



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Renata de Oliveira Tenório

“Análise genética e citogenética do complexo *Physalaemus cuvieri*–
Physalaemus ephippifer (Anura, Leptodactylidae)”

“Genetic and cytogenetic analyses of the *Physalaemus cuvieri*-*Physalaemus*
ephippifer species complex (Anura, Leptodactylidae)”

CAMPINAS

2020

Renata de Oliveira Tenório

“Análise genética e citogenética do complexo *Physalaemus cuvieri*–
Physalaemus ephippifer (Anura, Leptodactylidae)”

“Genetic and cytogenetic analyses of the *Physalaemus cuvieri*-*Physalaemus*
ephippifer species complex (Anura, Leptodactylidae)”

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

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology, in the area of animal biodiversity.

Orientadora: Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA RENATA DE OLIVEIRA TENÓRIO
E ORIENTADA PELA LUCIANA BOLSONI
LOURENÇO MORANDINI.

Campinas

2020

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

T258a Tenório, Renata de Oliveira, 1989-
Análise genética e citogenética do complexo *Physalaemus cuvieri*-
Physalaemus ephippifer (Anura, Leptodactylidae) / Renata de Oliveira
Tenório.– Campinas, SP : [s.n.], 2020.

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

1. Hibridação. 2. Citogenética. 3. *Physalaemus*. I. Lourenço, Luciana
Bolsoni, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic and cytogenetic analyses of the *Physalaemus cuvieri*-
Physalaemus ephippifer species complex (Anura, Leptodactylidae)

Palavras-chave em inglês:

Hybridization

Cytogenetics

Physalaemus

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini [Orientador]

Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito

Stenio Eder Vittorazzi

Data de defesa: 27-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6822-683X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1736499113987790>

Campinas, 27 de Janeiro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito

Prof. Dr. Stenio Eder Vittorazzi

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Unidade Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia.

Agradecimentos:

Agradeço à minha orientadora Luciana, por ter compartilhado do seus conhecimentos e me ajudado no crescimento científico. Por ter me apoiado em muitos momentos, apesar de todas as minhas dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Luciano e Elienai Tenório, por todo o apoio, e irmãos, Sheila e Lu. E também à minha cunha Alline. Vocês foram e sempre serão minha base, vou continuar lutando pra ir o mais longe que eu puder.

Gostaria de agradecer todo o apoio e crescimento junto à equipe do LabEsC e agregados por todos esses anos (Alê, Marcos, Stephanie, Kaleb, Dani, Rick, Karin, Willian, Maria, Ju, Maora, Vitor, Giovanna, Breno, Gabi, Rê, Gui e Ari), que desde 2014 quando comecei a Iniciação Científica, e de Julho de 2017, quando entrei no Mestrado, até hoje estiveram comigo.

Agradeço aos membros da minha qualificação (Cíntia, Michela e Garraffoni), também aos membros da pré-banca (Daniel, Cíntia e Michela) e à banca (Cíntia e Stenio) pelas suas contribuições ao meu trabalho e enriquecimento do texto.

Aos meus amigos borises, que desde a graduação e até hoje estiveram comigo. Obrigada queridos, Fer, Ana, Dani, André e Soldado.

Aos meus amigos tanto da UNICAMP quanto de fora, que me apoiaram em vários momentos e me viram lamentar ou comemorar períodos da minha vida. Obrigada Gih, Rafa, Samanta, Don, Alexandra, Raquel, Marquinho, Guilherme, tio Gu, Gabriel, Maurício e Marcel. Vcs foram essenciais durante toda essa fase.

Às amigas da M8a que sempre foram parceiras em várias fases da minha vida. Obrigada em especial à Paty, Jay, Amanda, Gabi e Flávia.

Agradeço a muitos professores da UNICAMP, que são e sempre serão minhas referências desde a graduação e me ajudaram a amar ainda mais essa profissão, bióloga.

Agradeço ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, vinculado ao presente projeto: #2017/15842-8.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Análises genéticas baseadas em sequências nucleotídicas têm se mostrado muito relevantes para entender a diversidade críptica de anuros, especialmente quando reúne dados de múltiplos locos. Atualmente, o gênero *Physalaemus* possui 48 espécies reconhecidas e suspeita-se da presença de algumas espécies crípticas, ainda não descritas. Análises filogenéticas e citogenéticas sugeriram a existência de pelo menos duas espécies crípticas ainda não descritas, proximamente relacionadas filogeneticamente a *Physalaemus cuvieri* e a *Physalaemus ephippifer*, podendo chegar a sete o número de espécies nesse grupo. A ausência da informação sobre a localidade-tipo de *P. cuvieri* dificulta a revisão taxonômica desse complexo de espécies e, por isso, até o momento as espécies delimitadas com base em sequências de DNA passaram a ser referidas como *Physalaemus* sp. - clado Oeste do Pará, *Physalaemus* sp. - clado Viruá), Linhagens 1A, 1B, 2 e 3 de “*P. cuvieri*”, *P. ephippifer*. Uma dúvida que ainda persiste em relação ao número de espécies contidas nesse complexo se refere a *P. ephippifer* e à Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Com base em sequências de DNA mitocondrial, foi identificada baixa distância genética entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. No entanto, existem diferenças citogenéticas entre esses grupos, principalmente em relação a cromossomos sexuais, pois apenas *P. ephippifer* apresenta heteromorfismo sexual cromossômico. Para entender melhor a relação entre esses dois grupos, se torna de suma importância o estudo de espécimes que ocorrem nas áreas situadas entre as localidades de ocorrência da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” e de *P. ephippifer*. No presente trabalho, com base em sequências de DNA mitocondrial, marcadores do tipo RAD-seq e dados cariotípicos, foram analisados espécimes dessa região, com o intuito de avaliar a hipótese de contato secundário entre as linhagens mencionadas. Os resultados mostraram que existem dois haplogrupos mitocondriais dentre os espécimes daquela região, um deles agrupado com *P. ephippifer* e o outro com a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Todavia, os agrupamentos inferidos com base nos marcadores nucleares do tipo RAD-seq foram incongruentes com aqueles apontados pelos dados mitocondriais, fortalecendo a hipótese de hibridação/introgressão envolvendo *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Os resultados citogenéticos revelaram um cariótipo exclusivo aos indivíduos da região em estudo, e nenhuma evidência da presença de híbridos de primeira geração foi encontrada. Assim, foi possível inferir que há evidência de contato secundário entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri* na área estudada” e que esse contato deve ter ocorrido há algum tempo.

Abstract

Genetic analyses based on nucleotide sequences are very relevant for understanding cryptic anuran diversity, especially when employed multiple loci data. Currently, the genus *Physalaemus* has 48 recognized species and it is suspected the presence of some cryptic species, not yet described. Phylogenetic and cytogenetic analyzes have suggested the existence of at least two undescribed cryptic species, closely related phylogenetically to *Physalaemus cuvieri* and *Physalaemus ephippifer*, and the number of species in this group may reach seven. The lack of information about the *P. cuvieri* type-locality makes it difficult to taxonomically revise this species complex and, so far, species delimited based on DNA sequences have been referred to as *Physalaemus* sp. - Western clade of Pará, *Physalaemus* sp. Viruá clade), Lineages 1A, 1B, 2 and 3 of “*P. cuvieri*”, *P. ephippifer*. One question that still persists regarding the number of species contained in this complex refers to *P. ephippifer* and Lineage 1 of “*P. cuvieri*”. Based on mitochondrial DNA sequences has been identified as a low genetic distance between *P. ephippifer* and “*P. cuvieri*”. However, great cytogenetic variation exists between these groups, especially about sex chromosomes, because only *P. ephippifer* presents chromosomal sexual heteromorphism. To better understand the relationship between these two groups, it is of paramount importance to study specimens that occur in the areas between the locations of occurrence of Lineage 1 of “*P. cuvieri*” and by *P. ephippifer*. In the present study, based on mitochondrial DNA sequences, RAD-seq markers and karyotypic data, specimens from this region were analyzed to evaluate the hypothesis of secondary contact between the mentioned strains. The results showed that there are two mitochondrial haplogroups among the specimens of that region, one of them grouped with *P. ephippifer* and the other with “*P. cuvieri*”. However, the inferred clusters based on RAD-seq nuclear markers were inconsistent with those indicated by mitochondrial data, raising the hypothesis of hybridization/introgression involving *P. ephippifer* and Lineage 1 of “*P. cuvieri*”. The cytogenetic results revealed an exclusive karyotype to individuals from the region under study, and no evidence of the presence of first generation hybrids was found. Thus, it was possible to infer that there is evidence of secondary contact between *P. ephippifer* and Lineage 1 of “*P. cuvieri*” in the area studied and that this contact must have occurred some time ago.

Sumário

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Introdução | 9 |
| 1.1 | O complexo <i>Physalaemus cuvieri</i> - <i>Physalaemus ephippifer</i> | 10 |
| 2 | Objetivos | 15 |
| 2.1 | Objetivos Gerais | 15 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 15 |
| 3 | Materiais e Métodos | 16 |
| 3.1 | Área de interesse e táxons amostrados | 16 |
| 3.2 | Extração de DNA genômico | 17 |
| 3.3 | Obtenção e análises de sequências mitocondriais | 18 |
| 3.3.1 | Obtenção de sequências nucleotídicas mitocondriais | 18 |
| 3.3.2 | Análises filogenéticas | 18 |
| 3.3.3 | Distância genética | 19 |
| 3.3.4 | Rede haplotípica | 20 |
| 3.3.5 | Tempo de divergência | 20 |
| 3.4 | Obtenção e análises de sequências RAD-seq | 21 |
| 3.4.1 | Construção de bibliotecas | 21 |
| 3.4.2 | Sequenciamento e Análise de sequências RAD-seq | 22 |
| 3.5 | Análises citogenéticas | 23 |
| 3.5.1 | Colorações cromossômicas | 24 |
| 4 | Resultados | 24 |
| 4.1 | Rede de haplótipos mitocondriais | 24 |
| 4.2 | Análises filogenéticas e de distância genética | 26 |
| 4.3 | Tempo de divergência | 29 |
| 4.4 | Análises RAD-seq | 31 |
| 4.5 | Análises citogenéticas | 32 |
| 4.5.1 | Indivíduos de SPAB-VNM | 32 |
| 4.5.2 | Indivíduos de Parauapebas-PA | 34 |
| 5 | Discussão | 37 |
| 5.1 | Possível área de contato entre <i>P. ephippifer</i> e L1 de “ <i>P. cuvieri</i> ” | 37 |
| 5.2 | Dois haplótipos mitocondriais na região de Balsas-MA | 39 |
| 5.3 | Linhagem 4 de “ <i>P. cuvieri</i> ” de Parauapebas-PA | 40 |
| 5.4 | Biogeografia da mesorregião Oeste Maranhense | 41 |
| 6 | Conclusão/principais resultados | 43 |
| 7 | Referências Bibliográficas | 44 |
| 8 | Materiais Suplementares | 50 |
| 9 | Anexos | 65 |
| 9.1 | Direitos autorais | 65 |
| 9.2 | Bioética | 66 |

1. Introdução

A delimitação de espécies é um tema central na Biologia, que tem reflexos importantes no desenho da amostra que se pretende estudar (para garantir a melhor representação do táxon de interesse), na interpretação de processos evolutivos subjacentes à variação biológica em investigação ou mesmo em decisões de manejo e conservação biológica (Agapow et al., 2004; Frankham et al., 2012; Fitzpatrick et al., 2015). A região neotropical apresenta expressiva diversidade de espécies de anfíbios, muitas delas ainda não conhecidas ou cuja delimitação permanece obscura. Giam et al. (2012), com base na análise dos trabalhos de descrição de espécies, no esforço taxonômico dedicado ao longo dos anos e na distribuição geográfica das espécies descritas, estimaram que cerca de 33% das espécies de anfíbios ainda não foram descritas e apontam as florestas neotropicais como o bioma que abriga a maior parte delas (cerca de 58%).

Análises genéticas baseadas em sequências nucleotídicas têm constituído importantes ferramentas na descoberta de diversidade críptica em anuros. Fouquet et al. (2007), por exemplo, comparando sequências nucleotídicas do gene ribossomal mitocondrial 16S de 60 espécies de 28 gêneros de anuros da região Amazônia-Guianas, inferiram que o número de espécies presentes na amostra analisada seria duas vezes maior do que o reconhecido àquela época. Funk et al. (2012) combinaram a análise de sequências mitocondriais e nucleares a dados morfológicos e acústicos de anuros pertencentes a grupos filogeneticamente distantes e hábitos distintos para inferir que a diversidade de anuros na Amazônia está subestimada. Segundo esses autores, o gênero *Engystomops* (família Leptodactylidae), que na ocasião possuía duas espécies, deveria conter de cinco a sete espécies, e o grupo *Hypsiboas calcaratus* (família Hylidae), em vez de duas, deveria conter de sete a nove espécies.

Apesar da grande relevância das sequências de DNA mitocondrial nas análises de variações intra e interespecíficas e em estudos filogeográficos (Vences et al., 2005a,b; Fouquet et al., 2007), a análise multilocos, que combina a análise de sequências mitocondriais (que têm herança materna e são herdadas como uma unidade de ligação simples) e nucleares, tem se mostrado mais eficiente na delimitação de espécies (Dupuis et al., 2012; Toews & Brelsford, 2012; Giska et al., 2015), além da importância nos estudos da diversidade genética e suas consequências na conservação das espécies (Dufresnes et

al., 2013). Esses dados são importantes para a identificação de híbridos e espécimes que sofreram introgressão (Anderson & Thompson, 2002; Randi, 2008; Vähä & Primmer, 2006). Avanços recentes nas tecnologias genômicas têm facilitado a utilização de conjuntos de dados multilocos e múltiplos indivíduos por população. A técnica de RAD-seq (*Restriction-site Associated DNA sequencing*) e suas derivadas (Baird et al., 2008; Peterson et al., 2012; McCormack et al., 2013; Graham et al., 2015; Hoffberg et al., 2016), por exemplo, permitem a análise de milhares de locos através do sequenciamento por NGS (*Next Generation Sequencing*) de fragmentos de restrição específicos. Dentre as técnicas derivadas de RAD-seq, destaca-se o método conhecido como RADcap (Hoffberg et al., 2016), em que iscas moleculares, construídas com base em dados preliminares gerados por 3RAD (dual-digest RADseq – originalmente proposto por Graham et al., 2015) a partir de uma pequena amostra do grupo de interesse, são utilizadas para a captura de locos informativos em meio a bibliotecas de fragmentos de restrição.

Embora as análises conduzidas com base em sequências de DNA sejam muito úteis, vale ressaltar a necessidade de sua integração com conjuntos de dados de outras naturezas, como os morfológicos, citogenéticos e, no caso de anuros, os acústicos, para inferências mais precisas sobre a delimitação de espécies e para decisões taxonômicas robustas (ver discussão em Padial & de la Riva, 2010; Padial et al., 2010; Camargo & Sites, 2013).

1.1 O complexo *Physalaemus cuvieri*-*Physalaemus ephippifer*

O gênero *Physalaemus*, pertencente à família Leptodactylidae e à subfamília Leiuperinae, atualmente composto por 48 espécies, é amplamente distribuído na região neotropical, ocorrendo na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas e por todo o Brasil (Frost, 2019). Com base em sequências de DNA mitocondrial e nuclear, dois grandes clados foram identificados nesse gênero, denominados de Clado *Physalaemus signifer*, que reúne *Physalaemus nattereri* e espécies dos grupos *Physalaemus deimaticus* e *Physalaemus signifer*, e o Clado *Physalaemus cuvieri*, que inclui os grupos *P. cuvieri*, *P. biligonigerus*, *P. gracilis*, *P. henselii* e *P. ofersii* (Lourenço et al., 2015). Na proposta de Lourenço et al. (2015), o grupo *Physalaemus cuvieri* inclui as espécies *P. albifrons*, *P. centralis*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri*

e *P. kroyeri*. Um aspecto relevante desse grupo se refere à notória variação genética (Conte et al., 2014; Lourenço et al., 2015; Nascimento, 2014; Nascimento et al., 2019) e citogenética (Lourenço et al., 2015 e referências nele citadas) observada dentre linhagens constituídas por indivíduos originalmente identificados como *P. cuvieri*, táxon que se mostra parafilético em relação a *P. ephippifer* (Lourenço et al., 2015).

As análises citogenéticas de diversas populações identificadas como *Physalaemus cuvieri* permitiram o reconhecimento de distintos citótipos, diferenciados principalmente pelo número e pela localização das regiões organizadoras de nucléolo (NOR). No citótipo de indivíduos de São Pedro da Água Branca, foram identificadas NOR nos pares 8 e 9 e um sítio de NOR adicional no par 7 (Quinderé et al., 2009). No citótipo encontrado em indivíduos de Urbano Santos–MA e Crateús–CE (Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”), são portadores de NOR os cromossomos 8 e 9 (Quinderé et al., 2009), enquanto no citótipo característico de indivíduos encontrados desde o estado da Bahia até a Argentina (Linhagem 2 de “*P. cuvieri*”), a NOR principal está no cromossomo 8 ou no cromossomo 11 (Silva et al., 1999; Quinderé et al., 2009). Já o citótipo da população de Porto Nacional–TO (Linhagem 3 de “*P. cuvieri*”) se diferenciou dos demais citados pela presença de múltiplas NORs, encontradas entre os pares 1, 3, 4, 5 e 10 (Quinderé et al., 2009). Esses três últimos grupos cariotípicos estiveram representados nas análises filogenéticas de Lourenço et al. (2015) e foram reconhecidos como linhagens distintas. A linhagem que inclui os indivíduos de Urbano Santos–MA e Crateús–CE, dentre outras localidades do nordeste brasileiro (Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”), é recuperada como grupo-irmão de *P. ephippifer*, arranjo que deixa *P. cuvieri* parafilético em relação a *P. ephippifer* (Lourenço et al., 2015; Fig.1).

Recentes estudos realizados por nossa equipe, que aliaram análises citogenéticas a inferências filogenéticas e análises de distância genética de populações da Amazônia a princípio identificadas como representantes de *Physalaemus ephippifer*, revelaram ainda maior diversidade nesse grupo, que ficou conhecido como **complexo *P. cuvieri* – *P. ephippifer*** (Nascimento et al., 2019). Dentre os espécimes, apenas machos foram analisados, diferentes citótipos foram reconhecidos, diferenciados pela posição e/ou número de NORs no cromossomo 8. Os cariótipos dos espécimes de Monte Alegre-PA, Óbidos-PA, Alenquer-PA, Prainha-PA e Curuá-PA (Citótipo I, fazem parte do clado oeste do Pará) mostraram uma NOR pericentromérica no braço curto e uma terminal no braço longo do par cromossômico 8. Nos cariótipos dos machos do Parque Nacional do Viruá-

RR (Citótipo II) apenas uma NOR foi detectada, localizada na região pericentromérica do braço curto do par 8. Os exemplares portadores dos Citótipos I e II foram reunidos em um mesmo clado (*Physalaemus* sp.), que mostrou uma subestruturação que acompanha a variação cariotípica detectada. O clado que reúne os Citótipos I e II é grupo-irmão daquele que agrupa *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” (Nascimento et al., 2019; Fig. 1).

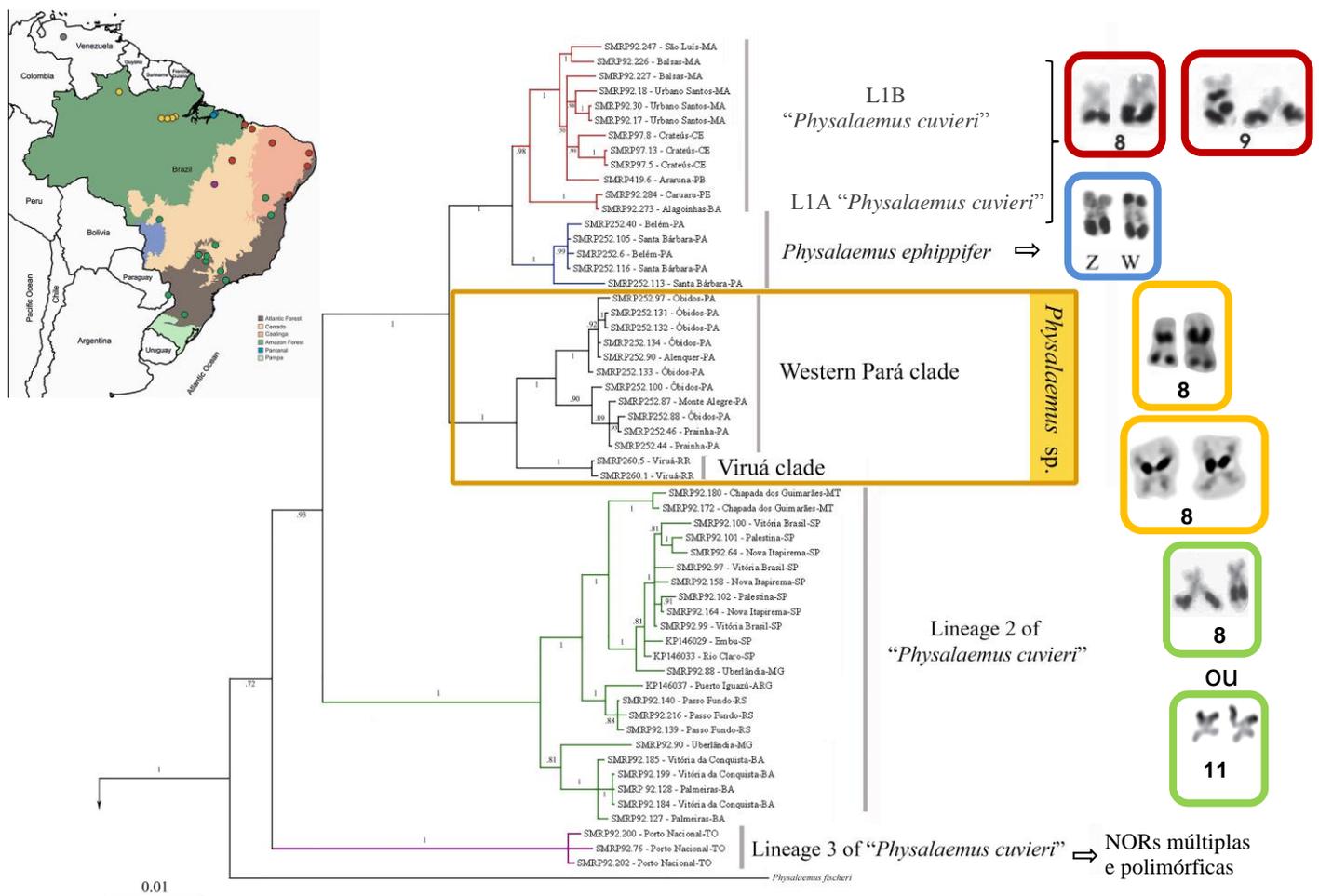


Figura 1. Relações filogenéticas do complexo *Physalaemus cuvieri* – *P. ephippifer* inferidas por Nascimento et al. (2019) com base no fragmento mitocondrial H1, que inclui seqüências dos genes ribossomais 12S e 16S e do gene para RNAt-Val. Os cromossomos portadores de NOR em *Physalaemus ephippifer* e nos citótipos encontrados por Nascimento et al. (2019), impregnados por prata, estão apresentados ao lado dos clados correspondentes. (Figura adaptada de Nascimento et al., 2019.). L1A e L1B referem-se às Linhagens 1A e 1B de “*P. cuvieri*”.

A análise conjunta dos dados levantados por Lourenço et al. (2015) e Nascimento et al. (2019) sugere a presença de 4 a 7 espécies no grupo que atualmente inclui apenas as espécies nominais *Physalaemus cuvieri* e *P. ephippifer* (Fig. 1). A imprecisão nas hipóteses de delimitação do número de possíveis espécies se deve à inferência de uma a três espécies no clado que inclui *P. ephippifer* e as linhagens de “*P. cuvieri*” denominadas de Linhagens 1A e 1B por Lourenço et al. (2015) e à inferência de uma ou duas espécies no clado que inclui a população encontrada no Parque Nacional do Viruá-RR e em localidades do estado do Pará (Nascimento et al., 2019) (Fig. 1). A distância genética inferida com base no gene ribossomal 16S entre a população de Viruá-RR e o clado referente aos espécimes do Pará é de 2%, valor abaixo daquele que foi sugerido por Fouquet et al. (2007) como um bom indício para a distinção de espécies candidatas (i.e., 3%). Sabe-se, no entanto, que a utilização apenas desse parâmetro é insuficiente para qualquer decisão taxonômica e que valores inferiores a 2% podem ser encontrados nas análises de distância genética do gene 16S de espécies válidas (exemplo em Guarnizo et al., 2012). A população de Viruá-RR e o clado referente aos espécimes do Pará também diferiram citogeneticamente, tendo sido encontrada uma NOR terminal no cromossomo 8 nos espécimes de Viruá, não observada nos indivíduos do Pará (Figura 2 de Nascimento et al., 2019). Assim como a distância genética, essa diferença citogenética encontrada entre esses clados é consistente tanto com variação interespecífica quanto com variação interpopulacional. Dessa forma, os dados moleculares e citogenéticos obtidos referentes aos clados Oeste do Pará e Viruá permanecem inconclusivos.

De maneira similar, as distâncias genéticas inferidas entre as linhagens 1A e 1B de “*Physalaemus cuvieri*” e a linhagem de *P. ephippifer* são baixas (entre 1,3 e 1,7%, tabela 1). Nesse caso, no entanto, chama atenção a divergência citogenética encontrada, já que cromossomos sexuais heteromórficos, que compõem o sistema ZZ/ZW de determinação sexual, são encontrados em *P. ephippifer* (Nascimento et al., 2010; Fig. 1 desse trabalho), mas não nas populações de “*Physalaemus cuvieri*” já analisadas citogeneticamente (Quinderé et al., 2009). A possível implicação de tal variação cariotípica no isolamento reprodutivo desses grupos é, no entanto, desconhecida. Cromossomos sexuais heteromórficos mostraram ter um importante papel no isolamento reprodutivo pós-zigótico, diminuindo a aptidão dos híbridos, gerando descendentes inférteis ou até inviáveis, e conseqüentemente na especiação (Saether et al., 2007; Masly & Presgraves, 2007; Presgraves, 2008; Graves, 2016; Dufresnes et al., 2016). Em espécies de grupos

taxonômicos distintos, o nível de isolamento reprodutivo é alto para cromossomos sexuais heteromórficos, intermediário em cromossomos homomórficos e baixo para os que apresentaram ausência de cromossomos sexuais (Lima, 2014). Uma forma dos cromossomos sexuais contribuírem para o isolamento reprodutivo ocorre de acordo com a “Regra de Haldane”, que afirma que geralmente é o sexo heterogamético do híbrido interespecífico que está ausente, é raro ou é estéril. Outra forma é devido ao “Grande Efeito X” ou “Grande Efeito Z” (Regra de Coyne), que trata da grande colaboração do cromossomo X/Z que pode tornar os híbridos heterogaméticos inviáveis ou estéreis, em comparação aos autossomos (Turelli e Moyle, 2007).

Dessa forma, é possível que essa variação cariotípica encontrada entre as referidas linhagens seja uma barreira reprodutiva pós zigótica que possa estar impedindo o fluxo gênico entre elas, e que as baixas distâncias genéticas obtidas sejam devido ao curto período de tempo não ter sido suficiente para acumular variações genéticas.

Assim, torna-se de grande relevância um estudo mais aprofundado sobre a relação entre a Linhagem 1 (que inclui as linhagens 1A e 1B) de “*Physalaemus cuvieri*” e *P. ephippifer*, a fim de melhor avaliar as hipóteses de especiação (incipiente ou não) nesse grupo. Nos trabalhos que descreveram a variação entre as referidas linhagens, foram incluídos indivíduos de *P. ephippifer* provenientes de apenas uma pequena área (que corresponde a localidades em Belém-PA e Santa Bárbara-PA; Figura 1; (Nascimento et al., 2019). Além disso, é possível notar nesses estudos um *gap* amostral entre as áreas de ocorrência de *P. ephippifer* e da Linhagem 1. Por essa razão, o estudo mais detalhado dos aspectos evolutivos envolvidos na diferenciação entre a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” e *P. ephippifer* deve incluir indivíduos de áreas próximas àquelas já amostradas previamente para ambas as linhagens em questão. É justamente nesse contexto em que se insere o presente estudo.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Analisar espécimes encontrados entre as áreas de ocorrência conhecidas atualmente para *Physalaemus ephippifer* e a Linhagem 1 de “*Physalaemus cuvieri*”, por meio de análises citogenéticas, filogenéticas e de distância genética, para avaliar se há evidências de hibridação entre as duas linhagens em questão e, assim, auxiliar na análise de delimitação de espécies.

2.2 Objetivos Específicos

- Inferir, com base em sequências de DNA mitocondrial e marcadores RAD-seq, a relação filogenética entre *P. ephippifer*, a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” e espécimes de localidades situadas entre a área de distribuição conhecida para *P. ephippifer* e Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”.
- Descrever os cariótipos de espécimes de localidades situadas entre a área de distribuição conhecida para *P. ephippifer* e Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” e compará-los com aqueles já conhecidos para o complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Área de interesse e táxons amostrados

Cinco diferentes locais situados entre as áreas de distribuição conhecidas para *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” foram amostrados. São eles: São Pedro da Água Branca-MA, Vila Nova dos Martírios-MA, Trecho Seco/Imperatriz-MA (SPAB-VNM-TS/Imp), e Parauapebas-PA (Fig. 2, Tabela S1). Adicionalmente, aumentamos a amostra de Balsas-MA, localidade situada no limite oeste da área de distribuição conhecida para a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. As coletas foram realizadas com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (ICMBio/SISBIO) (processo #32483) e os exemplares coletados foram depositados na coleção do Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso” da Universidade de Campinas (ZUEC) ou na coleção da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Foi analisado um total de 144 indivíduos pertencentes ao complexo *Physalaemus cuvieri*-*Physalaemus ephippifer*. Trinta e dois exemplares coletados em SPAB-VNM-TS/Imp foram incluídos em análises filogenéticas, análises de distâncias genéticas, rede de haplótipos e tempo evolutivo, realizadas com base em sequências de DNA mitocondrial. Análises filogenéticas baseadas em marcadores nucleares do tipo RAD-seq foram também realizadas e incluíram 14 desses indivíduos, além de 26 outros exemplares do complexo de espécies *P. cuvieri* – *P. ephippifer*.

Como *outgroup*, foram incluídos representantes de todas as demais espécies do grupo *P. cuvieri* e também representantes dos outros quatro grupos de espécies do Clado *Physalaemus cuvieri* (ver Lourenço et al., 2015 para detalhes sobre a composição desses clados), a saber: grupo *P. biligonigerus* (espécie incluída: *P. marmoratus*), grupo *P. henselii* (espécie incluída: *P. fernandezae*), grupo *P. gracilis* (espécie incluída: *P. barrioi*) e grupo *P. ofersii* (incluída: *P. feioi*) (Tabela S1). Foi também incluído um representante do clado *P. signifer*, indicado como raiz nas análises filogenéticas (espécie incluída: *P. nattereri*) (Tabela S1). A matriz utilizada para as análises filogenéticas incluiu genes ribossômicos 12S e 16S e o gene para RNAt-Val (fragmento H1), com cerca de 2300 bp.

3.2 Extração de DNA genômico

Foi realizada extração de DNA genômico de 75 indivíduos a partir de fragmentos de fígado ou músculo, utilizando o método TNES, como descrito por Medeiros et al. (2013), com autorização da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade de Campinas (CEUA/UNICAMP) (processo #4902-1/2018).

Após a extração do DNA genômico, o DNA foi quantificado em NanoDrop para a obtenção da concentração do material e em seguida submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a sua integridade.

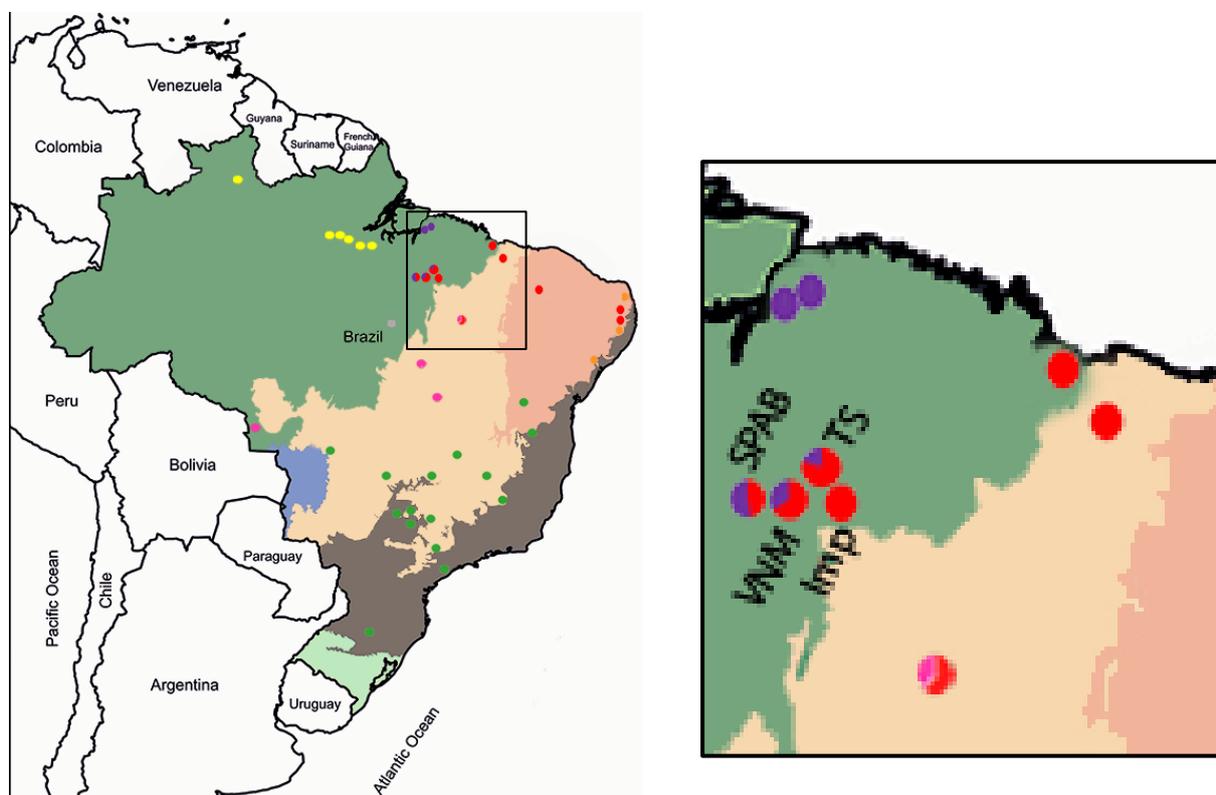


Figura 2. Distribuição geográfica dos exemplares do complexo de espécies *Physalaemus cuvieri* – *P. ephippifer* incluídos neste estudo. Em amarelo, *Physalaemus* sp. (conforme Nascimento et al., 2019); em roxo, *P. ephippifer*; localidades da área de interesse - São Pedro da Água Branca (SPAB), Vila Nova dos Martírios (VNM), Trecho Seco (TS) e Imperatriz-MA (Imp); em cinza, região de Parauapebas-PA; em vermelho, Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”; em vinho, indivíduos de Balsas, em verde, Linhagem 2 de “*P. cuvieri*”; e em rosa, Linhagem 3 de “*P. cuvieri*”, em amarelo, *Physalaemus* sp.

3.3 Obtenção e análises de sequências mitocondriais

3.3.1 Obtenção de sequências nucleotídicas mitocondriais

A partir dos produtos da extração de DNA genômico, foram realizadas reações de PCR com os pares de *primers* MVZ 59 (Graybeal, 1997) - Titus I (Titus & Larson, 1996), e 12L13 (Feller & Hedges, 1998) - 16Sbr (Palumbi et al., 1991). Os produtos dessas reações de PCR foram purificados com o auxílio do kit *Wizard SV and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo instruções do fabricante. As amostras purificadas foram submetidas a reações de sequenciamento Sanger, por interrupção da amplificação ao introduzir ddNTP marcados com fluorocromos usando o kit *BigDye Terminator (Applied Biosystems)*, de acordo com instruções do fabricante, utilizando os *primers* já citados e também MVZ50 (Graybeal, 1997), 16SL2a (Hedges, 1994), 16H10 (Hedges, 1994) e 16Sar (Palumbi et al., 1991).

A leitura das sequências foi realizada pelo setor de sequenciamento de DNA da empresa "Myleus Análises Genéticas SA". As sequências obtidas foram editadas com o uso do *software CodonCode Aligner v.5.1.5* e *Bioedit v.7.2.6* (Hall, T.A., 1999). As sequências foram alinhadas, juntamente com as disponíveis para *Physalaemus* do grupo *P. cuvieri* (Lourenço et al., 2015), utilizando o programa *Mafft online* e a estratégia G-INS-i (<http://www.trex.uqam.ca/index.php?action=mafft>).

3.3.2 Análises filogenéticas

Inferências filogenéticas foram geradas com os critérios de máxima parcimônia (Figura Suplementar 1) e máxima verossimilhança a partir do fragmento mitocondrial H1 (que inclui os genes ribossomais 12S e 16S e o gene para RNAt-Val). As árvores mais parcimoniosas foram obtidas por busca heurística no *software T.N.T v.1.1 (Tree Analysis Using New Technology)*, Goloboff et al., 2003), realizada através da opção *new technology search*, que incluiu *sectorial searches*, *ratchet*, *tree drifting* e *tree fusing*. O menor comprimento das árvores foi atingido 100 vezes durante a busca e elas foram obtidas de

driven searches. Os *gaps* resultantes do alinhamento das sequências foram considerados como quinto caráter. O suporte dos nós foi avaliado pela análise de *Bootstrap* com 1000 pseudorréplicas, realizada por *Traditional Search* no *T.N.T.*

A análise sob o critério de máxima verossimilhança foi realizada utilizando o *software MrBayes* v.3.2.6 (Ronquist et al., 2011), com o modelo evolutivo GTR+I+G, estimado pelo programa *MrModelTest* v.2.3 (Nylander, 2004) como o melhor modelo para a matriz em análise. Duas análises simultâneas foram executadas, com quatro cadeias em cada uma delas (três aquecidas e uma fria). O número de gerações executadas foi aumentado até que o valor de ASDSF (Desvio Padrão Média de Frequências de Divisão) fosse inferior a 0,01, tendo sido atingido um total de 50 milhões de gerações na análise. Uma árvore foi amostrada a cada 100 gerações e uma topologia de consenso com a probabilidade posterior para cada nó foi produzida depois do descarte das primeiras árvores geradas (25% iniciais). O programa *Tracer* (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para verificar a convergência dos parâmetros e valores de ESS (*Efctive sample size*).

3.3.3 Distância genética

A distância genética entre e dentro das principais linhagens do complexo *P. cuvieri-P. ehippifer* inferidos nas análises filogenéticas foi estimada por *p-distance*, com o auxílio do *software MEGA* v.10.0.5 (Tamura et al., 2013). Os haplótipos mitocondriais reconhecidos na área de interesse também foram comparados. Os *gaps* de alinhamento foram desconsiderados nas comparações par-a-par.

Para essa análise, além da matriz composta pelos fragmentos mitocondriais H1 de 151 sequências de 2323 pb (que contêm sequências dos genes ribossomais 12S e 16S, e o gene para RNAt-Val) também foi utilizada uma matriz composta pelos fragmentos 16S com 161 sequências de 1435 pb. Esta última foi delimitada pelo par de primers 16Sar e 16Sbr, segmento amplamente utilizado na análise de variações intra e interespecíficas em anuros (Fouquet et al., 2007).

3.3.4 Rede haplotípica

Fragmentos de DNA mitocondrial H1, com 2323 pb, referentes a 122 dos indivíduos pertencentes ao complexo *P. cvieri-P. ephippifer* foram utilizados para a construção de uma rede de haplótipos. Os haplótipos foram gerados utilizando o *software DNAsp v.5.10.01* (Librado and Rozas, 2009). Sítios com *gaps* não foram considerados. A árvore de redes de haplótipos foi gerada a partir do *software Network v.2.0.1.1*. (Bandelt et al,1999), pelo cálculo de *Median Joining* (MNJ), seguindo instruções do tutorial do programa.

3.3.5 Tempo de divergência

Uma análise de relações evolutivas e tempo de divergência entre as linhagens foi realizada utilizando o *software Beast v.2.5.2* (Drummond et al., 2013) por análise Bayesiana. Para descobrir em que momento aproximadamente ocorreram as separações entre as linhagens em milhares de anos de acordo com os caracteres utilizados, nesse caso, sequências de mtDNA.

Os parâmetros foram definidos utilizando o programa *BEAUti v.2.5.2* e o modelo evolutivo utilizado foi o GTR, como estimado pelo *MrModelTest v.2.3*. Foi utilizado o pacote *Beast-Classic* e *Beastlabs*, que contém os modelos filogeográficos. O modelo de relógio molecular foi relaxado, o que significa que as taxas de substituição de cada ramo são obtidas de maneira independente de uma única distribuição log normal discretizada, distribuídas exponencialmente. A taxa de mutação considerada para H1 foi de 0.0026 (taxa de substituição por sítio por milhão de anos), taxa estimada por Evans et al. (2004) com base na análise do fragmento H1 de espécies de Pipoida. O modelo de prioridade para cada parâmetro foi o *Yule model* (para um gene a uma taxa fixa) incluindo os *outgroups*. Foram rodadas 80 milhões de gerações com o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), e foi amostrada uma árvore a cada 10000 gerações. Uma árvore consenso foi obtida através do *software TreeAnnotator v1.10.4* (Drummond et al., 2013) removendo 10% das árvores menos prováveis. O programa *Tracer* (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para verificar a convergência dos parâmetros e atingir valores de ESS (*Efetive sample size*) maiores que 200. Esses valores de ESS representam o tamanho efetivo da amostra, ou seja, o número de tentativas efetivamente

independentes da distribuição posterior à qual a cadeia de Markov é equivalente. Se o ESS de um parâmetro for baixo, a estimativa da distribuição posterior desse parâmetro será fraca e o desvio padrão será grande.

3.4 Obtenção e análises de sequências RAD-seq

O DNA utilizado foi obtido conforme descrito no item 4.2. Para a obtenção das sequências de interesse, foi utilizado o protocolo 3RAD (triple-digest ADseq) proposto por Bayona-Vásquez et al. (2019).

3.4.1 Construção de bibliotecas

Cerca de 100 ng de cada amostra de DNA foram digeridas com as enzimas MspI e BamHI (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*; 10 U de cada enzima) por 1h a 37°C. Os fragmentos de restrição foram ligados a adaptadores específicos (R1 e R2) para cada uma das enzimas, com o auxílio de T4 DNA ligase (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*). Para tanto, o material foi incubado a 22°C por 20 min. Para que o produto de ligação de fragmentos de restrição entre si fosse removido, o material foi, então, incubado a 37°C por 10 min (duas vezes), o que permitiu a ação das enzimas de restrição ainda presentes. Dímeros entre os dois tipos de adaptadores não são esperados devido à ausência do grupo fosfato na extremidade 5' de um deles, enquanto dímeros resultantes da ligação entre adaptadores fosforilados foram eliminados pela ação da enzima ClaI (*New England BioLabs, Ipswich, MA, USA*; 10 U). Diferentes tipos de adaptadores R1 e R2 foram utilizados, cada um contendo um identificador específico. Para a inativação das enzimas usadas nessas etapas, o material foi incubado a 80°C por 20 min.

Os fragmentos de restrição ligados a adaptadores R1 e R2 foram reunidos em um único tubo e purificados com o auxílio de contas magnéticas (*SpeedBeads – FisherSci*) diluídas em NaCl-PEG, na proporção 1,2:1 (*SpeedBeads:DNA*), de acordo com Rohland & Reich (2012). O DNA ligado às contas magnéticas foi lavado em etanol 80% (duas vezes) e ressuspendido em 33 µL de TE (10 mM de Tris pH 8; 0,2 mM de EDTA). Aos fragmentos resultantes dessa etapa foram acrescentados segmentos adicionais, contendo

índexes específicos, com o auxílio de PCR na presença de *primers* iTru5 e iTru7 (Fig. 3). Para isso, em 25 μL de reação foram combinados com 2 μL de amostra de DNA (resultante da etapa anterior), 2,5 μL de *primer* iTru5-8N a 5 μM , 2,5 μl de *primer* iTru7 a 5 μM , 0,3 mM de cada dNTP, tampão *KAPA HiFi Fidelity Buffer* (1 x) e 0,5 U de DNA Polimerase *KAPA HiFi Hotstart* (*KAPA Biosciences*, Boston, MA, USA). As amostras foram incubadas a 95°C por 2 min e, em seguida, a 16 ciclos, compostos por 20 seg a 98°C, 15 seg a 60°C, e 30 seg a 72°C. Por fim, as amostras permaneceram a 72°C por 5 min. O amplificado por PCR foi purificado com o auxílio de *SpeedBeads*, lavado em etanol 80% e ressuspendido em 10 μL de TLE.

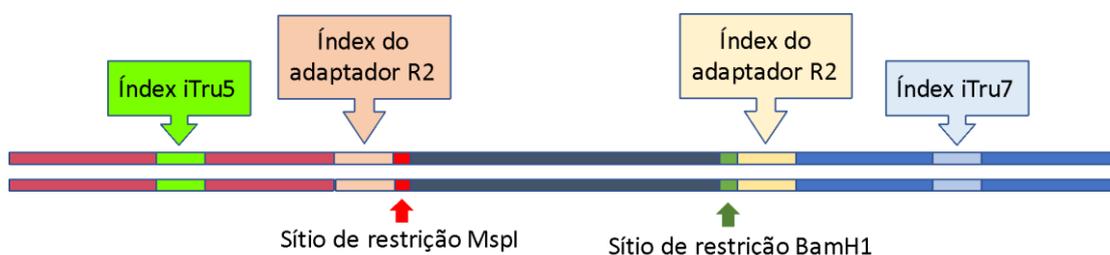


Figura 3: Estrutura geral dos fragmentos que compuseram as bibliotecas RAD-seq que foram geradas no presente estudo. O fragmento de interesse está representado em cinza.

3.4.2 Sequenciamento e Análise de sequências RAD-seq

Foram obtidas bibliotecas RAD-seq de 14 exemplares de indivíduos de SPAB-TS/Imp (SMRP 92.3, 92.4, 92.7-92.9, 92.11, 92.12, 92.311-92.317). As bibliotecas foram sequenciadas pela *Georgia Genomics Facility*, utilizando plataforma *Illumina HiSeq*, e cerca de 2 milhões de *reads* (*paired-end* 150 nt *reads*, *PE150*) foram obtidas para cada exemplar.

As *reads* geradas foram analisadas conjuntamente com aquelas sequências obtidas anteriormente de *P. ephippifer*, das Linhagens 1-3 de “*P. cuvieri*” e de *Physalaemus* sp. (Tabela 1; Nascimento et al., 2019), utilizando o programa *Ipyrad* (v. 0.7.28 (Eaton, 2014; Eaton & Overcast, 2018; <http://ipyrad.readthedocs.io>). *Reads* com *phred scores* abaixo de 33 foram descartadas e apenas locos com menos de 5 bases com sequenciamento dúbio foram retidos. O limite usado para a função *Clustering* foi de 85% e

o número mínimo de amostras por loco foi 4. De um total de 198055 locos analisados, 33415 foram retidos após a filtragem e submetidos à análise filogenética no programa *RAxML* (Stamatakis, 2006), considerando o modelo evolutivo GTR + G.

3.5 Análises citogenéticas

Foi realizada injeção intraperitoneal de colchicina 2% (0,2 mL/g do animal) em 21 espécimes de *Physalaemus* coletados para obtenção de preparações cromossômicas. Após cerca de quatro horas, foi realizada a eutanásia dos animais anestesiados com xilocaína 2% (50 mg/g de peso do animal, administrados sobre a pele, na região abdominal), para a remoção do intestino e testículos de machos. Para a obtenção de suspensões celulares, foi utilizado o método proposto por King & Rofe (1976), com as modificações apresentadas por Gatto et al. (2018), como descrito brevemente a seguir. Os intestinos foram cortados longitudinalmente para exposição da superfície epitelial interna e inseridos em solução de citrato de sódio 0,9% durante 40 minutos, e os testículos inseridos em água destilada gelada por 15-20 minutos. Em seguida, intestino e testículos foram transferidos para recipientes contendo fixador metanol-ácido acético (3:1). Os testículos foram cortados em pequenos fragmentos com tesoura cirúrgica e o epitélio intestinal foi raspado com o auxílio de uma espátula de plástico. As suspensões celulares resultantes foram aspiradas diversas vezes com pipeta Pasteur para desagregação das células. O produto obtido em cada caso foi então centrifugado a 800 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o material ressuspendido em fixador e armazenado em freezer a -20°C. Para a obtenção das preparações cromossômicas, as suspensões celulares foram gotejadas em lâminas limpas. O protocolo aqui descrito foi aprovado pela CEUA/UNICAMP (processo #4902-1/2018).

Também foram utilizadas suspensões celulares obtidas previamente, mantidas na coleção SMRP do Laboratório de Estudos Cromossômicos (LabEsC) do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.5.1 Colorações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa 10% e sequencialmente submetidas a bandamento C (conforme Sumner, 1972), que revela regiões de heterocromatina constitutiva, e coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0,5 µg/uL). Também foi utilizada a técnica AgNOR de impregnação por prata, de acordo com Howell & Black (1980), para identificação de NORs.

Os cromossomos em metáfase foram analisados em microscópio de fluorescência *Olympus Bx60* com câmera digital (Q-Color3). As imagens foram editadas com o auxílio dos programas *Adobe Photoshop CS3* e/ou *Image ProPlus 4.0* (*Media Cybernetics*, Bethesda, MD, USA).

4 Resultados

4.1 Rede de haplótipos mitocondriais

Foi realizada uma análise de rede de haplótipos com 122 sequências de 2323 caracteres obtidas para o complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer* utilizando o fragmento mitocondrial H1 (12S, RNAt-Val e 16S). A partir delas, 62 haplótipos mitocondriais distintos foram encontrados (Fig. 4).

As 31 sequências analisadas dos indivíduos pertencentes a SPAB-VNM-TS/Imp foram agrupadas em oito haplótipos distintos, 19 pertencentes ao Haplogrupo M1 de SPAB-VNM-TS/Imp, que possui haplótipos mais similares aos da Linhagem 1 B de “*P. cuvieri*”, e 12 haplótipos do Haplogrupo M2 de SPAB-VNM-TS/Imp, mais similares aos de *P. ephippifer* (Fig. 4).

Um haplótipo (H13) foi compartilhado entre SPAB-VNM-TS/Imp e Balsas, tendo sido encontrado em quinze espécimes de SPAB-VNM-TS/Imp e em dois exemplares de Balsas (Haplogrupo M1 de SPAB e Haplogrupo M1 de Balsas, respectivamente).

Também foram encontrados haplótipos da região de Balsas mais similares aos da Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” (chamados aqui de Haplogrupo M2 de Balsas).

Os haplogrupos que se referem à Linhagem 4 de “*P. cuvieri*” inclui espécimes de Parauapebas-PA.

O primeiro grupo com maior diversidade haplotípica foi dos indivíduos pertencentes à Linhagem 2 de “*P. cuvieri*”, sendo estes também os mais amplamente distribuídos geograficamente. O segundo foi o da Linhagem 1B de “*P. cuvieri*”.

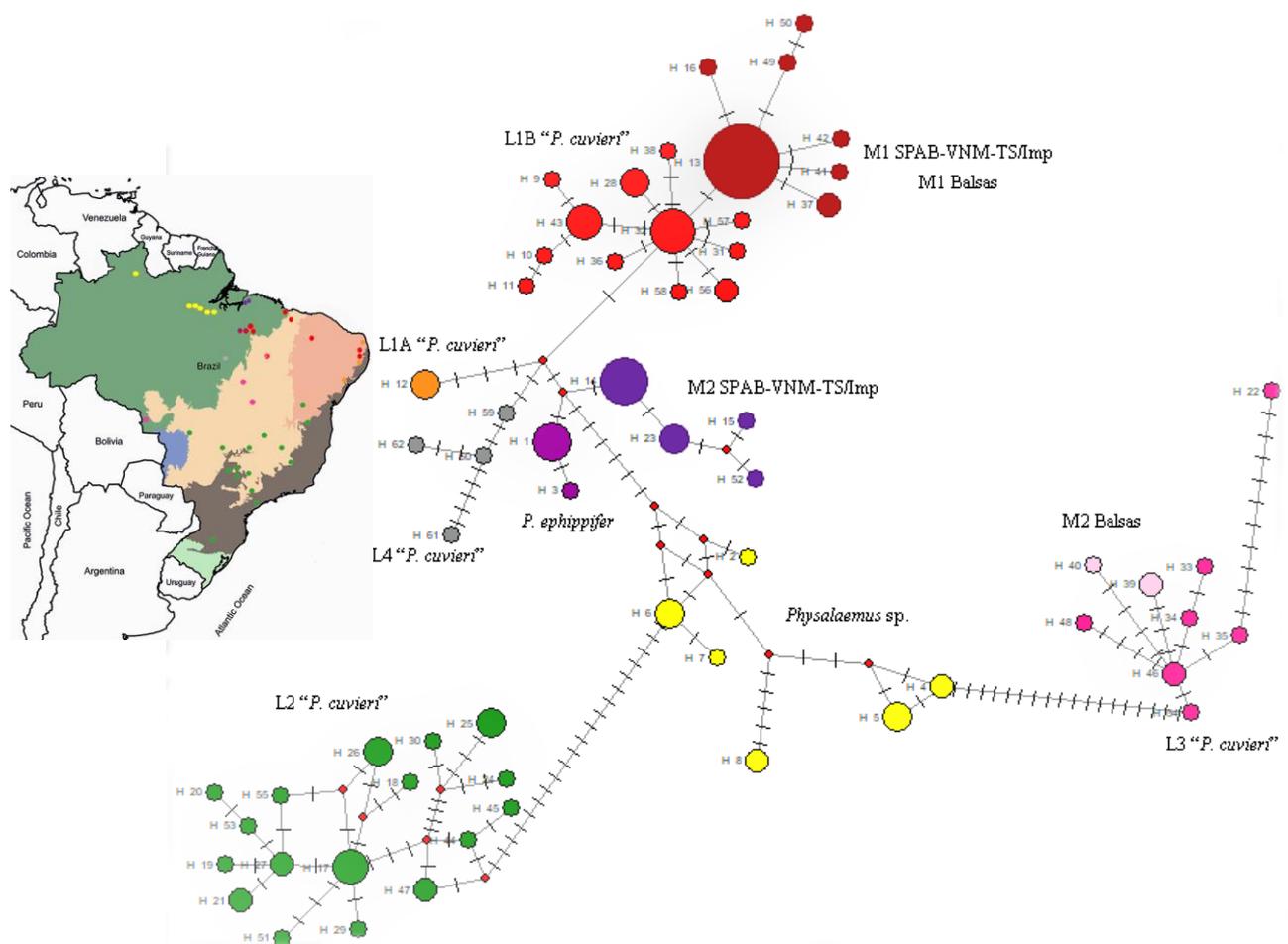


Figura 4. Rede haplotípica referente ao fragmento mitocondrial H1 (12S, RNAt-Val e 16S) dos indivíduos pertencentes ao complexo *Physalaemus cuvieri*-*Physalaemus ephippifer*, inferida pelo software *Network*. Cada círculo representa um haplótipo, e seu tamanho é diretamente proporcional à frequência do haplótipo em questão. Os traços pequenos entre os haplótipos representam mutações. L1A, L1B, L2, L3 e L4 referem-se às linhagens de “*P. cuvieri*”, M1 e M2 SPAB referem-se aos Haplogrupos de SPAB-VNM-TS/Imp e M1 e M2 Balsas referem-se aos Haplogrupos de Balsas-MA. Os pequenos círculos em vermelho escuro representam os vetores médios, haplótipos intermediários que não foram amostrados e que são inferidos pelo software

durante a análise. Os números ao lado das identificações das linhagens referem-se às frequências haplotípicas.

4.2 Análises filogenéticas e de distância genética

Análises filogenéticas de Máxima Parcimônia (MP) (Fig. Suplementar 1) e Máxima Verossimilhança (MV) (Fig. 5 e Fig. Suplementar 2) mostraram resultados congruentes em relação aos principais clados inferidos a partir das sequências de DNA mitocondrial. Foram encontrados dois haplogrupos distintos dentre os indivíduos de SPAB-VNM-TS/Imp, região localizada entre as áreas de ocorrência de *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de "*P. cuvieri*". O Haplogrupo M1 foi agrupado aos exemplares da Linhagem 1 de "*P. cuvieri*" (distância genética entre Haplogrupo M1 e L1 de "*P. cuvieri*": 0,97% para o fragmento delimitado pelos primers 16Sar e 16Sbr) e o Haplogrupo M2 foi agrupado a *P. ephippifer* (distância genética entre Haplogrupo M2 e *P. ephippifer*: 0,58% para o fragmento delimitado pelos primers 16Sar e 16Sbr) (Tab. 1, fig. 5). É importante ressaltar que em cada um dos haplogrupos foram encontrados indivíduos das diferentes localidades, tendo sido encontrados em São Pedro da Água Branca dez exemplares do Haplogrupo M1 e dez do M2; em Trecho Seco/Imperatriz-MA, quatro do Haplogrupo M1 e um do M2; e em Vila Nova dos Martírios-MA, dois do Haplogrupo M1 e um do M2. A distância genética obtida entre M1 e M2 de SPAB-VNM-TS/Imp foi de aproximadamente 1% para o fragmento ribossomal H1 e de cerca de 1,5% se apenas o fragmento de DNA ribossomal 16Sar-16Sbr for considerado. A distância genética dentro do Haplogrupo M1 de SPAB-VNM-TS/Imp foi de 0,06% e dentro do Haplogrupo M2 de SPAB-VNM-TS/Imp, de 0,2% para o fragmento mitocondrial que compreende os primers 16Sar e 16Sbr.

Também foram encontrados dois haplogrupos distintos dentre indivíduos coletados em Balsas-MA. Um haplogrupo (Haplogrupo M1 de Balsas) foi constituído por sequências de cinco indivíduos, agrupadas dentre as sequências do Haplogrupo M1 de SPAB-VNM-TS/Imp enquanto outro haplogrupo (Haplogrupo M2 de Balsas) reuniu sequências de três indivíduos, que foram agrupadas a sequências incluídas na Linhagem 3 de "*P. cuvieri*". Entre o Haplogrupo M1 e o M2 de Balsas foi encontrada uma alta distância genética (cerca de 6%).

Além de exemplares de Porto Nacional-TO previamente identificados como Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” (ver Lourenço et al., 2015; Nascimento et al., 2019) e do Haplogrupo M1 de Balsas, o clado aqui identificado como Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” também incluiu amostras de Paranã-TO e Vila Bela Santíssima Trindade-MT.

O clado aqui identificado como Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” é grupo-irmão do clado que inclui todas as demais linhagens de “*P. cuvieri*” e *P. ephippifer*. A Linhagem 2 de “*P. cuvieri*” é grupo-irmão do clado que inclui *Physalaemus* sp., *P. ephippifer* e as Linhagem 1A e Linhagem 1B de “*P. cuvieri*”. O clado de *Physalaemus* sp., com exemplares que ocorrem em localidades distribuídas a oeste da área de distribuição das demais linhagens citadas, na Amazônia, compõem o grupo-irmão do clado que inclui “*P. cuvieri*” da Linhagem 1, *P. ephippifer*, os exemplares de Parauapebas-PA e os da região de SPAB-VNM-TS/Imp. O clado de *P. ephippifer* foi inferido como grupo-irmão do que inclui exemplares da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, com uma distância genética entre eles de aproximadamente 1,7% (Tab. 1). Espécimes de Parauapebas-PA foram agrupados em um único clado, descrito aqui como Linhagem 4 de “*P. cuvieri*”, que se apresentou como grupo-irmão de (Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” + Haplogrupo M1 de SPAB-VNM-TS/Imp + Haplogrupo M1 de Balsas), embora com baixo valor de suporte estatístico (Fig.5).

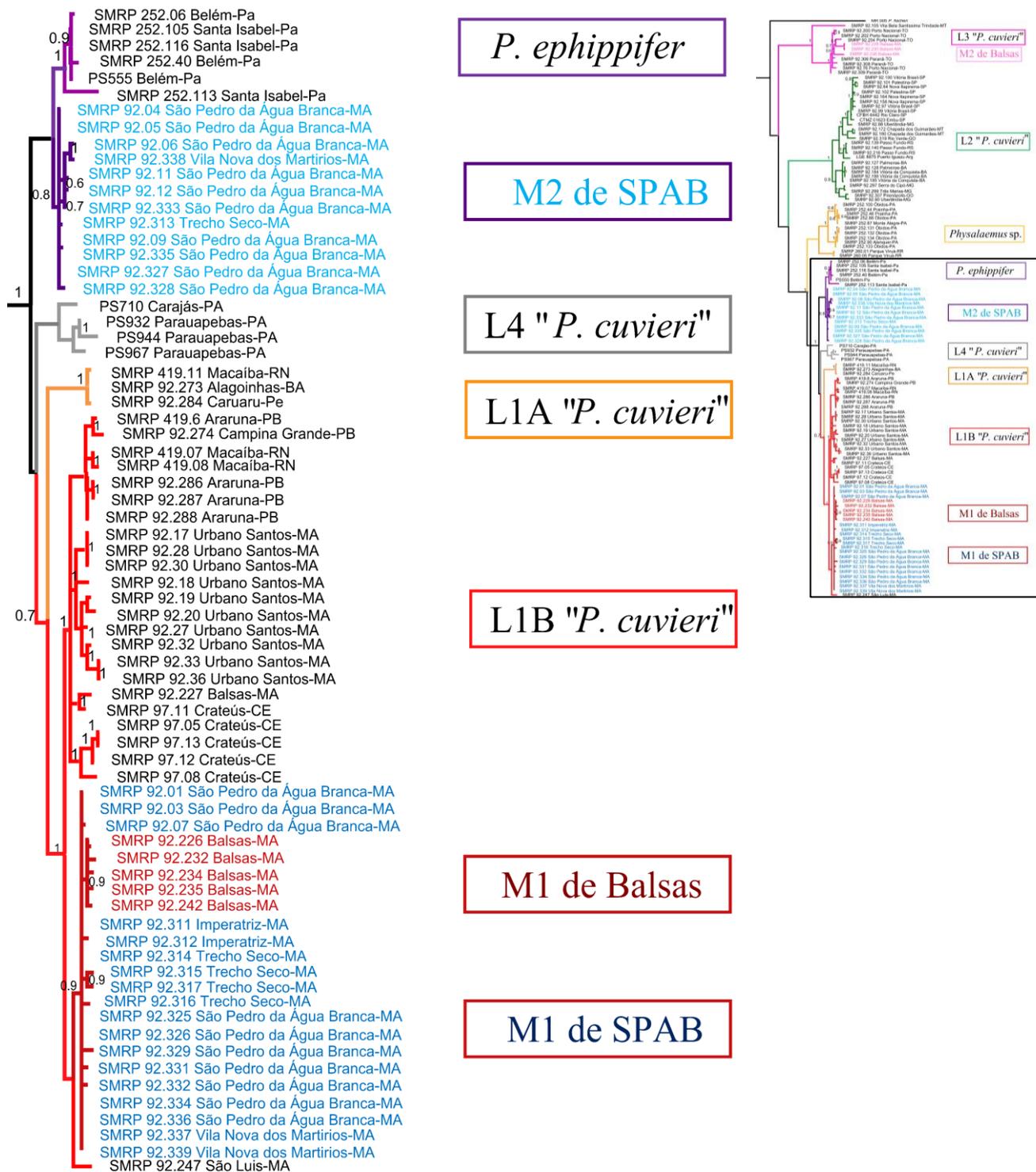


Figura 5. Cladograma inferido pela análise Bayesiana do fragmento mitocondrial H1, mostrando as relações filogenéticas entre clados pertencentes ao complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer*, com destaque para relação entre L1, L4, Haplogrupo M1 e M2 de SPAB e M1 de Balsas. L1A, L1B, L2, L3 e L4 referem-se às linhagens de "*P. cuvieri*". Valores de probabilidade a posteriori maiores do que 50% estão indicados nos nós. O outgroup utilizado na análise foi omitido (o cladograma completo está apresentado na Figura Suplementar 2). M1 e M2 SPAB referem-se aos Haplogrupos de SPAB-VNM-TS/Imp e M1 e M2 Balsas referem-se aos Haplogrupos de Balsas-MA.

Tabela 1. Distância genética (*p-distance*) (%) entre (em amarelo e salmão) e dentro (em cinza) dos principais clados pertencentes ao complexo *P. ephippifer*-*P. cuvieri* inferida pelo *software* MEGA. Variações entre os clados foram inferidas com base no fragmento do gene mitocondrial ribossomal 16S delimitado pelos primers 16Sar e 16Sbr (em amarelo) e com base no fragmento H1 (em salmão). Em cinza, distância genética inferida dentro de cada linhagem com base no fragmento delimitado pelos primers 16Sar e 16Sbr (esquerda) e pelo fragmento H1 (direita). M1 e M2 SPAB referem-se aos Haplogrupos de SPAB-VNM-TS/Imp.

| | L1 " <i>P. cuvieri</i> " | L2 " <i>P. cuvieri</i> " | L3 " <i>P. cuvieri</i> " | <i>P. ephippifer</i> | M1 de SPAB | M2 de SPAB | M1 de Balsas | M2 de Balsas | L4 " <i>P. cuvieri</i> " | <i>Physalaemus</i> sp. |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------------------|------------------------|
| L1 " <i>P. cuvieri</i> " | 1.14/0.70 | 4.74 | 4.77 | 1.39 | 0.68 | 1.26 | 0.73 | 5.16 | 1.51 | 2.52 |
| L2 " <i>P. cuvieri</i> " | 6.15 | 1.54/1.24 | 5.51 | 4.84 | 4.55 | 4.72 | 4.67 | 6.03 | 4.80 | 4.73 |
| L3 " <i>P. cuvieri</i> " | 5.51 | 6.41 | 1.22/1.03 | 5.09 | 4.75 | 4.89 | 4.89 | 1.08 | 5.02 | 5.04 |
| <i>P. ephippifer</i> | 1.72 | 5.90 | 5.71 | 0.26/0.12 | 1.24 | 0.51 | 1.34 | 5.41 | 1.10 | 2.26 |
| M1 de SPAB | 0.97 | 6.02 | 5.69 | 1.54 | 0.06/0.13 | 1.03 | 0.21 | 5.10 | 1.34 | 2.35 |
| M2 de SPAB | 1.76 | 5.85 | 5.52 | 0.58 | 1.49 | 0.20/0.30 | 1.13 | 5.16 | 1.07 | 2.15 |
| M1 de Balsas | 0.99 | 6.01 | 5.68 | 1.56 | 0.10 | 1.49 | 0.14/0.15 | 5.25 | 1.40 | 2.48 |
| M2 de Balsas | 6.23 | 7.45 | 1.24 | 6.43 | 6.33 | 6.20 | 6.38 | 0.00/0.65 | 5.35 | 5.41 |
| L4 " <i>P. cuvieri</i> " | 1.86 | 5.82 | 5.87 | 1.39 | 1.53 | 1.22 | 1.56 | 6.74 | 0.40/0.82 | 2.26 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | 3.61 | 5.99 | 5.72 | 3.21 | 3.53 | 3.05 | 3.49 | 6.63 | 3.16 | 1.03/1.31 |

4.3 Tempo de divergência

De acordo com a análise baseada em sequências mitocondriais, a Linhagem 3 de "*P. cuvieri*", estimada como grupo-irmão de todas as demais linhagens em estudo, foi a que divergiu há mais tempo (~ 8,21 Ma) (Fig.6). Em seguida, há cerca de 6,64 Ma, a Linhagem 2 divergiu do ancestral comum a *P. ephippifer*, Linhagens 1 e 4 de "*P. cuvieri*" e *Physalaemus* sp. (do oeste do Pará e Viruá). *Physalaemus ephippifer*, Linhagem 1 e Linhagem 4 de "*P. cuvieri*" divergiram mais recentemente (entre 3,31 e 3,78 Ma) (Fig. 6 e Fig. Suplementar 3). A divergência entre as linhagens de *P. ephippifer* e L1 de "*P. cuvieri*" são importantes para a investigação de eventos que tenham ocorrido no período que possam ter impulsionado esta separação. Os haplogrupos M1 e M2 de SPAB divergiram muito recentemente, e pode ser que ainda não tenha divergido suficientemente para qualquer tomada de decisão de suas posições taxonômicas.

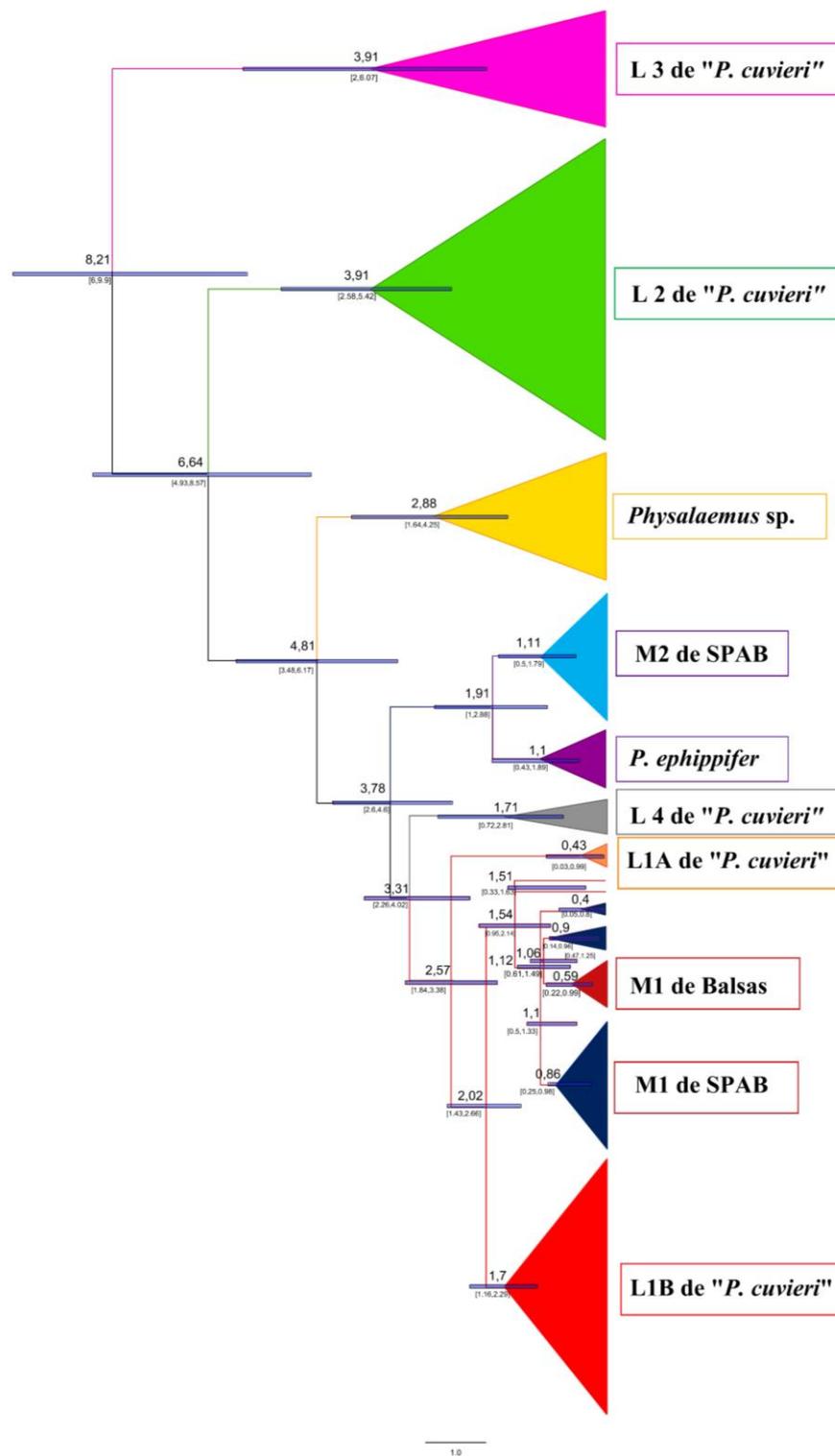


Figura 6. Árvore filogenética e tempo de divergência dos principais clados do complexo *P. cuvieri*-*P. ehippifer*, inferidos com base no fragmento mitocondrial H1 (12S+RNAtval+16S). As barras azuis mostram o intervalo de confiança com 95% de densidade de probabilidade para os tempos de divergência. Os números sobre os nós mostram o tempo de divergência em milhões de anos atrás (Ma), e os números abaixo dos nós revelam os valores do intervalo dos tempos de divergência. Cada linhagem ou haplogrupo foi representada por uma coloração distinta. O

cladograma completo está apresentado na Figura Suplementar 3. M1 e M2 SPAB referem-se aos Haplogrupos de SPAB-VNM-TS/Imp.

4.4 Análises RAD-seq

Os marcadores Rad-seq agruparam os espécimes da área de interesse de acordo com suas localidades, ou seja, indivíduos de São Pedro da Água Branca foram agrupados separadamente dos de Imperatriz e dos de Trecho Seco (Fig. 7). Este resultado difere daquele inferido nas análises das sequências nucleotídicas mitocondriais, que separaram indivíduos das localidades SPAB-VNM-TS/Imp em dois haplogrupos distintos (M1 e M2 de SPAB-VNM-TS/Imp), um agrupado com espécimes da L1 de “*P. cuvieri*” e o outro com *P. ephippifer*. (Fig. 4). Na Tabela S2 foram mostradas as estatísticas obtidas a partir das amostras de dados 3RAD.

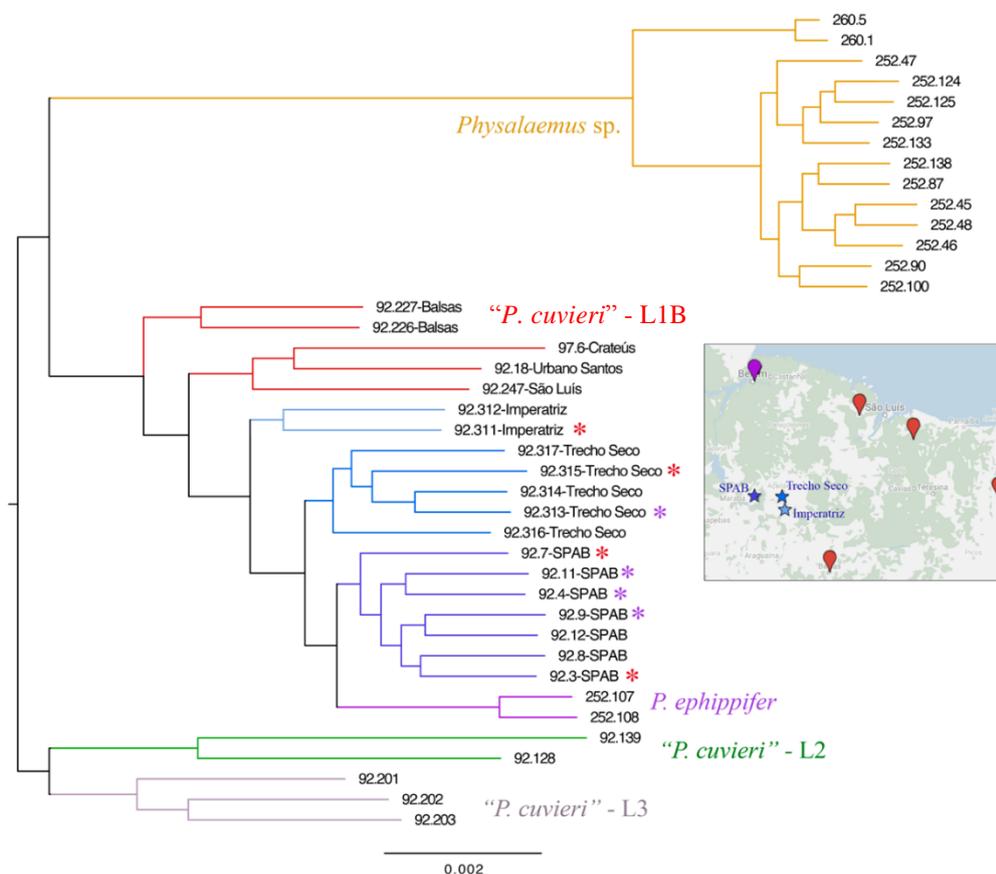


Figura 7. Análise de máxima verossimilhança (por RAXML) dos marcadores RAD-seq gerados para o complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer*. Em destaque, mapa com os sítios amostrados para a obtenção dos exemplares de *P. ephippifer* (roxo), da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” (vermelho) e da região de interesse no presente estudo, que incluiu São Pedro da Água Branca (SPAB), Trecho Seco e Imperatriz (diferentes tons de azul) utilizados nessa análise. *Indivíduos portadores de haplótipo mitocondrial do tipo M1 (similar aos

encontrados na Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”). *Indivíduos portadores de haplótipo mitocondrial do tipo M2 (similar aos encontrados em *P. ehippifer*).

4.5 Análises citogenéticas

4.5.1 Indivíduos de SPAB-VNM

As análises dos cariótipos dos indivíduos de São Pedro da Água Branca e Vila Nova dos Martírios-MA revelaram que todos os indivíduos apresentaram 22 cromossomos, com cinco pares metacêntricos e seis pares submetacêntricos (Fig. 8). Em todos os indivíduos, os pares cromossômicos 7, 8 e 9 foram portadores de NORs (Fig. 8D). No par de cromossomos 7, todos os indivíduos analisados apresentaram NOR no braço longo, e heteromorfismo em relação ao tamanho dessa NOR foi observado em uma fêmea e quatro machos (Fig. 8D). Em relação ao par cromossômico 8, foram identificadas variações tanto no número e localização quanto no tamanho de NORs, tendo sido encontrados cromossomos 8 sem NOR (em condição heterozigota, como encontrado nos exemplares SMRP 92.1 e SMRP 92.338), com NOR intersticial (condição mais comum) e com uma NOR intersticial e uma terminal (morfo encontrado no exemplar SMRP 92.338) (Fig. 8D). Já em relação ao par 9, um heteromorfismo das NORs foi observado nas três fêmeas analisadas, caracterizando cromossomos do sistema sexual ZZ/ZW. Em 9 machos que tiveram o padrão de NORs claramente reconhecido, ambos os cromossomos do par 9 apresentaram dois sítios de NORs no braço longo (um intersticial e um terminal), enquanto em todas as fêmeas analisadas um cromossomo do par 9 também apresentou uma NOR distal no braço curto (Fig. 8D), sendo um possível heteromorfismo cromossômico exclusivo às fêmeas.

Em metáfases coradas com Giemsa, constrições secundárias foram observadas nos cromossomos dos pares 7 e 8 (Figura 8A), e estas coincidem com as localizações das NORs reveladas pelo método Ag-NOR (Figura 8D).

O bandamento C revelou as regiões centroméricas de todos os cromossomos e uma banda intersticial do braço curto dos cromossomos do par 5, tanto em machos quanto em fêmeas, (Fig. 8B-C). Além disso, as NORs do braço longo dos cromossomos do par 9 se mostraram coincidentes com bandas C (Fig. 8B-C). Em todas as fêmeas, o par 9 foi

heteromórfico em relação ao padrão de bandas heterocromáticas. Já em machos além da banda centromérica, os cromossomos do par 9 apresentaram uma forte banda pericentromérica no braço curto e, no braço longo, uma banda pericentromérica e bandas coincidentes com as NORs (Figura 8B-C). Já nas fêmeas, o cromossomo portador de NOR adicional no braço curto também diferiu de seu homólogo pela ausência da banda pericentromérica do braço curto (Figura 8B-C).

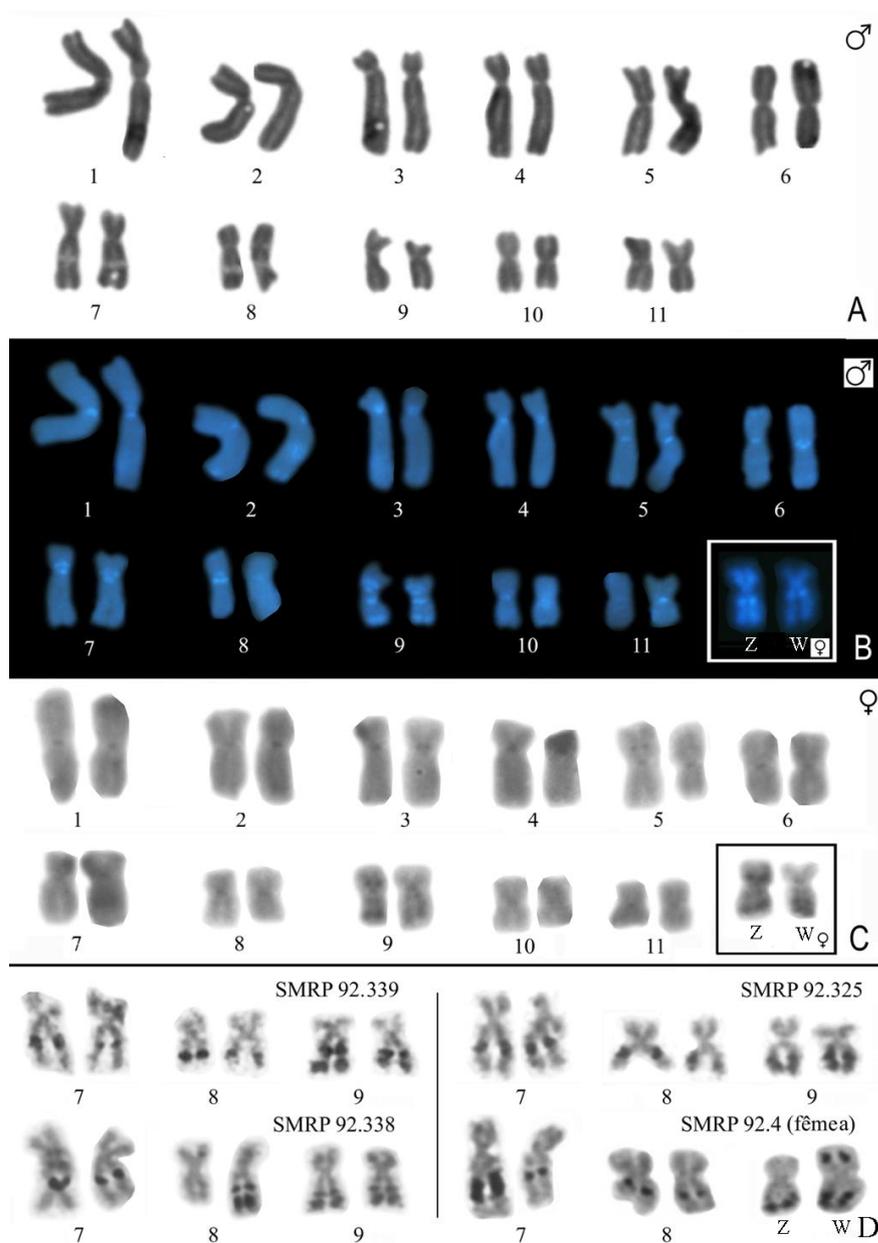


Figura 8. Cariótipo de espécimes de SPAB/VNM. A-B. Cariótipo do macho SMRP 92.325 corado com Giemsa (A) e sequencialmente submetido ao bandamento C e coloração com DAPI (B). Em destaque em B, o par 9 da fêmea SMRP 92.4 submetido ao bandamento C e coloração com DAPI. Em C, cariótipo da fêmea SMRP 92.4 submetido ao bandamento C. Em destaque, o par 9 de outra metáfase da mesma fêmea para

melhor observação das bandas heterocromáticas. D. Cromossomos portadores de NOR de quatro espécimes representantes da variação encontrada na presente análise.

4.5.2 Indivíduos de Parauapebas-PA

Os sete indivíduos (cinco machos e duas fêmeas) de Parauapebas/Carajás-PA analisados apresentaram cariótipo composto por 22 cromossomos, sendo 5 pares de cromossomos metacêntricos e 6 pares de cromossomos submetacêntricos (Fig. 9). Nenhum heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo foi identificado. Em metáfases coradas com Giemsa, constrições secundárias são observadas nos cromossomos do par 8 (Figura 9A), e estas coincidem com as NORs reveladas pelo método Ag-NOR (Figura 9D-E) e co-localizam com bandas C (Fig. 9B-E).

O cromossomo 8 mostrou-se polimórfico tanto em relação ao padrão de bandas C quanto em relação às NORs. Em todos os indivíduos analisados, o braço curto dos cromossomos 8 foi portador de uma banda C pericentromérica, enquanto o braço longo apresentou uma banda C terminal e uma intersticial. Esta última mostrou conspícua variação de tamanho na amostra em questão, podendo ser encontrados distintos tamanhos em um mesmo indivíduo, como no caso do exemplar PS 932 (Fig. 9D).

Em relação às NORs, foi observado polimorfismo tanto referente ao número quanto em relação ao tamanho dos sítios. Três sítios de NOR foram encontrados em 8q, sendo um pericentromérico, um intersticial e um terminal. Na fêmea PS709 e no macho PS712, ambos os homólogos do par 8 apresentaram NOR pericentromérica e NOR intersticial no braço longo. Na fêmea PS709, foi observado notável heteromorfismo de tamanho da NOR intersticial e um dos homólogos 8 apresentou NOR terminal, enquanto no outro, essa NOR não pode ser evidenciada pelo método Ag-NOR (Fig. 9D). Nos exemplares PS932, PS944, PS949 e PS967, ambos os homólogos do par 8 apresentaram as NORs intersticial e terminal. No exemplar PS932, pode ser observado um pequeno heteromorfismo de tamanho tanto em relação à NOR intersticial quanto em relação à NOR terminal (Fig. 9D). As constrições secundárias coincidentes com as NORs, vistas em cromossomos corados com Giemsa, variam em tamanho de acordo com o tamanho das NORs reveladas pelo método Ag-NOR (Fig. 9D).

As NORs do cromossomo 8 colocalizam com bandas reveladas pelo bandamento C. No entanto, o tamanho da NOR e o tamanho da banda C correspondente não estão diretamente relacionados. Isso pode ser comprovado na análise do exemplar PS712, que apresenta a conspícua NOR intersticial colocalizada com uma pequena banda C, enquanto nenhuma NOR foi detectada colocalizada com a notável banda C terminal (Fig. 9E).

Além das bandas citadas acima, o bandamento C revelou as regiões centroméricas de todos os cromossomos e uma banda intersticial no braço curto dos cromossomos do par 5 em todos os espécimes analisados (Fig. 9B-C). Uma banda no braço longo do cromossomo 9 também pode ser observada em algumas preparações. As bandas reveladas pelo bandamento C foram fortemente coradas com DAPI.

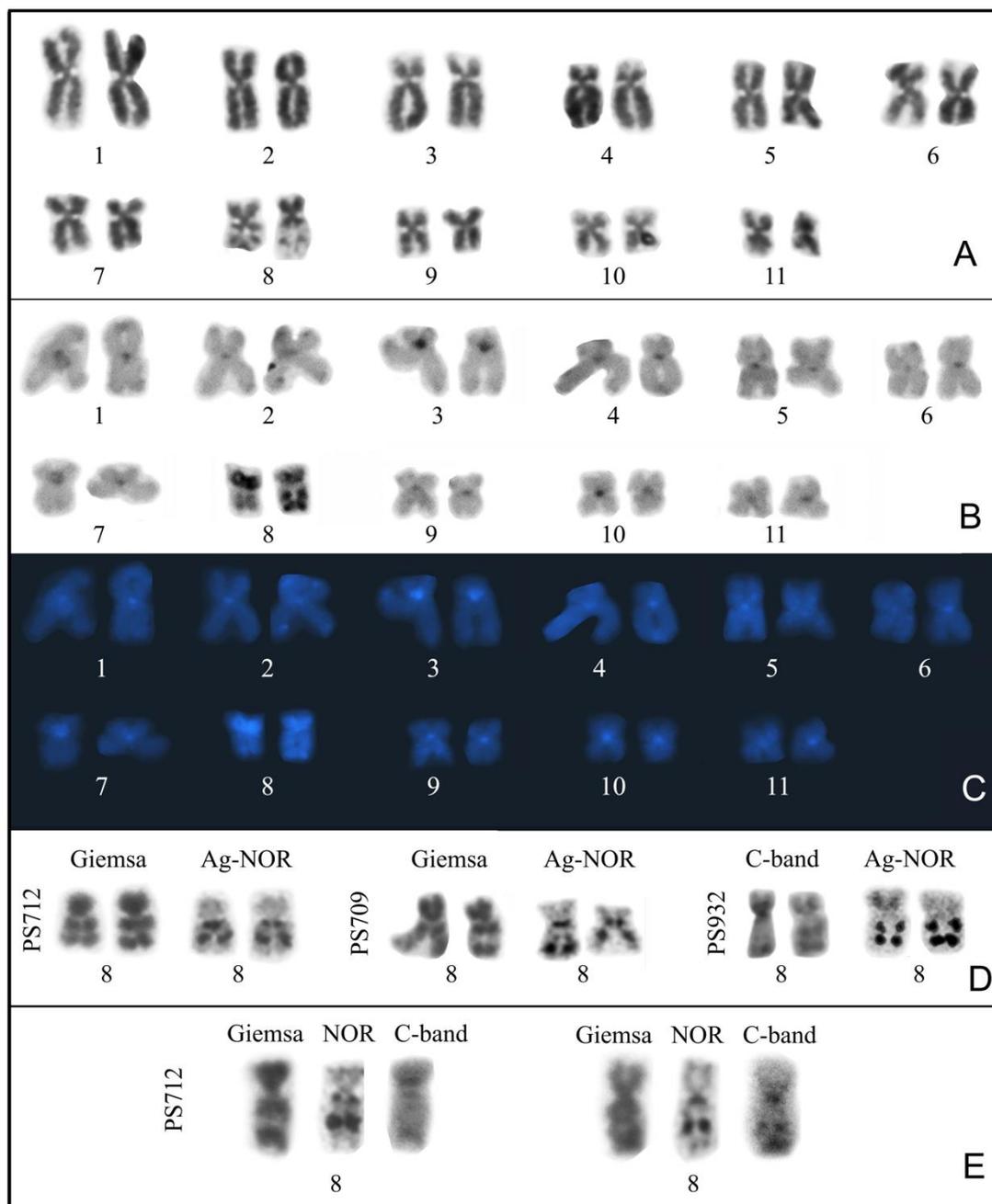


Figura 9. Cariótipo de espécimes de Parauapebas/Carajás-PA. A-C. Cariótipo do macho PS932 corado com Giemsa (A) e submetido ao bandamento C e sequencialmente corado com DAPI (B-C). D. Par cromossômico 8 de três indivíduos (PS712, PS709 e PS932) impregnado por prata após ter sido corado com Giemsa ou submetido ao bandamento C. Note a variação interindividual referente às NORs. E. Cromossomos 8 do exemplar PS712 submetidos sequencialmente a coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação por prata pelo método Ag-NOR. Note em D e E que o tamanho das constrições secundárias vistas em cromossomos corados com Giemsa varia conforme o tamanho das NORs reveladas pelo método Ag-NOR. Note ainda que as NORs co-localizam com bandas C e que não há uma relação direta entre tamanho de NOR e tamanho da banda C.

5 Discussão

5.1 Possível área de contato entre *P. ehippifer* e L1 de “*P. cuvieri*”

A análise de espécimes encontrados entre as áreas de ocorrência conhecidas atualmente para *Physalaemus ehippifer* e a Linhagem 1 de “*Physalaemus cuvieri*” permitiu notar a presença de dois haplogrupos mitocondriais na área de SPAB-VNM-TS/Imp, um deles similar a *P. ehippifer* e outro, à Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Em contraste com os agrupamentos inferidos com base nas sequências mitocondriais, os marcadores RAD-seq agruparam os exemplares de São Pedro da Água Branca separadamente dos de Imperatriz/Trecho Seco. Tais resultados sugerem a ocorrência de contato secundário/introgressão entre *P. ehippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” na região que denominamos de SPAB-VNM-TS/Imp.

O resultado de rede haplotípica foi congruente com os resultados das análises filogenéticas mitocondriais. Revelou que entre os haplótipos que fazem parte do Haplogrupo M1 de SPAB e os da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” há poucos passos mutacionais, havendo inclusive compartilhamento de haplótipo entre Balsas e SPAB. De maneira similar, os haplótipos de *P. ehippifer* e os do Haplogrupo M2 de SPAB mostram grande proximidade genética.

Considerando que os cariótipos de *P. ehippifer* e da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” são distintos (Quinderé et al., 2009; Nascimento et al., 2010), inclusive pela presença de cromossomos sexuais heteromórficos em *P. ehippifer*, seria esperado encontrar indivíduos com cariótipos híbridos na região em estudo se o suposto contato entre as linhagens fosse atual ou muito recente. A análise citogenética, no entanto, não revelou cariótipos constituídos pela simples combinação de cromossomos das duas linhagens. Ao contrário, essa análise detectou características exclusivas nos exemplares de SPAB e região, que os distinguem cariotipicamente de *P. ehippifer* e da linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, embora tenha revelado a presença de heteromorfismo sexual cromossômico (pertencente ao sistema ZZ/ZW) nessa população.

O cromossomo W encontrado em SPAB-VNM se assemelha ao de *P. ehippifer* (Nascimento et al. 2010) por apresentar NOR no braço curto, mas difere deste por não apresentar evidente bloco heterocromático terminal adjacente a essa NOR. Além disso, a

NOR do braço longo do cromossomo W de *P. ephippifer* não é detectada pelo bandamento C, diferindo das NORs do braço longo do cromossomo W de SPAB.

O cromossomo Z dos espécimes de SPAB-VNM difere do cromossomo Z de *P. ephippifer* (Nascimento et al. 2010) por apresentar uma banda heterocromática pericentromérica bem evidente e NORs coincidentes com regiões de banda C. Em relação à morfologia cromossômica e também à presença de NORs coincidentes com regiões heterocromáticas, o cromossomo Z dos espécimes de SPAB-VNM se assemelha aos cromossomos 9 da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” (Quinderé et al., 2009; Lourenço et al., 2015). Outra semelhança encontrada entre o cariótipo de SPAB/VNM e o cariótipo característico da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” (Quinderé et al., 2009; Lourenço et al., 2015) se refere ao par cromossômico 8, portador de NOR nos dois casos. Uma característica que distingue o cariótipo dos exemplares de SPAB-VNM tanto de *P. ephippifer* quanto da linhagem 1 de “*P. cuvieri*” é a presença de NOR no par cromossômico 7.

A não observação de cariótipos mistos na região de SPAB-VNM, resultantes da simples combinação de 11 cromossomos de *P. ephippifer* e 11 cromossomos da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, dá suporte, portanto, para a hipótese de que os eventos de hibridação entre as duas referidas linhagens tenham ocorrido já há algum tempo. Nesse cenário, a introgressão entre essas linhagens pode, inclusive, ter sido fundamental para a evolução cariotípica que resultou na origem de um terceiro tipo de cariótipo, distinto daqueles das duas linhagens citadas.

Futuras análises, que incluam maior número de indivíduos nas análises baseadas em marcadores RAD-seq e, principalmente, exemplares de localidades ao norte e ao sul da região de SPAB-VNM-TS/Imp, são ainda necessárias para uma melhor avaliação da extensão da zona de contato entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Se tais análises mostrarem que a zona de contato/hibridação entre essas linhagens não é extensa, será possível supor que *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” sejam espécies distintas. Um caso semelhante foi encontrado por Dufresnes et al. (2018) em hílideos que ocorrem ao norte e ao sul da Cordilheira dos Apeninos, na Itália. Com base na observação de restrita zona de contato entre linhagens mitocondriais altamente divergentes, esses autores descreveram *Hyla perrini* como uma espécie críptica em relação a *Hyla intermedia*.

Ainda no cenário em que as diferenças entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” se mostrem significativas, será preciso avaliar a possibilidade de que a população de SPAB-VNM-TS/Imp possa ser tratada como uma espécie resultante de um processo de especiação reticulada.

Por outro lado, caso a frequência de hibridação entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” seja elevada bem como a taxa de cruzamento desses híbridos com as linhagens parentais (caracterizando introgressão de uma linhagem na outra), a hipótese que deverá ser apoiada é a de que linhagens que começaram a divergir, em um passado mais recente, voltaram a sofrer homogeneização.

5.2 Dois haplótipos mitocondriais na região de Balsas-MA

Em Balsas-MA, localizada a leste de SPAB, além de indivíduos portadores de haplótipos mitocondriais pertencentes à Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, foram encontrados exemplares com haplótipo mitocondrial da Linhagem 3 de “*P. cuvieri*”. Esses dois haplogrupos encontrados em Balsas apresentaram distância genética de cerca de 6% no fragmento mitocondrial 16Sar-16Sbr, valor bastante acima daquele sugerida por Fouquet et al. (2007) e Lyra et al. (2016) como limite entre variação intra e interespecífica (i.e., cerca de 3%).

Os dados inferidos a partir da rede de haplótipos foram congruentes aos obtidos pelas análises filogenéticas mitocondriais. Um dos indivíduos apresentou haplótipo idêntico ao de parte dos indivíduos de SPAB-VNM-TS/Imp, agrupados à Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, e outros cinco com apenas um passo mutacional destes. E outros apresentaram haplótipos mais similares aos da Linhagem 3 de “*P. cuvieri*”.

Em contrapartida com as inferências baseadas em sequências mitocondriais, nas análises com marcadores RAD-seq, os dois exemplares de Balsas foram reunidos em um único grupo, inferido como grupo irmão do clado que incluiu *P. ephippifer*, os demais exemplares incluídos na Linhagem 1 com base nos haplótipos mitocondriais e os exemplares de SPAB-VNM-TS/Imp. Estes resultados incongruentes entre dados mitocondriais e nucleares revelam algumas possíveis inferências. Uma delas é que possam existir duas espécies distintas simpátricas em Balsas, uma referente à Linhagem 3 e outra à

Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Alternativamente, é possível que os resultados obtidos a partir de dados RAD-seq sejam resultantes de variações encontradas em marcadores nucleares provocadas pela introgressão de marcadores da Linhagem 3 de “*P. cuvieri*” na Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”. Todavia, como a amostragem de indivíduos na análise com RAD-seq foi reduzida e por não ter incluído indivíduos pertencentes ao haplogrupo M2 de Balsas, uma análise mais cuidadosa acerca dessas hipóteses ainda será necessária.

5.3 Linhagem 4 de “*P. cuvieri*” de Parauapebas-PA

Espécimes coletados em Parauapebas-PA, sítio localizado a oeste de São Pedro da Água Branca, foram recuperados nas análises de Máxima Parcimônia baseadas em haplótipos mitocondriais como grupo-irmão do clado que inclui da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, *P. ephippifer* e os exemplares de SPAB-VNM-TS/Imp, no entanto, com baixo suporte estatístico. A distância genética estimada com base no fragmento 16Sar-16Sbr entre as Linhagens 1 e 4 de “*P. cuvieri*” foi de aproximadamente 1,9%, valor abaixo daquele inferido por Fouquet et al (2007) e Lyra et al. (2016) como valor médio para suspeição de espécies candidatas, mas similar ao encontrado entre algumas espécies válidas de anuros (exemplos em Guarnizo et al., 2012).

A população de Parauapebas/Carajás-PA apresenta cariótipo distinto de todos os demais já reportados para o complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer*. Embora o cromossomo 9 dos exemplares de Parauapebas/Carajás-PA, portador de NOR, seja semelhante ao cromossomo 9 dos machos de SPAB-VNM-TS/Imp, os cromossomos 7 e 8 dessas duas linhagens diferem por não apresentarem NOR nos exemplares de Parauapebas/Carajás-PA. Nenhum heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo foi encontrado na população de Parauapebas/Carajás-PA.

Assim sendo, apesar de apresentarem uma baixa distância genética, os indivíduos pertencentes à Linhagem 4 de “*P. cuvieri*” mostraram um cariótipo exclusivo a eles.

5.4 Biogeografia da mesorregião Oeste Maranhense

A região central Maranhense é dividida em Floresta Amazônica e Cerrado, com dois tipos de clima, tropical úmido e equatorial, e transição de clima úmido da Amazônia para semi-árido do Nordeste. A floresta típica da região é a Ombrófila Densa. A área que compreende espécimes de SPAB-VNM-TS/Imp estão localizados neste local de transição.

No Mioceno, ocorreu o “Último Máximo Glacial” (LMG), com registros de secas devidas às baixas temperaturas globais, baixo nível dos oceanos e desertificação (Milthen, 2004). A temperatura mundial era cerca de seis graus mais baixa do que a atual e as vegetações diminuíram. Nessa época, foram registradas retrações da floresta Amazônica e expansão do Cerrado para o leste da Amazônia (Pennington, 2000). Foi nesse período que ocorreu a separação entre Linhagem 3 e as demais linhagens do complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer* (há cerca de $8,2 \pm 2,1$ Ma).

Mais recentemente, no período Quaternário (entre o Pleistoceno e Holoceno), devido às glaciações, foram registrados eventos de expansão e contração da Floresta Amazônica com períodos intermitentes de seca intercalados por períodos úmidos (“Teoria de refúgios”, por Haffer, 1969). Segundo essa teoria, nos períodos de seca, eram formados fragmentos florestais intercalados por áreas abertas e sem mata. Os fragmentos que permaneceram com mata, não sofreram grandes alterações em suas características tanto na flora quanto na fauna (sendo considerados refúgios). Já em regiões que perderam suas coberturas vegetais, a flora e fauna sofreram adaptações a esse novo ambiente ou migraram (no caso da fauna) para os fragmentos florestais (Prance, 1973). Muitas espécies então dispersaram em pequenas populações para as áreas com mata e formavam linhagens, que acabavam por se diferenciar no período em que estavam isoladas, podendo sofrer especiação, aumentando a diversidade. Essa teoria foi proposta como um dos fatores que justifica a alta diversidade amazônica. Quando ocorriam as intercalagens para os períodos úmidos, essas linhagens chegavam a se reencontrar devido à expansão destas matas, tornando-se contínuas (Haffer, 1969). Como os espécimes de *Physalaemus* pertencentes ao complexo podem ser encontrados em áreas abertas, é possível que os períodos de seca

tenham contribuído para a grande distribuição das populações e tenham formado a diversidade de linhagens encontrada nos dias atuais.

De acordo com nossos resultados, o tempo de divergência entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” ocorreu há cerca de $3,8 \pm 2$ Ma, entre o Plioceno e o Pleistoceno. Dessa maneira, é possível inferir que eventos ocorridos no quaternário possam ter influenciado a a divergência desses grupos, uma vez que eles são geneticamente próximos, mas citogeneticamente bastante divergentes. Ao fim desses eventos de seca, é possível que algumas populações das linhagens de *Physalaemus* tenham se expandido e se reencontrado na região de SPAB-VNM-TS/Imp, reconhecida em nosso trabalho como uma região de contato secundário entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”.

6 Conclusão/principais resultados

- O contato secundário entre *P. ephippifer* e a Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” foi inferida com base na presença de dois haplogrupos mitocondriais na região de SPAB-VNM-TS/Imp, um similar à Linhagem 1 de “*P. cuvieri*” e outro similar a *P. ephippifer*.
- Esse contato secundário não deve ser atual, pois nenhum híbrido de primeira geração, que apresentasse cariótipo misto entre aquele de *P. ephippifer* e o da Linhagem 1 de “*P. cuvieri*”, foi encontrado nessa região.
- Nos indivíduos de SPAB/VNM foi identificado um par cromossômico heteromórfico característico do sistema de determinação sexual ZZ/ZW.
- Em Balsas, foram encontrados haplótipos mitocondriais da Linhagem 1 e da Linhagem 3 de “*P. cuvieri*”, cuja distância genética é bastante alta (cerca de 6%). Esse dado sugere a possibilidade da ocorrência de duas espécies em simpatria nessa localidade.
- Uma nova linhagem, a Linhagem 4 de “*P. cuvieri*” foi reconhecida no complexo de espécies *P. cuvieri*-*P. ephippifer*, com base na análise cariotípica (exclusiva a este grupo) e de haplótipos mitocondriais. A distância genética relativa ao fragmento 16Sar-16Sbr entre a Linhagem 4, que agrupou indivíduos de Parauapebas, e a Linhagem 1 foi de 1,9%.

7 Referências Bibliográficas

AGAPOW P.M., BININDA-EDMONDS O.R.P., CRANDALL K.A., ET AL. THE IMPACT OF SPECIES CONCEPT ON BIODIVERSITY STUDIES Q. REV. BIOL. 79:161–79, 2004.

ANDERSON E.C. & THOMPSON E.A. A MODEL- BASED METHOD FOR IDENTIFYING SPECIES HYBRIDS USING MULTILOCUS GENETIC DATA. GENETICS, 160, 1217–1229, 2002.

BAIRD N.A., ETTER P.D., ATWOOD T.S., ET AL. RAPID SNP DISCOVERY AND GENETIC MAPPING USING SEQUENCED RAD MARKERS. PLOS ONE, 3, E3376, 2008.

BANDELT H.J., FORSTER P., ROHL A. MEDIAN-JOINING NETWORKS FOR INFERRING INTRASPECIFIC PHYLOGENIES. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION, 16: 37-48, 1999.

BARTON N.H. & HEWITT G.M. ANALYSIS OF HYBRID ZONES. ANN. REV. ECOL. SYST. 16, 113–148, 1985.

BAYONA-VÁSQUEZ N.J., GLENN T.C., KIERAN T.J., PIERSON T.W., HOFFBERG S.L, SCOTT P.A., ET AL. ADAPTERAMA III: QUADRUPLE-INDEXED, DOUBLE/TRIPLE-ENZYME RADSEQ LIBRARIES (2RAD/3RAD). PEERJ, 2019.

CAMARGO A., SITES J.J. SPECIES DELIMITATION: A DECADE AFTER THE RENAISSANCE. IN: PAVLINOV I (ED) THE SPECIES PROBLEM-ONGOING ISSUES. INTECH, 2013.

CATCHEN J., HOHENLOHE P.A., BASSHAM S., AMORES A., CRESKO W.A. STACKS: AN ANALYSIS TOOL SET FOR POPULATION GENOMICS.MOL. ECOL. 22: 3124–40, 2013.

COLOMA L.A., CARNAVAL-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. MOLECULAR PHYLOGENETICS OF STREAM TREEFROGS OF THE *HYLOSCIRTUS LARINOPYGION* GROUP (ANURA: HYLIDAE), AND DESCRIPTION OF TWO NEW SPECIES FROM ECUADOR, 2012.

CONTE M., TARGUETA C.P., ZUCCHI M.I., SOUZA A.P., PIMENTEL S.M.R. UNRAVELING THE VARIABILITY AND GENETIC STRUCTURE OF BARKER FROG *PHYSALAEMUS CUVIERI* (LEIUPERINAE) POPULATIONS FROM DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL. GENET. MOL. RES. 13: 8055–8065, 2014.

DAVEY J.W. AND BLAXTE M.L. RADSEQ: NEXT-GENERATION POPULATION GENETICS, 2011.

DRUMMOND A.J., HO S.Y.W., PHILLIPS M.J., RAMBAUT, A. RELAXED PHYLOGENETICS AND DATING WITH CONFIDENCE. PLOS BIOL. 4, 699–710, 2006.

DUFRESNES C., WASSEF J., GHALI K., ET AL. CONSERVATION PHYLOGEOGRAPHY: DOES HISTORICAL DIVERSITY CONTRIBUTE TO REGIONAL VULNERABILITY IN EUROPEAN TREE FROGS? MOL ECOL 22: 5669–5684, 2013.

DUFRESNES C., MAJTYKA T., BAIRD S.J.E., ET AL. EMPIRICAL EVIDENCE FOR LARGE X-EFFECTS IN ANIMALS WITH UNDIFFERENTIATED SEX CHROMOSOMES. SCI. REP. 6:21029. DOI: 10.1038/SREP21029, 2016A.

DUFRESNES C., MAZEPA G., RODRIGUES N., ET AL. GENOMIC EVIDENCE FOR CRYPTIC SPECIATION IN TREE FROGS FROM THE APENNINE PENINSULA, WITH DESCRIPTION OF *HYLA PERRINI* SP. NOV. 2018.

DUPUIS J.R., ROE A.D., SPERLING F.A.H. MULTI-LOCUS SPECIES DELIMITATION IN CLOSELY RELATED ANIMALS AND FUNGI: ONE MARKER IS NOT ENOUGH. *MOL. ECOL.* 21: 4422–4436, 2012.

DURAND E.Y. PATTERSON N., REICH D., SLATKIN M. TESTING FOR ANCIENT ADMIXTURE BETWEEN CLOSELY RELATED POPULATIONS. *MOL. BIOL. EVOL.* 28:2239–2252, 2011.

EATON D.A.R. PYRAD: ASSEMBLY OF DE NOVO RADSEQ LOCI FOR PHYLOGENETIC ANALYSES. *BIOINFORMATICS* 30, 1844–1849, 2014.

EATON D.A.R., AND OVERCAST I. IPYRAD: INTERACTIVE ASSEMBLY AND ANALYSIS OF RAD-SEQ DATA SETS. AVAILABLE AT [HTTP://IPYRAD.READTHEDOCS.IO/](http://IPYRAD.READTHEDOCS.IO/). 2018

EVANS B.J., KELLEY D.B., TINSLEY R.C., MELNICK D.J., CANNATELLA D.C. A MITOCHONDRIAL DNA PHYLOGENY OF AFRICAN CLAWED FROGS: PHYLOGEOGRAPHY AND IMPLICATIONS FOR POLYPLOID EVOLUTION. *MOL. PHYLOGENET. EVOL.* 33, 197–213, 2004.

FAIVOVICH J., FERRARO D.P., BASSO N.G., HADDAD C.F.B., RODRIGUES M.T., WHEELER W.C., LAVILLA E.O. A PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *PLEURODEMA* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE: LEIUPERINAE) BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENE SEQUENCES, WITH COMMENTS ON THE EVOLUTION OF ANURAN FOAM NESTS. *CLADISTICS* 28, 460–482, 2012.

FELLER A.E., HEDGES S.B. MOLECULAR EVIDENCE FOR THE EARLY HISTORY OF LIVING AMPHIBIANS. *MOL. PHYLOGENET. EVOL.* 9, 509–516, 1998.

FITZPATRICK B.M., RYAN M.E., JOHNSON J.R., CORUSH J., CARTER E.T. HYBRIDIZATION AND THE SPECIES PROBLEM IN CONSERVATION. *CURR. ZOO.* 61:206–216, 2015.

FOUQUET A., GILLES A., VENCES M., MARTY C., BLANC M., GEMMELL N.J. UNDERESTIMATION OF SPECIES RICHNESS IN NEOTROPICAL FROGS REVEALED BY MTDNA ANALYSES. *PLOS ONE* 2:E1109, 2007.

FRANKHAM R., BALLOU J.D., DUDASH M.R., ELDRIDGE M.D.B., IMPLICATIONS OF DIFFERENT SPECIES CONCEPTS FOR CONSERVING BIODIVERSITY. *BIOL. CONSERV.* 153:25–31, 2012.

FROST D.R. AMPHIBIAN SPECIES OF THE WORLD: AN ONLINE REFERENCE. AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY, NEW YORK, USA, 2019.

FUNK W.C., CAMINER M. AND RON S.R., HIGH LEVELS OF CRYPTIC SPECIES DIVERSITY UNCOVERED IN AMAZONIAN FROGS, 2012.

GATTO K.P., MATTOS J.V., SEGER K.R. E LOURENÇO L.B. SEX CHROMOSOME DIFFERENTIATION IN THE FROG GENUS *PSEUDIS* INVOLVES SATELLITE DNA AND CHROMOSOME REARRANGEMENTS. 2018.

GIAM X., SCHEFFERS B.R., SODHI N.S., WILCOVE D.S., CEBALLOS G., EHRlich P.R. RESERVOIRS OF RICHNESS: LEAST DISTURBED TROPICAL FORESTS ARE CENTRES OF UNDESCRIBED SPECIES DIVERSITY *PROC. R. SOC. B* 279: 67–76, 2012.

GISKA I., SECHI P., BABIK W. DEEPLY DIVERGENT SYMPATRIC MITOCHONDRIAL LINEAGES OF THE EARTHWORM *LUMBRICUS RUBELLUS* ARE NOT REPRODUCTIVELY ISOLATED. BMC EVOL. BIOL. 15: 217, 2015.

GOLOBOFF P.A., FARRIS J.S., NIXON K.C. TNT: TREE ANALYSIS USING NEW TECHNOLOGY. PROGRAM AND DOCUMENTATION. AVAILABLE AT WWW.ZMUC.DK/PUBLIC/PHYLOGENY, 2003.

GRAHAM C.F., GLENN T.C., MCARTHUR A.G. ET AL. IMPACTS OF DEGRADED DNA ON RESTRICTION ENZYME ASSOCIATED DNA SEQUENCING (RADSEQ). MOL. ECOL. RES. 15, 1304–1315, 2015.

GRAVES J.A.M. DID SEX CHROMOSOME TURNOVER PROMOTE DIVERGENCE OF THE MAJOR MAMMAL GROUPS? BIOESSAYS 38, 734–743, 2016.

GRAYBEAL A. PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF BUFONID FROGS AND TESTS OF ALTERNATE MACROEVOLUTIONARY HYPOTHESES CHARACTERIZING THEIR RADIATION. ZOOL. J. LINN. SOC. 119, 297–338, 1997.

GREEN R.E., KRAUSE J., BRIGGS A.W. ET AL. A DRAFT SEQUENCE OF THE NEANDERTAL GENOME. SCIENCE 328:710–722, 2010.

GUARNIZO C.E., ESCALLÓN C., CANNATELLA D., AMÉZQUITA A. CONGRUENCE BETWEEN ACOUSTIC TRAITS AND GENEALOGICAL HISTORY REVEALS A NEW SPECIES OF *DENDROPSOPHUS* (ANURA: HYLIDAE) IN THE HIGH ANDES OF COLOMBIA. HERPETOLOGICA 68:523–540, 2012.

HAFFER J. SPECIATION IN AMAZONIAN FOREST BIRDS. SCIENCE 165: 131–137, 1969

HALL T.A. BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/NT. NUCL. ACIDS. SYMP. SER. 41:95-98, 1999.

HEDGES S.B. MOLECULAR EVIDENCE FOR THE ORIGIN OF BIRDS. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 91, 2621–2624, 1994.

HOFFBERG S.L., KIERAN T.J., CATCHEN J.M., DEVAULT A., FAIRCLOTH B.C., MAURICIO R., GLENN T.C. RADCAP: SEQUENCE CAPTURE OF DUAL-DIGEST RADSEQ LIBRARIES WITH IDENTIFIABLE DUPLICATES AND REDUCED MISSING DATA. MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES 16: 1264–1278, 2016.

HUELSENBECK J.P., LARGET B., MILLER R.E., RONQUIST F. POTENTIAL APPLICATIONS AND PITFALLS OF BAYESIAN INFERENCE OF PHYLOGENY. SYSTEMATIC BIOLOGY, 51:673-688, 2002.

HOWELL W.M., BLACK D.A. CONTROLLED SILVER STAINING OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS WITH A PROTECTIVE COLLOIDAL DEVELOPER A 1-STEP METHOD. EXPERIENTIA 36, 1014–1015, 1980

KING M., ROFE R. KARYOTYPIC VARIATION IN THE AUSTRALIAN GEKKO *PHYLLODACTYLUS MARMORATUS* (GRAY) (GEKKONIDAE, REPTILIA), CHROMOSOMA 54, 75-87, 1976

LEMMON E.M., LEMMON A.R., CANNATELLA D.C. GEOLOGICAL AND CLIMATIC FORCES DRIVING SPECIATION IN THE CONTINENTALLY DISTRIBUTED TRILLING CHORUS FROGS (*PSEUDACRIS*). EVOLUTION 61, 2086–2103, 2007.

LIBRADO P., ROZAS J. DNASP V5: A SOFTWARE FOR COMPREHENSIVE ANALYSIS OF DNA POLYMORPHISM DATA. *BIOINFORMATICS*, 25, 1451-1452, 2009.

LIMA T. HIGHER LEVELS OF SEX CHROMOSOME HETEROMORPHISM ARE ASSOCIATED WITH MARKEDLY STRONGER REPRODUCTIVE ISOLATION. *NAT. COMMUN.* 5, 4743, DOI: 10.1038/NCOMMS5743, 2014.

LOURENÇO L.B., TARGUETA C.P., BALDO D., NASCIMENTO J., GARCIA P.C.A., ANDRADE G.V., HADDAD C.F.B., RECCO-PIMENTEL S.M. PHYLOGENY OF FROGS FROM THE GENUS *PHYSALAEMUS* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE) INFERRED FROM MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENE SEQUENCES. *MOL. PHYLOGENET. EVOL.* 92:204-216, 2015.

LYRA M.L., HADDAD C.F.B., DE AZEREDO-ESPIN A. MEETING THE CHALLENGE OF DNA BARCODING NEOTROPICAL AMPHIBIANS: POLYMERASE CHAIN REACTION OPTIMIZATION AND NEW COI PRIMERS. *MOL ECOL RES* 17:966–980, 2017.

MASLY J.P., PRESGRAVES, D.C. HIGH-RESOLUTION GENOME-WIDE DISSECTION OF THE TWO RULES OF SPECIATION IN *DROSOPHILA*. *PLOS BIOL.* 5, E243, 2007.

MCCORMACK J.E., HIRD S.M., ZELLMER A.J., CARSTENS B.C., BRUMFIELD R.T. APPLICATIONS OF NEXTGENERATION SEQUENCING TO PHYLOGEOGRAPHY AND PHYLOGENETICS. *MOL. PHYLOGENET. EVOL.* 66: 526–538, 2013.

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. COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS OF SOME SPECIES OF THE *DENDROSOPHUS MICROCEPHALUS* GROUP (ANURA, HYLIDAE) IN THE LIGHT OF PHYLOGENETIC INFERENCES. *BMC GENET.* 14:59, 2013

MILLER M.P., MULLINS T.D., FORSMAN E.D., HAIG S.M. GENETIC DIFFERENTIATION AND INFERRED DYNAMICS OF A HYBRID ZONE BETWEEN NORTHERN SPOTTED OWLS (*STRIX OCCIDENTALIS CAURINA*) AND CALIFORNIA SPOTTED OWLS (*S. O. OCCIDENTALIS*) IN NORTHERN CALIFORNIA. *ECOLOGY AND EVOLUTION.* 7:6871–6883, 2017.

MIRANDA N.E. O., MACIEL N.M., LIMA-RIBEIRO M.S.L, COLLI G.R., HADDAD C.F.B., COLLEVATTI R.G. DIVERSIFICATION OF THE WIDESPREAD NEOTROPICAL FROG *PHYSALAEMUS CUVIERI* IN RESPONSE TO NEOGENE-QUATERNARY GEOLOGICAL EVENTS AND CLIMATE DYNAMICS, 2019.

MITHEN, S. AFTER THE ICE: A GLOBAL HUMAN HISTORY, 20.000–5.000 BC. CAMBRIDGE MA: HARVARD UNIVERSITY PRESS. P. 3. ISBN 978-0-674-01570-8, 2004.

NASCIMENTO L.B., CARAMASCHI U., CRUZ C.A.G. TAXONOMIC REVIEW OF THE SPECIES GROUPS OF THE GENUS *PHYSALAEMUS FITZINGER*, 1826 WITH REVALIDATION OF THE GENERA *ENGYSTOMOPS* JIMÉNEZ-DE-LA-ESPADA, 1872 AND *EUEMPHIX STEINDACHNER*, 1863 (AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE). *ARQ. MUS. NAC. RIO DE JANEIRO* 63, 297–320, 2005.

NASCIMENTO J., QUINDERÉ Y.R.S.D., RECCO-PIMENTEL S.M., LIMA J.R.F., LOURENÇO L.B. HETEROMORPHIC Z AND W SEX CHROMOSOMES IN *PHYSALAEMUS EPHIPPIFER* (STEINDACHNER, 1864) (ANURA, LEIUPERIDAE). *GENETICA* 138: 1127–1132, 2010.

NASCIMENTO J. ESTUDO CITOGÉNÉTICO COMPARATIVO DE ANUROS DO GRUPO *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE). TESE DE DOUTORADO. PP. 118, 2014.

NASCIMENTO J., LIMA J.D., SUÁREZ P., ET AL. EXTENSIVE CRYPTIC DIVERSITY WITHIN THE *PHYSALAEMUS CUVIERI* – *PHYSALAEMUS EPHIPPIFER* SPECIES COMPLEX (AMPHIBIA, ANURA) REVEALED BY CYTOGENETIC, MITOCHONDRIAL, AND GENOMIC MARKERS. 2019.

NYLANDER J.A.A. MR. MODELTEST V2. EVOLUTIONARY BIOLOGY CENTRE, UPPSALA UNIVERSITY, 2004.

PADIAL J.M., DE LA RIVA I. A RESPONSE TO RECENT PROPOSALS FOR INTEGRATIVE TAXONOMY. BIOL. J. LINN. SOC. 101: 747–756, 2010.

PADIAL J.M., MIRALLES A., DE LA RIVA I., VENCES M. THE INTEGRATIVE FUTURE OF TAXONOMY. FRONT. ZOOL. 7: 1–14, 2010.

PALUMBI S.R., MARTIN, A., ROMANO, S., MCMILLAN, W.O., STICE, L., GRABOWSKI, G. THE SIMPLE FOOL'S GUIDE TO PCR, VERSION 2.0. PRIVATELY PUBLISHED DOCUMENT COMPILED BY S. PALUMBI, DEPT. ZOOLOGY, UNIV. HAWAII, HONOLULU, HI, 96822, 1991.

PENNINGTON R.T., PRADO D.E. AND PENDRY C.A., NEOTROPICAL SEASONALLY DRY FORESTS AND QUATERNARY VEGETATION CHANGES. 2000.

PETERSON B.K., WEBER J.N., KAY E.H., FISHER H.S., HOEKSTRA H.E. DOUBLE DIGEST RADSEQ: AN INEXPENSIVE METHOD FOR DE NOVO SNP DISCOVERY AND GENOTYPING IN MODEL AND NON-MODEL SPECIES. PLOS ONE 7: E37135, 2012.

PRANCE, G.T. PHYTOGEOGRAPHIC SUPPORT FOR THE THEORY OF PLEISTOCENE FOREST REFUGES IN THE AMAZON BASIN, BASED UPON EVIDENCE FROM DISTRIBUTION PATTERN IN CARYOCARACEAE, CHRYSO- BALANACEAE, DICHAPETALACEAE AND LECYTHIDACEAE. ACTA AMAZON, 3, 5–28, 1973.

PRESGRAVES D.C. SEX CHROMOSOMES AND SPECIATION IN *DROSOPHILA*. TRENDS GENET. 24, 336–343, 2008.

PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. INFERENCE OF POPULATION STRUCTURE USING MULTILOCUS GENOTYPE DATA. GENETICS 155: 945–959, 2000.

PYRON R.A., WIENS J.J. A LARGE-SCALE PHYLOGENY OF AMPHIBIA INCLUDING OVER 2,800 SPECIES, AND A REVISED CLASSIFICATION OF EXTANT FROGS, SALAMANDERS, AND CAECILIANS. MOL. PHYLOGENET. EVOL. 61, 543–583, 2011.

QUINDERÉ Y.R.D., LOURENÇO, L.B., ANDRADE G.V., TOMATIS C., BALDO D., RECCO-PIMENTEL S.M. POLYTYPIC AND POLYMORPHIC NOR VARIATIONS IN THE WIDESPREAD ANURAN *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA, LEIUPERIDAE). BIOL. RES. 42, 79–92, 2009.

RAMBAUT A., DRUMMOND A.J. BEAST: BAYESIAN EVOLUTIONARY ANALYSIS BY SAMPLING TREES. TRACER. V.1.5. <HTTP://TREE.BIO.ED.AC.UK/SOFTWARE/TRACER>, 2007.

RANDI E. DETECTING HYBRIDIZATION BETWEEN WILD SPECIES AND THEIR DOMESTICATED RELATIVES. MOLECULAR ECOLOGY, 17, 285–293, 2008.

RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D.L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M.A., HUELSENBECK J.P. MRBAYES 3.2: EFFICIENT BAYESIAN PHYLOGENETIC INFERENCE AND MODEL CHOICE ACROSS A LARGE MODEL SPACE. SYST. BIOL. 61, 1–4, 2011.

SAETHER S.A., SÆTRE G.-P., BORGE T., WILEY C., SVEDIN N., ANDERSSON G. ET AL. SEX CHROMOSOME-LINKED SPECIES RECOGNITION AND EVOLUTION OF REPRODUCTIVE ISOLATION IN FLYCATCHERS. *SCIENCE* 318, 95–97, 2007.

SILVA A.P.Z., HADDAD C.F.B., KASAHARA S. NUCLEOLUS ORGANIZER REGIONS IN *PHYSALAEMUS CUVIERI* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), WITH EVIDENCE OF A UNIQUE CASE OF AG-NOR VARIABILITY. *HEREDITAS* 131, 135–141, 1999.

STAMATAKIS A. RAXML-VI-HPC: MAXIMUM LIKELIHOOD-BASED PHYLOGENETIC ANALYSES WITH THOUSANDS OF TAXA AND MIXED MODELS. *BIOINFORMATICS* 22: 2688–2690, 2006.

SUMNER A.T. *EXP CELL RES* 75:304–306, 1972.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., NEI M., KUMAR S. MEGA6: MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS VERSION 6.0. *MOL. BIOL. EVOL.* 30, 2725–2729, 2013.

TITUS T.A., LARSON A. MOLECULAR PHYLOGENETICS OF DESMOGNATHINE SALAMANDERS (CAUDATA: PLETHODONTIDAE): A REEVALUATION OF EVOLUTION IN ECOLOGY, LIFE HISTORY, AND MORPHOLOGY. *SYST. BIOL.* 45: 229–238, 1996.

TOEWS D.P.L., BRELSFORD A. THE BIOGEOGRAPHY OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DISCORDANCE IN ANIMALS. *MOL. ECOL.* 21: 3907–3930, 2012.

TURELLI M. & MOYLE L.C. ASYMMETRIC POSTMATING ISOLATION: DARWIN'S COROLLARY TO HALDANE'S RULE. *GENETICS* 176, 1059–1088, 2007.

VÄHÄ J.P. & PRIMMER C.R. EFFICIENCY OF MODEL- BASED BAYESIAN METHODS FOR DETECTING HYBRID INDIVIDUALS UNDER DIFFERENT HYBRIDIZATION SCENARIOS AND WITH DIFFERENT NUMBERS OF LOCI. *MOLECULAR ECOLOGY*, 15, 63–72, 2006.

VENCES M., THOMAS M., VAN DER MEIJDEN A., CHIARI Y., VIEITES D.R. COMPARATIVE PERFORMANCE OF THE 16S RRNA GENE IN DNA BARCODING OF AMPHIBIANS. *FRONT. ZOO.* 2: 1–12, 2005A.

VENCES M., THOMAS M., BONETT R.M., VIEITES D.R. DECIPHERING AMPHIBIAN DIVERSITY THROUGH DNA BARCODING: CHANCES AND CHALLENGES. *PHIL. TRANS. R. SOC. B* 360: 1859–1868, 2005B.

8 Materiais Suplementares

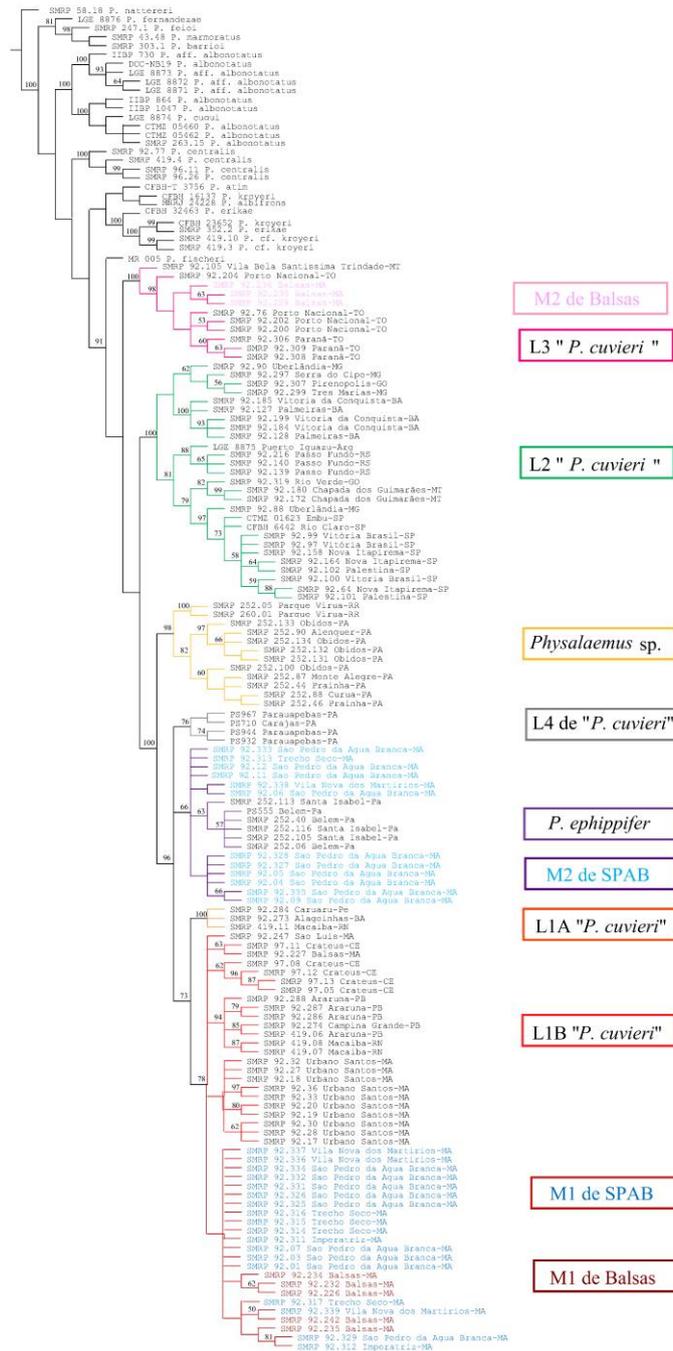


Figura Suplementar 1. Cladograma de consenso estrito de 459 árvores mais parcimoniosas (com 2745 passos) geradas com base no fragmento mitocondrial H1, inferido pelo TNT, mostrando relações filogenéticas entre clados pertencentes ao complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer*. Números nos nós referem-se aos valores de Bootstrap (em % apenas valores maiores do que 50% estão mostrados). L1A, L1B, L2, L3 e L4 referem-se às linhagens de “*P. cuvieri*”.

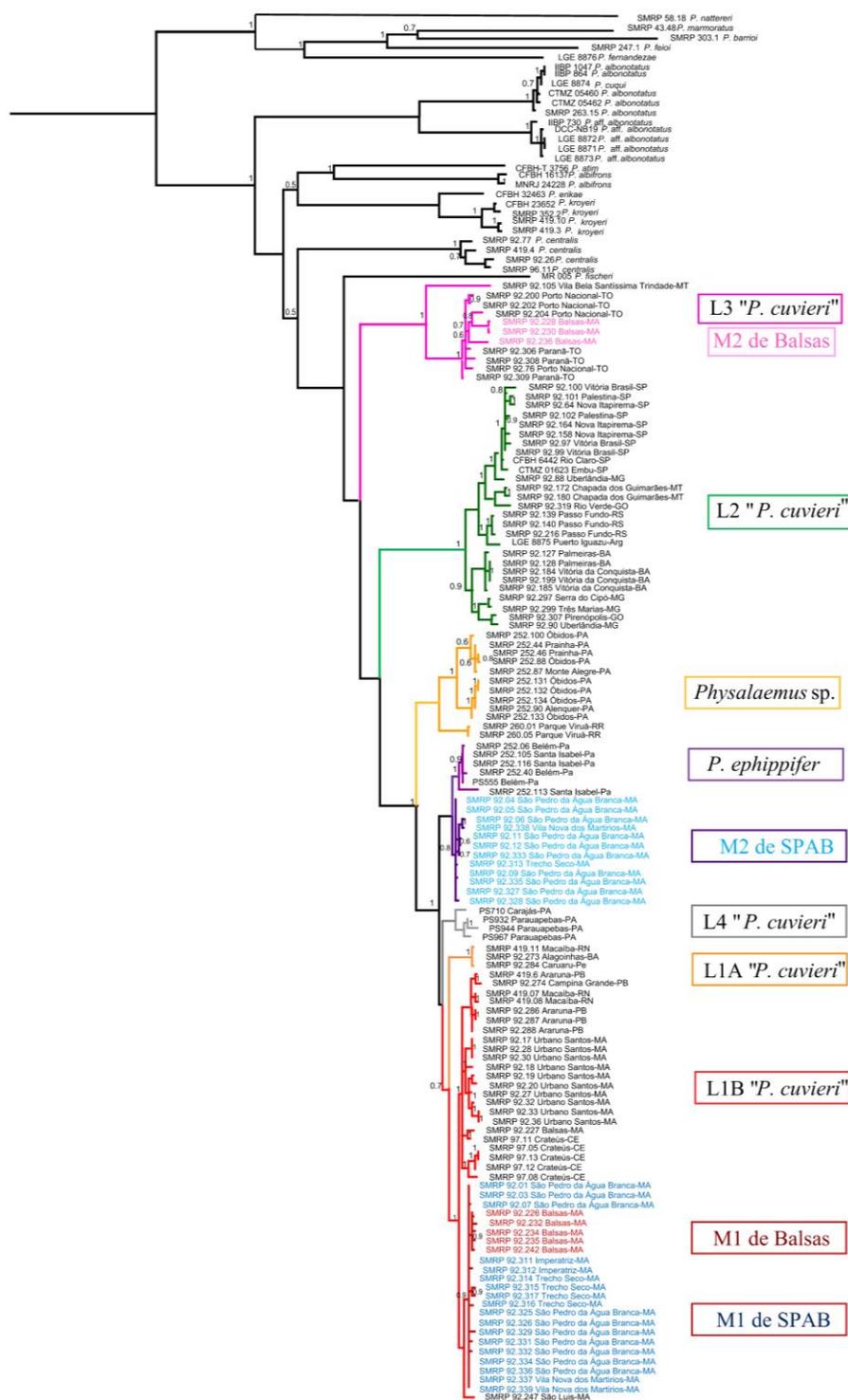


Figura Suplementar 2. Cladograma completo inferido pela análise Bayesiana do fragmento mitocondrial H1, mostrando as relações filogenéticas entre clados pertencentes ao complexo *P. cuvieri*-*P. ehippifer* e o outgroup, com destaque para relação entre L1, L4, Haplogrupo M1 e M2 de SPAB e M1 de Balsas. L1A, L1B, L2, L3 e L4 referem-se às linhagens de “*P. cuvieri*”. Valores de probabilidade a posteriori maiores do que 50% estão indicados nos nós.

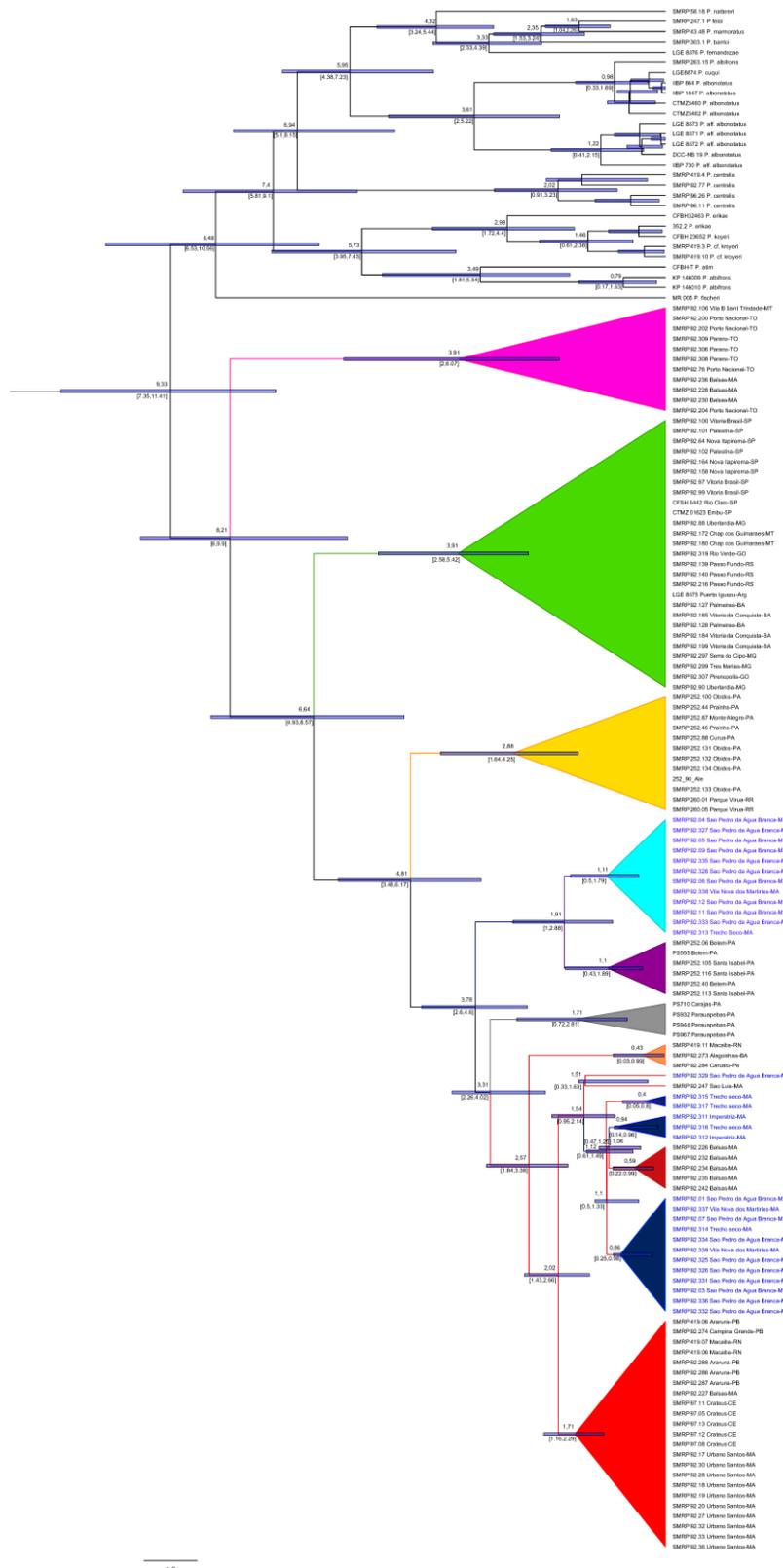


Figura Suplementar 3. Árvore filogenética e tempo de divergência dos principais clados do complexo *P. cuvieri*-*P. ephippifer* e os outgroup, inferidos com base no fragmento mitocondrial H1 (12S+RNAtvl+16S). As barras azuis mostram o intervalo de confiança com 95% de densidade de probabilidade para os tempos de divergência. Os números sobre os nós mostram o tempo de divergência em milhões de anos atrás (Ma), e os números abaixo dos nós revelam os valores do intervalo dos tempos de divergência. Cada linhagem ou haplogrupo foi representada por uma coloração distinta.

Tabela S1. Tabela de indivíduos inseridos nas análises filogenéticas. MNRJ: Museu Nacional do Rio de Janeiro, HUFMA: Museu da Universidade Federal do Maranhão, ZUEC: Museu de Zoologia Prof. Dr. Adão José Cardoso (UNICAMP), SMRP: Coleção de tecidos mantida no Laboratório de Estudos Cromossômicos (LabEsC) da UNICAMP. Na coluna Análises, mt: análise mitocondrial; C: análise citogenética; R: análise RAD-seq. “*Physalaemus cuvieri*” – L1, L2 e L3 referem-se, respectivamente, às linhagens nomeadas como linhagens 1, 2 e 3 de “*P. cuvieri*” conforme Lourenço et al. (2015).

| Espécie - Linhagem - Complexo <i>P. cuvieri</i>-<i>P. ephippifer</i> | Voucher do exemplar | Voucher do tecido | Localidades | Nº loci RAD analisado | Análises | Nº Acesso GB | Referências |
|---|----------------------------|--------------------------|---|------------------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| <i>P. nattereri</i> | ZUEC 17506 | SMRP 58.18 | Três Lagoas-MS | | mt | KP146103 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. fernandezae</i> | LGE 8876 | LGE 8876 | Argentina: Punta Lara, Buenos Aires | | mt | KP146068 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. feioi</i> | ZUEC 16247 | SMRP 247.01 | Viçosa-MG | | mt | KP146080 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. marmoratus</i> | ZUEC 13399 | SMRP 43.48 | São José do Rio Preto-SP | | mt | KP146083 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. barrioi</i> | ZUEC 18146 | SMRP 303.01 | Serra da Bocaina-SP | | mt | KP146067 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. aff. albonotatus</i> | IIBP 730 | IIBP 730 | Paraguay: Estancia Ybu, Concepcion | | mt | KP146057 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. aff. albonotatus</i> | LGE 8871 | LGE 8871 | Argentina: Villa Lanus, Misiones | | mt | KP146060 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. aff. albonotatus</i> | LGE 8872 | LGE 8872 | Argentina: Ituzaingo, Corrientes | | mt | KP146058 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. aff. albonotatus</i> | LGE 8873 | LGE 8873 | Argentina: Estancia El Oscuro, Corrientes | | mt | KP146059 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albonotatus</i> | CTMZ 05460 | CTMZ 05460 | Tangará da Serra-MT | | mt | KP146056 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albonotatus</i> | CTMZ 05462 | CTMZ 05462 | Tangará da Serra-MT | | mt | KP146055 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albonotatus</i> | DCC-NB 19 | | Argentina: Chaco: San Fernando | | mt | DQ337210 | Ron et al., 2006 |
| <i>P. albonotatus</i> | IIBP 1047 | IIBP 1047 | Paraguay: Estancia Pira Potrero, Amambay | | mt | KP146053 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albonotatus</i> | IIBP 864 | IIBP 864 | Paraguay: Concepcion | | mt | KP146054 | Lourenço et al, 2015 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|-------------|--------------|--|--|----|-------------|-------------------------|
| <i>P. albonotatus</i> | ZUEC 16419 | SMRP 263.15 | Lambari do Oeste-MT | | mt | KP146050 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. centralis</i> | ZUEC 17905 | SMRP 419.04 | Alagoinhas-BA | | mt | MK241498 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>P. centralis</i> | ZUEC 13101 | SMRP 92.26 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. centralis</i> | ZUEC 13375 | SMRP 92.77 | Porto Nacional-TO | | mt | KP146062 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. centralis</i> | ZUEC 13697 | SMRP 96.11 | Vitória Brasil-SP | | mt | KP146061 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. cuqui</i> | LGE 8874 | LGE 8874 | Argentina: Salta | | mt | KP146071 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. erikae</i> | CFBH 32463 | CFBH-T 16267 | Uruçuca-BA | | mt | KP146008 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albifrons</i> | CFBH 16137 | CFBH-T 5357 | Viçosa do Ceara-CE | | mt | KP146010 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. albifrons</i> | MNRJ 24228 | SMRP 74.21 | Vassouras, Barreirinhas-MA | | mt | KP146009 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. cf. kroyeri</i> | ZUEC 17904 | SMRP 419.03 | Alagoinhas-BA | | mt | KP145923 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. cf. kroyeri</i> | ZUEC 17911 | SMRP 419.10 | Bom Conselho-PE | | mt | KP146007 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. kroyeri</i> | ZUEC 17.481 | SMRP 352.02 | Ponta da Tulha, Ilhéus-BA | | mt | KP146006 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. kroyeri</i> | CFBH 23652 | CFBH-T 11432 | Fazenda Santo Onofre e Canabrava, Maracas-BA | | mt | KP146005 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. atim</i> | CFBH 12512 | CFBH-T 3756 | Campo Limpo de Goiás-GO | | mt | MH507401/02 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. fischeri</i> | MR 005 | | Venezuela: Guárico, Calabozo | | mt | DQ337211 | Ron et al., 2006 |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14691 | SMRP 92.200 | Porto Nacional-TO | | mt | KP146047 | Lourenço et al, 2015 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------|------------|-------------|----------------------------------|------|-------|----------|----------------------|
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14692 | SMRP 92.201 | Porto Nacional-TO | 3323 | R | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14693 | SMRP 92.202 | Porto Nacional-TO | 3319 | mt, R | KP146049 | Lourenço et al, 2015 |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14694 | SMRP 92.203 | Porto Nacional-TO | 4368 | R | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 13374 | SMRP 92.76 | Porto Nacional-TO | | mt | KP146048 | Lourenço et al, 2015 |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 17563 | SMRP 92.105 | Vila Bela Santíssima Trindade-MT | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 17564 | SMRP 92.106 | Vila Bela Santíssima Trindade-MT | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14695 | SMRP 92.204 | Porto Nacional-TO | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 14696 | SMRP 92.205 | Porto Nacional-TO | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 20390 | SMRP 92.306 | Paraná-TO | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 20392 | SMRP 92.308 | Paraná-TO | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L3 | ZUEC 20393 | SMRP 92.309 | Paraná-TO | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - M2Bal | ZUEC 17518 | SMRP 92.228 | Santa Luzia, Balsas/MA | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - M2Bal | ZUEC 17520 | SMRP 92.230 | Santa Luzia, Balsas/MA | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - M2Bal | ZUEC 17526 | SMRP 92.236 | Santa Luzia, Balsas/MA | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L2 | ZUEC 14670 | SMRP 92.100 | Vitória Brasil-SP | | mt | KP146024 | Lourenço et al, 2015 |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L2 | ZUEC 14634 | SMRP 92.101 | Palestina-SP | | mt | KP146028 | Lourenço et al, 2015 |

| | | | | | | | |
|--------------------------|------------|-------------|--------------------------|------|-------|----------|----------------------|
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14635 | SMRP 92.102 | Palestina-SP | | mt | KP146034 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 13670 | SMRP 92.127 | Palmeiras-BA | | mt | KP146045 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 13671 | SMRP 92.128 | Palmeiras-BA | 3210 | mt, R | KP146044 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14648 | SMRP 92.139 | Passo Fundo-RS | 3850 | mt, R | KP146040 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14649 | SMRP 92.140 | Passo Fundo-RS | | mt | KP146038 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 13177 | SMRP 92.15 | Nova Itapirema-SP | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14681 | SMRP 92.158 | Nova Itapirema-SP | | mt | KP146032 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14687 | SMRP 92.164 | Nova Itapirema-SP | | mt | KP146035 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14623 | SMRP 92.172 | Chapada dos Guimarães-MT | | mt | KP146026 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14631 | SMRP 92.180 | Chapada dos Guimarães-MT | | mt | KP146025 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14714 | SMRP 92.184 | Vitória da Conquista-BA | | mt | KP146046 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14715 | SMRP 92.185 | Vitória da Conquista-BA | | mt | KP146042 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14729 | SMRP 92.199 | Vitória da Conquista-BA | | mt | KP146043 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 14657 | SMRP 92.216 | Passo Fundo-RS | | mt | KP146039 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | | SMRP 92.319 | Rio Verde-GO | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L2 | ZUEC 12355 | SMRP 92.64 | Nova Itapirema-SP | | mt | KP146030 | Lourenço et al, 2015 |

| | | | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------------------------------|-------|-------|----------|-------------------------|
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 13366 | SMRP 92.88 | Uberlândia-MG | | mt | KP146027 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 13368 | SMRP 92.90 | Uberlândia-MG | | mt | KP146041 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 14667 | SMRP 92.97 | Vitória Brasil-SP | | mt | KP146031 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 14669 | SMRP 92.99 | Vitória Brasil-SP | | mt | KP146036 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 20391 | SMRP 92.307 | Pirenópolis-GO | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 20381 | SMRP 92.297 | Serra do Cipó-MG | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri" - L2</i> | ZUEC 20383 | SMRP 92.299 | Três Marias-MG | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. cf. cuvieri</i> | MZUSP 134232 | CTMZ 01623 | Embu-SP | | mt | KP146029 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. cuvieri</i> | CFBH 6442 | | Rio Claro-SP | | mt | KP146033 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. cuvieri</i> | LGE 8875 | LGE 8875 | Argentina: Puerto Iguazu, Misiones | | mt | KP146037 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 18203 | SMRP 252.100 | Óbidos-PA | 19696 | mt, R | MK241507 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 22694 | SMRP 252.124 | Óbidos-PA | 18767 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 22695 | SMRP 252.125 | Óbidos-PA | 18962 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 22701 | SMRP 252.131 | Óbidos-PA | | mt | MK241503 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 22702 | SMRP 252.132 | Óbidos-PA | | mt | MK241504 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus sp.</i> | ZUEC 22703 | SMRP 252.133 | Óbidos-PA | 19952 | mt, R | MK241505 | Nascimento et al., 2019 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|------------|--------------|-----------------|-------|-------|----------|-------------------------|
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 22704 | SMRP 252.134 | Óbidos-PA | | mt | MK241506 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 22708 | SMRP 252.138 | Monte Alegre-PA | 20793 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17591 | SMRP 252.44 | Prainha-PA | | mt | MK241512 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17592 | SMRP 252.45 | Prainha-PA | 20446 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17593 | SMRP 252.46 | Prainha-PA | 18530 | mt, R | MK241511 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17594 | SMRP 252.47 | Prainha-PA | 18409 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17595 | SMRP 252.48 | Prainha-PA | 20198 | R | | Este trabalho |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 18185 | SMRP 252.87 | Monte Alegre-PA | 18501 | mt, R | MK241509 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 18188 | SMRP 252.88 | Curuá-PA | | mt | MK241510 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 18190 | SMRP 252.90 | Alenquer-PA | 20102 | mt, R | MK241508 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 18196 | SMRP 252.97 | Óbidos-PA | 20459 | mt, R | MK241502 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17600 | SMRP 260.01 | Parque Viruá-RR | 13874 | mt, R | MK241513 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>Physalaemus</i> sp. | ZUEC 17604 | SMRP 260.05 | Parque Viruá-RR | 14950 | mt, R | MK241514 | Nascimento et al., 2019 |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L4 | | PS710 | Carajas-PA | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L4 | | PS932 | Parauapebas-PA | | mt | | Este trabalho |
| " <i>P. cuvieri</i> " - L4 | | PS944 | Parauapebas-PA | | mt | | Este trabalho |

| | | | | | | | |
|------------------------------|------------|--------------|-----------------------------------|------|--------|----------|-------------------------|
| <i>"P. cuvieri"</i> - L4 | | PS967 | Serra da Bocaina - Carajas | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri"</i> - L4 | | PS970 | Serra da Bocaina - Carajas | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | | PS475 | Santa Barbara-PA | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | | PS555 | Belém-PA | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | | PS556 | Parque Ambiental Utinga, Belém-PA | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 13704 | SMRP 252.06 | Belém-PA | | mt | KP146003 | Lourenço et al, 2015 |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 21355 | SMRP 252.105 | Santa Bárbara-PA | | mt | MK241499 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 21357 | SMRP 252.107 | Santa Bárbara-PA | 5324 | R | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 21358 | SMRP 252.108 | Santa Bárbara-PA | 6070 | R | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 21363 | SMRP 252.113 | Santa Bárbara-PA | | mt | MK241500 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 21366 | SMRP 252.116 | Santa Bárbara-PA | | mt | MK241501 | Nascimento et al., 2019 |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 13730 | SMRP 252.32 | Belém-PA | | mt | | Este trabalho |
| <i>P. ephippifer</i> | ZUEC 13738 | SMRP 252.40 | Belém-PA | | mt | HQ592353 | Lourenço et al., 2015 |
| <i>"P. cuvieri"</i> - M2SPAB | MNRJ 24258 | SMRP 92.04 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C,R | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri"</i> - M2SPAB | MNRJ 24259 | SMRP 92.05 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt | | Este trabalho |
| <i>"P. cuvieri"</i> - M2SPAB | MNRJ 24260 | SMRP 92.06 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |

| | | | | | | | |
|------------------------------|------------|-------------|--|------|--------|----------|----------------------|
| "P. cuvieri" - M2SPAB | MNRJ 24263 | SMRP 92.09 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C,R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | MNRJ 24265 | SMRP 92.11 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C,R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | MNRJ 24266 | SMRP 92.12 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | ZUEC 24592 | SMRP 92.313 | Vilarejo do Trecho Seco (entre Imperatriz e Açailândia), Imperatriz/MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2290 | SMRP 92.327 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2291 | SMRP 92.328 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2293 | SMRP 92.330 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2296 | SMRP 92.333 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2298 | SMRP 92.335 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M2SPAB | HUFMA 2301 | SMRP 92.338 | Vila Nova dos Martírios-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1A | ZUEC 17912 | SMRP 419.11 | Macaíba-RN | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1A | ZUEC 17886 | SMRP 92.273 | Alagoinhas-BA | | mt | KP146011 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1A | ZUEC 17897 | SMRP 92.284 | Caruaru-PE | | mt | KP146012 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | HUFMA 884 | SMRP 92.247 | São Luis-MA | 4871 | mt, R | KP146021 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13083 | SMRP 97.06 | Crateús-CE | 6999 | R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13102 | SMRP 92.27 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |

| | | | | | | | |
|---------------------------|------------|-------------|-------------------|------|-------|----------|----------------------|
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17907 | SMRP 419.06 | Araruna-PB | | mt | KP146017 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17908 | SMRP 419.07 | Macaíba-RN | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17909 | SMRP 419.08 | Macaíba-RN | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13091 | SMRP 92.17 | Urbano Santos-MA | | mt | KP146020 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13092 | SMRP 92.18 | Urbano Santos-MA | 4235 | mt, R | KP146018 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13093 | SMRP 92.19 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13094 | SMRP 92.20 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17517 | SMRP 92.227 | Balsas-MA | 7192 | mt, R | KP146016 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17887 | SMRP 92.274 | Campina Grande-PB | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13103 | SMRP 92.28 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17899 | SMRP 92.286 | Araruna-PB | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17900 | SMRP 92.287 | Araruna-PB | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 17901 | SMRP 92.288 | Araruna-PB | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13105 | SMRP 92.30 | Urbano Santos-MA | | mt | KP146019 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13107 | SMRP 92.32 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 11939 | SMRP 92.33 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |

| | | | | | | | |
|------------------------------|------------|-------------|--|--|--------|----------|----------------------|
| "P. cuvieri" - L1B | | SMRP 92.36 | Urbano Santos-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13082 | SMRP 97.05 | Crateús-CE | | mt | KP146015 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13085 | SMRP 97.08 | Crateús-CE | | mt | KP146013 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - L1B | ZUEC 13090 | SMRP 97.13 | Crateús-CE | | mt | KP146014 | Lourenço et al, 2015 |
| P. aff. cuvieri | ZUEC 13088 | SMRP 97.11 | Serra das Almas, Crateús-CE | | mt | KP146014 | Lourenço et al, 2015 |
| P. aff. cuvieri | ZUEC 13089 | SMRP 97.12 | Serra das Almas, Crateús-CE | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | MNRJ 24255 | SMRP 92.01 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | MNRJ 24257 | SMRP 92.03 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C,R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | MNRJ 24261 | SMRP 92.07 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | MNRJ 24262 | SMRP 92.08 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C,R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | | SMRP 92.311 | Imperatriz-MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | | SMRP 92.312 | Imperatriz-MA | | R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | ZUEC 24591 | SMRP 92.314 | Vilarejo do Trecho Seco (entre Imperatriz e Açailandia), Imperatriz/MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | | SMRP 92.315 | Vilarejo do Trecho Seco (entre Imperatriz e Açailandia), Imperatriz/MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | | SMRP 92.316 | Vilarejo do Trecho Seco (entre Imperatriz e Açailandia), Imperatriz/MA | | mt, R | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | | SMRP 92.317 | Vilarejo do Trecho Seco (entre Imperatriz e Açailandia), Imperatriz/MA | | mt | | Este trabalho |

| | | | | | | | |
|------------------------------|------------|-------------|-----------------------------|------|-------|----------|----------------------|
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2288 | SMRP 92.325 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2289 | SMRP 92.326 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2292 | SMRP 92.329 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2294 | SMRP 92.331 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2295 | SMRP 92.332 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2297 | SMRP 92.334 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2299 | SMRP 92.336 | São Pedro da Água Branca-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2300 | SMRP 92.337 | Vila Nova dos Martírios-MA | | mt,C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1SPAB | HUFMA 2302 | SMRP 92.339 | Vila Nova dos Martírios-MA | | mt, C | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17516 | SMRP 92.226 | Balsas-MA | 5138 | mt, R | KP146022 | Lourenço et al, 2015 |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17521 | SMRP 92.231 | Balsas-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17522 | SMRP 92.232 | Balsas-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17524 | SMRP 92.234 | Balsas-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17525 | SMRP 92.235 | Balsas-MA | | mt | | Este trabalho |
| "P. cuvieri" - M1Bal | ZUEC 17532 | SMRP 92.242 | Balsas-MA | | mt | | Este trabalho |

Tabela S2. Estatísticas resumidas das amostras de dados 3RAD gerados pelo ipyrad. SMRP: Coleção de tecidos e preparações cromossômicas “Shirlei Maria Recco Pimentel”, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

| Amostra | SMRP | Número total de reads | Número de reads após filtragem de qualidade | Número de locos na matriz final de dados | Heterozigosidade (%) |
|----------------|-------------|------------------------------|--|---|-----------------------------|
| L9 | 252.108 | 4111577 | 4066654 | 994 | 0,8085 |
| L10 | 92.9 | 3567506 | 3520495 | 1100 | 0,8321 |
| L11 | 252.87 | 5894031 | 5762780 | 788 | 0,7909 |
| L12 | 92.18 | 2836789 | 2787502 | 976 | 0,831 |
| L13 | 252.107 | 5259717 | 5214628 | 1092 | 0,7783 |
| L14 | 252.97 | 6421816 | 6328690 | 782 | 0,8058 |
| L15 | 252.100 | 6948259 | 6851399 | 802 | 0,8021 |
| L16 | 252.124 | 5795812 | 5719018 | 774 | 0,8018 |
| L17 | 252.125 | 6852250 | 6773792 | 764 | 0,7829 |
| L18 | 92.202 | 7265319 | 7175888 | 452 | 0,7508 |
| L19 | 92.226 | 5650922 | 5558623 | 1062 | 0,7374 |
| L20 | 92.247 | 7301236 | 7177467 | 1118 | 0,7646 |
| L21 | 252.133 | 6577310 | 6521431 | 778 | 0,8392 |
| L22 | 252.138 | 7287896 | 7177302 | 792 | 0,8914 |
| L23 | 252.90 | 6123622 | 6036176 | 792 | 0,8336 |
| L24 | 252.45 | 6678369 | 6591526 | 792 | 0,898 |
| L25 | 252.46 | 7914785 | 7834158 | 758 | 0,8161 |
| L26 | 252.47 | 7025271 | 6932517 | 762 | 0,7767 |
| L27 | 252.48 | 5482230 | 5339702 | 798 | 0,8364 |
| L28 | 260.1 | 3548366 | 3378800 | 642 | 0,7294 |
| L29 | 260.5 | 4018071 | 3987070 | 650 | 0,7509 |
| L30 | 92.3 | 5809355 | 5728671 | 1276 | 0,8868 |
| L31 | 92.4 | 4898642 | 4841615 | 1234 | 0,8081 |
| L32 | 92.203 | 6339015 | 6243923 | 500 | 0,8207 |
| L33 | 92.8 | 6420849 | 6360493 | 1258 | 0,8094 |
| L34 | 92.11 | 4116204 | 4065305 | 1148 | 0,7794 |
| L35 | 92.12 | 5029525 | 4906961 | 1212 | 0,8335 |
| L43 | 97.20 | 5385590 | 5268346 | 984 | 0,8937 |
| L44 | 92.227 | 8864032 | 8631924 | 1068 | 0,8206 |
| L45 | 92.128 | 3826641 | 3792978 | 366 | 0,8604 |
| L46 | 92.139 | 5045759 | 4977630 | 362 | 0,8446 |
| L47 | 92.201 | 7129925 | 7037703 | 488 | 0,7868 |
| L48 | 92.7 | 7783337 | 7698910 | 1286 | 0,8691 |

9 Anexos

9.1 Direitos autorais

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 **Análise genética e citogenética do complexo *Physalaemus cuvieri*–*Physalaemus ephippifer* (Anura, Leptodactylidae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 03 de Abril de 2020

Assinatura : Renata de O. Tenório
Nome do(a) autor(a): **Renata de Oliveira Tenório**
RG n.º 47073250-7

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

9.2 Bioética



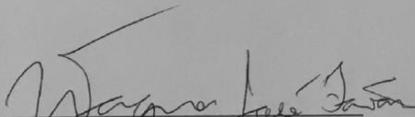
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Análise filogeográfica do complexo *Physalaemus cuvieri-Physalaemus ephippifer* (Anura, Leptodactylidae)**, registrada com o nº **4902-1/2018**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini** e **Renata de Oliveira Tenório**, que envolve a produção, manutenção 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, 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)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **07 de fevereiro de 2018**.

| | |
|--|--------------------------------------|
| Finalidade: | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência do projeto: | 31/07/2017-31/10/2019 |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 07/02/2018-31/10/2019 |
| Espécie / linhagem/ raça: | Anfíbio / <i>Physalaemus</i> |
| No. de animais: | 30 |
| Idade/Peso: | 01 ano / 02g |
| Sexo: | 15 machos / 15 fêmeas |
| Origem: | Nordeste brasileiro, Maranhão |
| Biotério onde serão mantidos os animais: | LaDiVert, DBA/IB/UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 07 de fevereiro de 2018.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.