 123f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

Leite F.S.F., Pezzuti T.L., De Anchieta Garcia P.C. 2012. A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from the Espinhaço range, central Bahia, Brazil (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, 68(3): 401-409.

Lemmon E.M., Lemmon A.R., Canatella D.C. 2007. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). *Evolution*, 61, 2086-2103.

Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

Linder H.P., Bykova O., Dyke J., Etienne R.S., Hickler T., Kühn I., Marion G., Ohlemüller R., Schymanski S.J., Singer A. 2012. Biotic modifiers, environmental modulation and species distribution models. *J. Biogeogr.*, 39: 2179 – 2190.

Lougheed S.C., Gascon C., Jones D.A., Bogart J.P., Boag P.T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 266 (1431): 1829-1835.

Lourenço A.C.C., Nascimento L.B., Pires M.R.S. 2009. A new species of the *Scinax catharinae* species group (Anura: Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brazil. *Herpetologica*, 65(4): 468-479.

Lourenço L.B., Targueta C.P., Baldo D., Nascimento J., Garcia P.C.A., Andrade G.A., Haddad C.F.B., Recco-Pimentel S.M. 2015. Phylogeny of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 92: 204-16.

Lousada J.M., Borba E.L., Lovato M.B. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*, 139: 431 – 440.

Lyra M.L., Haddad C.F., De Azeredo-Espin A.M.L. 2016. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: Polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Mol. Ecol. Resour.*

MacArthur R.H., Wilson E.O. 1967. *The Theory of Island Biogeography*, Princeton University Press.

Machado N., Noce C.M., Ladeira E.A., De Oliveira, O.B. 1992. U-Pb geochronology of Archean magmatism and Proterozoic metamorphism in the Quadrilátero Ferrífero, southern São Francisco craton, Brazil. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 104(9): 1221-1227.

Martinelli G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Braz. J. Bot.*, 30(4): 587-597.

Mascarenhas L., Tiso C., Linares A.M., De Moura C.F.O., Pezzuti T.L., Leite F.S.F., Eterovick P.C. 2016. Improved local inventory and regional contextualization for anuran (Amphibia) diversity assessment at an endangered habitat in southeastern Brazil. *J. Nat. Hist.*, 50(19-20): 1265-1281.

Maxson L.R., Heyer W.R. 1982. Leptodactylid frogs and the Brazilian Shield: an old and continuing adaptive relationship. *Biotropica*, 10-15.

Miller M.P. 2005. Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.*, 96(6): 722-724.

Miola D.T., Freitas C.R., Barbosa M., Fernandes G.W. 2011. Modeling the spatial distribution of the endemic and threatened palm shrub *Syagrus glaucescens* (Arecaceae). *Neotrop. Biol. Conserv.*, 6(2): 78-84.

Moore W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution*, 49, 718-726.

Moraes E.M., Yotoko K.S., Manfrin M.H., Solferini V.N., Sene F.M. 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *J. Biogeography*, 36(11): 2136-2147.

Morando M., Avila L.J., Baker J., Sites J.W. Jr. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): Evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58: 842–861.

Nascimento L.B., Carvalho Jr. R.R., Wogel H., Fernandes D.S., Feio R.N. 2001. Reprodução e descrição do girino de *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli and Feio, 1991 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Bol. Mus. Nac. Rio de J.*, 450:1-10.

Nascimento L.B., Caramaschi U., Cruz C.A.G. 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jimenezde-La-Espada, 1872 and *Euphemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Mus. Nac.* 63(2): 297-320.

Nogueira C., Ribeiro S., Costa G.C., Colli G.R. 2011. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot: distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. *J. Biogeogr.*, 38: 1907–1922.

Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.

Ohsawa T, Ide Y. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography* 17: 152–163.

Oliveira E.F., Tolledo J., Feio R.N. 2009. Amphibia, Anura, *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli and Feio, 1991: Distribution extension and geographic distribution map. *Check List*, 5: 815–818.

Otto S.P., Barton N. H. 2001. Selection for recombination in small populations. *Evolution*, 55: 1921–1931.

Padial J.M., Castroviejo-Fisher S., Köhler J., Vilà C., Chaparro J.C., De la Riva I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zool Scripta*, 38(4): 431-447.

Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.*, 7: 1–14.

Palumbi S.R., Martins A., Romano S., Mc-Millan W.O., Stice L., Grabawski G. 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. University of Hawaii, Honolulu: Privately published, compiled by S. Palumbi.

Passos P., Teixeira Jr. M., Recoder R.S., Sena M.A.D., Vechio F.D., Pinto H.B.D.A., Mendonça S.H.S.T, Cassimiro J. Rodrigues M.T. 2013. A new species of *Atractus* (Serpentes: Dipsadidae) from Serra do Cipó, Espinhaço range, Southeastern Brazil, with proposition of a new species group to the genus. *Pap. Avulsos de Zool. (São Paulo)*, 53(6): 75-85.

Pimenta B.V., Wachlevski M., Cruz C.A.G. 2008. Morphological and acoustical variation, geographic distribution, and conservation status of the spinythumb frog *Crossodactylus bokermanni* Caramaschi and Sazima, 1985 (Anura, Hylodidae). *J. Herpetol.*, 42(3): 481-492.

Prado C., Haddad C.F., Zamudio K.R. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Mol. Ecol.*, 21(4): 921-941.

Prates I., Rivera D., Rodrigues M.T., Carnaval A.C. 2016. A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic Forest by Amazonian anole lizards. *Mol. Ecol.*, 25(20): 5174-5186.

Rambaut A. 2012. FigTree v1. 4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. *Edinburgh, UK: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology*.

Rambaut A., Drummond A.J. 2013. TreeAnnotator v1. 7.0. Available as part of the BEAST package at <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Rambaut A., Suchard M., Xie W., Drummond A. 2014. Tracer v. 1.6. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Rando J.G., Zuntini A.R., Conceição A.S., Van den Berg C., Pirani J.R., De Queiroz L. P. 2016. Phylogeny of *Chamaecrista* ser. *Coriaceae* (Leguminosae) unveils a lineage recently diversified in Brazilian campo rupestre vegetation. *Int. J. Plant Sci.*, 177(1): 3-17.

Rapini A., De Mello-Silva R., Kawasaki M.L. 2002. Richness and endemism in *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil—a conservationist view. *Biodivers. Conserv.*, 11(10): 1733-1746.

Renger F.E., Noce C.M., Romano A.W., Machado N. 1994. Evolução sedimentar do Supergrupo Minas: 500 Ma. de registro geológico no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. *Revista Geonomos*, 2(1): 1-11.

Ribeiro P.L. 2011. Filogenia e variabilidade genética de *Minaria* (Apocynaceae): implicações para biogeografia e conservação da Cadeia do Espinhaço. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

Ribeiro P.L., Rapini A., Silva U.C.S.E., Konno T.U.P., Damascena L.S., Van den Berg C. 2012. Spatial analyses of the phylogenetic diversity of *Minaria* (Apocynaceae): assessing priority areas for conservation in the Espinhaço Range, Brazil. *Syst. Biodivers.*, 10(3): 317-331. Rueda M., Rodríguez M.A., Hawkins B.A. 2013. Identifying global zoogeographical regions: lessons from Wallace. *J. Biogeogr.*, 40: 2215–2225.

Rull V. 2014. Biodiversity, mountains and climate change. *Collect Bot*, 33(1): 75-79.

Sanmartín I. 2012. Historical biogeography: evolution in time and space. *Evo. Edu. Outreach.*, 5: 555–568.

São Pedro V.D.A. 2008. Composição, ocupação ambiental e sazonalidade dos anfíbios anuros da Serra do Ouro Branco, Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. 55f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

São-Pedro V.D.A., Feio R.N. 2011. Anuran species composition from Serra do Ouro Branco, southernmost Espinhaço Mountain Range, state of Minas Gerais, Brazil. *Check List*, 7(5): 671-680.

Sarmiento F.O., Frolich L.M. 2002. Andean cloud forest tree lines: naturalness, agriculture and the human dimension. *Mt. Res. Dev.*, 22(3): 278-287.

Sazima I., Caramaschi U. 1986. Descrição de *Physalaemus deimaticus*, sp. n., e observações sobre comportamento deimático em *P. nattereri* (Steidn.) - Anura, Leptodactylidae. *R. bras. Biol.*, 13(1): 91-101.

Schneider S., Excoffier L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3): 1079-1089.

Segalla M.V., Caramaschi U., Cruz C.A.G., Grant T., Haddad C.F.B., Garcia P.C.A., Berneck B.V.M., Langone J.A. 2016. Brazilian amphibians—List of species. *Herpetologia Brasileira*, 5(2): 34-46.

Silva J.M.C. da. 1997. Endemic bird species and conservation in the Cerrado Region, South America. *Biodivers. Conserv.*, 6: 435–450.

Silva J.M.C. da, Bates J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* 52: 225-233.

Silva J.D.A., Machado R.B., Azevedo A.A., Drumond G.M., Fonseca R.L., Goulart M. F. et al. 2008. Identificação de áreas insubstituíveis para conservação da Cadeia do Espinhaço, estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil. *Megadiversidade*, 4(1-2): 272-309.

Silva R.M., Fernandes G.W., Lovato M.B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Can J Bot.*, 85:629–636

Simpson B.B. 1979. Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. In: Duellman, W.E. (Ed.), *The South American herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal*. University of Kansas, Lawrence, p.157-188.

Stephens M., Donnelly P.A. 2003. Comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.*, 73:1162-1169.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123.3: 585-595.

Thomé M.T.C, Zamudio K.R., Giovanelli J.G.R., Haddad C.F.B., Baldiserra Jr. F.A., Alexandrino J.M.B. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pleistocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 55, 1018-1031.

Thomé M.T.C., Zamudio K.R., Haddad C.F., Alexandrino J. 2012. Delimiting genetic units in Neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. *BMC Evol. Biol.*, 12(1): 242.

Thomé M.T.C., Carstens B.C. 2016. Phylogeographic model selection leads to insight into the evolutionary history of four-eyed frogs. *PNAS.*, 113(29): 8010-8017.

Thomé M.T.C., Sequeira F., Brusquetti F., Carstens B., Haddad C.F., Rodrigues M.T., Alexandrino J. 2016. Recurrent connections between Amazon and Atlantic forests shaped diversity in Caatinga four-eyed frogs. *J. Biogeogr.*

Titus T.A., Larson A. 1996. Molecular phylogenetics of desmognathine salamanders (Caudata: Plethodontidae): A reevaluation of evolution in ecology, life history, and morphology. *Syst. Biol.* 45: 451-472.

Vasconcelos M.F., Lopes L.E., Machado C.G., Rodrigues M. 2008. As aves dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço: diversidade, endemismo e conservação. *Megadiversidade*, 4: 221-241.

Vasconcelos M. F., Rodrigues M. 2010. Patterns of geographic distribution and conservation of the open-habitat avifauna of southeastern Brazilian mountaintops (campos rupestres and campos de altitude). *Pap. Avuls. Zool.*, São Paulo 50: 1–29.

Vasconcelos, M.F.D. 2011. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil?. *Braz. J. Bot.*, 34(2): 241-246

Vasconcelos M.F., Chaves A.V., Dos Santos F.R. 2013. First record of *Augastes scutatus* for Bahia refines the location of a purported barrier promoting speciation in the Espinhaço Range, Brazil. *Rev. Bras. Ornitol.*, 20(50): 443-446.

Vuilleumier B.S. 1971. Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173(3999): 771-780.

Wallace A.R. 1876. The geographical distribution of animals:-1880. *Island life*.

Werneck F.D.P., Giugliano L.G., Collevatti R.G., Colli G.R. 2009 Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Mol. Ecol.*, 18 262–278.

Werneck F.P., Gamble T., Colli G.R., Rodrigues M.T., Sites Jr. J.W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66(10): 3014-3034.

Wiens J.J., Fetzner J.W., Parkinson C.L., Reeder T.W. 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Syst. Biol.*, 54(5): 778-807.

Zeisset I., Beebee T.J.C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101(2): 109-119.

ANEXO I

Relação dos indivíduos, amostras e localidades.

Grupos	Espécie	Tecidos	Localidade
Grupo <i>P. deimaticus</i>	<i>P. deimaticus</i>		
		SMRP 497_1	Diamantina
		SMRP 497_2	Diamantina
		SMRP 497_3	Diamantina
		SMRP 497_4	Diamantina
		SMRP 497_5	Diamantina
		SMRP 497_6	Diamantina
		SMRP 497_7	Diamantina
		SMRP 497_8	Diamantina
		UFMG-T 1794	Diamantina
		UFMG-T 1795	Diamantina
		UFMG 3261	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3266	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3267	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3268	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3967	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3968	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3969	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3970	Parque estadual do Pico do Itambé
		UFMG 3971	Parque estadual do Pico do Itambé
		SMRP 495_1	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 495_2	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_1	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_2	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_3	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_4	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_5	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_6	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		SMRP 496_7	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1619	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1620	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1621	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1622	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1623	Jaboticatubas/Morro do Pilar
		UFMG 1624	Jaboticatubas/Morro do Pilar
	<i>P. erythros</i>		
		UFMG 1432	Barão de Cocais
		UFMG 1433	Barão de Cocais
		UFMG 1434	Barão de Cocais
		UFMG 1435	Barão de Cocais

UFMG 1436	Barão de Cocais
UFMG 1437	Barão de Cocais
UFMG 1438	Barão de Cocais
UFMG 1457	Barão de Cocais
UFMG-T 1110	Catas Altas
UFMG 16893	Catas Altas
UFMG 16894	Catas Altas
UFMG 16896	Catas Altas
MNRJ55001 (CH32)	Catas Altas
SMRP 494_1	Ouro Preto
SMRP 494_2	Ouro Preto
SMRP 494_3	Ouro Preto
SMRP 494_4	Ouro Preto
SMRP 494_5	Ouro Preto
SMRP 494_6	Ouro Preto
SMRP 494_7	Ouro Preto
SMRP 494_8	Ouro Preto
UFMG 1414	Ouro Preto
UFMG - PCR 179	Ouro Preto
UFMG - PCR 180	Ouro Preto
UFMG - T 724b	Ouro Preto
<hr/>	
<i>P. rupestris</i>	
<hr/>	
UFMG (PCAG) 1767	Lima Duarte - MG
UFMG (PCAG) 1768	Lima Duarte - MG
UFMG (PCAG) 1770	Rio Preto - MG
UFMG (PCAG) 1771	Rio Preto - MG
<hr/>	
<i>Physalaemus sp.</i>	
<hr/>	
SMRP 430_1	Morro do Pilar (Cipó) - MG
SMRP 430_2	Morro do Pilar (Cipó) - MG
SMRP 432_1	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1630	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1631	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1632	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1633	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1634	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1635	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1636	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1637	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1638	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1639	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1640	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1641	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1642	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG 1643	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG-T 1558	Morro do Pilar (Cipó) - MG
UFMG-T 1559	Morro do Pilar (Cipó) - MG

	UFMG-T 1560	Morro do Pilar (Cipó) - MG
Grupo externo		
<i>P. cuvieri</i>	SMRP 92_68	Mogi das Cruzes - SP
<i>P. albifrons</i>	SMRP 419_1	Alagoinha - BH
<i>P. feioi</i>	SMRP 371_78	Viçosa - MG
<i>P. spiniger</i>	SMRP 294_1	Guaraqueçaba - PR
<i>P. signifer</i>	SMRP 508_1	Rio Preto - MG

ANEXO II

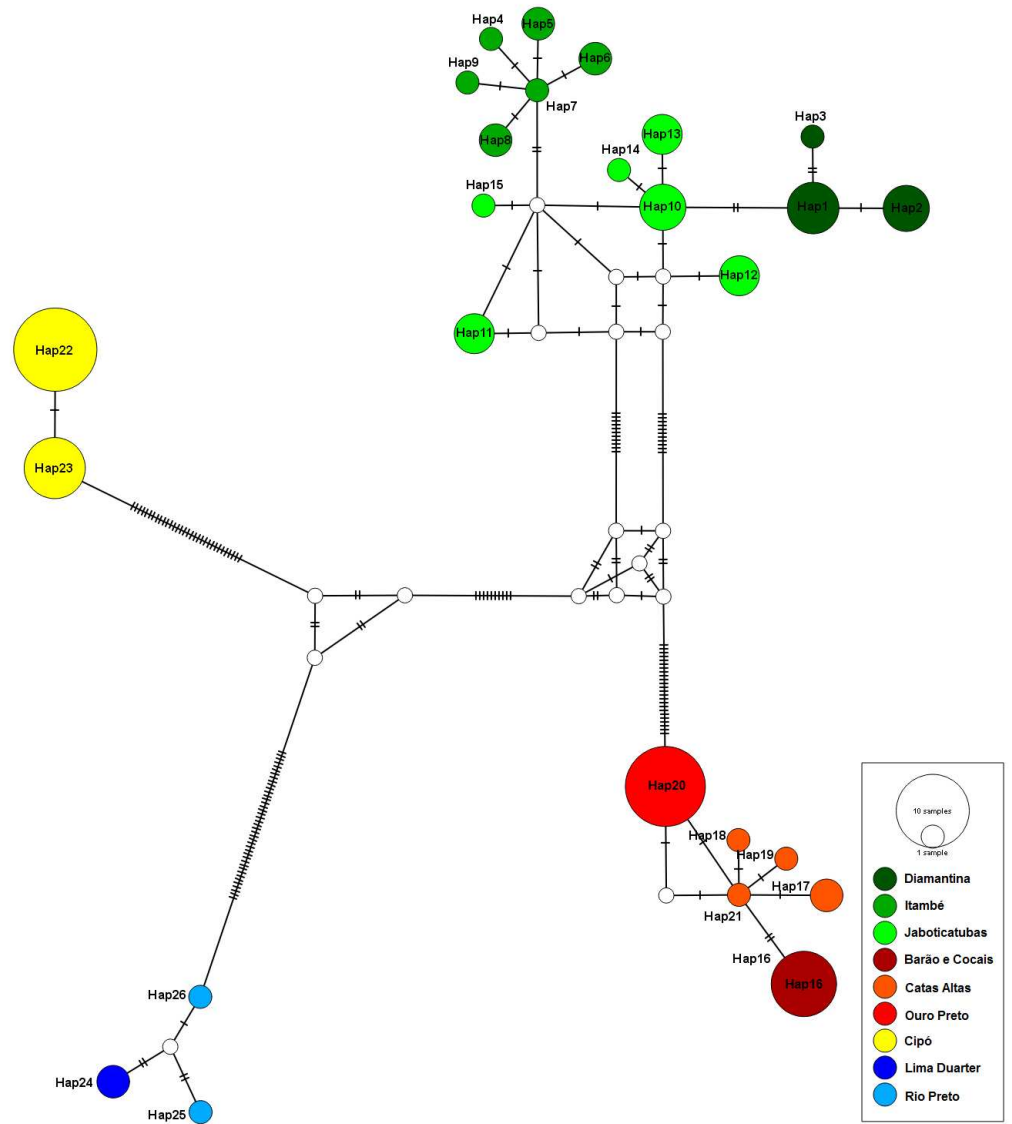
Indivíduos utilizados nas análises e suas respectivas localidades. Identificação dos indivíduos e seus respectivos haplótipos da matriz mitocondrial concatenada e alelos nucleares. Sequências não obtidas representadas por *.

Espécie	Localidade	Nº de identificação	Haplótipo (Hap) mitocondrial					Alelo (Hap) nuclear		
			12S	16S	COI	NAD	Conc	B-crys	POMC	RHOD
<i>P. rupestris</i>	Lima Duarte	PCAG 1767	18	24	14	21	35	8/8	18/18	3/3
<i>P. rupestris</i>	Lima Duarte	PCAG 1768	18	24	14	21	35	8/8	*	3/3
<i>P. rupestris</i>	Rio Preto	PCAG 1770	18	25	15	22	36	8/8	19/19	3/3
<i>P. rupestris</i>	Rio Preto	PCAG 1771	19	26	16	23	37	8/8	20/20	3/10
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	PCR 179	14	20	12	14	29	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	PCR 180	14	20	12	14	29	*	*	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	UFMG-724b	14	20	12	14	29	6/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_1	14	20	12	14	29	*	10/10	*
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_2	14	20	12	14	29	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_3	14	20	12	14	29	6/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_4	14	20	12	14	29	6/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_5	14	20	12	14	29	5/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_6	14	20	12	14	29	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_7	14	20	12	14	29	5/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	SMRP 494_8	14	20	12	14	29	6/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Ouro Preto	UFMG 1414	14	20	12	14	29	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	Catas Altas	UFMG 16893	15	18	12	17	27	*	*	*
<i>P. erythros</i>	Catas Altas	UFMG 16894	14	19	12	18	28	*	*	*
<i>P. erythros</i>	Catas Altas	UFMG 16896	14	17	12	17	26	*	*	*
<i>P. erythros</i>	Catas Altas	MNRJ 55001	14	21	12	19	30	*	*	1/6
<i>P. erythros</i>	Catas Altas	UFMG 1110	14	17	12	17	26	6/6	11/12	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1432	14	16	11	15	22	5/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1433	14	16	11	16	23		10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1434	14	16	11	15	24	5/6	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1435	14	16	11	15	24	5/6	10/10	1/6
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1436	14	16	11	15	24	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1437	14	16	11	16	25	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1438	14	16	11	15	24	*	10/10	1/1
<i>P. erythros</i>	B. de Cocais	UFMG 1457	14	16	11	15	24	6/6	10/10	1/1

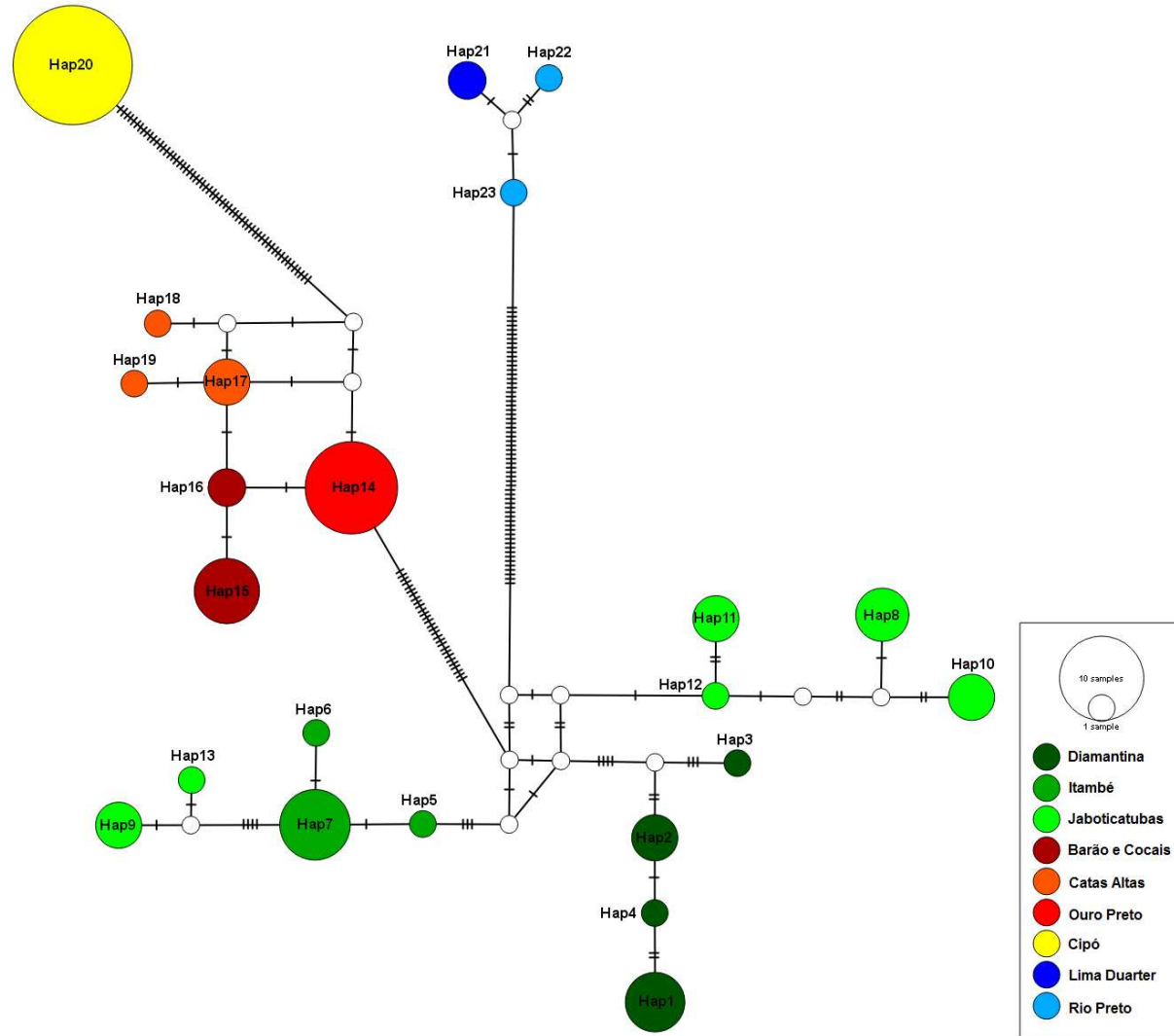
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	UFMG 1794	3	2	2	4	5	*	1/2	*
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	UFMG 1795	1	1	1	1	1	1/1	1/4	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_1	1	1	1	1	1	*	1/1	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_2	2	1	1	1	2	*	1/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_3	3	2	2	2	3	*	1/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_4	3	2	2	2	3	*	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_5	1	1	1	1	1	*	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_6	4	3	3	3	4	*	1/3	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_7	1	1	1	1	1	*	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Diamantina	SMRP 497_8	3	2	2	2	3	*	1/1	1/1
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3261	5	4	4	5	6	1/1	2/5	1/2
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3266	6	5	5	6	7	1/1	2/5	1/1
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3267	7	6	5	7	8	1/1	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3268	8	6	5	7	9	1/1	2/2	1/3
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3967	6	7	4	7	10	1/2	2/2	1/4
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3968	6	5	5	7	11	*	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3969	5	8	4	7	12	*	2/2	1/5
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3970	5	8	4	7	12	*	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	P. do Itambé	UFMG 3971	6	9	4	7	13	*	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1619	9	12	6	10	19	3/3	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1620	13	15	10	13	20	1/3	7/9	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1621	10	11	7	9	15	3/4	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1622	9	10	6	8	21	1/1	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1623	10	11	7	9	15	1/1	7/7	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	UFMG 1624	9	10	6	8	14	*	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 495_1	9	10	6	8	14	*	2/6	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 495_2	10	11	7	9	15	3/3	2/2	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_1	9	12	6	10	16	*	7/7	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_2	11	13	8	11	17	*	6/8	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_3	9	12	6	10	16	*	2/8	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_4	11	13	8	11	17	*	2/8	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_5	12	14	9	12	18	*	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_6	9	10	6	8	14	*	*	1/1
<i>P. deimaticus</i>	Jaboticatubas	SMRP 496_7	11	13	8	11	17	*	2/8	1/1
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	SMRP 430_1	16	22	13	20	31	*	13/13	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	SMRP 430_2	16	23	13	20	32	*	*	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	SMRP 432_1	16	22	13	20	31	*	14/15	7/7

<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1630	16	22	13	20	31	*	13/16	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1631	16	22	13	20	31	*	16/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1632	16	22	13	20	31	*	13/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1633	16	23	13	20	33	*	16/16	4/4
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1634	16	23	13	20	33	*	14/15	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1635	17	23	13	20	34	*	14/14	4/4
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1636	16	22	13	20	31	*	16/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1637	16	22	13	20	31	*	16/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1638	17	23	13	20	34	*	14/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1639	16	22	13	20	31	*	13/13	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1640	17	23	13	20	34	7/7	13/16	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1641	16	22	13	20	31	7/8	16/16	4/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1642	16	22	13	20	31	7/7	16/16	7/7
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1643	16	22	13	20	31	7/7	16/17	4/4
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1558	16	22	13	20	31	*	13/16	7/8
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1559	16	22	13	20	31	*	*	8/9
<i>Physalaemus</i> sp.	M. do Pilar	UFMG 1560	16	23	13	20	33	*	*	4/7

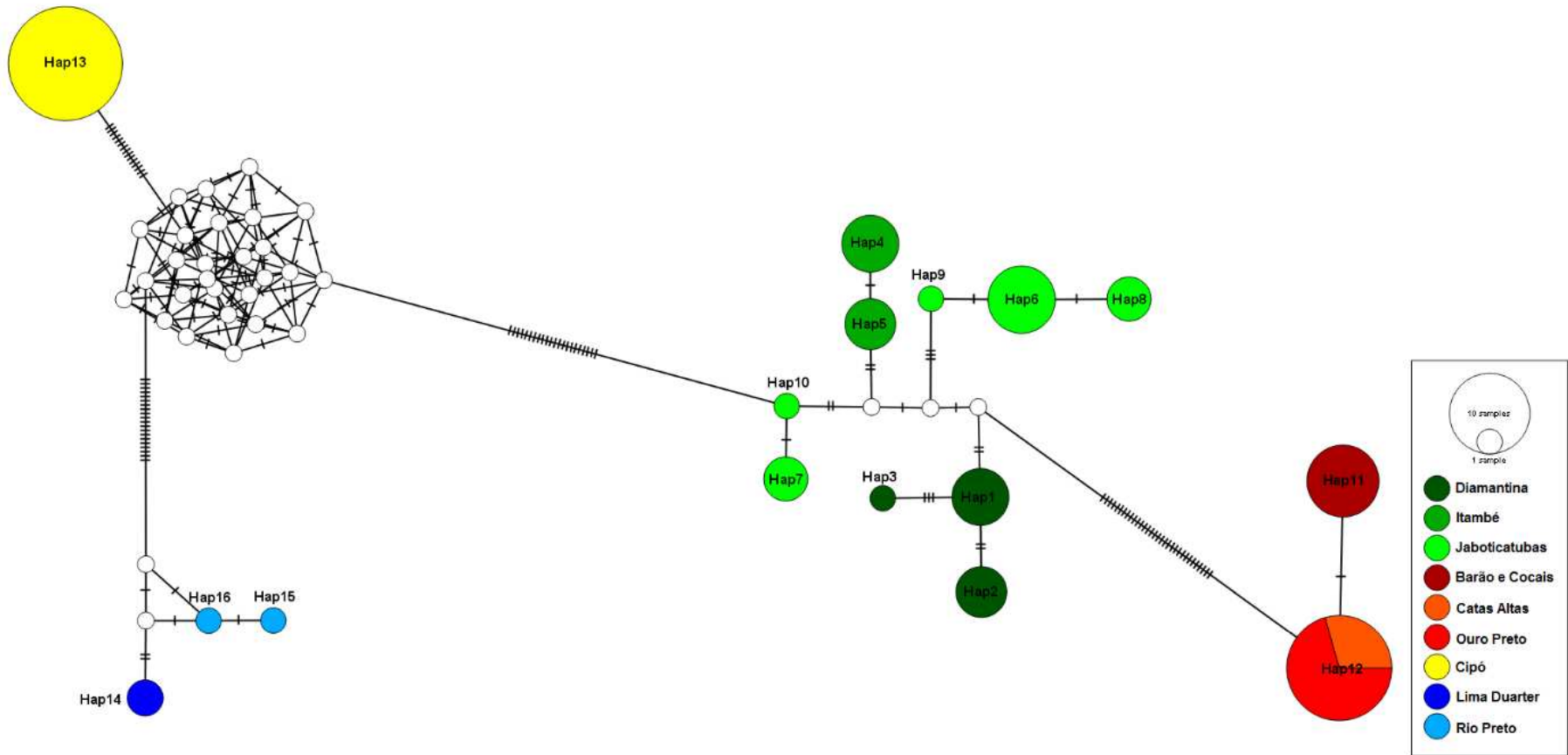
B



C



D



ANEXO IV

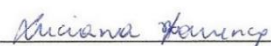
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Aspectos Filogeográficos do grupo *Physalaemus deimaticus* (sensu Nascimento, Cruz e Caramaschi 2005)(Amphibia: Anura)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de outubro de 2017

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **William Pinheiro da Costa**
RG n.º 23143000-0

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Luciana Bolsani Lourenço**
RG n.º 21582155-5

ANEXO V



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Relação Filogenética e Biogeografia das espécies do grupo *Physalaemus delmaticus* (sensu Nascimento, Caramaschi & Cruz 2005) composto por *Physalaemus delmaticus*, *Physalaemus erythros* e *Physalaemus rupestris*", protocolo nº 3994.4 sob a responsabilidade de Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenco / William Pinheiro da Costa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 10 de agosto de 2015.

Vigência do projeto: 10/2015-02/2017

Espécie/Linhagem: Anfíbio / *Physalaemus delmaticus*

No. de animais: 20

Peso/Idade: 08 meses / 02g

Sexo: 15 machos / 05 fêmeas

Espécie/Linhagem: Anfíbio / *Physalaemus erythros*

No. de animais: 20

Peso/Idade: 08 meses / 02g

Sexo: 15 machos / 05 fêmeas

Espécie/Linhagem: Anfíbio / *Physalaemus rupestris*

No. de animais: 20

Peso/Idade: 08 meses / 02g

Sexo: 15 machos / 05 fêmeas

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 10 de agosto de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva