

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KARIN REGINA SEGER

“ANÁLISE DA IDENTIDADE TAXONÔMICA DE *Dendropsophus nanus* E  
*Dendropsophus walfordi* (ANURA, HYLIDAE) COM BASE EM DADOS  
MOLECULARES”

CAMPINAS, 2014



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KARIN REGINA SEGER

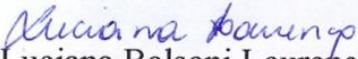
**“ANÁLISE DA IDENTIDADE TAXONÔMICA DE *Dendropsophus nanus* E  
*Dendropsophus walfordi* (ANURA, HYLIDAE) COM BASE EM DADOS  
MOLECULARES”**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

***Karin Regina Seger***

E orientada pela Profa.  
Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de MESTRA em BIOLOGIA ANIMAL na área de Biodiversidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra.  Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

CAMPINAS, 2014

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

Se37a Seger, Karin Regina, 1983-  
Análise da identidade taxonômica de *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus walfordi* ( Anura, Hylidae) com base em dados moleculares / Karin Regina Seger. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Anfíbio – Classificação. 2. Sistemática molecular. 3. Filogenia. I. Lourenço,  
Luciana Bolsoni, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Taxonomic identity analysis of *Dendropsophus nanus* e  
*Dendropsophus walfordi* (Anura, Hylidae) based on molecular data

**Palavras-chave em inglês:**

Amphibians - Classification

Molecular systematics

Phylogeny

**Área de concentração:** Biodiversidade Animal

**Titulação:** Mestra em Biologia Animal

**Banca examinadora:**

Luciana Bolsoni Lourenço [Orientador]

Adriane Barth

Ariovaldo Antonio Giaretta

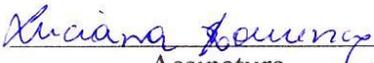
**Data de defesa:** 19-12-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

Campinas, 19 de dezembro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini  
(orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Adriane Barth

  
Assinatura

Prof. Dr. Ariovaldo Antonio Giaretta

  
Assinatura

Prof. Dr. Mauricio Papa de Arruda

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Michela Borges

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## I - RESUMO

O gênero *Dendropsophus* apresenta uma grande diversidade de espécies, compreendendo atualmente mais de 90 espécies de anuros hilídeos, e se caracteriza por apresentar como principal sinapomorfia o número cromossômico  $2n=30$ . Muitas problemáticas taxonômicas ainda cercam esse grupo, como a referente a *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus walfordi*. Tais espécies já foram consideradas sinônimas com base em dados morfológicos, proposta que foi refutada após análise de canto. Recentes inferências filogenéticas têm apontado o possível parafiletismo dessas duas espécies de anuros, mas nenhuma delas teve a amostragem devidamente desenhada para avaliar cuidadosamente a questão taxonômica decorrente dessa observação. Mesmo o estudo filogenético que incluiu o maior número de representantes dessas espécies contou com apenas cerca de 700 pb de um único marcador genético (gene ribossomal mitocondrial 12S). Além disso, não incluiu nenhum exemplar da localidade-tipo de ambas as espécies e, embora a amostra dessa espécie tenha sido a maior utilizada até o momento em análises filogenéticas, ainda não foi suficiente para cobrir toda a grande área de ocorrência desses anuros. Com o intuito de solucionar tais problemas e contribuir para a análise da delimitação dessas espécies, foi investigado o possível parafiletismo entre as espécies *D. nanus* e *D. walfordi*, por meio da comparação de sequências dos genes mitocondriais 12S, 16S e CO1, e com a amostragem de indivíduos de 24 localidades abrangendo a maior parte da distribuição incluindo as localidades-tipo de cada uma das duas espécies. Foi observada alta estruturação genética do grupo de interesse pela análise de variância molecular (AMOVA) e cinco principais clados (A-E) foram identificados em todos os cladogramas inferidos. O parafiletismo de *D. nanus* com relação a *D. walfordi* foi observado em todas as análises filogenéticas. As distâncias genéticas entre os clados A-E foram altas e permitem sugerir que o grupo em questão represente na realidade um complexo com mais de duas espécies diferentes.



## ABSTRACT

The *Dendropsophus* genus presents a great diversity of species, currently including more than 90 species of hylid frogs, and its main synapomorphy is the chromosome number  $2n = 30$ . Many taxonomic problems still surround this group, as those referred to *Dendropsophus nanus* and *Dendropsophus walfordi*. Such species have been considered synonymous based on morphological data, but that proposal was rejected after call analysis. Recent phylogenetic inferences have pointed out the possible paraphyly of these species of frogs, but they were not designed to carefully evaluate the taxonomic question arising from this observation. Even the phylogenetic study that included a large number of representatives of these species did not sampled their type locality and was based on only ~ 700 bp of a single genetic marker (mitochondrial 12S ribosomal gene). In order to solve these problems and contribute to the analysis of these species delimitation, we investigated the possible paraphyly between *D. nanus* and *D. walfordi* by comparing the sequences of the mitochondrial genes 12S, 16S and CO1, and sampling specimens from 24 localities, including the type-locality of each of these species. High genetic structuration was observed inside this group by the analysis of molecular variance (AMOVA) and five major clades (A-E) were recognized in all inferred cladograms. The paraphyly of *D. nanus* with respect to *D. walfordi* was observed in all phylogenetic analyses. The genetic distances among the Clades A-E were high and allowed to suggest that in fact a complex with more than two different species exist in the analyzed group.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
Abstract.....	ix
I. INTRODUÇÃO .....	1
1. Ferramentas para a identificação de uma espécie.....	3
2. Genes mitocondriais úteis na distinção entre espécies animais.....	4
3. O gênero <i>Dendropsophus</i> .....	7
4. O parafiletismo de <i>D. nanus</i> e <i>D. walfordi</i> .....	8
II. OBJETIVO .....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
1. Taxons amostrados .....	12
2. Extração de DNA genômico.....	15
3. Obtenção das sequências nucleotídicas .....	16
4. Análises filogenéticas .....	16
5. Análises de diversidade e variância genética, e redes de haplótipos.....	17
IV. RESULTADOS .....	19
1. Inferências filogenéticas e a identificação do parafiletismo de <i>D. nanus</i> em relação a <i>D. walfordi</i> .....	19
2. Análise de diversidade e variância genética, e redes de haplótipos.....	22
V. DISCUSSÃO.....	25
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
VIII. ANEXO .....	40



*Dedico à minha **família**. Aos que formam o  
nosso tripé: mãe **Zeli** e mano **Daniel** e em  
memória ao meu pai **Dionísio**.*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por todos os desafios a mim colocados e a força concedida para enfrentá-los.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, por fornecer as condições necessárias para essa etapa de minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade Estadual Campinas, pela oportunidade de realização do curso e em especial à professora Silmara Allegretti por sua disposição em auxiliar-nos sempre que possível.

À Professora Luciana Bolsoni Lourenço pela orientação, por me dar suporte e equilíbrio em todos os momentos; pelo exemplo de competência, seriedade e sensatez que será lembrado por mim ao longo de toda minha carreira e pela paciência em me orientar elucidando meus pensamentos mais complexos.

À Profa Dra. Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello, pelo carinho, paciência e serenidade no ensino e nos momentos de café e conversa que me permitiram o equilíbrio em muitos momentos difíceis no decorrer deste mestrado.

A todos os pesquisadores que colaboraram na coleta de espécimes que auxiliaram a enriquecer este trabalho, em especial: Dr. Ariovaldo A. Giaretta, Dra Gilda Vasconcelos Andrade, Dra Albertina Pimentel Lima, Dr. André Pansonato e Denise Cerqueira Rossa-Feres.

A todos os colegas de laboratório pelo convívio e aprendizado em especial Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito, Daniel Pacheco Bruschi, Stenio Vittorazzi, Maria Madalena Rodrigues, Lenita De Freitas Tallarico, Débora Rodrigues, Kaleb Pretto Gatto, Julliana Nascimento, Maurício Papa Arruda, Julio Sérgio, William Pinheiro Costa, Ariane Campos, Caique Malospírito, Rafael Vicente, Renata Oliveira Tenório, Gabriel e todos que tive o prazer do convívio e de momentos de aprendizado.

Aos amigos e colegas de disciplina pelo apoio e convívio, em especial Calorina Lemes e Sarah Lemes.

À Professora Dra. e amiga Adriane Barth, por me introduzir o conhecimento desta área da ciência tão excepcional e intrigante, e por me fazer perceber isso. Por seus conselhos e amizade por tanto tempo.

À minha mãe Zeli Maria Machado de Oliveira que mesmo longe sempre me apoiou em todos os meus objetivos mesmo os que ela desconhecia. Agradeço a ela por minha vida, e exemplo de paciência em resolver os percalços da vida e levantar quando caímos, por mais brusca que seja a queda. Seu apoio sempre me deu força para continuar todo e qualquer caminho.

Ao meu irmão Daniel Fabiano Seger pelos ensinamentos de uma vida inteira que me permitem hoje tomar decisões importantes também em minha carreira.

A meus primos que a cada dia que passa se tornam exemplos de sabedoria e de força, em especial Giana Paula Machado de Oliveira, Rita de Cássia Machado de oliveira, Maria Carolina Machado de Oliveira, Tiago Machado de Oliveira, Felipe Machado de Oliveira Amanda Machado de Oliveira, Roger e Roana Georg e Estevão Nilton Aker.

À minha prima Heidi Daiana Machado de Oliveira por seu apoio e palavras amigas de conforto em todos os momentos, pela sua disposição em me dar o suporte necessário quando parecia que não havia ninguém.

Aos meus amigos que mesmo distantes me apoiam com o carinho a mim dedicado em especial Cristiane Trein da Silva, Jéssica trein, Michele Scur Dalatéia, Rafaela Fetzner Drey, Leiza Soares, Mariane Luz, as irmãs Juliane e Josiane Amorim, Gabriele Marisco e Daniela Koop.

À minha avó Orlandina Machado de Oliveira, que mesmo sem conhecer meu trabalho sempre me apoiou e incentivou.

Ao meu noivo Américo José Carvalho Viana, que em todos os momentos me apoiou desde o vestibular, pela sua paciência e companheirismo e principalmente por seu amor e dedicação incondicional.



## I. INTRODUÇÃO

A delimitação de espécies sempre foi alvo do estudo de sistematas e taxonomistas e cada vez mais esse assunto tem chamado a atenção daqueles que se preocupam com estratégias conservacionistas. Atualmente, estima-se que haja entre 2 e 100 milhões de espécies no Planeta, e que apenas 1,4 milhões delas tenham sido descritas (WORLD RESOURCES INSTITUTE, IUCN, 2014). Embora a correta identificação de novas espécies e uma taxonomia sem equívocos seja fundamental para um sistema confiável de informação biológica, essas nem sempre são tarefas fáceis. Apesar de haver um consenso entre os pesquisadores de que espécie seja a menor unidade evolutiva independente, os conceitos de espécie têm sido muito debatidos (ROSSELLO-MORA & AMANN, 2001, ALEIXO, 2009) e até mesmo novos conceitos têm sido sugeridos na tentativa de unificá-los (HAUSDORF, 2011). Dentre os conceitos de espécie existentes, três têm sido mais utilizados, todos eles não excludentes entre si: o **Conceito de Morfoespécie ou Conceito Tipológico de Espécie**, o **Conceito Biológico de Espécie** e o **Conceito Filogenético de Espécie**.

Segundo o **Conceito Tipológico**, “as espécies são os menores grupos que são consistente e persistentemente distintos e distinguíveis por características comuns a cada um dos grupos” (ver revisão de RICHARDS, 2013). O **Conceito Biológico de Espécie (CBE)** define espécies como grupos de populações naturais realmente ou potencialmente intercruzantes e capazes de produzir descendência fértil, que são reprodutivamente isolados de outros grupos tais como esses (MAYR, 1942, 1963). Já o **Conceito Filogenético de Espécie (CFE)** se baseia na sistemática filogenética ou cladística. Diferentes autores enfatizam variados processos ou abordagens ao definirem espécies sob o ponto de vista filogenético e, baseado nessa observação, de QUEIROZ (1998) reconheceu três classes de conceitos filogenéticos de espécie. A primeira delas equivaleria a um conceito cladístico ou Hennigiano de espécie, cuja definição enfatiza os eventos de cladogênese. De QUEIROZ (1998) cita a seguinte afirmação de RIDLEY (1989) ao definir essa classe de conceito: “Espécie é um grupo de organismos entre dois eventos de especiação, ou entre um evento de especiação e um evento de extinção, ou descendente de um evento de especiação (RIDLEY, 1989)”. A segunda classe de conceito filogenético de espécie reconhecida por de QUEIROZ (1998) seria aquela em que o reconhecimento da espécie como

um grupo monofilético é o cerne da questão. Para exemplificar autores que privilegiam o conceito de monofiletismo na definição de uma espécie, de QUEIROZ (1998) cita, dentre outros, MISHLER (1985), que afirma que espécies são “grupos monofiléticos de organismos reconhecidos como linhagens, com base em caracteres derivados compartilhados e classificados como espécies devido a fatores causais que mantêm as linhagens como o menor grupo monofilético importante reconhecido em uma classificação formal.” A terceira classe de definições relacionadas ao conceito filogenético de espécies seria aquela em que os caracteres de diagnose são privilegiados (de QUEIROZ, 1998). Para exemplificar essa classe, de Queiroz cita, dentre outras, a definição dada por CRACRAFT (1983), o primeiro estudioso a empregar o conceito filogenético de espécie: “Uma espécie é o menor grupo diagnosticável de indivíduos em que há um padrão de ancestralidade e descendência”.

Dentre os conceitos acima citados, existem vantagens e algumas restrições. O conceito tipológico de espécie tem a vantagem de poder ser amplamente aplicado. Porém a definição de espécie a partir desse conceito pode se tornar muito simplista e arbitrária. O **CBE** não pode ser diretamente aplicável, é difícil de ser testado, como no caso de fósseis, e não se aplica a organismos assexuados, por exemplo. Já o **CFE** pode ser aplicado a qualquer tipo de organismo e pode ser testado, porém exige tempo, recursos e cautela nas análises (ver discussão em FREEMAN & HERRON, 2009). É importante ressaltar que este último pode abranger os outros dois conceitos e permite a diferenciação de espécies crípticas ou inferir a presença de um complexo de espécies. Recentemente, as inferências filogenéticas têm sido importantes ferramentas na identificação de espécies candidatas (exemplo em FUNK *et al.*, 2012; RIVERA-CORREA & ORRICO, 2013; ABRAHAM *et al.*, 2013 e MATSUI *et al.*, 2014) e na descrição de várias espécies de anuros (exemplos em HAWKINS *et al.*; 2007, FOUQUET *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2011).

## 1. Ferramentas para a identificação de uma espécie

Para a descrição de uma espécie, os caracteres morfológicos que permitam sua distinção são de grande importância. No entanto, muitas espécies são extremamente similares morfolologicamente, podendo assim acarretar problemas taxonômicos. Nesse contexto, outros tipos de análise têm se juntado às morfológicas na tentativa de investigar a presença de espécies crípticas. Diferentes grupos taxonômicos contam com ferramentas específicas que auxiliam em cada caso. As aves, por exemplo, além de sua morfologia, são diferenciadas pelo canto (VIELLIARD *et al.*, 2010). Invertebrados também possuem características peculiares de grande relevância para a discriminação de espécies. No caso de formigas, por exemplo, são observados e analisados seus tipos de nidificação (SIMAS *et al.*, 2003). Para os anfíbios anuros não é diferente. Muitos dados são utilizados além dos morfológicos, como aqueles relativos a modos reprodutivos (WOGEL & POMBAL, 2007), ao cariótipo (SIQUEIRA *et al.*, 2009) e, principalmente, à vocalização (CONTE *et al.*, 2010). Desde a década de 1990, outra importante ferramenta tem auxiliado amplamente na identificação de espécies e na solução de problemas taxonômicos: as inferências filogenéticas e de dinâmicas populacionais (tais como taxa de fluxo gênico) baseadas em marcadores moleculares.

As hipóteses de relacionamentos filogenéticos têm sido cada vez mais exploradas por taxonomistas na descrição de novas espécies (exemplos em RIVERA-CORREA & ORRICO, 2013; JUNGFER *et al.*, 2010 ou CAMINER & RON, 2014). O emprego de filogenias para esse fim se tornou especialmente importante quando sequências de DNA passaram a ser utilizadas para a inferência de cladogramas, já que essas permitem o levantamento de um número grande de caracteres filogeneticamente informativos, o que dificilmente é obtido com dados de outra natureza. Os genes mitocondriais têm sido amplamente utilizados para a inferência de filogenias (FAIVOVICH *et al.*, 2005; GRANT *et al.*, 2006; ALEXANDER PYRON & WIENS, 2011), sendo os genes 12S, 16S e CO1 os mais comuns para a delimitação de espécies de anfíbios (VENCES *et al.*, 2005a,b; HAWKINS *et al.*, 2007; COLOMA *et al.*, 2012), como mostra o próximo item.

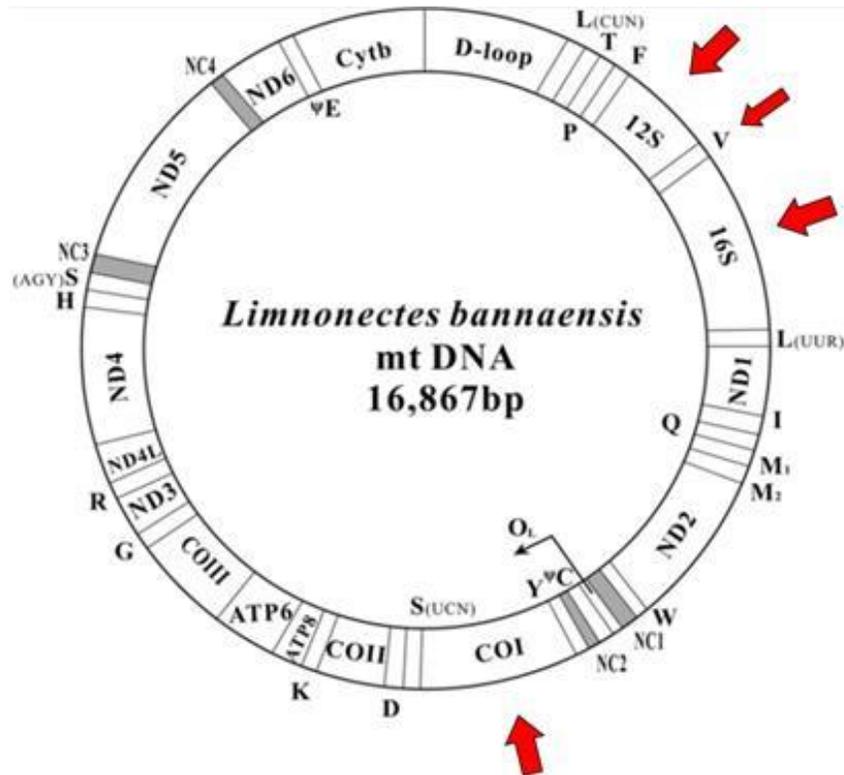
## 2. Genes mitocondriais úteis na distinção entre espécies animais

O DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) tem sido amplamente utilizado atualmente em estudos filogenéticos, pois apresenta uma baixa frequência de recombinações e elevada taxa evolutiva, estimada em 5-10 vezes maior do que a do genoma nuclear (BROWN *et al.*, 1979 e MIYATA *et al.*, 1982). Dentre os fatores que parecem contribuir para a rápida taxa evolutiva do genoma mitocondrial estão a) sua elevada exposição a danos oxidativos, o sistema de replicação falho a que está sujeito, b) ausência ou deficiência de mecanismos de reparo de danos no DNA, c) a menor chance de eliminar mutações pouco deletérias decorrente da baixa frequência de eventos de recombinação e, ainda, d) a alta taxa de renovação das moléculas de DNAm<sub>t</sub> (revisão de GRAY, 1989). Dessa forma, a análise de DNAm<sub>t</sub> possibilita a detecção de sinais filogenéticos mesmo em estudos de táxons menos abrangentes. Além disso, o DNAm<sub>t</sub> apresenta grande número de cópias por célula (MICHAELS *et al.*, 1982; ROBIN & WONG, 1988), o que também facilita a manipulação do material a ser estudado.

A molécula do genoma mitocondrial dos vertebrados (DNAm<sub>t</sub>) é circular e contém 37 genes: 13 genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial, 22 genes transcritores de RNA transportador (RNAt) e 2 de RNAs ribossomais (RNAr), os genes 12S e 16S (ZHANG *et al.*, 2009) (FIGURA 1). O DNAm<sub>t</sub> inclui ainda uma região controle, que é a maior região não-codificadora desse genoma, também denominada D-loop, localizada entre os genes Cytb e RNAt<sup>Leu (CUN)</sup> (ZHANG *et al.*, 2009). O nome dessa região se deve ao fato de ser a região reguladora da replicação e transcrição do DNA e o nome D-loop se refere a uma “alça” formada no início da replicação (CLEYTON, 1982).

Diferentes taxas evolutivas podem ser observadas ao longo dos genes ribossomais, sendo os sítios mais conservados aqueles correspondentes a regiões dos RNAr que se associam com proteínas, RNAm e RNAt (HILLIS & DIXON, 1991). O segmento mitocondrial que transcreve RNAr 16S apresenta cerca de 1500 pares de nucleotídeos e revela grande quantidade de informações importantes para estudos filogenéticos de diferentes grupos taxonômicos, auxiliando tanto no estudo de níveis hierárquicos mais abrangentes quanto de espécies

(exemplos em BLACK IV & PIESMAN, 1994; VENCES *et al.*, 2005; KUO *et al.*, 2003; SPICER & DUNIPACE, 2004).



**Figura 1.** DNA mitocondrial do anuro *Limnonectes bannaensis* (Modificado de ZHANG *et al.*, 2009). Os genes utilizados neste trabalho (12S, 16S, RNAt Val e COI) estão indicados pelas setas.

Dentre os genes codificadores de proteínas, o gene COI, que codifica a subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase, tem se destacado por auxiliar na identificação taxonômica de organismos de vários grupos. Justamente por essa capacidade, o gene COI foi o primeiro a ser proposto para a geração de sequências de DNA capazes de servir como identificadoras de táxons, denominadas “DNA barcodes” (HEBERT *et al.*, 2003). A enzima citocromo c oxidase é uma proteína transmembrana de tamanho considerável que atua no processo da fosforilação oxidativa e, por conta dessa característica generalista para o metabolismo de uma célula, é bastante conservada entre as espécies. Por outro lado, o gene COI tem apresentado variabilidade

interespecífica suficiente para diferenciar espécies pertencentes a diversos grupos animais porque sua variação intraespecífica tem sido bem menor do que a encontrada entre diferentes espécies (HEBERT *et al.*, 2003, 2004a, b; revisão de WAUGH, 2007). Segundo HEBERT *et al.* (2004a), a variação interespecífica média do gene CO1 apresenta-se cerca de 10 vezes maior do que a variação intraespecífica média em diferentes grupos animais e, conseqüentemente, a consideração dessa proporção na análise da diversidade de animais pode acelerar a descoberta de novas espécies.

Recentemente, o programa “*Barcode of Life Initiative*” surgiu com o objetivo de gerar códigos de barra de DNA (DNA *Barcode*), possibilitando estudos moleculares e a catalogação de espécies de diferentes grupos ([www.barcodeoflife.org](http://www.barcodeoflife.org); revisão de SHNEYER, 2007). As sequências de DNA geradas nesse programa são armazenadas em bancos de dados sujeitos a regras mais rigorosas do que aquelas praticadas no Genbank, dentre os quais podem ser destacados o banco de dados **BOLD** (*The Barcode of Life Data Systems*; [www.barcoding.org](http://www.barcoding.org)) e o **CBOL** (*Consortium for the Barcode of Life*; [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)). Tais bancos de dados têm permitido que sequências-teste, provenientes de espécimes com identificação taxonômica desconhecida, sejam comparadas com sequências previamente catalogadas e, assim, identificações taxonômicas sejam inferidas.

Apesar do gene CO1 ser considerado o gene padrão para DNA *barcode* em vários grupos animais, para o estudo de anfíbios, talvez esse não seja o único ou o melhor marcador a ser considerado. VENCES *et al.* (2005a, b) argumentam que o gene ribossomal mitocondrial 16S preenche todos os requisitos necessários a um marcador para DNA *barcode* em anfíbios e defende seu uso como marcador complementar ao gene CO1. Segundo VENCES *et al.* (2005a,b), um dos fatores limitantes para o uso do CO1 como DNA *barcoding* para anfíbios é a alta variabilidade dos sítios de anelamento dos *primers*, o que dificulta a aplicação de *primers* universais para todas as espécies. Outro importante fator levantado por VENCES *et al.* (2005b) como limitante do uso de CO1 para DNA *barcode* de anfíbios se refere à alta taxa de variação intraespecífica apresentada em várias espécies. Com a análise de sequências de CO1 de anuros da família Mantellidae e de salamandras do gênero *Aneides*, VENCES *et al.* (2005b) notaram a sobreposição de níveis de divergência intraespecífica e interespecífica ao invés de taxas de

divergência interespecífica 10 vezes maiores do que as de divergência intraespecífica, como era esperado com base nos estudos de HEBERT *et al.* (2004a). Baseados nesse achado, VENCES *et al.* (2005b) discutiram sobre a dificuldade na definição de valores de divergência que permitam o uso desse marcador para a distinção entre espécies. Por outro lado, XIA *et al.* (2012) indicam o CO1 como o gene mitocondrial mais adequado para DNA *barcode* de salamandras asiáticas. Mediante tais resultados contraditórios obtidos a partir do estudo de diferentes grupos de anfíbios, fica clara a necessidade de novos estudos do grupo taxonômico Amphibia que incluam os dois genes.

### 3. O gênero *Dendropsophus*

Os anfíbios estão distribuídos por todo o globo, e estão divididos em três ordens: Caudata, Gymnophiona e Anura (POUGH, 1999; FROST, 2014). Com 1026 espécies, o Brasil é o país de maior diversidade de anfíbios (SILVANO & SEGALLA, 2014). Só nos últimos nove anos, mais de 200 novas espécies foram descritas no Brasil (SILVANO & SEGALLA, 2014). Atualmente, a destruição de áreas por desmatamento tem reduzido a fauna, atingindo também esse grupo (STUART *et al.*, 2004). Algumas das espécies recém-descritas já estão ameaçadas e pouco se conhece sobre a sua história natural e ecologia. Assim, estudos que caracterizem esses anfíbios são importantes subsídios para ações que visem à conservação dessas espécies (RÖDDER *et al.*, 2009).

A família Hylidae tem distribuição nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia e possui aproximadamente 944 espécies, agrupadas em três subfamílias: Hyalinae, Pelodyadinae, Phyllomedusinae (FROST, 2014). Atualmente, a subfamília Hyalinae, é constituída por 43 gêneros e em torno de 678 espécies (FAIVOVICH *et al.*, 2005; FROST, 2014). *Dendropsophus* é o segundo maior gênero da subfamília Hyalinae, com mais de 90 espécies distribuídas desde o Norte da Argentina e Paraguai até o Sul do México (FROST, 2014). Foram registradas pelo menos 60 espécies deste gênero no Brasil e espécies novas têm sido descritas todos os anos (HADDAD *et al.*, 2008; FROST, 2014). Embora os dados citogenéticos para esse grupo ainda sejam escassos e, vários deles, restritos ao número e

morfologia dos cromossomos, o número cromossômico diploide igual a 30 ( $2n=30$ ) é considerado a principal sinapomorfia desse gênero (FAIVOVICH *et al.*, 2005; SUÁREZ *et al.*, 2013), em que é possível também verificar uma intrigante variação do número de cromossomos telocêntricos entre diferentes espécies (para revisão, ver CATROLI & KASAHARA, 2009). Entretanto, até hoje não foi possível inferir os passos evolutivos que levaram à divergência cariotípica nesse gênero, pois o reconhecimento de homeologias cromossômicas interespecíficas é ainda muito controverso (ver discussão em MEDEIROS *et al.*, 2013).

Dentre os nove grupos de espécies reconhecidos em *Dendropsophus*, o grupo *D. microcephalus* é o que reúne maior número de espécies, incluindo atualmente mais de 30 espécies (FAIVOVICH *et al.*, 2005; FROST, 2014). WIENS *et al.* (2010) relataram o parafiletismo desse grupo em relação a *Dendropsophus riveroi*, que havia sido atribuído ao grupo *D. minimus* por FAIVOVICH *et al.* (2005). FOUQUET *et al.* (2011) recuperaram dentro do grupo *D. microcephalus* não só *D. riveroi* mas também *D. gaucheri*, uma espécie previamente alocada no grupo *D. parviceps*. Apesar da relação interespecífica no grupo *D. microcephalus* permanecer por ser elucidada, algumas das suas espécies foram tentativamente atribuídas a dois clados por FAIVOVICH *et al.* (2005): o clado *Dendropsophus decipiens* (incluindo *D. berthalutzae*, *D. decipiens*, *D. haddadi* e *D. oliveirai*) e o clado *Dendropsophus rubicundulus* (incluindo *D. anataliasiasi*, *D. araguaia*, *D. cachimbo*, *D. cerradensis*, *D. elianae*, *D. jimi*, *D. rhea*, *D. rubicundulus* e *D. tritaeniatus*). Estes clados correspondem a grupos de espécies propostos anteriormente por outros pesquisadores (NAPOLI & CARAMASCHI, 1998, 1999; CARVALHO-E-SILVA *et al.*, 2003), mas FAIVOVICH *et al.* (2005) destacaram a ausência de um rigoroso teste para o monofiletismo de cada um desses grupos.

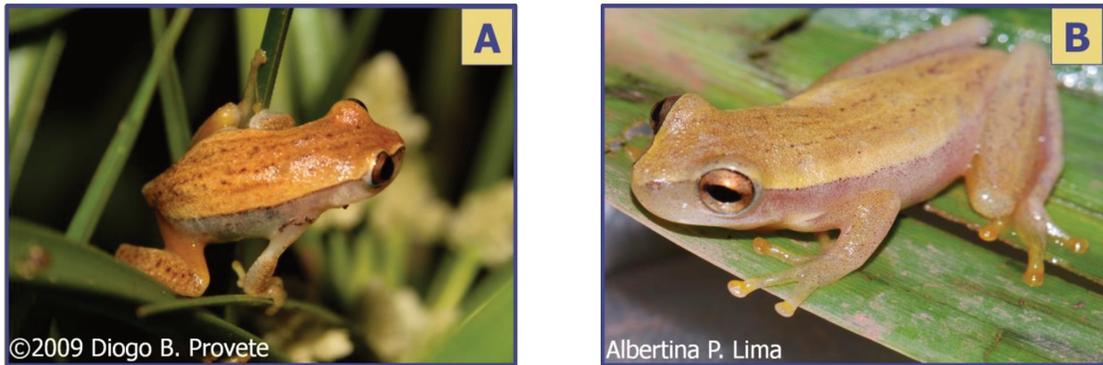
#### **4. O parafiletismo de *D. nanus* e *D. walfordi***

Além da falta de informações filogenéticas sobre as espécies pertencentes ao grupo *D. microcephalus*, várias questões taxonômicas persistiram sobre algumas delas. Os tamanhos muito pequenos e morfologias externas muito semelhantes desses anuros fazem da sua

identificação taxonômica um desafio, resultando em uma série de problemas, incluindo a identificação equivocada de espécimes. Destacamos aqui algumas questões relativas às espécies *D. nanus*, *Dendropsophus sanborni*, *Dendropsophus walfordi* e *Dendropsophus jimi* (LANGONE E BASSO, 1987; MEDEIROS *et al.*, 2003; FOUQUET *et al.*, 2011).

Em relação a *D. nanus* e *D. sanborni*, as análises citogenéticas foram muito relevantes na identificação de possíveis equívocos de identificação taxonômica. Os cariótipos encontrados para indivíduos de *D. nanus* e *D. walfordi* por MEDEIROS *et al.* (2003) foram idênticos aos descritos, anteriormente, respectivamente para *D. sanborni* (por SKUK & LANGONE, 1992) e *D. nanus* (por BOGART, 1973). MEDEIROS *et al.* (2003) argumentaram que a semelhança morfológica entre estas duas espécies poderiam ter resultado em equívocos de identificação, hipótese que foi confirmada por GRUBER *et al.* (2005), que detectaram os mesmos cariótipos descritos por MEDEIROS *et al.* (2003) para *D. nanus* e *D. sanborni*.

Entre *D. walfordi* e *D. nanus* (Figura 2) outra problemática taxonômica foi levantada. *Dendropsophus walfordi* foi descrita em 1962, tem como localidade-tipo Forte Príncipe da Beira, Território de Rondônia, Brasil (BOKERMANN, 1962) e ocorre na região central e mais ao norte da Bacia Amazônica no Brasil (FROST, 2014). Já *D. nanus* ocorre do nordeste ao sul do Brasil, no Paraguai, no norte da Argentina e leste da Bolívia, no Uruguai e na Bacia de La Plata, na Argentina (FROST, 2014) e sua localidade-tipo é Colonia Resistencia, uma área no sul do Chaco da Argentina (BOULENGER, 1889). Baseados em dados morfológicos, LUTZ (1973) e DUELLMAN (1977) consideraram *D. walfordi* sinônimo de *D. nanus*, mas *D. walfordi* foi novamente elevada à categoria de espécie válida por LANGONE & BASSO (1987), com base em análises de vocalização. FOUQUET *et al.* (2011), em uma análise filogenética que incluiu dois espécimes de *D. nanus* da Guiana Francesa, um da Argentina e um exemplar de *D. walfordi* de Rondônia, levantaram novamente a questão taxonômica referente a esses táxons, pois esses se mostraram parafiléticos. No entanto, a escassez da amostra utilizada nesse estudo impediu que os autores chegassem a qualquer conclusão em relação a essa questão.



**Figura 2.** Exemplar de *Dendropsophus nanus* (A) e de *Dendropsophus walfordi* (B)

Recentemente, em um estudo conduzido por MEDEIROS *et al.* (2013), exemplares de *D. nanus* de sete localidades do Brasil e de uma localidade da Argentina foram utilizados em uma análise filogenética que incluiu também quatro espécimes de *D. walfordi* e representantes de outras nove espécies do grupo de *D. microcephalus*. O parafiletismo de *D. walfordi* em relação a *D. nanus* foi novamente inferido nessa análise, que também mostrou que os cariótipos dessas espécies são idênticos. No entanto, nesse estudo apenas cerca de 700 pb de um único marcador genético (gene ribossomal mitocondrial 12S) foram utilizados nas inferências filogenéticas. Além disso, nenhum exemplar da localidade-tipo de *D. nanus* foi incluído e, embora a amostra dessa espécie tenha sido a maior utilizada até o momento para a análise da questão taxonômica citada, ainda não foi suficiente para cobrir toda a área de distribuição geográfica inferida para a espécie. Vale ainda destacar que os exemplares de *D. walfordi* analisados por MEDEIROS *et al.* (2013) foram provenientes de Guajará-Mirim-RO, mas não exatamente de Forte-Príncipe da Beira, a localidade-tipo dessa espécie. Dessa maneira, fica evidente a importância de um estudo mais detalhado que utilize outros genes aumentando o número de caracteres a serem investigados; um maior número de localidades a fim de abranger maior área da distribuição das espécies, e que indispensavelmente inclua amostras das localidades-tipo de *D. nanus* e *D. walfordi*.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo Geral**

Investigar a hipótese de parafiletismo entre as espécies *D. nanus* e *D. walfordi* e, conseqüentemente, o enquadramento desses táxons no conceito filogenético de espécie.

### **Objetivos Específicos**

1. Ampliar a amostragem das duas espécies a serem investigadas neste trabalho, especialmente a de *D. nanus*, cuja distribuição geográfica é bastante ampla, obtendo inclusive amostras das localidades-tipo de ambas as espécies.

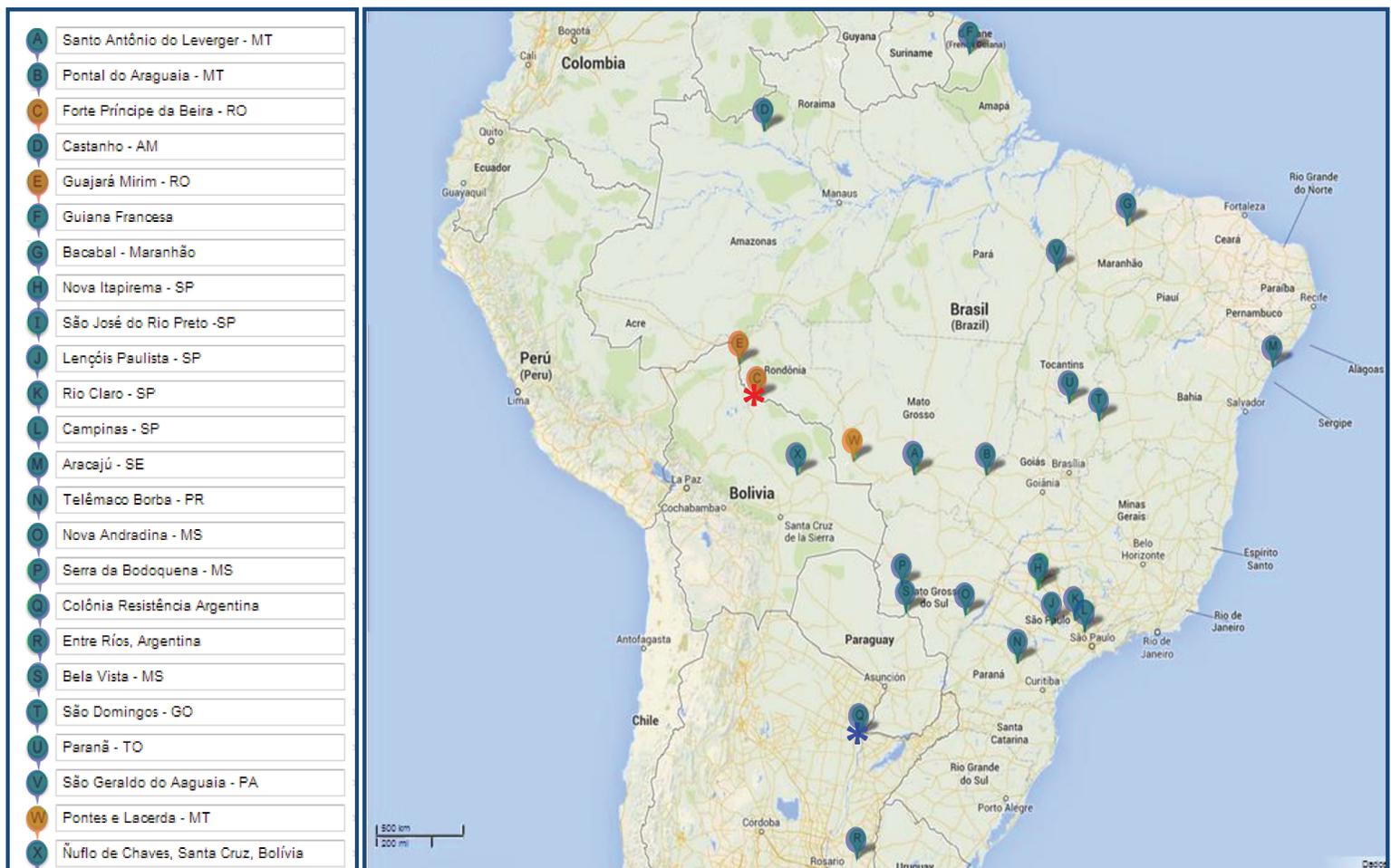
2. Gerar inferências filogenéticas para *D. nanus* e *D. walfordi* com base em seqüências do fragmento mitocondrial H1 e do gene mitocondrial CO1 analisadas separadamente ou em conjunto.

3. Comparar todas as topologias geradas e avaliar a validade dos táxons *D. nanus* e *D. walfordi*.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Táxons amostrados

Nas análises filogenéticas foram utilizados 58 indivíduos sendo 53 de *D. nanus*, quatro de *D. walfordi* e um indivíduo identificado como *Dendropsophus sp.* de 24 localidades, inclusive da localidade-tipo de cada uma das espécies, conforme descrito na Tabela 1 e Figura 3. Como grupo-externo, foram utilizadas as espécies *D. elianeae*, *D. rubicundulus*, *D. meridianus* e *D. sanborni*, também pertencentes ao grupo *D. microcephalus*, e *D. labialis*, pertencente ao grupo de *D. labialis*, que foi utilizada para enraizar as topologias obtidas.



**Figura 3.** Procedência dos espécimes analisados identificados a priori como de *D. nanus* (em vermelho), *Dendropsophus sp.* (em laranja) e *D. walfordi* (em azul). Asterisco azul: localidade-tipo de *D. nanus*. Asterisco vermelho: localidade-tipo de *D. walfordi*.

**Tabela 1.** Espécimes utilizados no presente estudo, respectivos locais de coleta e identificação de suas amostras de tecido em coleção e/ou de suas sequências nucleotídicas no GenBank. **SMRP:** coleção de tecidos “Shirlei Maria Recco-Pimentel”, depositada no Laboratório de Estudos Cromossômicos do IB-UNICAMP; **ZUEC:** Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas “Adão José Cardoso”; **ZUFG:** Museu de Zoologia da Universidade Federal de Goiás; **AAG-UFU:** Coleção de Anuros da Universidade Federal de Uberlândia; **DZSJRP:** Coleção zoológica do Departamento de Zoologia da UNESP - São José do Rio Preto; **MACN:** Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”; **MLP DB:** Coleção de tecidos Diego Baldo depositada no Museo de La Plata – ARG; **MNK:** Museo de Historia Natural “Noel Kempff Mercado”; **INPA-H:** Coleção Herpetológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; **MRT:** Coleção de tecidos Miguel Trefaut Rodrigues depositada no MZUSP; **MZUSP:** Museu de Zoologia da Universidade Federal de São Paulo **CFBH:** Coleção Célio F.B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro; **MJH:** Número de campo de Martin J. Henzl; **DFCH-USFQ:** DF Cisneros-Heredia’s collection, housed at the Universidad San Francisco de Quito; **JPC:** número de campo de Janalee P. Caldwell; **AMNH:** Museu Americano de História Natural.

<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Registro do voucher em museu</b>	<b>Identificação da amostra de tecido ou da sequência</b>
<i>D. nanus</i>	Nova Itapirema – SP	ZUEC 11647	<b>SMRP 47.20</b>
	Nova Itapirema – SP	ZUEC 11648	<b>SMRP 47.21</b>
	Nova Itapirema – SP	ZUEC 11649	<b>SMRP 47.22</b>
	Serra da Bodoquena – MS	ZUEC 13186	<b>SMRP 47.81</b>
	Serra da Bodoquena – MS	ZUEC11899	<b>SMRP 47.93</b>
	Serra da Bodoquena – MS	ZUEC 11904	<b>SMRP 47.98</b>
	Serra da Bodoquena – MS	ZUEC 12392	<b>SMRP 47.171</b>
	Bacabal – MA	ZUEC 11879	<b>SMRP 47.129</b>
	Bacabal – MA	ZUEC 11886	<b>SMRP 47.136</b>
	Bacabal – MA	ZUEC 11887	<b>SMRP 47.137</b>
	Castanho – AM	ZUEC 12215	<b>SMRP 47.150</b>
	Castanho – AM	ZUEC 12217	<b>SMRP 47.152</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12382	<b>SMRP 47.161</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12383	<b>SMRP 47.162</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12386	<b>SMRP 47.165</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12387	<b>SMRP 47.166</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12388	<b>SMRP 47.167</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12389	<b>SMRP 47.168</b>
	Telêmaco Borba – PR	ZUEC 12390	<b>SMRP 47.169</b>
	São José do Rio Preto – SP	ZUEC 11417	<b>SMRP 47.10</b>
	São José do Rio Preto – SP	ZUEC 11418	<b>SMRP 47.11</b>
	Aracaju – SE	ZUEC 18018	<b>SMRP 47.189</b>
	Campinas – SP	ZUEC 17870	<b>SMRP 47.179</b>
	Campinas – SP	ZUEC 17871	<b>SMRP 47.180</b>

	Campinas – SP	ZUEC 17872	<b>SMRP 47.181</b>
	Rio Claro – SP	ZUEC 18685	<b>SMRP 47.233</b>
	Rio Claro – SP	ZUEC 18686	<b>SMRP 47.234</b>
	Rio Claro – SP	ZUEC 18687	<b>SMRP 47.235</b>
	Lençóis Paulistas – SP	ZUEC 21203	<b>SMRP 47.283</b>
	Santo Antônio de Leverger – MT	ZUEC 21211	<b>SMRP 47.304</b>
	Santo Antônio de Leverger – MT	ZUEC 21212	<b>SMRP 47.305</b>
	Santo Antônio de Leverger – MT	ZUEC 21213	<b>SMRP 47.306</b>
	Santo Antônio de Leverger – MT	ZUEC 21214	<b>SMRP 47.307</b>
	Nova Andradina – MS	ZUEC 21217	<b>SMRP 47.310</b>
	Nova Andradina – MS	ZUEC 21218	<b>SMRP 47.311</b>
	Nova Andradina – MS	ZUEC 21219	<b>SMRP 47.312</b>
	Nova Andradina – MS	ZUEC 21220	<b>SMRP 47.313</b>
	São Domingos – GO	ZUFG 7447	<b>SMRP 47.314</b>
	São Domingos – GO	ZUFG 7448	<b>SMRP 47.315</b>
	Paraná – TO (Ponto1)	ZUEC 21221	<b>SMRP 47.317</b>
	Paraná – TO (Ponto1)	ZUEC 21223	<b>SMRP 47.319</b>
	Paraná – TO (Ponto2)	ZUEC 21226	<b>SMRP 47.327</b>
	Paraná – TO (Ponto2)	ZUEC 21228	<b>SMRP 47.329</b>
	São Geraldo do Araguaia – PA	ZUEC 21234	<b>SMRP 47.322</b>
	São Geraldo do Araguaia – PA	ZUEC 21235	<b>SMRP 47.323</b>
	São Geraldo do Araguaia – PA	ZUEC 21236	<b>SMRP 47.324</b>
	<sup>1</sup> Colônia Resistência – Chaco-ARG	MLP DB4514	<b>MLP DB4514</b>
	Entre Rios - ARG	MACN 37785	AY549346
	1-Bolívia	MNK A9474	JF790086
	2-Bolívia	MNK A9824	JX187446
	Guiana Francesa	-	JF9733041
	Bela Vista – MS	AAG-UFU 0159	<b>SMRP 493.2</b>
	Pontal do Araguaia - MT	AAG-UFU 1085	<b>SMRP 493.3</b>
<b><i>D. walfordi</i></b>	Guajará Mirim - RO	ZUEC 12192	<b>SMRP 177.3</b>
	Guajará Mirim - RO	ZUEC 12193	<b>SMRP 177.4</b>
	Guajará Mirim - RO	ZUEC 12194	<b>SMRP 177.5</b>
	<sup>2</sup> Forte príncipe da Beira- RO	INPA-H 31327	<b>SMRP 177.97</b>
<b><i>Dendropsophus sp.</i></b>	Pontes Lacerda - MT	ZUEC 21240	<b>SMRP 177.93</b>
<b><i>D. rubicundulus</i></b>	Lagoa Santa-MG	AAG-UFU562	AAG-UFU562
	Três Marias - MG	ZUEC 20226	SMRP 451.1
<b><i>D. aff. rubicundulus</i></b>	Paraná - TO	ZUEC 20227	SMRP 451.2
<b><i>D. jimi</i></b>	Uberlândia - MG	ZUEC 12406	122.24
	Uberlândia - MG	ZUEC 12407	122.25
<b><i>D. berthaluzae</i></b>	Rio de Janeiro - RJ	CFBH 5418	AY843607
<b><i>D. elianeae</i></b>	Vitória Brasil - SP	DZSJRP 7968	SMRP 128.10
	Nova Andradina - MS	ZUEC 20236	SMRP 128.22
	Rio Claro - SP	ZUEC 18645	SMRP 128.20
	Nova Itapirema - SP	DZSJRP 7964	SMRP 128.6

	Uberlândia - MG	ZUEC 12455	SMRP 120.10
	Serra da Bodoquena - MS	ZUEC 12468	SMRP 128.17
<i>D. elegans</i>	Viçosa - MG	ZUEC 16973	SMRP 348.8
<i>D. weneri</i>	São Vicente - SP	ZUEC 16316	SMRP 329.1
<i>D. sanborni</i>	Entre Rios - ARG	MACN 38638	AY843663
<i>D. bipunctatus</i>	Jussari - BA	MRT5946	AY843608
<i>D. rhodopeplus</i>	Jenaro Herrera -PER	MHZ 462	AY843658
<i>D. anceps</i>	Linhares - ES	CFBH 5797	AY843597
<i>D. bifurcus</i>	-	-	AY362975
<i>D. salli</i>	-	-	AY362976
<i>D. sarayacuensis</i>	Huanuco - PER	MJH 7143	AY843664
<i>D. triangulum</i>	Napo - ECU	WED 54094	AY326053
<i>D. miyatai</i>	Sucumbios - ECU	JPC 10772	AY843647
<i>D. minutus</i>	Misiones - ARG	MACN 33799	AY549345
<i>D. frosti</i>	-	NCN:ADN46749	JQ088283
<i>D. brevifrons</i>	Huanuco - PER	MJH 7101	AY843611
<i>D. parviceps</i>	Estrada Rio Braco/Porto Velho - AC	AMNH A-139315	AY843652
<i>D. giesleri</i>	Ubatuba - SP	CFBH S/N	AY843629
<i>D. meridensis</i>	La Carbonera - VEN	-	JF422585
<i>D. luddeckei</i>	Tutaza- COL	Guina15	JF422597
<i>D. labialis</i>	Santa Fé - COL	Guadalupe08	JF422603
<i>D. carnifex</i>	Pichincha - ECU	DFCH-USFQ 899	AY843616
<i>D. seniculus</i>	Angra dos Reis - RJ	CFBH 5761	AY843666
<i>D. marmoratus</i>	Huanuco - PER	MJH 7116	AY843640
<i>X. truncata</i>	Restinga de Marica - RJ	CFBH 7600	AY843775

<sup>1</sup>Localidade-tipo de *D. nanus*. <sup>2</sup>Localidade-tipo de *D. walfordi*. Em negrito sequências geradas neste trabalho.

## 2. Extração do DNA genômico

Para a obtenção de DNA genômico, fragmentos de fígado, de músculo ou amostras suspensão de células do intestino foram imersos em solução de lise (TNES: 50 mM de Tris pH 7,5, 400 mM de NaCl, 20 mM de EDTA, 0,5% de SDS) contendo proteinase K (100 µg/mL) e incubados por 4 ou 5 horas a 55° C. As amostras foram centrifugadas depois do acréscimo de NaCl 5 M (1/3 do volume de amostra). O sobrenadante foi recolhido e o DNA foi precipitado com álcool isopropílico, lavado com etanol (70%), ressuspenso em TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 8,0) e armazenado a -20 ° C.

### 3. Obtenção das sequências nucleotídicas

Reações de PCR para amplificação das sequências de interesse foram realizadas em volume final de 25  $\mu$ L, contendo tampão de reação (10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, Invitrogen), 1,5 mM  $MgCl_2$  (Invitrogen), 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada um dos *primers*, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 400 a 1000 ng de DNA. Para a amplificação dos genes mitocondriais 12S, RNAt-Val, 16S e CO1 foram utilizados os pares de *primers* MVZ59 (GRAYBEAL, 1997) e Titus I (GOEBEL, 1999), 12SL13 e 16Sbr (PALUMBI *et al.*, 1991), e AnF1 e AnR1 (gentilmente cedidos pela Dra. Mariana Lyra da UNESP de Rio Claro), respectivamente.

Os produtos resultantes das amplificações por PCR foram purificados com o sistema *DNA Purification kit* (Promega) ou com a Enzima ExoSap-IT (Affymetrix), e foram sequenciados nos dois sentidos, usando os *primers* citados no parágrafo anterior. Para o sequenciamento do gene mitocondrial 12S foi também utilizado o *primer* MVZ 50 (GRAYBEAL, 1997) e para o sequenciamento do gene 16S, foram usados também os *primers* Titus I, 16L2a, 16SH10 e 16Sar (PALUMBI *et al.* 1991; HEDGES, 1994). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *kit BigDye Terminator* (Applied Biosystems), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. As sequências nucleotídicas foram geradas pelo Serviço de Sequenciamento de DNA - SSDNA IQUSP ou pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da UNICAMP, e editadas no programa BIOEDIT v.7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

### 4. Análises filogenéticas

Inicialmente as sequências obtidas para os diferentes táxons em análise foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE (EDGAR *et al.*, 2004), implementado no Programa MEGA v.5.2. Uma matriz concatenada foi montada com as sequências de DNA obtidas de todos os fragmentos mitocondriais (12S, RNAt-Val, 16S e CO1), composta por 73 sequências e 2782 caracteres.

As relações filogenéticas foram inferidas pelo critério de Máxima Parcimônia, utilizando o programa TNT v. 1.1 (GOLOBOFF *et al.*, 2003), e por análise Bayesiana, com o auxílio do programa MR.BAYES (HUELSENBECK & RONQUIST, 2002). Nas análises de Máxima Parcimônia, os gaps foram considerados como quinto estado de caráter e as árvores mais parcimoniosas (MPT) foram obtidas pelo método de busca heurística, com o comando *xmult*, que combina buscas setoriais, *ratchet*, *tree drifting* e *tree fusing*, retendo 100 árvores por réplica, e realiza permuta dos ramos por bissecção e reconexão de árvore (*tree bisection and reconnection*-TBR). Os nós presentes nos cladogramas gerados foram avaliados pelo teste de reamostragem *Bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), baseado em 1000 pseudorréplicas.

Para a análise Bayesiana, o modelo evolutivo utilizado foi o GTR + I + G, conforme estimado pelo programa MR.MODELTEST v.2.3 (NYLANDER, 2004). Para todos os genes o modelo evolutivo que melhor se ajustou para os dados obtidos foi o mesmo. Duas análises simultâneas foram executadas, com quatro cadeias em cada uma delas (três aquecidas e uma fria). Foram executadas 2.000.000 de gerações em cada uma das corridas sendo 1 árvore amostrada a cada 100 gerações. Uma topologia de consenso com a probabilidade posterior para cada nó foi produzida depois do descarte das primeiras árvores geradas (25% iniciais). O valor de ASDSF (Desvio Padrão Média de Frequências de Divisão) foi inferior a 0,01.

## **5. Análises de diversidade e variância genética, e redes de haplótipos**

Duas matrizes de dados contendo 58 sequências de *D. nanus* e *D. walfordi* foram montadas para a análise de distância genética, uma com 2297 caracteres referentes ao fragmento H1 (que compreende os genes ribossomais 12S, RNAt-Val e 16S) e outra com 419 caracteres correspondentes apenas à porção final do gene 16S. Na matriz de 2297 caracteres foram incluídas 32 sequências de outras 22 espécies do gênero *Dendropsophus* e de *Xenohyla truncata* (Tabela 1). Sequências com dados faltantes não foram incluídas. As sequências de *D. nanus* e *D. walfordi* foram organizadas em cinco diferentes grupos relativos aos clados A, B, C, D e E inferidos nas análises filogenéticas. A distância genética entre e dentro dos diferentes grupos de sequências foi estimada por *p-distance*, com o auxílio do Programa MEGA v.5.2 (TAMURA *et*

*al.*, 2011). Foi avaliada, com o Programa ARLEQUIN v.3.5.1.2, a estrutura genética dos agrupamentos, usando uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA, EXCOFFIER *et al.*, 1992), com 1000 permutações e o modelo de Kimura 2p para estimativas de distância genéticas (KIMURA, 1980) das duas primeiras matrizes.

Por fim, foram construídas redes de haplótipos a partir da matriz concatenada com todos os genes mitocondriais, utilizando o método de junção de mediana (MJN – *Median Joining*) (BANDELT *et al.*, 1999) implementado no programa NETWORK v.4.6.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>), com todos os parâmetros definidos de acordo com instruções do tutorial do programa.

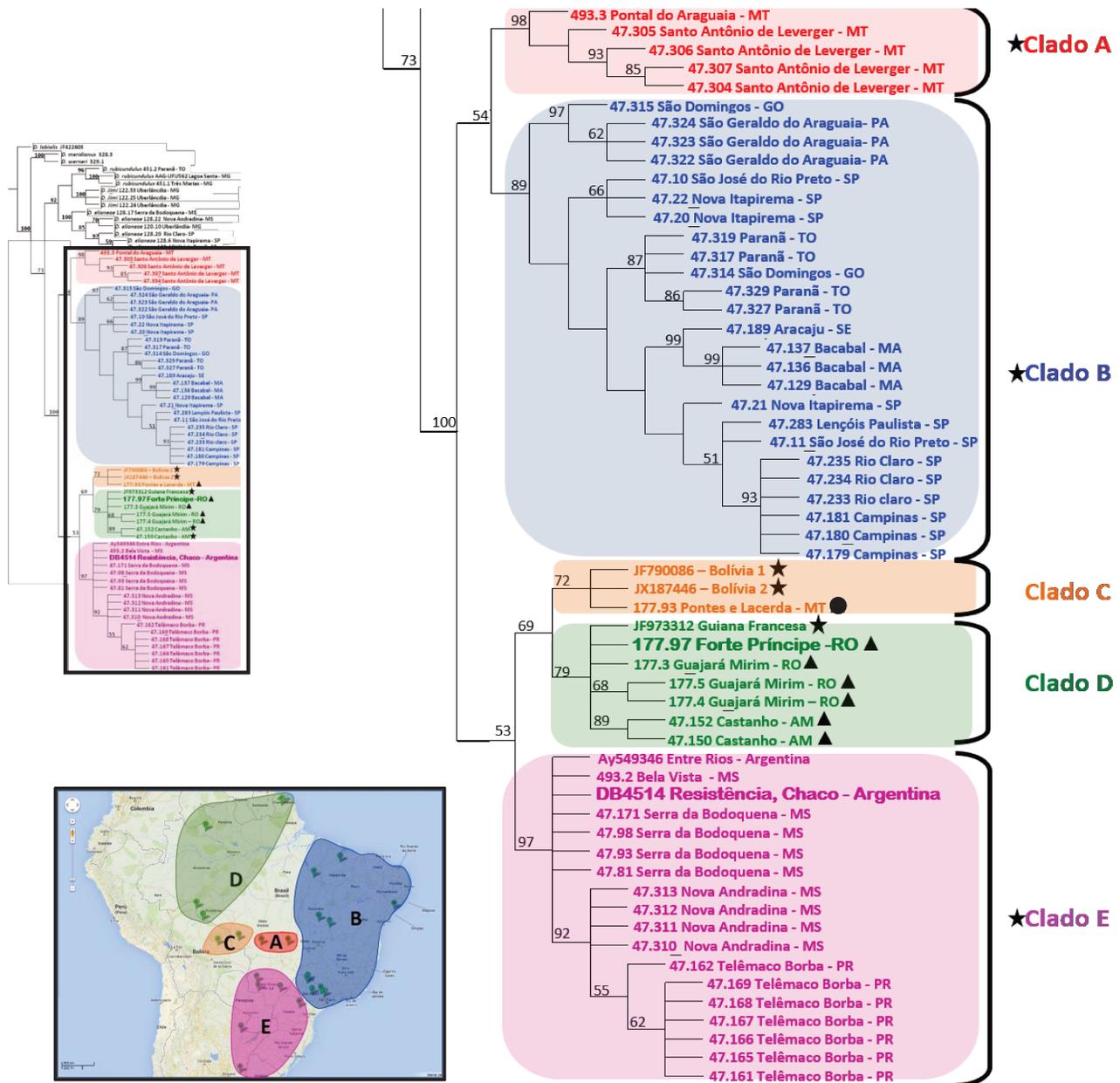
## IV. RESULTADOS

### 1. Inferências filogenéticas e a identificação do parafiletismo de *D. nanus* em relação a *D. walfordi*

Tanto na análise Bayesiana quanto na análise por Máxima Parcimônia, os exemplares de *D. nanus* e *D. walfordi* foram agrupados em cinco principais clados (Figuras 5 e 6). O Clado **A** foi composto pelos exemplares de *D. nanus* de Santo Antônio de Leverger – MT e Pontal do Araguaia – MT. O Clado **B** incluiu os exemplares de *D. nanus* de Bacabal – MA, Aracajú – SE, Paranã – TO, São Geraldo do Araguaia – PA, São Domingos – GO e das localidades do estado de São Paulo amostradas. O Clado **C** agrupou indivíduos de Pontes e Lacerda – MT e Bolívia. O Clado **D** incluiu os exemplares de *D. walfordi* da localidade-tipo (Forte Príncipe da Beira - RO), Guajará Mirim – RO, e de Castanho – AM e Guiana Francesa. Um quinto clado, denominado Clado **E**, foi composto pelos espécimes de *D. nanus* de Telêmaco Borba – PR, Nova Andradina – MS, Serra da Bodoquena – MS, Entre Rios – Argentina e pelo indivíduo da localidade-tipo de *D. nanus*, Colônia Resistência - Chaco – Argentina.

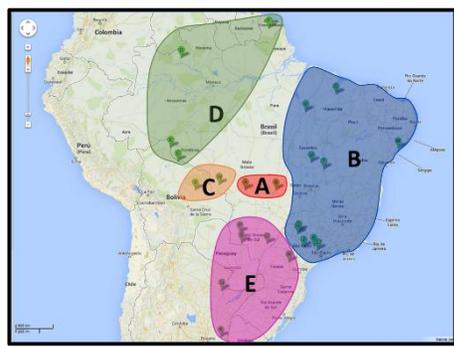
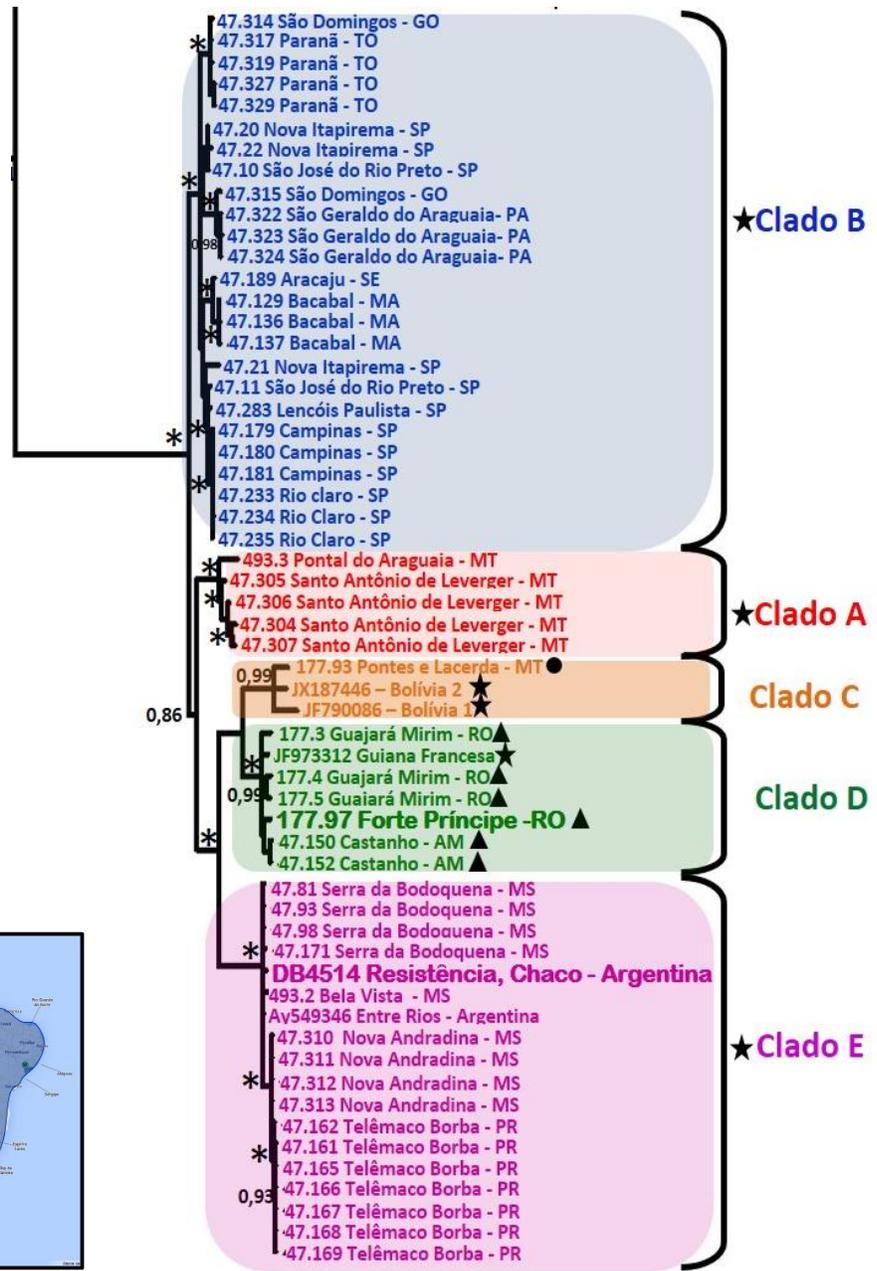
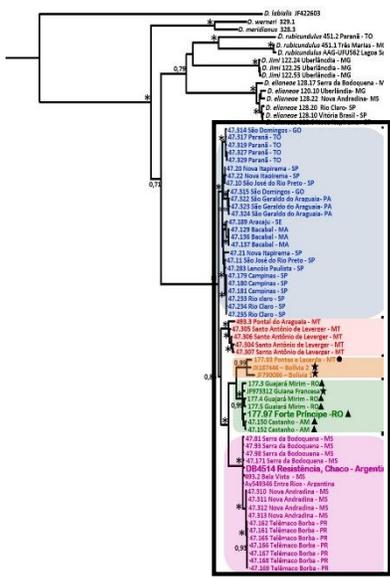
Apesar de o clado ((C,D)E) ter sido recuperado nas duas análises e com alto suporte na análise Bayesiana (Figura 5), a relação desse com os Clados A e B não foi congruente entre as análises. Na análise de Máxima Parcimônia, o clado irmão de ((C,D)E) foi o clado (A,B) (Figura 5), já na análise Bayesiana, o Clado B foi mais basal e o Clado A, irmão de ((C,D)E) (Figura 5).

É importante observar que o Clado D inclui tanto indivíduos previamente identificados como *D. nanus* quanto exemplares de *D. walfordi*. Indivíduos identificados como *D. nanus* também são encontrados nos Clados A, B, C e E. Dessa forma, caracteriza-se o parafiletismo entre *D. nanus* e *D. walfordi*.



**Figura 4.** Cladograma

de consenso estrito gerado a partir das 6 MPT obtidas (com 1732 passos) na análise com TNT. Em destaque, os clados que incluem representantes de *D. nanus* e *D. walfordi*. Os ramos são identificados pelos códigos dos indivíduos (ver Tabela 1) e suas localidades. O mapa representa a distribuição geográfica dos Clados A, B, C, D e E. Em negrito, os ramos referentes a espécimes coletados nas localidades-tipo de *D. nanus* e de *D. walfordi*. Os números apresentados nos nós são referentes a valores de *Bootstrap* maiores que 50. ★ : seqüências de espécimes originalmente identificados como *D. nanus*. ▲ : seqüências de espécimes originalmente identificados como *D. walfordi*. ● : seqüências de espécimes identificados como *Dendropsopus* sp.



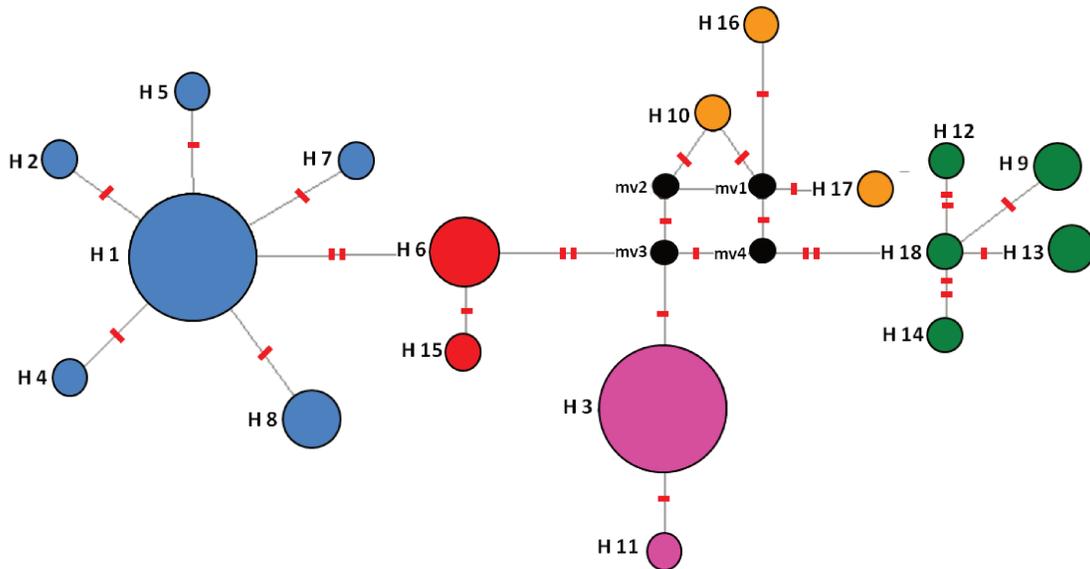
**Figura 5.** Cladograma de consenso estrito obtido pela análise Bayesiana. Em destaque, os clados que incluem representantes de *D. nanus* e *D. walfordi*. Os ramos são identificados pelos códigos dos indivíduos (ver Tabela 1) e suas respectivas localidades. O mapa representa a distribuição geográfica dos Clados A, B, C, D e E. Em negrito, as sequências de indivíduos coletados nas localidades-tipo de *D. nanus* e de *D. walfordi*. Os números acima dos nós são referentes a valores de probabilidade. Os asteriscos indicam valor de probabilidade igual a 1, e valores abaixo de 0,7 não estão representados. ★: sequências de espécimes originalmente identificados como *D. nanus*. ▲: sequências de espécimes originalmente identificados como *D. walfordi*. ●: sequências de espécimes identificados como *Dendropsophus* sp.

## 2. Análise de diversidade e variância genética, e redes de haplótipos

A partir da matriz elaborada com 2297 caracteres, as distâncias genéticas observadas entre os Clados A-E foram em torno de 3%, com exceção da distância entre os Clados A e B, que foi de 1,7%. A divergência genética dentro de cada um desses clados foi inferior a 0,6%. Dentre as demais espécies de *Dendropsophus* analisadas, os menores valores de distância genética foram observados entre *D. labialis*, *D. luddeckei* e *D. meridensis*, três espécies do grupo *D. labialis* (Tabela 3). As Análises de Variância Molecular (AMOVA) indicaram significativa variação entre os Clados A-E ( $F_{st}$  de 0,950), já que 79,31% da variação genética encontrada no grupo de interesse (*D. nanus* + *D. walfordi*) se devem à diferença entre os clados citados. Da variação genética observada, 15,62% correspondem a variações entre as populações dentro dos grupos/clados e 5,08% se devem a diferenças dentro das populações.

Quando analisamos a matriz de sequências com 419 pb (Tabela 4), correspondentes à porção final do gene 16S, as distâncias genéticas calculadas apresentaram valores inferiores aos observados com a análise da matriz de 2297 pb (Tabela 3). O valor inferido entre os clados D e E, por exemplo, foi de 1,4% na análise feita a partir da matriz com 419 pb, e de 2,6% na análise baseada na matriz de 2297 pb. Uma diferença ainda maior foi observada entre os valores de distância observados entre os clados C e E, pois a distância genética entre esses clados calculada com base na análise da matriz de 419 pb foi de 1,6%, enquanto aquela inferida na análise da matriz de 2297 pb foi de 3,1%.

A rede de haplótipos construída com a mesma matriz de sequência dos genes mitocondriais utilizada para as inferências filogenéticas apresentou haplótipos compartilhados entre populações dentro de cada um dos Clados A, B, C, D e E inferidos nas análises filogenéticas. Podemos observar ainda que os três grupos de haplótipos referentes aos Clados C (laranja), D (verde) e E (rosa) parecem derivar dos mesmos haplótipos (vetores médios, em preto).



**Figura 6.** Rede de haplótipos inferida por *median joining* referente aos genes mitocondriais **12s**, **RNA<sub>t</sub> Val**, **16s(H1)** e **CO1**. Cada círculo representa um único haplótipo e seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços em vermelho correspondem a passos evolutivos. As cores vermelha, azul, laranja, verde, rosa e dos círculos representam os clados inferidos nas análises filogenéticas (Clados A, B, C, D e E, respectivamente). Os círculos em preto são os vetores médios e representam possíveis haplótipos intermediários inferidos pelo *software* de análise.

**Tabela 3.** Distância genética (%) entre espécies do gênero *Dendropsophus* e os Clados A-E recuperados nas análises filogenéticas deste trabalho, estimada com base no fragmento H1 (aproximadamente 2297pb).

	Entre os grupos																									Dentro dos Clados	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		26
1 A																											0,5
2 B	1,7																										0,6
3 C	2,9	3,1																									#
4 D	2,8	2,6	2,7																								0,5
5 E	2,7	2,4	3,2	2,6																							0,2
6 <i>D. elianeae</i>	9,5	9,4	10,6	10,1	9,9																						#
7 <i>D. jimi</i>	9,4	9,4	10,3	10,1	9,8	8,6																					#
8 <i>D. bipunctatus</i>	10,2	10,0	10,6	10,3	10,3	9,9	9,9																				#
9 <i>D. werneri</i>	9,6	9,5	10,0	9,7	9,8	11,0	10,6	10,6																			#
10 <i>D. sanborni</i>	9,5	9,8	10,5	10,2	9,8	5,7	8,1	9,6	10,5																		#
11 <i>D. rhodopeplus</i>	11,3	11,2	11,7	11,7	11,4	12,0	12,3	12,1	12,4	11,3																	#
12 <i>D. anceps</i>	12,6	12,6	12,7	12,8	12,3	12,7	12,3	12,9	12,9	12,4	12,8																#
13 <i>D. sarayacuensis</i>	14,5	14,4	14,8	15,0	14,6	14,5	14,1	14,9	14,9	14,4	14,1	13,3															#
14 <i>D. triangulum</i>	14,1	14,0	14,5	14,6	14,2	14,2	14,6	14,7	14,8	14,1	13,8	13,3	12,3														#
15 <i>D. miyatai</i>	15,7	15,5	16,0	15,9	15,5	16,1	16,1	16,3	16,1	16,4	16,3	15,3	17,0	16,2													#
16 <i>D. minutus</i>	15,5	15,6	16,0	15,8	15,6	16,0	16,2	16,2	15,9	15,4	14,9	15,4	16,8	15,2	17,1												#
17 <i>D. frosti</i>	14,7	14,4	14,5	14,9	14,8	15,2	14,8	15,5	15,1	14,8	14,8	14,1	15,9	15,5	16,7	17,6											#
18 <i>D. brevifrons</i>	15,0	14,7	15,1	15,3	14,8	15,2	15,1	15,7	15,4	14,6	15,0	14,2	15,6	15,7	16,8	17,2	6,1										#
19 <i>D. parviceps</i>	13,0	12,8	13,5	13,2	13,0	14,2	13,5	14,0	13,9	14,1	13,4	13,9	14,8	15,0	16,8	16,9	11,4	11,8									#
20 <i>D. giesleri</i>	13,5	13,5	13,7	13,6	13,3	14,0	13,5	13,8	13,3	13,4	13,2	12,5	14,8	14,8	16,0	15,3	13,2	14,1	13,4								#
21 <i>D. meridensis</i>	13,4	13,4	13,7	13,6	13,2	13,3	13,3	13,3	13,8	13,5	13,6	12,7	15,0	13,6	16,3	15,7	13,8	13,9	14,1	12,4							#
22 <i>D. luddeckei</i>	13,5	13,4	13,9	13,8	13,1	13,3	13,4	13,3	13,9	13,5	13,2	12,8	15,3	14,3	16,8	16,0	13,7	13,8	14,4	12,3	2,8						#
23 <i>D. labialis</i>	13,2	13,2	13,6	13,5	12,9	13,2	13,1	12,8	13,4	13,3	12,9	12,3	14,8	13,5	16,0	15,6	13,3	13,2	13,6	12,0	2,6	2,3					#
24 <i>D. carnifex</i>	14,6	14,4	14,9	14,7	14,2	13,9	14,2	14,6	14,2	14,2	13,5	13,3	15,1	14,0	16,6	16,0	13,8	14,2	13,6	13,0	6,9	7,4	7,1				#
25 <i>D. seniculus</i>	13,1	13,2	13,5	13,8	13,3	14,5	13,7	14,6	13,5	14,4	14,5	13,1	14,4	14,6	16,3	15,6	15,5	15,6	14,6	13,9	13,7	14,0	13,3	14,5			#
26 <i>D. marmoratus</i>	13,7	13,9	14,1	14,3	13,6	14,1	14,6	13,8	14,6	13,6	14,5	13,0	15,0	14,5	16,5	15,8	14,9	15,0	15,0	13,5	13,8	13,8	13,7	13,9	9,7		#
27 <i>X. truncata</i>	12,9	13,0	13,5	13,2	13,1	13,7	13,8	13,6	12,8	13,6	13,5	12,5	15,2	14,1	15,8	15,0	13,9	14,8	14,0	12,6	13,4	13,1	12,9	13,2	12,5	13,6	#

#: Valor da distância genética dentro do grupo não calculado pois apenas uma sequência foi considerada na análise.

**Tabela 4.** Distância genética (%) entre os Clados A-E recuperados nas análises filogenéticas deste trabalho, estimada com base nos 419 pb finais dos fragmentos do gene 16S.

	1	2	3	4
1 Clado A				
2 Clado B	0,9			
3 Clado C	1,8	2,4		
4 Clado D	2,0	2,3	1,4	
5 Clado E	1,4	1,6	1,6	1,6

## V. DISCUSSÃO

As análises filogenéticas aqui realizadas confirmaram o parafiletismo de *D. nanus* em relação a *D. walfordi*, corroborando a hipótese sugerida por FOUQUET *et al.* (2011) e MEDEIROS *et al.* (2013). Os exemplares originalmente atribuídos a esses táxons foram agrupados em cinco principais clados (Clados A-E) em todas as inferências. A diferenciação genética desses clados foi suportada pelas análises de AMOVA, que mostram estruturação entre eles. A rede construída com os haplótipos encontrados também refletiu esse padrão, tendo permitido o agrupamento de sequências pertencentes a indivíduos incluídos nos mesmos clados inferidos nas análises filogenéticas.

É importante salientar que os indivíduos das localidades-tipo de *D. walfordi* e *D. nanus* aparecem incluídos nos Clados D e E, respectivamente, que juntamente com o Clado C, formam o clado irmão de A na análise Bayesiana e de (A,B) na análise por Máxima Parcimônia. Outra observação importante a se fazer é que o Clado D contém tanto indivíduos identificados como *D. nanus* quanto indivíduos de *D. walfordi*.

O parafiletismo de *D. nanus* em relação a *D. walfordi* implica a necessidade de uma revisão taxonômica, que levaria à sinonimização de *D. walfordi* com *D. nanus* e/ou ao reconhecimento de novas espécies de acordo com as linhagens inferidas filogeneticamente. Quatro hipóteses baseadas nas relações filogenéticas aqui apresentadas podem ser levantadas: (i) cada um dos cinco clados principais (Clados A-E) representa uma espécie diferente; (ii) há quatro espécies distintas no grupo em análise, que corresponderiam, respectivamente aos clados A, B, (C,D) e E.; (iii) O Clado ((C,D) E) representa uma espécie, o Clado A, outra e o Clado B,

uma terceira; e por fim (iv) os Clados A-E representam cinco diferentes linhagens de uma mesma espécie.

Quando analisamos as distâncias genéticas entre os Clados A-E, dados adicionais são revelados e podem nos auxiliar na análise das hipóteses acima mencionadas. Primeiramente, merece destaque a constatação de que, no grupo em análise, a taxa de variação da porção final do gene 16S é menor do que aquela observada no fragmento que compreende o gene para RNAt-Val e a maior parte dos genes ribossomais 12S e 16S. Entre os Clados D e E, o valor de distância genética inferido com base na porção final do gene 16S foi de 1,6%, diferente daquele calculado a partir da matriz de 2297pb (2,6%). Os Clados D e E incluem indivíduos da Guiana Francesa e da Argentina respectivamente, os quais também foram analisados por FOUQUET *et al.* (2007), que, com base na análise da porção final do gene 16S (419 pb), obtiveram um valor muito próximo ao estimado aqui para a distância genética entre esses indivíduos (1,4%).

Ao contrário de FOUQUET *et al.* (2007), GUARNIZO *et al.* (2012) utilizaram, para a análise comparativa de espécies do Grupo *Dendropsophus labialis* (*D. luddeckei*, *D. labialis* e *D. meridensis*), o fragmento H1 (que contém os genes para RNAt-Val e os genes ribossomais 12S e 16S) e os autores observaram entre as espécies valores de divergência genética muito próximos aos obtidos em nossas análises da matriz de 2297pb. De modo semelhante, para avaliar as distâncias entre os clados aqui inferidos, consideramos a matriz com um maior número de caracteres, correspondente ao fragmento H1, ou seja, a matriz de 2297pb.

A partir da matriz de sequências de 2297 caracteres os valores de distância genética observados entre os Clados C-E e entre esses e os Clados A e B foram altos, variando entre 2,4 e 3,2 %. A menor distância genética estimada entre os grupos em análise foi a inferida entre os Clados A e B (1,7%), clados que não foram recuperados como grupos irmãos nas análises Bayesianas, o que não corrobora se tratarem de uma única espécie. Em contraste, a divergência genética dentro de cada um desses cinco clados (Clados A-E) não passou de 0,6%, nem mesmo nos Clados B, D e E, que se apresentam amplamente distribuídos geograficamente. Além disso, podemos notar que algumas populações pertencentes a diferentes clados estão próximas geograficamente, como é o caso das populações de Telêmaco Borba- PR e Lençóis Paulista –

SP, inseridas nos Clados E e B, respectivamente. A distância genética inferida entre essas populações é de 2,4%, embora a distância geográfica entre elas seja de apenas 377 km. Por outro lado, a distância geográfica entre as populações incluídas no Clado B chega a 2579 km, e entre populações do Clado E chega a 1336 km.

Valores de distância genética semelhantes àqueles encontrados entre os Clados A-E em estudo foram observados entre as espécies *D. luddeckei*, *D. labialis* e *D. meridensis* (2,2 –2,7%) por GUARNIZO *et al.* (2012), com base na análise do segmento mitocondrial 12S-16S. Um clado que une essas três espécies foi recuperado por esses autores, que descreveram *D. luddeckei* como espécie nova com base em exemplares previamente identificados como *D. labialis*. *Dendropsophus luddeckei* e *D. labialis* são espécies morfologicamente crípticas, diferentes no canto, de modo que *D. luddeckei* tem canto de duração mais curta, maior taxa de pulso e menor número de pulsos do que *D. labialis*. Apesar disso, os autores não comprovam a existência de um isolamento pré-zigótico, pois somente análises de fonotaxia poderiam fornecer essa resposta. As duas espécies parecem estar isoladas reprodutivamente por mecanismos pós-zigóticos, pois foram encontrados híbridos entre as duas espécies mas não apresentaram índice de sobrevivência significativamente alto (ULLOA, 2003). Ainda no trabalho realizado por GUARNIZO *et al.* (2012), a espécie *D. pelidna* foi recuperada no clado de *D. meridensis*, o qual aparece como grupo irmão às duas outras espécies *D. luddeckei* e *D. labialis*. Esse resultado e a baixa divergência genética entre *D. pelidna* e *D. meridensis* (0,9% referente ao fragmento 12S-16S), GUARNIZO *et al.* (2012) sugerem que *D. pelidna* seja sinônimo júnior de *D. meridensis*.

Como podemos ver, análises de distância genética auxiliaram nas decisões taxonômicas de GUARNIZO *et al.* (2012) e têm sido também bastante utilizadas por outros autores (exemplos em COLOMA *et al.*, 2012, RIVERA-CORREA & ORRICO, 2013) como ferramenta para a descrição e sinonimização de espécies. Considerando que em um grupo com baixa vagilidade como os anfíbios, o principal fator que leva à diferenciação genética entre indivíduos de uma mesma espécie é o isolamento por distância, FOUQUET *et al.* (2007) analisaram a distância genética e a distância geográfica entre várias populações co-específicas e interespecíficas de hílídeos e notaram que o valor de 3% pode ser considerado um bom limiar entre distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas. Dessa maneira, esse valor foi

considerado adequado para auxiliar na identificação de linhagens que poderiam corresponder a espécies candidatas. Porém linhagens com distância genética abaixo desse valor (discussão em COLOMA *et al.*, 2012, Funk *et al.*, 2012 e PADIAL *et al.*, 2011) também têm sido reconhecidas como espécies válidas. No entanto, esse parâmetro deve ser analisado com bastante cautela e sua utilização deve ser acompanhada de outras análises, como relações filogenéticas, morfologia e canto.

Portanto, os altos valores de distância genética observados (em torno dos 3%) entre os Clados A-E inferidos em nossa análise e a estruturação genética observada entre eles na análise de variância molecular dão suporte à hipótese de que tais linhagens evolutivas independentes representem espécies distintas (hipótese (i) mencionada anteriormente), ou seja, que haja um complexo de espécies dentre indivíduos atualmente identificados como *D. nanus* e *D. walfordi*. Dessa maneira, *D. walfordi* corresponderia ao Clado D, *D. nanus* ao Clado E e os Clados A, B e C a espécies ainda não descritas.

No Clado D, o indivíduo da Guiana Francesa (sequência nucleotídica JF9733041) foi o único não identificado previamente como *D. walfordi*. Considerando a grande similaridade morfológica entre *D. nanus* e *D. walfordi*, acreditamos que o indivíduo tenha sido identificado equivocadamente, tratando-se de um exemplar de *D. walfordi*, e não *D. nanus*.

Na revalidação de *D. walfordi* proposta por LAGONE & BASSO (1987) são destacadas três características que diferenciariam essa espécie de *D. nanus*: forma do focinho, desenho dorsal e desenho das tíbias. No entanto, os autores não especificam as características típicas de diagnose para cada uma das espécies. Na revalidação dessa mesma espécie por DE LA RIVA & BOSCH (1997), a característica de diagnose foi o canto de anúncio com um pulsado mais marcante para *D. walfordi*. As duas publicações sugerem haver algumas particularidades nos indivíduos da bacia Amazônica sem citá-las. Portanto, além do reconhecimento de novas espécies relacionadas a *D. nanus* e *D. walfordi*, sugerimos que uma nova diagnose seja apresentada para as duas espécies já descritas.

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados corroboram claramente a hipótese de parafiletismo entre *D. walfordi* e *D. nanus*, previamente levantada por FOUQUET *et al.* (2011) e MEDEIROS *et al.* (2013) com base em conjuntos menores de dados. Sugerem, ainda, a existência de um complexo de espécies formado por cinco linhagens distintas. A validação de cada um dos clados como espécies plenas e com diagnose específica para cada uma delas será possível através de uma análise integrativa de novos caracteres, como canto e morfologia. Estudos da variação genética por DNA microsatélite entre as populações das regiões geográficas limites entre os diferentes clados poderão auxiliar no estudo das zonas de contato entre essas espécies candidatas.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R.K.; PYRON, R.A.; ANSIL, B.R.; ZACHARIAH, A. & ACHARIAH, A. (2013). Two novel genera and one new species of treefrog (Anura: Rhacophoridae) highlight cryptic diversity in the Western Ghats of India. **Zootaxa**, 3640 (2): 177-189.
- ALEIXO, A.L.P. (2009). Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. **Megadiversidade**, 5: 87-95.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P. & ROHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16: 37-48.
- BLACK I.V, W.C. & PIESMAN, J. (1994). Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 10034-10038.
- BOGART, J.P. (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: Vial JL (ed) **Evolutionary Biology of Anurans**, Univ. Missouri Press, Columbia, Missouri, 337-349.
- BOKERMANN, W.C.A. (1962). Cuatro nuevos hylidos del Brasil. **Neotropica**, 8: 81-91.

- BOULENGER, G.A. (1889). On a collection of batrachians made by Prof. Charles Spegazzini at Colonia Resistencia, South Chaco, Argentine Republic. **Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova**, 2(7): 246-249.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.J.R. & WILSON, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 76: 1967-1971.
- CAMINER, M.A. & RON, S.R. (2014). Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **ZooKeys**, 370: 1-68.
- CARVALHO-E-SILVA S.P.; CARVALHO-E-SILVA, A.M.P.T. & IZECKSOHN, E. (2003). Nova espécie de *Hyla Laurenti* do grupo de *H. microcephala* Cope (Amphibia, Anura, Hylidae) do nordeste do Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 20: 553-558.
- CATROLI, G.F. & KASAHARA, S. (2009). Revisão dos dados citogenéticos em espécies da família Hylidae (Amphibia, Anura): resultados e perspectivas. Publication UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**, 15: 67-86.
- CLAYTON, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell**, 28(4): 693-705.
- COLOMA, L.A.; CARVAJAL-ENDARA, F.; DUEÑAS, J.F.; PAREDES-RECALDE, A.; MORALES-MITE, M.; ALMEIDA-REINOSO, D.; TAPIA, E.E.; HUTTER, C.R.; TORAL, E. & GUAYASAMIN, J.M. (2012). Molecular phylogenetics of stream treefrogs of the *Hyloscirtus larinopygion* group (Anura: Hylidae), and description of two new species from Ecuador. **Zootaxa**, 3364: 1-78.
- CONTE, C.R.; NOMURA, F.; MACHADO, R. A.; KWET, A.; LINGNAU, R. & ROSSA-FERES, D. C. (2010). Novos registros na distribuição geográfica de anuros na Floresta com Araucária e considerações sobre suas vocalizações. **Biota Neotropica**, 10(2): 201-224.

- CRACRAFT, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. **Current Ornithology**, 1: 159-187. [reprinted in *The Units of Evolution*, M. Ereshefsky, ed., MIT Press, Cambridge, 1992: 93-120].
- DE LA RIVA, I.; MÁRQUEZ, R. & BOSCH, J. (1997). Description of the advertisement calls of some South American Hylidae (Amphibia: Anura): taxonomic and methodological consequences. **Bonner Zoologische Beiträge**, 47: 175-186.
- DE QUEIROZ, K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: D.J. Howard & S.H. Berlocher (eds). **Endless forms: species and speciation**. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 57-75.
- DUELLMAN, W.E. (1977). Liste der rezenten Amphibien und Reptilien: Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. **Das Tierreich**, 95: 1-225.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB L. (1983). Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomy and phylogenetic relationships. In A.G.J. Rhodin and K. Miyata (editors), *Advances in herpetology and evolutionary biology*. Cambridge, MA: **Museum of Comparative Zoology, Harvard University**, 33-51.
- EDGAR, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, **Nucleic Acids Research**, 32: 1792-1797.
- EVANS, B.J.; GREENBAUM, E.; KUSAMBA, C.; CARTER, T.F.; TOBIAS, M.L.; MENDEL, S.A. & KELLEY, D.B. (2011). Description of a new octoploid frog species (Anura: Pipidae: *Xenopus*) from the Democratic Republic of the Congo, with a discussion of the biogeography of African clawed frogs in the Albertine Rift. **Journal of Zoology**, 283: 276-290.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131(2): 479-491.

- FAIVOVICH J.; HADDAD C.F.B.; GARCIA P.C.A.; FROST D.R.; CAMPBELL J.A. & WHEELER W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 294: 240.
- FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach 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(10): e1109.
- FOUQUET A.; NOONAN B.; BLANC M. & ORRICO, V.G.D. (2011). Phylogenetic position of *Dendropsophus gaucheri* (Lescure and Marty 2000) highlights the need for an in-depth investigation of the phylogenetic relationships of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae). **Zootaxa**, 3035: 59-67.
- FREEMAN,S. & HERRON, J.C. (2009). **Análise Evolutiva**. 4a ed. Porto Alegre: ArtMed Editora. 605-607.
- FROST, D.R. (2014). Amphibian species of the world: an online reference. Version 6. Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA
- FUNK, W.C.; CAMINER, M. & RON, S.R. (2012). High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734): 1806-1814.
- GOEBEL, A.M.; DONNELLY, J.M. & ATZ, M.E. (1999) PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 11: 163-199.

- GOLOBOFF P.A.; FARRIS J.S. & NIXON K.C. (2003). T.N.T.: Tree analysis using new technology. **Program and documentation**, Available at [www.zmuc.dk/public/phylogeny](http://www.zmuc.dk/public/phylogeny).
- GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GALIARDO, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E. & WHEELER, W. (2006). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura, Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of natural History**, 299: 1-262.
- GRAY, M.W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 5: 25-50.
- GRAYBEAL, A., (1997). Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 119: 297-338.
- GRUBER, S.L.; HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. (2005). Evaluating the karyotypic diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species. **Folia Biologica**, 51: 68-75.
- GUARNIZO, C.E.; ESCALLÓN, C.; CANNATELLA, D. & AMÉZQUITA, A. (2012). Congruence between acoustic traits and genealogical history reveals a new species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) in the high Andes of Colombia. **Herpetologica**, 68(4): 523-540.
- HADDAD, C.F.B.; TOLEDO, L.F. & PRADO, C.P.A. (2008). **Anfibios da Mata Atlântica: Guia dos Anfíbios Anuros da Mata Atlântica**, Editora Neotropica, São Paulo.
- HAUSDORF, B. (2011). Progress toward a general species concept. **Evolution**, 65(4): 923-931.
- HAWKINS, M.A.; SITES, J.W. & NOONAN, B.P. (2007). *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) of the Guiana Shield: using DNA barcodes to assess identity and diversity. **Zootaxa**, 1540: 61-67.

- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. & DE WAARD, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270: 313-322.
- HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S. & FRANCIS, C.M. (2004a). Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLOS Biology**, 2: 1657-1663.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 101: 14812-14817.
- HEDGES, S.B. (1994) Molecular evidence for the origin of birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91(7): 2621-2624.
- HILLIS, D.M. & DIXON, M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, 66: 411-453.
- HUELSENBECK, J.P.; LARGET, B.; MILLER, R.E. & RONQUIST F. (2002). Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. **Systematic Biology**, 51:673-688.
- IUCN (WORLD CONSERVATION UNION) (2014). Conservation International & NatureServe. (2004). **Global - Amphibian Assessment**. Disponível em <http://www.globalamphibians.org> (acessado em novembro de 2014).
- JUNGFER, K.H.; REICHLER, S. & PISKUREK, O. (2010). Description of a new cryptic southwestern Amazonian species of leaf-gluing treefrog, genus *Dendropsophus* (Amphibia: Anura: Hylidae). **Salamandra**, 46: 204-214.
- KIMURA, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16(2): 111-120.

- KUO, C. H.; HUANG, S. & LEE, S. C. (2003). Phylogeny of hagfish based on the mitochondrial 16S rRNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 28:448-457.
- LANGONE, J.A. & BASSO, N.G. (1987). Distribucion geografica y sinonimia de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. **Comunicaciones Zoologicas Museo de Historia Natural de Montevideo**, 164: 1-17.
- LUTZ B (1973). **Brazilian species of Hyla**. University of Texas Press, Austin and London, 260.
- MAYR, E. (1942). **Systematics and the origin of species**, New York.
- MAYR, E. (1963). **Animal species and evolution**, Cambridge, MA.
- MATSUI, M.; SHIMADA, T. & SUDIN, A. (2014). First record of the tree-frog genus *Chiromantis* from Borneo with the description of a new species (Amphibia: Rhacophoridae). **Zoological science**, 31(1): 45-51.
- MEDEIROS, L.R.; ROSSA-FERES, D.C. & RECCO-PIMENTEL, S.M. (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity**, 94: 149-154.
- MEDEIROS, L.R.; LOURENÇO, L.B.; ROSSA-FERES, D.C.; LIMA, A.P, ANDRADE, G. V.; GIARETTA, A.A.; EGITO, G.T.B.T. & RECCO-PIMENTEL, S.M. (2013). Cytogenetics and phylogenetics of species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) **Genetics and Molecular Biology**.
- MICHAELS, G.S.; HAUSWIRTH, W.W. & LAIPIS, P.J. (1982). Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. **Developmental Biology**, 94: 246-251.
- MISHLER, B.D. (1985). The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. **Bryologist**, 88: 207-214.
- MIYATA, T.; HAYASHIDA, H.; KIKUNO, R.; HASEGAWA, M.; KOBAYASHI, M. & KOIKE, K. (1982). Molecular clock of silent substitution: at least six-fold preponderance

- of silent changes in mitochondrial genes over those in nuclear genes. **Journal of Molecular Ecology**, 19: 28-35.
- NAPOLI, M.F. & CARAMASCHI, U. (1998). Duas novas espécies de *Hyla* Laurenti, 1768 do Brasil central afins de *H. tritaeniata* Bokermann, 1965 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu Nacional**, 391: 1-12.
- NAPOLI, M.F. & CARAMASCHI, U. (1999). Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi* with the description of a new species (Anura, Hylidae). **Alytes**, 16: 165-189.
- NYLANDER, J.A.A. (2004). Mr. Modeltest v2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Centre**, Uppsala University.
- PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I. & VENCES, M. (2010). Review: The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, 7: 1-14.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.O.; STICE, L. & GRABOWSKI, G. (1991). The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Honolulu: **Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii**.
- POUGH, F.H. (1999). **A vida dos vertebrados**, São Paulo: Atheneu Editora.
- PRADO, C.; HADDAD, C.F. & ZAMUDIO, K.R. (2012). Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. **Molecular ecology**, 21(4): 921-941.
- PYRON, R.A. & WIENS, J.J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61(2): 543-583.
- RICHARDS, R.A. (2013). The Species Problem: A Conceptual Problem? **The Species Problem-Ongoing Issues**, 41.
- RIDLEY, M. (1989). The cladistic solution to the species problem. **Biology and Philosophy**, 4: 1-16.

- RIVERA-CORREA, M. & ORRICO, V.G.D. (2013). Description and phylogenetic relationships of a new species of treefrog of the *Dendropsophus leucophyllatus* group (Anura: Hylidae) from the Amazon basin of Colombia and with an exceptional color pattern. **Zootaxa**, 3686(4): 447.
- ROBIN, E.D. & WONG, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. **Journal of Cellular Physiology**, 136: 507-513.
- RÖDDER, D.; KIELGAST, J.; BIELBY, J.; SCHMIDTLEIN, S.; BOSCH, J.; GARNER, T.W.J.; VEITH, M.; WALKER, S.; FISHER, M.C. & LÖTTTERS S. (2009). Global Amphibian Extinction Risk Assessment for the Panzootic Chytrid Fungus. **Diversity**, 1: 52-66.
- ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. (2001). The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, 25(1): 39-67.
- SHNEYER V.S. (2007). On the species-specificity of DNA: fifty years later. **Biochemistry**, 72: 1377–1384.
- SILVANO, D.L. & SEGALLA, M.V. (2014). Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, 1: 79-86.
- SIMAS, V.R.; COSTA, E.C. & SIMAS, C.A. (2003). Características externas do ninho de *Atta vollenweideri* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). **In: XVI Simpósio de Mirmecologia**, Florianópolis, SC. CD-Rom.
- SIQUEIRA, S.J.R.; AGUIAR, J.R.O.; SOUZA, M.B.; LIMA, A.P. & RECCO- PIMENTEL, S.M. (2009). Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). **Hereditas**, 146: 141-151.
- SKUK, G. & LANGONE, J.A. (1992). Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de  $2n=30$ . **Acta Zoologica Lilloana**, 41: 165-171.

- SPICER, G.S. & DUNIPACE, L. (2004). Molecular phylogeny of songbirds (Passeriformes) inferred from mitochondrial 16S ribosomal RNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30: 325-335.
- STUART, S.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L. & WALLER, R.W. (2004): Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, 306: 1783-1786.
- SUÁREZ, P.; CARDOZO, D.; BALDO, D.; PEREYRA, M.O.; FAIVOVICH, J.; ORRICO, V.G.D. & PIECZARKA, J.C. (2013). Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Cytogenetic and genome research**, 141(4): 295-308.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M., & KUMAR, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-2739.
- ULLOA, C. (2003). **Efecto de la Distancia Geografica Sobre el Aislamiento Reproductivo entre Poblaciones de la Rana *Hyla labialis* (Anura: Hylidae)**. Undergraduate Thesis. Universidad de los Andes, Bogota, DC, Colombia.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI, Y. & VIEITES, D.R. (2005a) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transaction of the Royal Society B**, 360: 1859-1868.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI, Y. & VIEITES, D.R. (2005b). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, 2: 1-12.
- VIELLIARD, J. & SILVA, M.L. (2010). Bioacústica - bases teóricas e regras práticas de uso em ornitologia In: Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, **Técnicas de Pesquisa e Levantamento ed. Rio de Janeiro: Technical books**, 313-326.

- WAUGH, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **Bioessays**, 29: 188–197.
- WIENS, J.J.; KUCZYNSKI, C.A.; HUA, X. & MOEN, D.S. (2010). An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequencedata. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 871-882.
- WOGEL, H., & POMBAL JR., J. P. (2007). Comportamento reprodutivo e seleção sexual em *Dendropsophus bipunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae). **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, 47(13): 165-174.
- XIA, L.; ZHENG, X.; ZHENG, W.; ZHANG, G.; WANG, H.; TAO, Y. & CHEN, D. (2012). The Niche-Dependent Feedback Loop Generates a BMP Activity Gradient to Determine the Germline Stem Cell Fate. **Current Biology**, 22: 515-521.
- ZHANG, J.F.; NIE, L.W.; WANG, Y. & HU, L.L. (2009). The complete mitochondrial genome of the large-headed frog, *Limnonectes bannaensis* (Amphibia: Anura), and a novel gene organization in the vertebrate mtDNA. **Gene**, 442: 119-127.

## VIII. ANEXO

### Anexo I – Certificado Comissão de Ética



CEUA/Unicamp

#### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Análise da identidade taxonômica de *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus walfordi* (Anura, Hylidae) com base em dados moleculares" (protocolo nº 3453-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço / Karin Regina Seger, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **05 de setembro de 2014**.

Campinas, 05 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva