

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA  
EVOLUTIVA – PPGGCBEV

TAXONOMIA E FILOGENIA MOLECULAR DO GRUPO *Rhinella*  
*margaritifera* (AMPHIBIA, ANURA, BUFONIDAE) DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA

DANIELA MARIA LEROY E VIEIRA

Manaus – Amazonas  
Abril/2010

DANIELA MARIA LEROY E VIEIRA

Taxonomia e filogenia molecular do grupo *Rhinella margaritifer*  
(Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia brasileira

Orientador: Tomas Hrbek, Dr

Co-orientadora: Albertina Pimentel Lima, Dra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – Amazonas  
Abril/ 2010

Vieira, Daniela Maria Leroy e  
Taxonomia e filogenia molecular de *Rhinella margaritifera* (Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia Brasileira ----Manaus: [s. n.], 2010.  
xix, 123f.: il. color.  
Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM, Manaus, 2010.  
Orientador: Tomas Hrbek  
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva  
1. Filogenia 2. *Rhinella margaritifera* 3. espécie críptica. 4. filogeografia  
I. Título.

CDD 19. ed. 581.5

**Sinopse:**

*Rhinella margaritifera* constitui um complexo críptico, entretanto, características morfológicas não são capazes de identificar as possíveis espécies dentro do grupo. A análise dos genes 12S, 16S, tirosinase e rodopsina mostrou a existência de possíveis 13 linhagens dentro do complexo, sendo que muitas destas ocorrem em simpatria, tem pequena distribuição e, muitas vezes, são contíguas. Este é um estudo preliminar que gera subsídios para a descrição de futuras espécies deste complexo e ajuda a estimar a diversidade da anurofauna da Amazônia brasileira.

Palavras-chave: 1. Filogenia 2. *Rhinella margaritifera* 3. espécie críptica. 4. filogeografia

*Às pessoas que sempre me apoiaram, especialmente, à minha querida e amada família.*

*Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.  
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo  
que planejando, vivendo que esperando porque embora quem quase morreu esteja vivo, quem  
quase vive já morreu.  
Luiz Fernando Veríssimo*

*O sonho é o material com que se pavimenta os mais sólidos caminhos. Quem sonha já  
começou a abrir sua própria estrada.  
Autor desconhecido*

*Uma coisa, porém, eu faço: esquecendo o que fica para trás, eu me lanço para o que está na  
frente.  
Fl 3,13*

## Agradecimento Institucional

Os meus agradecimentos aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica, ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva pela estrutura acadêmica, ao Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da Universidade Federal do Amazonas por toda estrutura física e suporte técnico-laboratorial.

Sou muito grata!

## Agradecimento Pessoal

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, não só nesta etapa, mas em toda minha vida, pois me presenteou com vida, saúde, força, coragem e sabedoria para entender e superar as provações.

Agradeço à minha querida e amada família, pelo apoio, carinho, incentivo e amor. Aos meus pais, Diva Pires Leroy e Vieira e José Luiz Vieira, meus pilares e exemplos de honestidade e caráter. À minha mãe dedico gratidão adicional pelas palavras sempre oportunas, pelo exemplo de fé e por nunca me deixar desistir. Agradeço ainda ao meu querido irmão, Luiz Guilherme Leroy e Vieira, pela amizade, preocupações e pela torcida. Obrigada família! Amo vocês!

Agradeço, especialmente, meu orientador, Dr. Tomas Hrbek, pesquisador exemplar, que acreditou em mim. Obrigada pela oportunidade e confiança, por estar sempre disposto e paciente para tirar minhas dúvidas, pela ajuda significativa que contribuiu para meu desenvolvimento acadêmico e para realização deste projeto. É com muita admiração e respeito que demonstro meu sincero agradecimento.

À Dra. Albertina Lima, minha co-orientadora, agradeço por me dar este presente, o projeto com os sapinhos que me deixaram tão encantada. Com certeza, sua empolgação e amor à herpetologia me contagiaram em todas nossas conversas. Obrigada pela confiança e oportunidade.

Com carinho especial, agradeço à Dra. Izeni Pires Farias, que coordena o laboratório LEGAL, sempre presente e disposta a contribuir. Com certeza, um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Programa Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA, pela oportunidade de cursar este mestrado. Agradeço aos docentes pelos conhecimentos adicionados durante o curso, à coordenação do programa e, acima de tudo, às secretárias, sempre tão solícitas e atenciosas, em especial, Alessandra.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, por toda infra-estrutura, em especial pelo espaço do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL).

Obrigada a todos os colegas do LEGAL, pelo ótimo ambiente de trabalho e pelos ensinamentos que melhoraram decisivamente minha pesquisa, em especial ao Ed e Pedro Ivo, que me ajudaram nos períodos iniciais de adaptação e aprendizagem. Mesmo sem citar todos aqui, a colaboração de cada um foi muito importante e sou muito grata.

Agradeço a todos os amigos do GCBEv: Alexandre, Edvaldo, Gabriela, Graciela, Melina, Liza, Suzana, Arlisson, Fabíola, Alessandra, mas em especial aos extraterrestres que chegaram comigo neste mundo novo e foram super importantes para minha adaptação e fizeram muito bem o papel de família postiça, Bárbara, Deyla, Edson, Joel, Leila, Mariana e Mauro. Pessoas especiais e inesquecíveis, obrigada pela força, pelos risos, amizade, cervejas, papos cabeças, papos furados, pelos aniversários, pelas piadas, danças, abraços, enfim, por tudo que vocês foram pra mim e que eu também espero ter sido pra vocês. Valeu!!!

A Igor, pela presteza e ajuda nos campos, por sempre me ensinar uma coisa nova e me dar a oportunidade de conhecer os caboclos, povo maravilhoso que nas nossas coletas sempre se mostrou solícito e amigo. Obrigada também pela leitura da primeira versão desta dissertação, a qual contou não somente com suas correções, mas com suas idéias e incentivos a cada comentário.

A Eduardo e Natasha, pela inestimável ajuda com as análises desta dissertação. Com certeza, esta fase difícil teria ficado muito pior se não tivesse podido contar com vocês. E, além de tudo, sempre me dando ânimo, trocando idéias e tornando tudo mais tranqüilo.

Agradeço à amiga Bianca Ottoni, recém chegada em minha vida, mas que foi de fundamental importância pelas palavras e conselhos, por me dar forças nesta última etapa de trabalho. Obrigada por agüentar os momentos de afobação e por me entender, até mesmo se eu precisasse bater umas portas.

A Tiago Nogueira Galinari, pessoa única e especial, com quem, como um presente de Deus, tive a oportunidade de conviver. Obrigada pelo apoio quando precisei largar toda minha vida em Minas e me lançar neste mundo novo e desconhecido. Suas palavras de carinho, esperança, força e coragem foram fundamentais para minha adaptação e para que pudesse investir neste mestrado sem olhar pra trás. Você ficará para sempre na memória e no coração.

À amiga Rubana Palhares, pessoa querida que, num momento difícil neste período, soube me dizer as palavras exatas para me dar calma e me fazer seguir em frente. Minha amiga chapiscadora de quem sinto muito falta.

À Helena Baeta Costa, amiga, confidente, a irmã que escolhi para minha vida. Nem mesmo a distância e os momentos de ausência foram capazes de abalar nossa amizade de mais de duas décadas (afe...). Agradeço imensamente pelas preocupações, pelos risos, pelos exemplos de coragem, garra de mulher e profissionalismo, por sempre me jogar pra cima e fazer acreditar que tudo de ruim sempre vai passar.

Ao querido amigo Edson, companheiro de todas as horas, agradeço por sempre me ouvir, por sempre me emprestar um ombro, um colo e seus ouvidos pra desabafar. Pelos

momentos de total piração, como dos alimentos alucinógenos ou da nossa banda imaginária de músicas de fossa, por ser cúmplice dos eventos impactantes que aconteceram na minha vida, por sempre estar comigo até o fim das festas e até mesmo por me encontrar de madrugada em pleno Porão. Obrigada ainda pelos conselhos sempre tão diretos, envolvendo “bolachas no pacote” e “poço de estabilidade emocional”. Você é “o cara”!

Por fim, agradeço a todos que cruzaram meu caminho nesta etapa da minha vida. Aos que me deram esperança, incentivo ou uma simples palavra positiva, meu muito obrigada. Agradeço também aqueles que me jogaram pra baixo, pois só assim pude perceber o quão forte e determinada eu sou e, por isso, VENCI.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

Os sapos pertencentes ao complexo *Rhinella margaritifera* são considerados um dos mais complexos dos anuros neotropicais. Eles possuem ampla distribuição, mas estudos prévios feitos por Hass *et al.* (1995) e Fouquet *et al.* (2007) propõem que estes constituam complexos de espécies crípticas. Aparentemente, fatores históricos favoreceram altos níveis de diversidade críptica dentro do grupo e os métodos taxonômicos (morfológicos) utilizados até agora não foram os mais apropriados para identificar estas possíveis espécies. Isto porque o complexo não parece mostrar um padrão morfológico diagnóstico. Assim sendo, seqüências de DNA podem ser usadas da mesma maneira que outros dados para gerar hipóteses sobre o status e os limites de espécies. O presente estudo, portanto, teve por objetivo propor uma hipótese filogenética que tentasse estimar quantas possíveis espécies crípticas há dentro do grupo na região estudada e se eventos biogeográficos poderiam explicar estes padrões. Análises dos genes mitocondriais 12S rRNA e 16S rRNA e dos genes nucleares tirosinase e rodopsina mostram a existência de 13 linhagens dentro do complexo, sendo que muitas destas ocorrem em simpatria, têm pequena distribuição e, muitas vezes, são contíguas. Como as análises filogeográficas foram feitas considerando todas as linhagens como uma única espécie, os dados obtidos não foram tão precisos. Entretanto, foi possível corroborar estes resultados com os obtidos nas análises filogenéticas, principalmente para os genes mitocondriais. Além disto, foi visto concordância espacial em alguns eventos inferidos. Tudo isto reforça o status de unidades evolutivas significativas (ESU), já que houve monofilia para os genes mitocondriais e diferenças significativas para os genes nucleares. Contudo, sugerimos que novos estudos que promovam outras evidências (ecológicas, fisiológicas etc) sejam feitos para que o status de espécies destas linhagens seja mais seguramente atribuído.

Palavras-chave: Filogenia, *Rhinella margaritifera*, espécie críptica, filogeografia.

## ABSTRACT

The toads of *Rhinella margaritifera* complex are one of the most chaotic of the neotropical anurans. They are widespread, but studies of Hass *et al.* (1995) and Fouquet *et al.* (2007) propose this toads are a species cryptic complex. Clearly, many historical factors act generating high cryptic diversity level in this group and the taxonomic methods (morphology) used until now were not the most appropriate to identify this possible species. Therefore DNA sequences can be used to generate hypotheses about status and boundaries of species. The goal of present study was to propose a phylogenetics hypothesis to estimate the number of possible cryptic species and if biogeographic events could explain these patterns. Analyses of the 12S rRNA and 16S rRNA of mitochondrial genome and the tyrosinase and rhodopsin nuclear genes showed 13 lineages in the complex. Many of these are sympatric, with small distribution and mainly contiguous. As the phylogeographic inferences were made considering all the lineages as only one specie, the obtained data were not so concise. However these results corroborated with those of phylogenetics analyses, mainly for the mitochondrial genes. Moreover some spatial inferences were concordant for some events. All this reinforce the evolutionarily significant units (ESU) status, since it had significant monophyly for the mitochondrial genes and significant differences for the nuclear genes. However, we suggest that new studies should be performed to promote other evidences (ecological, physiological etc) to correctly attribute the status of species for these lineages.

Key-words. Phylogeny, *Rhinella margaritifera*, cryptic specie, phylogeography.

## Sumário

Lista de Figuras .....	xvi
Lista de tabelas .....	xx
1 – Introdução .....	1
1.1 – <i>Introdução geral</i> .....	1
1.2 – <i>Biologia e incertezas taxonômicas e filogenéticas no grupo <i>R. margaritifera</i></i> .....	2
1.3 – <i>Existência de diversidade críptica em anuros</i> .....	8
1.4 – <i>Estudos filogeográficos na Amazônia</i> .....	9
1.5 – <i>Marcadores moleculares</i> .....	14
2 – Justificativa e Hipóteses .....	17
3 – Objetivos .....	18
3.1 - <i>Objetivo Geral</i> .....	18
3.2 - <i>Objetivos Específicos</i> .....	18
4 - Material e métodos .....	19
4.1 – <i>Locais de coleta e amostragem</i> .....	19
4.2 – <i>Extração de DNA</i> .....	21

4.3 – Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	21
4.4 – Purificação e seqüenciamento .....	25
4.5 – Edição e alinhamento das seqüências .....	27
4.6 – Análise de dados .....	27
4.6.1 – Análise filogenética .....	27
4.6.2 – Análises filogeográficas .....	28
5 – Resultados .....	29
5.1 – 16S .....	29
5.1.1 – Filogenia .....	29
5.1.2 – <i>Rede de haplótipos</i> .....	29
5.1.3 – NCPA .....	31
5.2 – 12S .....	34
5.2.1 – Filogenia .....	34
5.2.2 – <i>Rede de haplótipos</i> .....	36
5.2.3 – NCPA .....	38
5.3 – Mitocondriais .....	38
5.3.1 – Filogenia .....	38

5.3.2 – Rede de haplótipos .....	39
5.3.3 – NCPA .....	39
5.4 – Tirosinase .....	43
5.4.1 – Filogenia .....	43
5.4.2 – Rede de haplótipos .....	43
5.4.3 – NCPA .....	45
5.5 – Rodopsina .....	45
5.5.1 – Filogenia .....	45
5.5.2 – Rede de haplótipos .....	46
5.5.3 – NCPA .....	46
6 – Discussão .....	50
6.1 – 16S .....	50
6.2 – 12S .....	58
6.3 – Mitocondriais .....	64
6.4 – Tirosinase .....	70
6.5 – Rodopsina .....	71
6.6 – Discussão geral .....	72
7 – Conclusões .....	77

8 – Bibliografia .....	79
9 – Apêndices .....	90
9.1 – Tabela de amostras .....	90
9.2 – Tabelas de NCPA .....	90

## Lista de Figuras

- Figura 01. Três diferentes morfotipos de sapos do grupo *Rhinella margaritifer*. Fotos de: 1- Albertina P. Lima; 2 e 3: Retirado de Fouquet *et al.* (2007)..... 4
- Figura 02. Casal de *Rhinella gr. margaritifer* num amplexo para reprodução. Foto: Albertina P. Lima ..... 5
- Figura 03. Figura 3: Mapa da distribuição geográfica de *Rhinella gr. margaritifer*. Modificado de <http://www.globalamphibians.org>, em 08/11/2008, às 10:30h ..... 6
- Figura 04. Esquema mostrando as diferentes posições taxonômicas propostas para o grupo de espécies *Rhinella margaritifer*. Modificado de Frost *et al.*, 2006 ..... 8
- Figura 05. Esquema do DNA mitocondrial de um anuro. Os genes utilizados neste trabalho (12S rRNA e 16S rRNA) estão apontados pela seta e vermelho. Modificado de Zhang *et al.*, 2009 ..... 16
- Figura 06. Mapa representando os pontos de coleta. Modificado de <http://www.maps.google.com.br> ..... 21
- Figura 07. Árvore filogenética de 16S baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o GTR + G + I ..... 23
- Figura 08. Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a oito possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 24

Figura 09. Redes de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede B corresponde a duas possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer* e as redes C e D a uma linhagem cada. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 25

Figura 10: Árvore filogenética de 12S baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o TVM + G. .... 40

Figura 11: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 12S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a onze possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 41

Figura 12: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 12S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. As redes de B a G correspondem a seis possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 42

Figura 13: Árvore filogenética dos genes mitocondriais analisados de forma concatenada, baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o GTR + G + I ..... 43

Figura 14: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências dos genes 12S+16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a seis possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifera*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III; amarelo = nível IV; rosa = nível V). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 44

Figura 15: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências dos genes 12S+16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. As redes de B a F correspondem, cada uma, a uma possível linhagem existente dentro do complexo *margaritifera*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III; amarelo = nível IV). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 44

Figura 16: Árvore filogenética de Tirosinase baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o HKY + G ..... 45

Figura 17: Árvore filogenética de Rodopsina baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o J2 + G ..... 46

Figura 18: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene Rodopsina. Foram obtidas doze redes de haplótipos. Esta rede corresponde a três possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifera*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 47

Figura 19: Redes de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene Rodopsina. Foram obtidas doze redes de haplótipos. As redes em A foram geradas por haplótipos de um mesmo indivíduo. Os haplótipos em B não se ligaram a nenhuma rede. Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1 ..... 48

Figura 20: Diferenças morfológicas entre um espécime de Autazes (AM) e da Guiana Francesa, pertencentes ao clado 5. Ao contrário do que foi proposto por Fouquet *et al.* (2007a), crestas craniais extremamente expandidas dorsolateralmente não parecem ser um sinapomorfia para o grupo. Fotos: A - Daniela Leroy; B – Fouquet *et al.*(2007a) .....47

Figura 21: Mapa mostrando a distribuição das possíveis linhagens existentes de *R. margaritifer*. Cada cor corresponde a uma linhagem encontrada no presente trabalho. Mapa original de Marilyn J. Weitzman. Modificado por Tibério Gonzaga de Figueiredo..... 48

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 01. Principais teorias biogeográficas propostas para a Amazônia</i> .....	13
Tabela 02. Relação entre espécies, número de indivíduos e locais coletados .....	22
<i>Tabela 03. Componentes da reação de PCR dos genes mitocondriais</i> .....	24
Tabela 04. Componentes da primeira reação de PCR dos genes nucleares .....	22
Tabela 05. Componentes da segunda reação de PCR dos genes nucleares .....	13
Tabela 06. Primers utilizados neste trabalho, suas seqüências e devidas referências. As referências onde se encontram * se referem a primers desenhados para este trabalho .....	22
Tabela 07. Componentes da reação de PCR seqüenciamento .....	13
Tabela 08. Matriz de significância para os valores de P da análise de $F_{st}$ par a par para o gene tirosinase. Valores significativos de comparações par a par estão assinalados com +. Valores não significativos estão marcados com - .....	46
Tabela 09. Matriz de significância para os valores de P da análise de $F_{st}$ par a par para o gene rodopsina. Valores significativos de comparações par a par estão assinalados com +. Valores não significativos estão marcados com - .....	50

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - INTRODUÇÃO GERAL

Florestas tropicais são famosas por serem os ecossistemas mais ricos em espécies do planeta. As florestas tropicais estão desaparecendo a taxas alarmantes, sendo que catalogar as espécies que as constituem deve ser, obviamente, o primeiro passo para seu entendimento e conservação (Gentry, 1992). Em vista disto, a Amazônia brasileira enfrenta as maiores ameaças e apresenta as maiores oportunidades dos nossos tempos para a conservação da biodiversidade tropical. (Peres, 2005).

Os anfíbios são um dos grupos mais diversos dentre os vertebrados (Smith *et al.*, 2008). Entretanto, são muito sensíveis às modificações no habitat, poluentes e a mudanças climáticas globais (Phillips 1990, Alford e Richards 1999) e o grupo é um dos que mais vem sofrendo declínios, sendo muitos fatores responsáveis por isto (Storfer, 2003). Perda de habitat, introdução de espécies, super-exploração, mudanças climáticas globais, contaminantes químicos e doenças (principalmente as causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*) são os que mais agravam a situação, sendo que estes fatores podem agir sozinhos ou sinergicamente para eliminar as populações e espécies (Carey *et al.*, 2001; Storfer, 2003). Conseqüentemente, os efeitos destes problemas nos anfíbios devem ser vistos no contexto do amplo colapso da biodiversidade atual, sendo que, para muitos, o declínio deste grupo servirá como um modelo para entender esta crise (Carey *et al.*, 2001; Storfer, 2003; Stuart *et al.*, 2004).

Os anfíbios neotropicais são conhecidos por exibir notável estrutura filogeográfica e divergências genéticas profundas, sendo necessária grande quantidade de tempo para que diferenças fenotípicas possam evoluir (Lougheed *et al.*, 1999; Zamudio e Savage, 2003; Lougheed *et al.*, 2006). As florestas da Bacia Amazônica são umas das mais ricas em espécies de anuros, mas pouco se sabe sobre a diversidade genética dentro e entre as espécies desta região, sugerindo que a história evolutiva deste grupo é muito mais complicada do que a imaginada quando se analisam apenas dados morfológicos (Elmer *et al.*, 2007). Por isto, a não-delimitação correta de espécies pode levar a interpretações errôneas (Sites e Marshall, 2003), dificultando a realização de estratégias eficientes para a conservação e o manejo da biodiversidade.

A ordem Anura, composta por sapos, rãs e pererecas, apresenta vários problemas e deficiências em sua classificação taxonômica. A maioria dos anuros é classificada na subordem Neobatrachia, que inclui duas linhagens principais, as superfamílias Ranoidea e Hyloidea (ou Bufonoidea), sendo que dentro desta última está a família Bufonidae (Hedges e Maxson, 1993; Hillis *et al.*, 1993; Hay *et al.*, 1995). Nesta ordem, o encontro entre os sexos se dá por orientação sonora, sendo que o canto varia entre as espécies e, dentro destas, existem dois ou três tipos diferentes, utilizados em diferentes situações. As características do canto de anúncio servem para identificar a espécie e o sexo do animal que o emite (Pough *et al.*, 1998). O canto de anúncio de uma espécie é considerado um caráter evolutivo conservativo e táxons aparentados frequentemente apresentam cantos similares (Pough *et al.*, 1998).

A família Bufonidae, composta por 62 espécies, conforme Frost *et al.* (2006), também conhecida como a dos sapos verdadeiros, se caracteriza por uma grande glândula paratóide no lado da cabeça e a maioria das espécies apresenta tubérculos na pele do dorso. São terrestres e insetívoras, sendo as formigas sua dieta principal. Adultos se agregam em brejos ou em ambientes lânticos para a reprodução. Os ovos são pequenos e pigmentados e a ovoposição é realizada em cordões na água. Os girinos são pequenos e negros. O disco oral que margeia a boca é direcionado anteroventralmente e tem uma fila de papilas marginais lateralmente, estando ausentes papilas dorsal e ventralmente. O número de dentes geralmente segue a fórmula 2(1)3 (Rodríguez e Duellman, 1994).

Com um papel ainda não esclarecido na sua função como bioindicador, Sousa e colaboradores (2008) sugerem que, possivelmente, os anuros podem funcionar como bioindicadores da diversidade de outros grupos da biota, inclusive de invertebrados, ou então grupos diferentes da fauna podem responder de forma semelhante aos efeitos da perturbação e sucessão. Este uso como bioindicadores é mais eficaz se os organismos possuem alta distribuição em uma determinada área ou bioma. Como a família Bufonidae possui a distribuição mais ampla dentre todos os anfíbios e uma das maiores entre os vertebrados, além de histórias de vida variadas, os bufonídeos são interessantes para trabalhos de biologia evolutiva e biogeografia (Pramuk *et al.*, 2001).

## **1.2 - BIOLOGIA E INCERTEZAS TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS NO GRUPO *R. margaritifer***

Frost e colaboradores (2006) dividiram o gênero *Bufo* em dois, *Rhinella* e *Chaunus*. O gênero *Rhinella* tem o número de espécies descritas aumentado a cada ano (Duellman e Sweet,

1999). Este gênero é cosmopolita, não ocorrendo apenas na Antártida, Austrália e em Madagascar (Duellman e Sweet, 1999). Apesar da grande quantidade de trabalhos envolvendo a filogenia deste gênero, suas relações sistemáticas e a taxonomia das espécies ainda são discordantes e pouco conclusivas (Pramuk e Kadivar, 2003).

Os sapos do complexo *Rhinella margaritifera* (Fitzinger, 1826), como proposto por Frost *et al.* (2006), incluem os antigos grupos de espécies de *Bufo typhonius* ou *Bufo margaritifera*, com umas das histórias taxonômica e sistemática mais complexas dos anuros neotropicais (De La Riva *et al.*, 2000; Caramaschi e Pombal Jr., 2006). Frost *et al.* (2006) incluíram no complexo *margaritifera* todas as espécies anteriormente associadas a estes dois grupos, resultando em 14 táxons. São eles: *R. acutirostris*, *R. alata*, *R. castaneotica*, *R. dapsilis*, *R. hoogmoedi*, *R. lescurei*, *R. magnussoni*, *R. margaritifera*, *R. martyi*, *R. proboscidea*, *R. roqueana*, *R. sclerocephala*, *R. scitula* e *Rhinella stanlaii*. Em 2010, uma nova espécie do complexo foi descrita por Ávila *et al.*, sendo sua ocorrência no Pantanal e denominada *R. paraguayensis*.

O nome vulgar para os espécimes deste grupo é sapo-folha. As espécies de *R. gr. margaritifera* (Laurenti, 1768) são sapos de tamanho médio (machos medem entre 40-67 mm e as fêmeas entre 46-76 mm), distribuídos principalmente na Amazônia, sendo que no Brasil apenas *R. scitula* é encontrada no Cerrado, e *R. paraguayensis*, típica do Pantanal, não estão neste bioma (Ávila *et al.*, 2010). A pele do dorso possui tubérculos e o espinho neural da vértebra é proeminente. O ventre é granular. Uma faixa diagonal de tubérculos cônicos se estende da parte de trás da cabeça até o fim do tronco. O tímpano pode estar presente ou ausente. As características mais marcantes são as crestas pós-orbitais elevadas em algumas espécies do grupo, sendo que algumas fêmeas são extremamente expandidas dorsolateralmente, apesar deste não parecer ser o padrão mais comumente observado na Amazônia central. Outra característica diagnóstica é o nariz pontiagudo em vista dorsal. Em vista lateral, o nariz é afinado e proeminente anteriormente. As glândulas paratóides são triangulares ou subtriangulares e confluentes com as crestas craniais. O primeiro e segundo dedos são iguais em tamanho e os dígitos terminais são pequenos e arredondados. Os pés e os dedos possuem tubérculos na margem externa. O dorso varia de uniformemente marrom avermelhado a mais escuro, podendo apresentar manchas ou pontos enegrecidos. Ainda existe uma variedade de polimorfismos na faixa media-dorsal, que pode apresentar coloração mais clara, bege. O ventre varia de acinzentado a bege, com ou sem manchas. A íris é geralmente cor de bronze com um anel verde envolvendo a pupila (Rodríguez e Duellman, 1994;

Caramaschi e Niemeyer, 2003; Pramuk e Kadivar, 2003; Lima *et al*, 2007; www.globalamphians.org, A.P.L., comunicação pessoa)

São diurnos e vivem no chão da floresta, onde sua coloração e seus espinhos irregulares resultam em um grande mimetismo com as folhas caídas no ambiente, por isso o nome popular de sapo-folha. À noite, geralmente, sobem em copas baixas (5 a 100 cm) para dormir. A reprodução, que ocorre de forma explosiva, também é realizada a noite. (Heyer, 1976; Rodríguez e Duellman, 1994, A.P.L., comunicação pessoal).



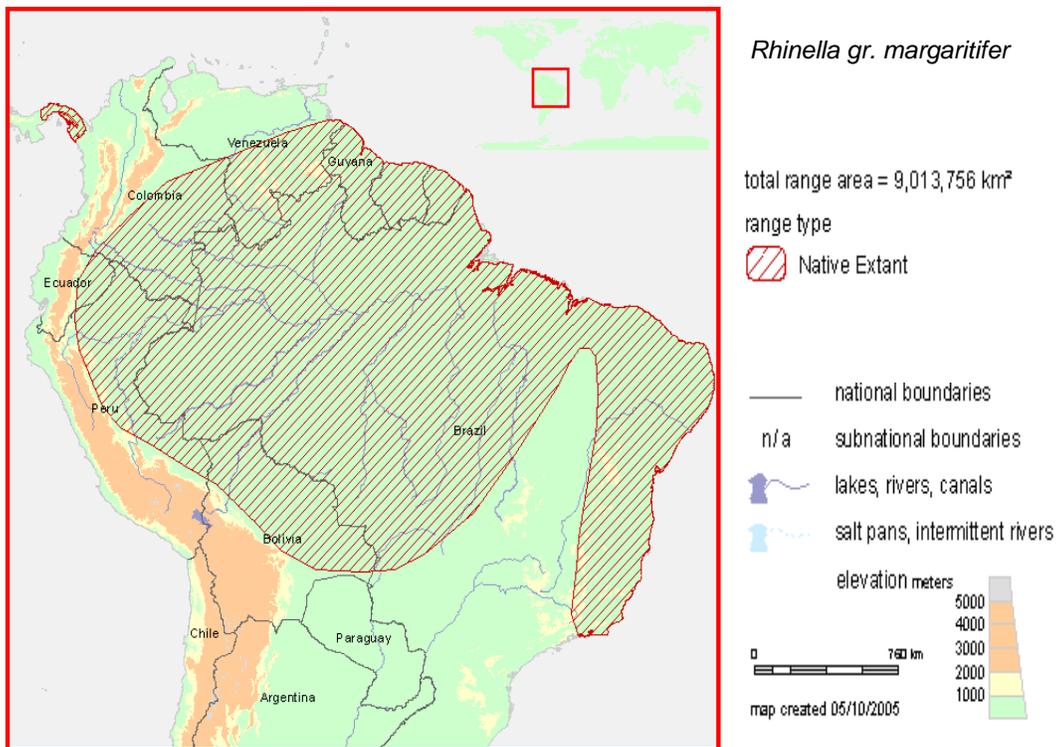
**Figura 1: Três diferentes morfotipos de sapos do grupo *Rhinella margaritifera*.**  
Fotos de: 1- Albertina P. Lima; 2 e 3: Retirado de Fouquet *et al.* (2007).

Pode ocorrer poliploidia no grupo (Hoogmoed, 1989), mas ainda não há nenhum estudo publicado nesta área.



**Figura 2: Casal de *Rhinella gr. margaritifera* num amplexo para reprodução.**  
Foto: Albertina P. Lima.

É um grupo de espécies neotropicais, que ocorrem na Bacia Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela) e em partes do Panamá, vivendo do nível do mar a até 2400m de altitude (www.globalamphibians.org).



**Figura 3:** Mapa da distribuição geográfica estimada de *Rhinella gr. margaritifer*.

Modificado de <http://www.globalamphibians.org>, em 08/11/2008, às 10:30h.

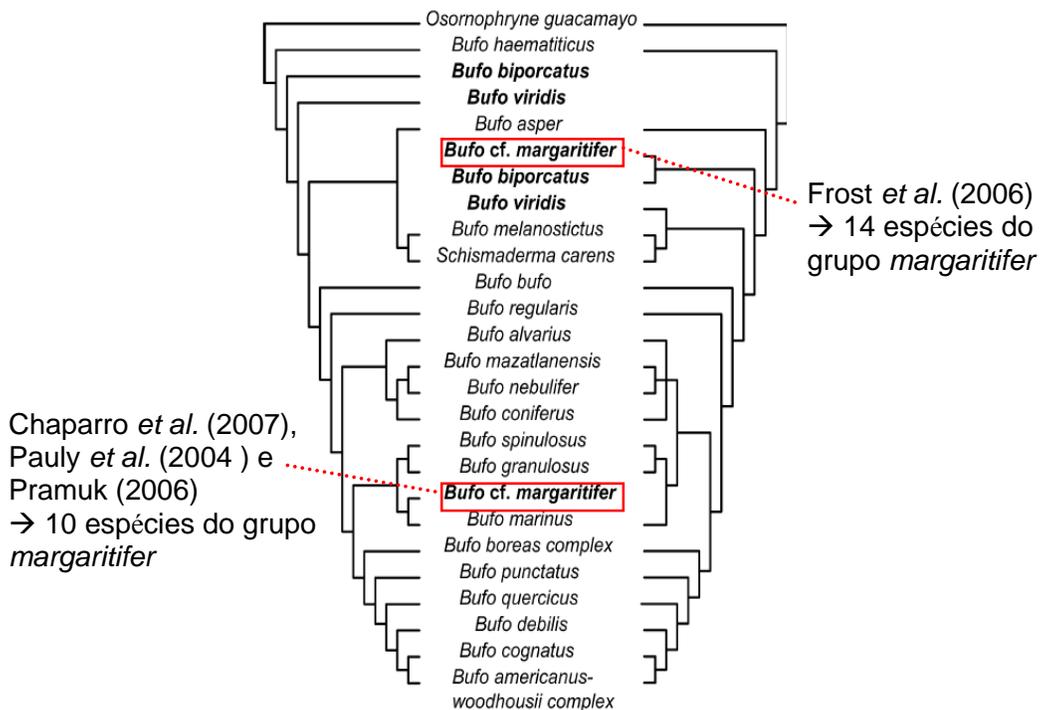
Análises moleculares são muito úteis em estudos de anfíbios porque suas morfologias muito conservativas oferecem, relativamente, poucos caracteres que podem ser usados para resolver relações filogenéticas (Hass *et al.*, 1995). Em particular, os estudos moleculares são úteis para discernir espécies morfologicamente crípticas que são diferenciadas geneticamente (Donnellan e Aplin, 1989; Hedges e Thomas, 1991). Segundo Hass *et al.*, (1995), análises moleculares parecem ser ideais para quantificar o nível de variação genética dentro do complexo *margaritifer*.

Hass *et al.* (1995) analisaram dados imunológicos de albumina de 6 espécies já descritas dentro do grupo *margaritifer* e espécies ainda não descritas. Eles verificaram a

ocorrência de duas espécies com respostas imunológicas diferentes vivendo em simpatria na Guiana Francesa, assim como espécimes de Tabatinga (AM, Brasil), os quais apresentaram diferentes padrões imunológicos que puderam ser corroborados por diferentes tamanhos corporais e cor de íris. Os dados de diversidade molecular encontrados dentro deste complexo mostraram um enorme número de populações simpátricas isoladas reprodutivamente, que já podem ser designadas como espécies únicas. Alguns destes dados, mas não todos, podem ser corroborados por observações morfológicas, a maioria de populações com pequena distribuição, sendo que este complexo inclui espécies que são parcialmente sobrepostas ou alopátricas. Encontrou-se entre espécies já descritas e ainda não definidas taxonomicamente divergências de 20 milhões de anos, sendo que, provavelmente, o ancestral destas espécies divergiu a 30 milhões de anos atrás no Panamá. Esta divergência do Eoceno é comparada com a do começo do Cenozóico, conforme dados já encontrados para alguns anuros da América do Sul. O trabalho de Hass *et al.* (1995) sugere ainda que uma filogenia mais robusta possa ser obtida com seqüências de DNA, o que foi feito por Fouquet e colaboradores em 2007, utilizando apenas indivíduos da Guiana Francesa. Neste estudo foram encontradas seis linhagens distintas que correspondem a diferentes espécies. Além disto, Fouquet *et al.* (2007) verificaram que pode ter ocorrido expansão à partir de um refúgio do norte do país, o que diferenciou as linhagens devido a refúgios isolados por áreas de savana ou pela aumento do nível do mar.

Além das incertezas taxonômica e filogenética dentro do complexo *margaritifera*, sua posição sistemática em relação aos outros bufonídeos também permanece obscura. Segundo trabalho de Chaparro *et al.* (2007), a topologia filogenética que inclui *R. gr. margaritifera* difere da proposta por Frost *et al.* (2006) e concorda com a topologia proposta por Pauly *et al.* (2004) e Pramuk (2006), com o grupo consistindo de apenas 10 espécie e sendo *B. granulatus* grupo-irmão de *R. gr. margaritifera* (conforme figura 4).

Frost e colaboradores (2006) propuseram nova posição filogenética e sistemática para as espécies do grupo *R. margaritifera* utilizando caracteres morfológicas e análise de seqüências de alguns genes, explicitando que as relações filogenéticas propostas por Duellman e Schulte (1992) foi baseada apenas em similaridades, e não em sinapomorfias, e que o diagnóstico do grupo feito exclusivamente pelas crestas craniais precisa ser redefinido, já que esta não é a regra para o grupo. Além disto, segundo estes autores, a classificação reorganizando todas as espécies dentro de um único grupo pode minimizar o risco de erros taxonômicos.



**Figura 4:** Esquema mostrando as diferentes posições taxonômicas propostas para o grupo de espécies *Rhinella margaritifer*.

Modificado de Frost *et al.*, 2006.

De La Riva *et al.* (2000) também constataram que *Rhinella margaritifer* é um complexo com diversidade subestimada. Em uma revisão sobre anfíbios bolivianos, os autores verificaram que neste país algumas populações do grupo *margaritifer* ainda devem ser melhor estudadas, sendo que na área amostrada há, pelo menos, quatro espécies distintas a serem descritas.

Ainda há o problema da existência de coloração críptica dentro do grupo, o que dificulta a identificação das espécies. Também faltam dados na literatura sobre vocalização e morfologia de juvenis. Apenas *R. proboscidea* (Zimmerman e Bogart, 1988), *R. castaneotica* (Köhler e Lötters 1999) e *R. paraguayensis* (Ávila *et al.*, 2010) tiveram suas vocalizações descritas, enquanto a morfologia de girinos foi descrita somente para *R. margaritifer* (Duellman 1978), *R. castaneotica* (Caldwell 1991), *R. scitula* (Caramaschi e Niemeyer 2003) e *R. proboscidea* (Menin *et al.*, 2006).

Muitas questões ainda aparecem obscuras sobre o parentesco entre os bufonídeos do novo mundo. Por isto é tão importante buscar alternativas para identificar as espécies deste grupo. Neste sentido, as ferramentas moleculares podem ser bastante úteis.

### 1.3 - EXISTÊNCIA DE DIVERSIDADE CRÍPTICA EM ANUROS

A inferência de relacionamento filogenético em anuros é tradicionalmente baseada em dados morfológicos, enquanto a utilização de outros sistemas (*ex.* comportamento, cromossômico, molecular) é muito pequena (Hillis *et al.*, 1993). Análises filogenéticas baseadas somente em características morfológicas podem resultar em árvores com baixa resolução, refletindo a evolução morfológica conservativa dos anuros e a pequena quantidade de características com sinal filogenético (Austin *et al.*, 2002).

Uma característica dos sapos é o seu complexo sistema acústico que permite a comunicação, defesa de território, proteção contra predadores e ainda tem função de atração para reprodução (Gerhardt e Huber, 2002). Este sistema de escolha para acasalamento, na maioria dos sapos, não é baseado em nenhuma característica morfológica (Bickford *et al.*, 2006), podendo, muitas vezes, ocorrer um isolamento de populações com comportamento/ecologia diferentes, resultando em posterior especiação. De uma forma simplória, estas duas ou mais espécies erroneamente classificadas como uma única espécie é dada o nome de espécies crípticas (Bickford *et al.*, 2006).

A diversidade da anurofauna é drasticamente subestimada pelos levantamentos faunísticos baseados somente em características morfológicas (Elmer *et al.*, 2007). Muitas vezes, a existência de espécies crípticas é desconsiderada devido a algumas suposições feitas erroneamente, como a inexistência de morfologia conservada. Na grande parte da literatura sobre o tema, o ponto mais comum posto inequivocadamente é que estas espécies resultam de um processo de especiação tão recente que as características morfológicas, que seriam usadas para diagnóstico, ainda não divergiram o suficiente (Bickford *et al.*, 2006).

O aumento do número de trabalhos utilizando dados moleculares reforça que a evolução morfológica em anfíbios é geralmente críptica (*ex.* Elmer *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2007; Elmer e Cannatella, 2008; Lötters *et al.*, 2009; Padial e De la Riva, 2009), necessitando uma revitalização na taxonomia dos anfíbios. Fouquet e colaboradores (2007) afirmam que muitos grupos de anfíbios são morfológicamente conservados e não têm características externas capazes de ser facilmente diferenciadas e que isto, somado ao alto grau de convergência, leva a inúmeras interpretações incorretas sobre filogenias geradas por características morfológicas. Mas, apesar de todos estes estudos, a sistemática dos anfíbios continua mal resolvida e subestimada.

Tudo isto mostra a importância de se delimitar precisa e corretamente as espécies, que são as unidades básicas para a biogeografia, ecologia, macroevolução e para a conservação. Super e subestimar os limites das espécies podem levar a interpretações errôneas (Sites e Marshall, 2003; Fouquet *et al.*, 2007). Como em *Rhinella* gr. *margaritifera* existe diversidade críptica, muitas vezes é preciso recorrer a outras características para discriminar as diferentes espécies, como canto e morfologia de girinos. Entretanto, poucas espécies possuem estas características estudadas, sendo preciso buscar alternativas para identificar corretamente as espécies e/ou unidades evolutivas significativas do grupo, sendo, portanto, as ferramentas moleculares uma ótima opção.

#### **1.4 - ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS NA AMAZÔNIA**

A filogeografia, ou seja, a análises das relações entre estrutura genética populacional e dados biogeográficos, é uma ferramenta poderosa no estudo de influências históricas na distribuição da biodiversidade há mais de 20 anos (Avise *et al.*, 1987) e tem sido aplicada para estudos em todo mundo, com os mais diferentes taxa (Avise, 2000). As análises filogeográficas são uma das melhores ferramentas para a investigação de aspectos históricos da biogeografia e da estrutura genética de uma população, sendo que os métodos analíticos mais comumente utilizados são baseados na construção de árvores filogenéticas ou em redes de haplótipos. A estrutura genética é, então, quando possível, interpretada cronologicamente e plotada sobre dados geográficos, sendo que a relação genótipo X distribuição geográfica é interpretada para inferir histórias populacionais (Zeisset e Beebee, 2008). Então, o objetivo central da filogeografia é explicar padrões da história populacional, considerando diferenças regionais de latitude, topografia, correntes oceânicas, dentre outros aspectos (Hewitt, 2000).

Anfíbios, geralmente, têm baixa mobilidade individual, que muitas vezes é acompanhada de filopatria aos sítios natais (Beebee, 1996). Com isto, as populações tendem a ser altamente estruturadas geneticamente em pequenas distâncias geográficas e retêm fortes sinais de eventos históricos que geram determinada distribuição de uma espécie, diferindo de outras espécies móveis. Além disto, os anfíbios são relativamente fáceis de amostrar, quando comparados à maioria dos mamíferos ou dos répteis que também têm baixas taxas de mobilidade e fortes sinais filogeográficos (Zeisset e Beebee, 2008). Finalmente, os anuros possuem distribuição cosmopolita e são muito diversos, ocorrendo em todos continentes, exceto Antártida (Duellman, 1986). As análises filogeográficas das espécies de anfíbios de

regiões temperadas e tropicais têm amplo potencial de prover entendimentos sobre os períodos do Último Terciário e Quaternário e a influência de processos biogeográficos, segundo Zeisset e Beebee (2008), sendo, então, ótimos modelos para inferir os eventos filogeográficos de uma determinada região.

Na Amazônia, muitos aspectos biogeográficos são explicados através de modelos, ou seja, possíveis teorias que possam ter levado a esses padrões. Segundo Marroig e Cerqueira (1997), muitas teorias e hipóteses têm sido postuladas para explicar a biodiversidade da região neotropical, sendo que as mais aceitas são: Centros de origem e dispersão, Vicariância Geotectônica, Refúgios, Gradientes ecológicos, Rios como barreiras e Dinâmica dos rios. Estes autores acreditam que nenhum destes modelos sozinho é capaz de explicar a evolução na Amazônia. Por isto, propuseram uma nova teoria chamada de Hipótese do Lago Amazônico. Uma resumida tabela é apresentada abaixo com os principais pontos de cada um destes modelos.

<b>TEORIA</b>	<b>AUTORES</b>	<b>PRINCIPAL IDÉIA E MODELO DE ESPECIAÇÃO</b>
Centro de Origem e Dispersão	- Hershkovitz, 1977 - Reig, 1984	Ocorre dispersão através de uma barreira pré-existente de uma área geograficamente estável (um centro de origem). Ou seja, uma espécie ancestral cruza uma barreira, promovendo fragmentação.  O modelo de especiação é alopátrico.
Vicariância Geotectônica	- Platnick e Nelson, 1978 - Cracraft e Prum, 1988 - Futuyma, 1992 - Amorim e Pires, 1996	Eventos geotectônicos passados foram os responsáveis por separar populações ancestrais que eram contínuas.  O modelo de especiação é alopátrico.
Refúgios	- Haffer, 1969 - Vanzolini e Williams, 1970	Modelo baseado em fatos paleoclimáticos, paleopalínológicos, paleogeográficos, paleoecológico e geomorfológicos que

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cerqueira, 1982</li> <li>- Prance, 1982</li> </ul>	<p>causaram os ciclos climáticos do Terciário e do Pleistoceno, em que havia alternância de períodos seco/frio e quente/úmido. O período de seca e frio levou a fragmentação das florestas em refúgios, com subsequente expansão (nos períodos de calor e umidade), o que levou à origem de uma grande parte da fauna existente. O modelo de especiação é o clássico proposto para alopatria.</p>
Gradientes Ecológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endler, 1977, 1982</li> </ul>	<p>Este modelo sugere que os padrões de distribuição das espécies são consistentes com divergências geográficas e adaptação aos fatores ecogeográficos atuais, independente dos fatores históricos. Com isto, o isolamento por distância permite forte adaptação genética a diferentes áreas, resultando em zonas com uniformidade de frequências genética e/ou fenotípicas, separadas por áreas de mudanças ou por clinas. O modelo de especiação é parapátrica.</p>
Rios como barreiras	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wallace, 1849</li> <li>- Sick, 1968</li> <li>- Capparella, 1988</li> <li>- Ayres e Clutton-Brock, 1992</li> <li>- Patton <i>et al.</i>, 1994</li> </ul>	<p>Como o próprio nome já diz, os rios atuam como barreiras ao fluxo gênico (tanto para a inexistência quanto para a redução deste), ficando as diferentes populações sujeitas a ação da seleção natural e/ou deriva genética, causando divergências entre as populações ou especiação. O modelo de especiação é um caso clássico de alopatria.</p>
Dinâmica de rios	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Salo <i>et al.</i>, 1986</li> </ul>	<p>As mudanças causadas pela constante dinâmica dos rios (processos de erosão lateral, mudanças nos cursos d'água etc) são capazes de criar ou manter espécies, já que populações podem ser</p>

		<p>transferidas passivamente de uma margem para outra.</p> <p>O modelo de especiação é o alopátrico.</p>
Lago Amazônico	- Marroig e Cerqueira, 1997	<p>Este modelo sugere que houve um aumento no nível do mar entre 700 e 750 mil anos atrás (alta temperatura e umidade), resultando na submersão de planícies costeiras e uma grande descarga de água dos Andes. O efeito do aumento do nível do mar foi contrabalanceado na Amazônia pelo grande fluxo de água de origem andina, que, quando se chocaram, resultou em um grande lago na bacia amazônica, que foi formado recorrentemente no Último Terciário e no Quaternário.</p> <p>O modelo de especiação é alopátrico.</p>
Hipótese do museu	- Fjeldsa, 1994	<p>As espécies se originam em terras altas e se acumulam em terras baixas. Assim, áreas de terra firme são muito instáveis na escala local, fazendo com que estas atuem, acumulando grande número de espécies (de potenciais múltiplas origens).</p> <p>Não possui um modelo propriamente para especiação, mas é um modelo de diferenciação, que pode levar à especiação que começa com refúgios alopátricos.</p>

Tabela 1: Principais teorias biogeográficas propostas para a Amazônia.

Estudos filogeográficos foram feitos com diversos organismos amazônicos como o pirarucu, *Arapaima gigas* (Hrbek *et al.*, 2005), o peixe-boi, *Trichechus inunguis* (Cantanhede *et al.*, 2005), o jacaré-tinga, *Caiman crocodilus* (Farias *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2006), o jacaré-açú, *Melanosuchus niger* (Farias *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2008), a tartaruga gigante da Amazônia, *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006). Todas estas espécies foram excessivamente exploradas, sofrendo fortes pressões antropogênicas. Estes eventos antropogênicos têm causado fortes efeitos demográficos, diminuindo o tamanho efetivo destas

populações e encobrendo os reais processos que levam a distribuição filogeográfica destes animais (Hrbek *et al.*, 2005; Pearse *et al.*, 2006).

Pearse *et al.* (2006) verificaram uma estrutura populacional da tartaruga gigante da Amazônia utilizando marcadores mitocondriais e microssatélites. Não foi observada uma estruturação filogeográfica, mas foram encontradas diferenças haplotípicas entre as populações de diferentes bacias. Este padrão foi coincidente com a fragmentação populacional observada nestes répteis e o *homing* feito pelas fêmeas para a postura dos ovos. Isto ajuda a propor estratégias de proteção e manejo que deverão ser feitas considerando cada bacia como uma população demograficamente independente. Além disto, o estudo também permitiu conferir a eficiência do programa de proteção do IBAMA a estes animais, que averiguou a eficácia de programas de manejo já feitos em uma população que sofreu efeitos de gargalo-de-garrafa.

Vasconcelos *et al.* (2008) e de Thoisy *et al.* (2006) estudaram a distribuição espacial da variabilidade genética do jacaré-açu, utilizando a região do citocromo b do mtDNA. Os autores verificaram que o isolamento por distância esteve presente na dinâmica populacional, mostrando uma diferenciação genética, causada pela hidrogeografia da região, nas populações da Guiana Francesa e do Amapá quando comparadas com as outras populações da bacia Amazônica. Além disto, as populações do Equador se mostraram diferenciadas geneticamente das do Brasil, Peru e Guiana Francesa. Dentro da bacia Amazônica foi encontrada pequena diferenciação e as distâncias geográficas e genéticas não estão correlacionadas.

O estudo da filogeografia é importante, pois fornece dados para a conservação das espécies, avaliação da biodiversidade e identificação de processos que geram a diversidade biológica (Smith *et al.*, 2001; Avise, 2004). Portanto, para se obter um modelo filogeográfico adequado é preciso um organismo com ampla distribuição na área de estudo e que não esteja sujeito a exploração antropogênica, como é o caso do grupo de sapos *Rhinella margaritifera*. As amostras podem ter sua distribuição geográfica influenciada por processos geológicos e biológicos que atuaram e ainda atuam nesta região, possibilitando entender seus padrões genéticos. Por isto o presente estudo sobre a filogeografia deste grupo é tão importante.

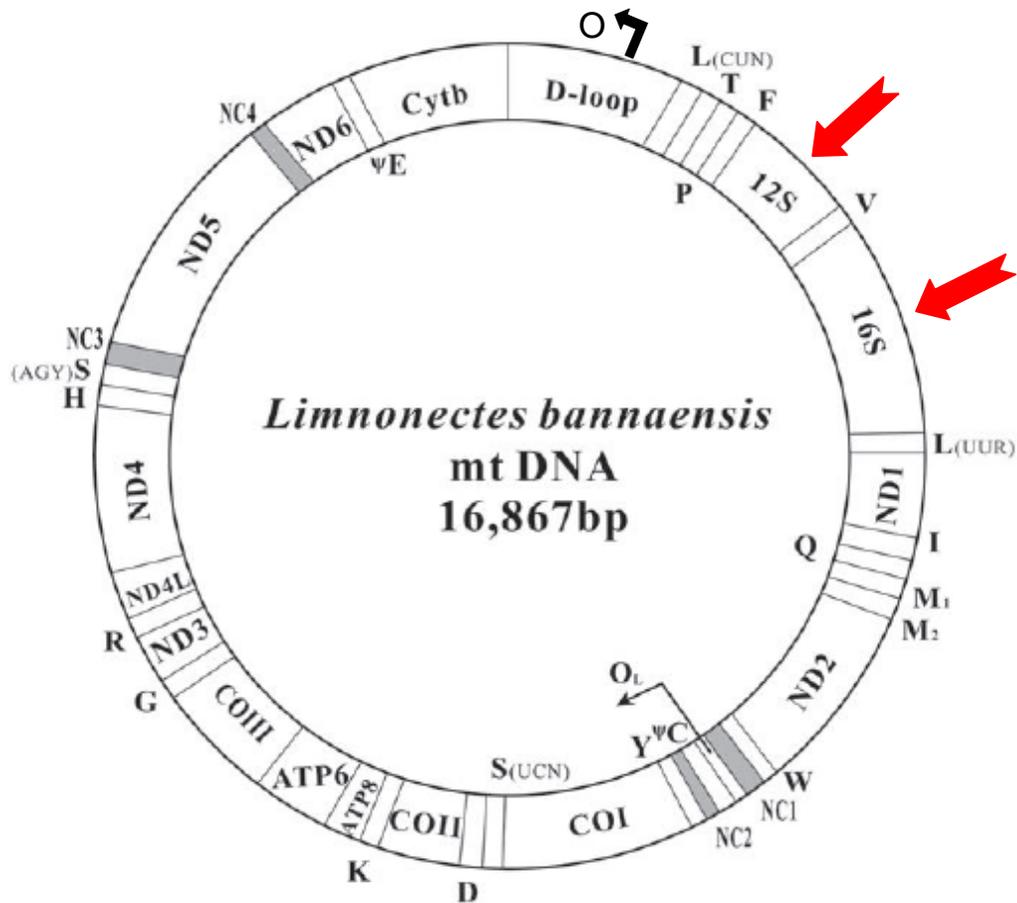
## **1.5 - MARCADORES MOLECULARES**

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para estudos de genética de populações, determinação de parentescos e paternidades, identificação de unidades taxonômicas, dentre outros. Poucos estudos que visaram examinar a variabilidade genética de anfíbios tropicais de ampla distribuição foram feitos utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares (Fouquet et al. 2007). Neste presente estudo, foram utilizados tanto marcadores mitocondriais quanto nucleares.

O genoma mitocondrial dos vertebrados (mtDNA) é uma molécula circular, composta por 37 genes codificadores (13 genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial, 22 RNA de transferência e 2 rRNA) e uma região controle não-codificadora (Avisé *et al.*, 1986). As características que tornam os genes deste genoma bons marcadores são: a herança uniparental, raramente sofrendo recombinação, o tamanho relativamente pequeno (aproximadamente 16-20 kb), o arranjo dos genes geralmente conservado, taxas evolutivas 1-10 vezes mais altas que o genoma nuclear, sendo a maioria das substituições de bases simples e inserções/deleções de um ou pouco nucleotídeos (Avisé *et al.*, 1986; 1987). No presente trabalho serão utilizados dois marcadores mitocondriais: 12S e 16S.

Estudos envolvendo seqüências de genes que transcrevem as subunidades do RNA ribossomal do mtDNA demonstraram que a evolução destes genes ocorreu numa taxa suficiente para gerar variação necessária para resolver problemas de inferência filogenética em anuros (Hedges e Maxson, 1993; Hay *et al.*, 1995; Ruvinsky e Maxson, 1996; Graybeal, 1997; Austin *et al.*, 2002). Portanto, os genes 12S e 16S que codificam as subunidades ribossomais podem ser bastante úteis tanto na resolução de divergências genéticas profundas quanto no esclarecimento das relações filogenéticas de taxa mais relacionados (Goebel *et al.*, 1999), como é o caso de *Rhinella* gr. *margaritifera*.

Já o genoma nuclear, diferentemente do mitocondrial, é organizado e regulado de forma mais complexa, além de possuir baixas taxas evolutivas em regiões de alta pressão seletiva (éxons). A vantagem do DNA nuclear é que se observa reduzido nível de homoplasia entre os táxons mais distantes, como consequência de baixa taxa evolutiva (Claubaut *et al.*, 2005) e a combinação dos dois marcadores fornecem informações mais robustas, pois são genomas com diferentes taxas evolutivas e formas de herança. Neste trabalho, serão utilizados dois genes nucleares: rodopsina e tirosinase. A rodopsina é uma



**Figura 5:** Esquema do DNA mitocondrial de um anuro. Os genes utilizados neste trabalho (12S rRNA e 16S rRNA) estão apontados pela seta e vermelho.

Modificado de Zhang *et al.*, 2009.

proteína que está associada a neurônios modificados e grupos prostéticos e são responsáveis pela captação de luz (retirado de <http://www.simbiotica.org/fotorreceptores.htm> em 18-01-2010 às 12:31h). Já a tirosinase é uma enzima que atua como um importante catalisador, que por meio de uma complexa cadeia de reações oxidativas converte a L-tirosina presente na pele em L-dopa e, em seguida, em melanina. (retirado de <http://www.portaleducacao.com.br/formacao-da-melanina> em 18-01-2010 às 12:39h)

Pramuk *et al.* (2001) examinaram as relações evolutivas e biogeografia do grupo de sapos *Bufo peltoccephalus* das Antilhas (de Cuba às Ilhas Virgens). Dados de seqüências de marcadores mitocondriais 12S, 16S e citocromo b evidenciaram a monofilia destes sapos, sendo sua origem de algum grupo do novo mundo. Apesar destes resultados serem concordantes com os obtidos com estudos morfológicos e geográficos, os autores sugerem

que mais análises devem ser feitas para um estabelecimento preciso da filogenia dos sapos neotropicais.

Chaparro *et al.* (2007) descreveram uma nova espécie do gênero *Rhinella* utilizando características externas e osteológicas e seqüências do gene mitocondrial 12S. A nova espécie, nomeada *R. manu*, é típica das montanhas úmidas do sul do Peru. Mas apesar dos dados morfológicos e moleculares darem suporte a filogenia desta nova espécie, os autores também sugerem que mais estudos com os sapos mais comuns da América do Sul (i.e., do gênero *Rhinella*) devem ser feitos para esclarecer a filogenia deste grupo de espécies.

Fouquet e colaboradores (2007) examinaram a variabilidade genética de *Rhinella gr. margaritifer* utilizando seqüências dos genes 12S, 16S, 18S e tirosinase para inferir a filogenia e filogeografia das espécies deste grupo. O estudo, feito na Guiana Francesa, mostrou a existência de 11 linhagens que podem representar espécies distintas. As análises filogeográficas também deram suporte a este novo *status* específico das linhagens, sendo que as de baixa divergência foram encontradas em simpatria, possivelmente correspondendo a recentes processos de especiação.

Estes e outros trabalhos envolvendo sapos neotropicais mostram a necessidade de melhor estabelecer a taxonomia e as relações filogenéticas e, conseqüentemente, contribuir para o esclarecimento taxonômico e das hipóteses filogenética e filogeográfica do grupo *Rhinella margaritifer*. Este estudo é importante pois fornece dados para a avaliação da biodiversidade e identificação de processos que geram diversidade biológica.

Segundo Fouquet *et al.* (2007), a utilização de métodos combinando filogenia e filogeografia, utilizando tanto marcadores nucleares quanto mitocondriais, ajudam a entender melhor a história evolutiva de complexos de espécies. Esses autores ainda afirmam que o conhecimento sobre a distribuição geográfica da diversidade genética nas comunidades de anfíbios tropicais pode levar a conclusões que diferem enormemente das análises prioritárias baseadas somente na ocorrência de espécies que não pertençam a grupos. Este estudo também tem potencial para contribuir mais objetivamente na conservação prioritária de anfíbios em áreas tropicais.

## 2- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A sistemática do grupo de sapos *Rhinella margaritifera* (Anura: Bufonidae) é umas das que gera mais dúvidas entre os anuros neotropicais e existe uma grande variedade de morfotipos conhecidos, além de grande diversidade morfológica críptica, sendo todos estes organismos classificados, muitas vezes, como uma mesma espécie. Por serem anfíbios de ampla ocupação na Amazônia, o estudo filogeográfico deste grupo pode prover pistas sobre a história evolutiva, os padrões de diferenciação local e endemismo neste bioma.

As ferramentas moleculares são muito úteis para identificar, caracterizar e delimitar espécies e/ou populações e verificar como a variabilidade genética está geograficamente distribuída. Assim, o objetivo deste projeto foi estudar as relações filogenéticas e filogeográficas deste grupo e entender os processos que possa ter dirigido a distribuição e especiação de *R. gr. margaritifera* na Amazônia brasileira. Para isto, foram utilizados marcadores mitocondriais (16S e 12S) e nucleares (rodopsina e tirosinase).

Os resultados obtidos neste estudo ajudam a determinar quantas possíveis espécies e/ou unidades significativamente evolutivas existem no grupo e, então, comparar com informações morfológicas/ecológicas obtidas anteriormente, sendo possível reconhecer a biodiversidade destes anuros, entender os processos que levaram a distribuição da variabilidade genética e inferir o real *status* para conservação. Baseada nas informações expostas anteriormente e na extensão geográfica da Amazônia, que abriga uma grande diversidade da anurofauna, é possível levantar diversas hipóteses. Neste estudo, toda a problemática abordada se resume a uma hipótese que foi testada:

H<sub>0</sub>: *Rhinella gr. margaritifera* é composta de apenas uma unidade evolutiva significativa

H<sub>1</sub>: *Rhinella gr. margaritifera* é composta por mais de uma unidade evolutiva significativa,

existindo diversidade críptica

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral**

O objetivo geral foi estudar as relações filogenéticas e a filogeografia do grupo de espécies *Rhinella margaritifera*, utilizando marcadores moleculares, a fim de identificar unidades evolutivas significativas distintas na Amazônia brasileira.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Identificação de clusters moleculares;
  
- Análise de clusters gerados por diferentes marcadores moleculares, sendo capazes de indicar linhagens evolutivas distintas ou espécies;
  
- Proposição de uma hipótese filogenética para o grupo e;
  
- Inferência de prováveis eventos biogeográficos explicando os padrões filogenéticos.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Locais de coleta e amostragem

Os espécimes do grupo *Rhinella margaritifera* foram coletados em diversos pontos da Amazônia brasileira, conforme mapa e tabela abaixo. Também foram coletados 2 (duas) espécies não identificadas deste gênero, para tentarmos identificá-las molecularmente, além de 1(um) indivíduo de *Bufo marinus* para ser utilizado como grupo externo nas análises deste trabalho.

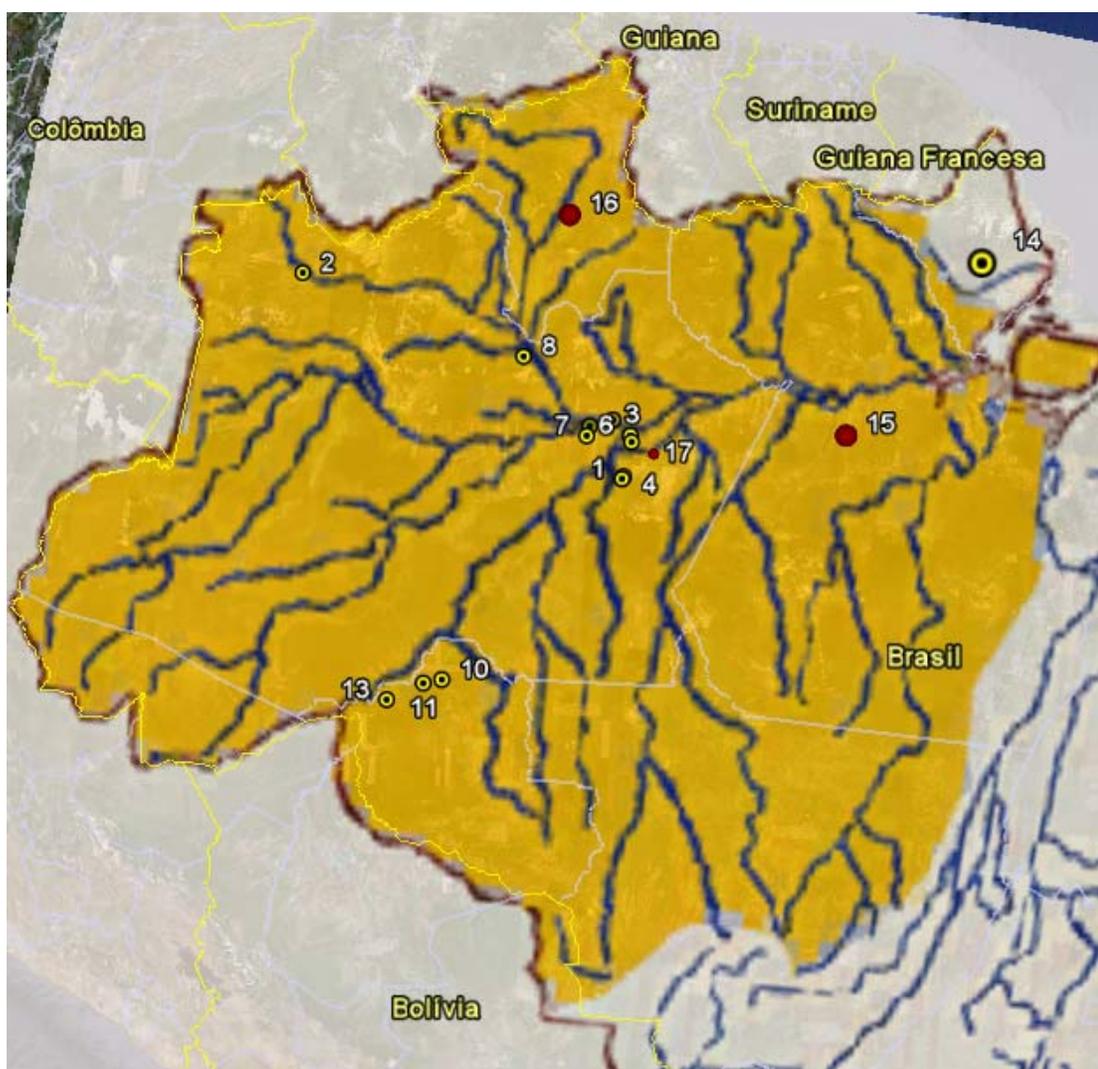


Figura 6: Mapa representando os pontos de coleta.

Modificado de <http://www.maps.google.com.br>

<b>ESPÉCIE</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>NÚMERO DE INDIVÍDUOS</b>	<b>PONTO NO MAPA</b>
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Vila Gomes - AM	6	1
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	São Gabriel da Cachoeira - AM	4	2
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Autazes - AM	8	3
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Borba - AM	4	4
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Reserva Ducke (Manaus) - AM	5	5
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Lago Miriti (Careiro) - AM	19	6
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Manaquiri - AM	14	7
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Barcelos - AM	15	8
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Manacapuru - AM	21	9
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Morrinho Esquerdo - RO	4	10
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Teotônio Esquerdo - RO	1	11
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Mutum Esquerdo - RO	1	12
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Cachoeira do Jirau - RO	9	13
<i>Rhinella gr. margaritifer</i>	Serra do Navio - AP	6	14
<i>Bufo magnussoni</i>	Treviso - PA	15	15
<i>Bufo castaneoticus</i>	Treviso - PA	8	15
<i>Bufo marinus</i>	Reserva Ducke (Manaus) - AM	1	5
<i>Rhinella sp.</i>	ParNa Viruá - RR	1	16
<i>Rhinella sp.</i>	Ramal do Puru Puru - AM	1	17
<b>TOTAL</b>		<b>142</b>	

Tabela 2: Relação entre espécies, número de indivíduos e locais coletados.

As coletas foram realizadas utilizando a licença concedida pelo RAN/ IBAMA, sob número 13777-2. O esforço de coleta visou um mínimo de 10 indivíduos por localidade. Os espécimes foram fotografados e, quando possível, tiveram seu canto gravado. As localidades

amostradas foram georeferenciadas (conforme apêndice 1) e os animais tiveram uma amostra de tecido muscular retirada e armazenadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal/CTGA do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Após, estes foram fixados em formol 10% e depositados na coleção de Herpetologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

#### **4.2 - Extração do DNA**

Para cada exemplar, antes da fixação em formol, foi coletada uma pequena porção do tecido muscular, posteriormente preservada em álcool 96%. O DNA genômico total foi extraído utilizando-se o método padrão de extração com CTAB e Proteinase K como proposto por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações.

Um pequeno pedaço do músculo (aproximadamente 100mg) foi cortado e digerido com Proteinase K, que é uma enzima proteolítica não-específica com atividade em diferentes pH, e solução de CTAB 2% (Brometo de Cetiltrimetilamônio), um detergente que rompe as membranas celulares para a liberação dos ácidos nucleicos. O músculo foi cortado em pedaços menores e acondicionado em um microtubo de 1,5 mL com 500µL de tampão CTAB 2% e 15µL de Proteinase K e deixado em banho-maria a 60°C overnight ou até a total digestão do tecido.

Após, foi feita uma desproteínização pela adição de clorofórmio: álcool-isoamílico (25:1), seguida por centrifugação a 10000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em um novo microtubo. Foi adicionado, então, 500µL de isopropanol frio e a amostra ficou incubada no freezer por duas horas para a precipitação dos ácidos nucleicos. O *pellet* formado após centrifugação a 10000rpm por 20 minutos foi lavado com álcool 70%, centrifugado a 10000rpm por 10 minutos e ficou secando em ar seco. Por último, o DNA foi ressuscitado em 50µL de água ultra-pura.

O DNA extraído teve sua integridade avaliada e foi quantificado por eletroforese sob luz UV, por comparação com marcador de peso molecular conhecido. Para isto, 2 µl do corante Bromofenol misturado a 2 µl do DNA total foram aplicados em gel de agarose 1% e levados à cuba de eletroforese horizontal com tampão Tris-Borato-EDTA 1X onde a corrida do material foi feita a 70 V iniciais, passados para 95 V. Posteriormente, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (EtBr, 0,5 µg/mL) e levado a um transiluminador de luz ultravioleta *Image Master (Pharmacia Biotech)* para avaliação do DNA.

### 4.3 - Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os genes mitocondriais (12S rRNA e 16S rRNA) e nucleares (Tirosinase e Rodopsina) foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), técnica que permite a obtenção de um grande número de cópias de um fragmento de interesse a partir do DNA genômico molde, extraído do tecido.

Para os genes mitocondriais 12S e 16S foram feitas reações de PCR com volume final de 15 $\mu$ L, conforme tabela abaixo.

Tabela 3: Componentes da reação de PCR dos genes mitocondriais

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME ( $\mu$ L)
Tampão	10X	1,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5
dNTP	10mM	1,5
<i>Primer forward</i>	2mM	1,5
<i>Primer reverse</i>	2mM	1,5
BSA	5C	1,0
Taq DNA polimerase	5u/ $\mu$ L	0,3
DNA (amostra)	--	1,0
Água ultra-pura	--	5,2
TOTAL		15

Cada amostra de reação foi colocada em tubo de 0,2  $\mu$ l e levada a um termociclador *Veriti (Applied Biosystems)* onde se processou a reação de amplificação, conforme os passos descritos abaixo:

- Desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto;
- 35 ciclos de:
  - . Desnaturação a 92 °C por 60 segundos;
  - . Anelamento a 50 °C (16S) e 54°C (12S) por 40 segundos;
  - . Extensão a 72 °C por 90 segundos;
- Extensão final a 72 °C por 5 minutos (uma única vez).

Já para os genes nucleares da tirosinase e rodopsina foram feitas duas amplificações, uma primeira com primers externos e a segunda com primers flanqueadores das regiões gênicas de interesse. As amplificações foram feitas num volume final de 26µL e cada uma das PCR (para o primeiro e segundo par de primers) teve temperatura de anelamento diferente.

Tabela 4: Componentes da primeira reação de PCR dos genes nucleares

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (µL)
Tampão	10X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,0
dNTP	10mM	2,0
<i>Primer forward</i>	2mM	2,5
<i>Primer reverse</i>	2mM	2,5
BSA	5C	2,5
Betaine	6M	5,4
Taq DNA polimerase	5u/µL	0,7
DNA (amostra)	--	2,0
Água ultra-pura	--	3,9
TOTAL		26

Cada amostra de reação foi colocada em tubo de 0,2 µl e levada a um termociclador *Veriti (Applied Biosystems)* onde se processou a reação de amplificação, conforme os passos descritos abaixo:

- Desnaturação inicial a 68°C por 1 minuto;
- 35 ciclos de:
  - . Desnaturação a 93 °C por 10 segundos;
  - . Anelamento a 50 °C (tirosinase) e 53°C (rodopsina) por 35 segundos;
  - . Extensão a 68 °C por 90 segundos;
- Extensão final a 68 °C por 7 minutos (uma única vez)

Após, o produto desta primeira amplificação foi utilizado como molde para a amplificação com os primers internos, como mostram as tabelas abaixo.

Tabela 5: Componentes da segunda reação de PCR dos genes nucleares

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME ( $\mu$ L)
Tampão	10X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,0
dNTP	10mM	2,0
<i>Primer forward</i>	2mM	2,5
<i>Primer reverse</i>	2mM	2,5
Taq DNA polimerase	5u/ $\mu$ L	0,7
DNA (amostra do amplificado do primeiro PCR)	--	2,0
Água ultra-pura	--	11,8
<b>TOTAL</b>		<b>26</b>

Cada amostra de reação foi colocada em um novo tubo de 0,2  $\mu$ l e levada a um termociclador *Verit* (Applied Biosystems) onde se processou a segunda reação de amplificação, conforme os passos descritos abaixo:

- Desnaturação inicial a 68°C por 1 minuto;
- 35 ciclos de:
  - . Desnaturação a 93 °C por 10 segundos;
  - . Anelamento a 55 °C (tirosinase) e 50°C (rodopsina) por 35 segundos;
  - . Extensão a 68 °C por 90 segundos;
- Extensão final a 68 °C por 7 minutos (uma única vez)

Os primers utilizados neste trabalho, bem como suas seqüências e referências estão listados na tabela a seguir.

<i>Primers</i>	<i>Seqüências</i>	<i>Referências</i>
16S A	5' - CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCT – 3'	Palumbi <i>et al.</i> , 1991
16S B	5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'	Salducci <i>et al.</i> , 2005
Phef.1	5' - CAAAGCATAGCACGTA AAAATGC - 3'	
12S r.6	5'- CGATTATAGRACAGGCTCCTCTAG – 3'	

Tyr 1.A	5 – AGGTCCTCTTRAGCAAGGAATG – 3’	Bossuyt <i>et</i>
Tyr 1.E	5’ – GAGAAGAAAGAWGCTGGGCTGAG – 3’	<i>al.</i> , 2000
Tyr 1r.1	5’ –AGTCCCAGAAGGGAATGGTGRAG-3’	
	5’-	Não
Tyr 1f.1	GTAAAACGACGGCCAGTCCTGTCTAACTCTTCC ATAGG-3’	publicado *
Rhod Ex.3r.1	5’- AGTGSACGACGAACATGTAGAT -3’	
Rhod Ex.1f.1	5’ - ATGAACGGAACAGAAGGYCC - 3’	
Rhod Ex. 3r.2	5’ – AATACGACTCACTATAGGCTTCAGGG -3’	Não publicado *
<b>Rhod Ex. 1f.2</b>	5’ – GTAAAACGACGGCCAGTCCCATGTCC - 3’	

Tabela 6: Primers utilizados neste trabalho, suas seqüências e devidas referências. As referências onde se encontram \* se referem a primers desenhados para este trabalho.

Para verificar se as amostras foram amplificadas, 2 µl do produto de PCR foi adicionado a 2 µl de azul de Bromofenol para análise em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV. O tamanho do amplificado foi verificado por comparação com marcador de tamanho molecular conhecido.

#### 4.4 - Purificação e seqüenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando enzimas exonucleases e fosfatase alcalina de acordo com as recomendações do fabricante do kit ExoSap (*GE Healthcare*). Estas enzimas, em sua temperatura de ação, gerada por termociclador, eliminam resíduos de baixo peso molecular como restos de primers, dNTPs e sais, permitindo a retirada de impurezas da PCR. Para cada 10 µl do produto da PCR foi utilizado 0,27 µl de EXO (10 u/µl); 0,40 µl de SAP (1 u/µl) e 2,33 µl de água ultra-pura.

A reação de seqüenciamento foi feita em uma placa específica (para eletroinjeção no seqüenciador), num volume final, por amostra, de 10 µl, contendo: DNA amplificado e purificado; *Big Dye*, que é um mix contendo DNA polimerase, dNTPs e dideoxinucleotídeos

(que possuem a fluorescência a ser captada no seqüenciador automático); tampão do *Big Dye*; primer e água ultra-pura. As concentrações e volumes se encontram na tabela abaixo.

Para 12S e 16S, foram utilizados os próprios primers forward usados na reação de PCR. Entretanto, para os genes nucleares da rodopsina e tirosinase, a reação de seqüência foi feita com a cauda universal M13, complementar às 17 bases do primers *forward* da segunda amplificação destes genes.

Tabela 7: Componentes da reação de PCR seqüenciamento

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME ( $\mu$ L)
Big Dye Terminator	--	0,25
Buffer do Big Dye	5x	2,5
<i>Primer</i>	2mM	2,0
Amostra purificada	--	2,0
Água ultra-pura	--	3,25
TOTAL		10,0

Em seguida, as amostras foram submetidas ao termociclador com ciclos programados para desnaturação das fitas complementares; anelamento dos *primers* e extensão da região a ser seqüenciada, conforme os passos descritos abaixo:

- 35 ciclos de:
  - . Desnaturação a 96 °C por 10 segundos;
  - . Anelamento a 50 °C por 35 segundos;
  - . Extensão a 60 °C por 4 minutos;

Os produtos amplificados para seqüenciamento foram precipitados utilizando etanol/EDTA (2,5 $\mu$ l de EDTA a 125 mM e 27,5  $\mu$ l de etanol absoluto) e etanol 70% (30  $\mu$ l), sempre seguido de centrifugações a rotações e temperaturas adequadas. Este procedimento retira restos de *primer* e DNA da reação de seqüenciamento. Após, as amostras foram ressuspensas em 10 $\mu$ L de formamida.

Em seguida, a placa contendo o DNA foi submetida à eletroinjeção no seqüenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*), de acordo com a metodologia padrão proposta pelo fabricante.

## 4.5 - Edição e alinhamento das seqüências

As seqüências obtidas foram editadas no programa BioEdit Version 7.0.9.0 (Hall, 1999) e alinhadas com o auxílio da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1996), utilizando as configurações padrão, além da edição manual. Aos sítios que apresentaram *indels*, foram acrescentados gaps com a finalidade de manter a homologia entre as seqüências.

Os sítios variáveis foram checados no programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2004). Neste programa também foi checada a presença de heterozigotos nas seqüências nucleares.

## 4.6 - Análise de dados

### 4.6.1 – Análise filogenética

As relações filogenéticas construídas sob o critério de máxima verossimilhança foram estimadas utilizando-se o programa Treefinder (Jobb, 2008), com robustez de 1000 pseudo-réplicas não paramétricas de bootstrap. O modelo molecular evolutivo mais provável foi inferido com o auxílio do programa PAUP 4.0 Beta Version (Swofford, 1998) e do aplicativo online ModelTest Server (Posada, 2006), utilizando-se o critério de informação corrigida AKAIKE (AIC) (Akaike, 1974). Além das seqüências obtidas neste trabalho também foram utilizadas seqüências de *Rhinella* gr. *margaritifera* depositadas no GenBank geradas pelo estudo de Fouquet e colaboradores (2007) para os genes 12S, 16S e tirosinase. Estas amostras foram previamente classificadas em linhagens, conforme proposto pelos autores: *R. margaritifera* A, *R. margaritifera* B, *R. margaritifera* C, *R. margaritifera* D e *R. margaritifera* E.

Cada grupo estabelecido na análise filogenética de máxima verossimilhança foi definido como uma unidade evolutiva significativa (SEU), como proposto por Moritz (1994), quando três critérios foram aceitos: o primeiro é a monofilia nos gene de mtDNA, o segundo é valores de bootstrap acima de 70% e o terceiro é valores significativos de  $F_{st}$  par a par para os genes nucleares, que foram calculados no programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

### 4.6.2 – Redes haplotípicas

A inferência do relacionamento entre os haplótipos foi baseada no método de parcimônia estatística de Templeton *et al.* (1992). Esse método gera a estimativa do número

máximo de diferenças entre os haplótipos como resultado de substituições únicas com confiabilidade de 95% (Posada e Crandall, 2001). Estas análises foram feitas através do programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), e a hierarquização da rede de haplótipos foi feita segundo algoritmo descrito por Templeton *et al.* (1987) e Templeton e Sing (1993). As sequências nucleares foram transformadas em haplótipos utilizando o programa PHASE 2.1 (Stephens *et al.*, 2004) e o aplicativo online SeqPhase (Flot, 2010). Os dois possíveis haplótipos obtidos foram utilizados na construção da rede de haplótipos. As ambigüidades de conexões resultantes das mutações homoplásicas na rede de haplótipos foram resolvidas utilizando as informações da topologia geradas pela máxima verossimilhança.

#### **4.6.2 – Análises filogeográficas**

Para verificar a significância da associação entre os haplótipos com a distribuição geográfica inferindo eventos históricos e demográficos, como resultado dos níveis de restrição de fluxo gênico, foi usada a análise dos cladogramas hierarquizados (Nested Clade Phylogeography Analysis – NCPA), desenvolvido por Templeton *et al.* (1995), utilizando-se o programa GEODIS (Posada *et al.*, 2000) e a chave de inferência de Templeton (2004), dentro do software ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). Os níveis de confiança foram estimados por testes de permutações (1000 replicações). A partir da genealogia gênica, frequência de haplótipos e distâncias geográficas, o NCA gera inferências que permitem discriminar eventos históricos (e.g. fragmentação, expansão, etc.) e processos atuais (e.g. fluxo gênico) que possam estar influenciando nas distribuições de uma determinada espécie ou linhagem. Todas as inferências obtidas foram corroboradas através de testes estatísticos adicionais. Para verificar a diferenciação entre os grupos, foram feitos testes de Variância Molecular (AMOVA) e de estruturação populacional ( $F_{st}$ ), que, quando confirmados, podem ser explicações para eventos de fragmentação ou colonização a longas distâncias ou quaisquer casos em que o fluxo gênico ficava restrito. Já os eventos de expansão foram verificados com os testes  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima. Todas estas análises foram feitas utilizando o programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Por último, foi feita uma análise de concordância espacial entre os resultados de diferentes genes.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - 16S

#### 5.1.1 - Filogenia

Para o gene 16S, foi obtido um total de 357 pb para 102 indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifera*. Além disto, foram utilizadas 21 seqüências deste complexo de espécies, provenientes da Guiana Francesa, que se encontram depositadas no GenBank, 1 seqüência de *Bufo marinus* e mais 7 seqüências de outras espécies relacionadas, estas oito últimas usadas como grupo externo, num total de 131 seqüências de 16S. A composição das bases apresentou a proporção anti-guanina (A = 31,89%, C = 19,98%, G = 18%, T = 30,13%), sendo que a base adenina (A) se apresentou em maior proporção.

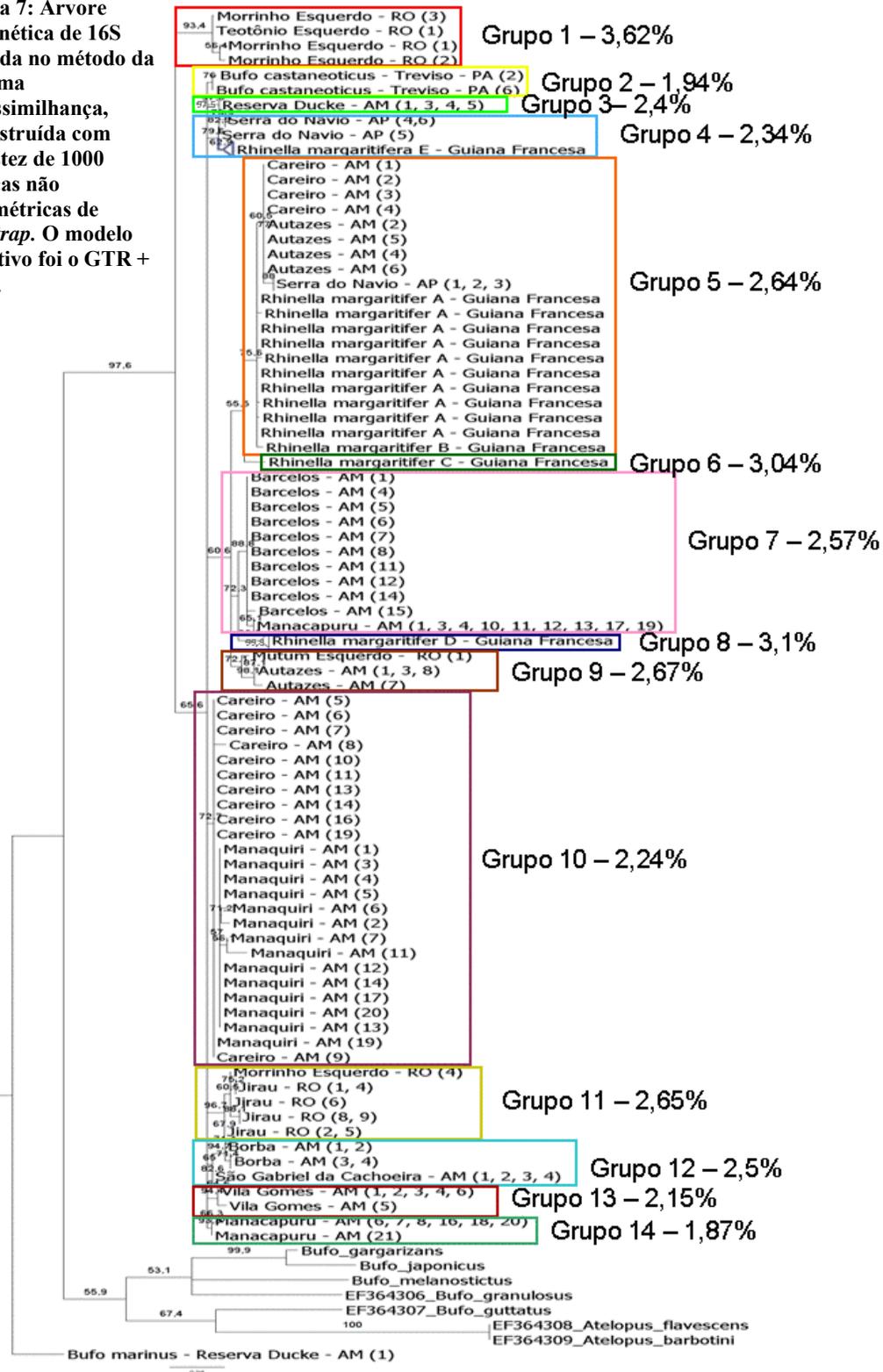
A árvore filogenética baseada no método de Máxima Verossimilhança para o gene 16S (figura 7) foi proposta segundo o modelo molecular evolutivo de substituição nucleotídica GTR+G (general time reversible + Gamma), que propõe que cada nucleotídeo tem uma taxa de substituição própria, levando-se em consideração sua freqüência e a discreta distribuição gamma, que prediz que os sítios evoluem diferentemente (Felsenstein, 2004; [www.molrev.org](http://www.molrev.org) em 16/03/2010 às 12:58h).

Nesta análise foram obtidos 14 grupos de *R. margaritifera* e 7 grupos externos (os grupos *B. gargarizans*, *B. japonicus*, *B. melanosticus*, *B. granulosus*, *B. gutatus*, *B. marinus* e um clado formado por *Atelopus flavescens* e *A. barbotini*). Esta separação em 21 clados foi baseada tanto na topologia da árvore filogenética quanto nos valores de distância genética entre os possíveis grupos. Para os indivíduos cuja posição filogenética não permitiu sua inclusão nos 21 agrupamentos por meio de inspeção visual da topologia foram realizadas comparações de distância genética par a par, sendo as divergências menores que 1% agrupadas no mesmo clado.

Os 14 agrupamentos obtidos para *R. margaritifera* foram: clado 1, composto por Morrinho e Teotônio Esquerdo; clado 2, composto por *B. castaneoticus*; clado 3, correspondente aos indivíduos da Reserva Ducke; clado 4, formado pela possível linhagem *R.*

*margaritifer* E; clado 5, formado pela possível linhagem *R. margaritifer* A; grupo 6, formado pela possível linhagem *R. margaritifer* C; clado 7, composto por Barcelos e Manacapuru; clado 8, formado pela possível linhagem *R. margaritifer* D; clado 9, formado por Mutum e Autazes; clado 10, composto por Manaquiri e Careiro; clado 11, formado por todos

Figura 7: Árvore filogenética de 16S baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o GTR + G + I.



indivíduos do Jirau e um de Morrinho; grupo 12, formado por Borba e São Gabriel da Cachoeira; clado 13, formado por Vila Gomes; e finalmente clado 14 formado por alguns indivíduos de Manacapuru.

### **5.1.2 - Rede de haplótipos**

Pela Análise dos Clados Agrupados (NCA ou Nested Clade Analysis), implementada no TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), a partir das 123 seqüências de *R. margaritifera* de 357 pb do gene 16S, foram geradas seis redes de haplótipos não conectadas entre si (figuras 8 e 9). Para melhor entendimento das redes formadas, a hierarquização completa dos haplótipos, que foi feita manualmente, foi omitida, ficando apenas os agrupamentos no nível hierárquico de interesse. Cada nível hierárquico foi representado por uma cor distinta nas figuras.

Duas redes de haplótipos foram omitidas nesta discussão por envolverem apenas indivíduos da Guiana Francesa. Uma das redes foi formada exclusivamente pela linhagem *R. margaritifera* D. A outra rede que teve a imagem omitida neste trabalho foi formada pela linhagem *R. margaritifera* A como clado mais interno e, possivelmente, mais ancestral, de onde partem as linhagens *R. margaritifera* B e C. Nesta análise, que é baseada no método da máxima parcimônia (MP), a linhagem A não parece ser grupo irmão da possível linhagem formada por Careiro + Autazes + Serra do Navio (figura 8, clado II-3, na cor verde), como mostrou a árvore filogenética baseada no método da máxima verossimilhança (figura 7).

### **5.1.3 - NCPA**

Como a análise prévia para 16S desenvolvida pelo software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) utilizando critérios de parcimônia estatística ao nível de confiança de 95%, gerou mais de uma rede de haplótipos sem conexão, as inferências filogeográficas (NCPA) foram feitas utilizando apenas os dados separados das duas maiores redes, através do pacote de programas ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). Duas novas redes haplotípicas foram construídas e a hierarquização foi feita automaticamente pelo programa. Após, as inferências foram feitas automaticamente pelo ANeCA 1.2 utilizando a chave de inferência proposta por Templeton (2004). Os resultados estão resumidos no Apêndice 2.

A maior rede formou clados hierarquizados de nível 5 e três possíveis eventos foram inferidos nesta análise de NCPA: dois eventos distintos de fragmentação alopátrica em diferentes localidades e um possível evento de colonização a longa distância e/ou fragmentação populacional no passado.

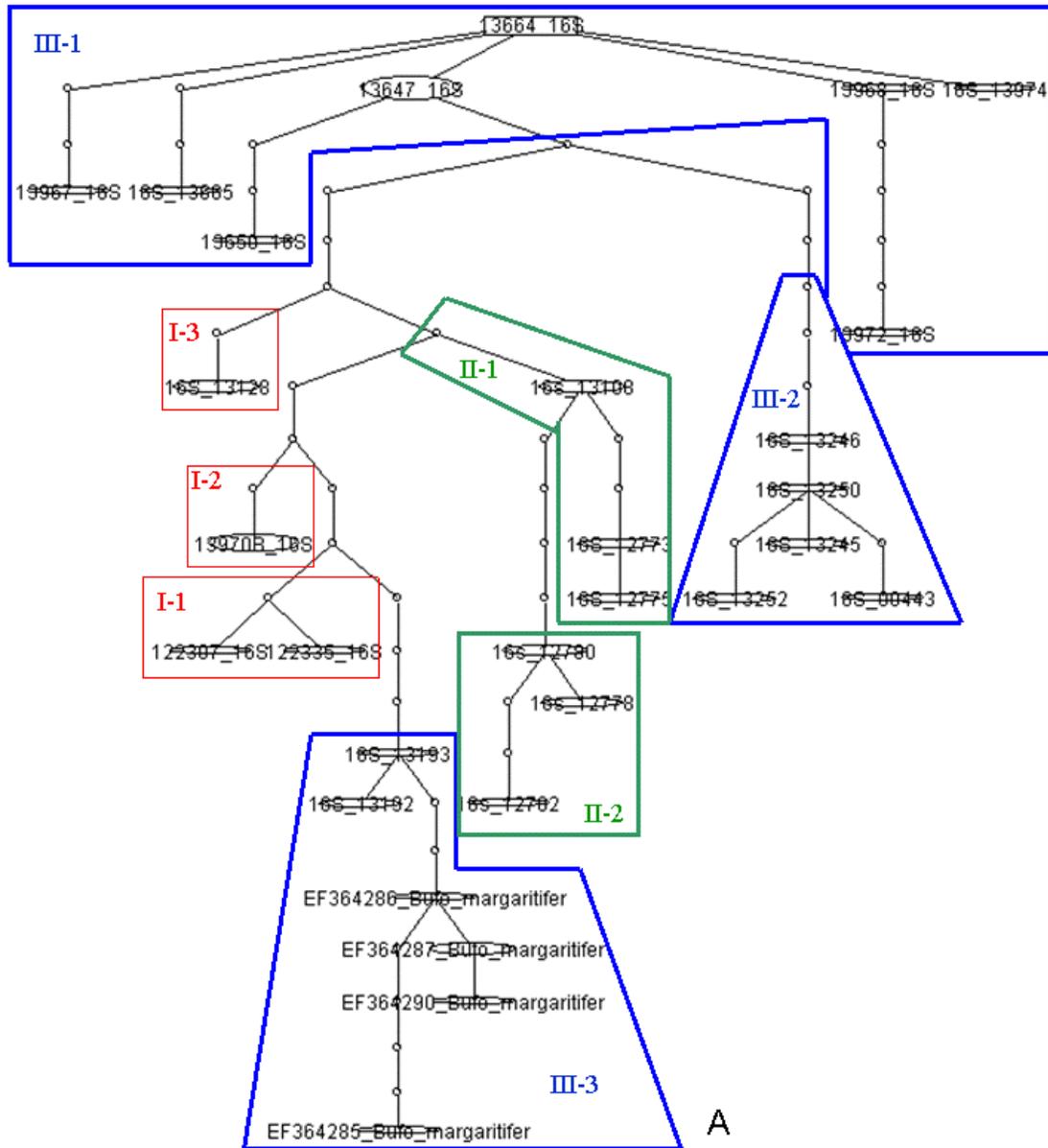


Figura 8: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a oito possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifera*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

Já a rede menor formou clados hierarquizados até o nível 4 e foi sugerido um evento de fragmentação alopátrica entre Barcelos e Manacapuru, assim como para todas as amostras desta rede.

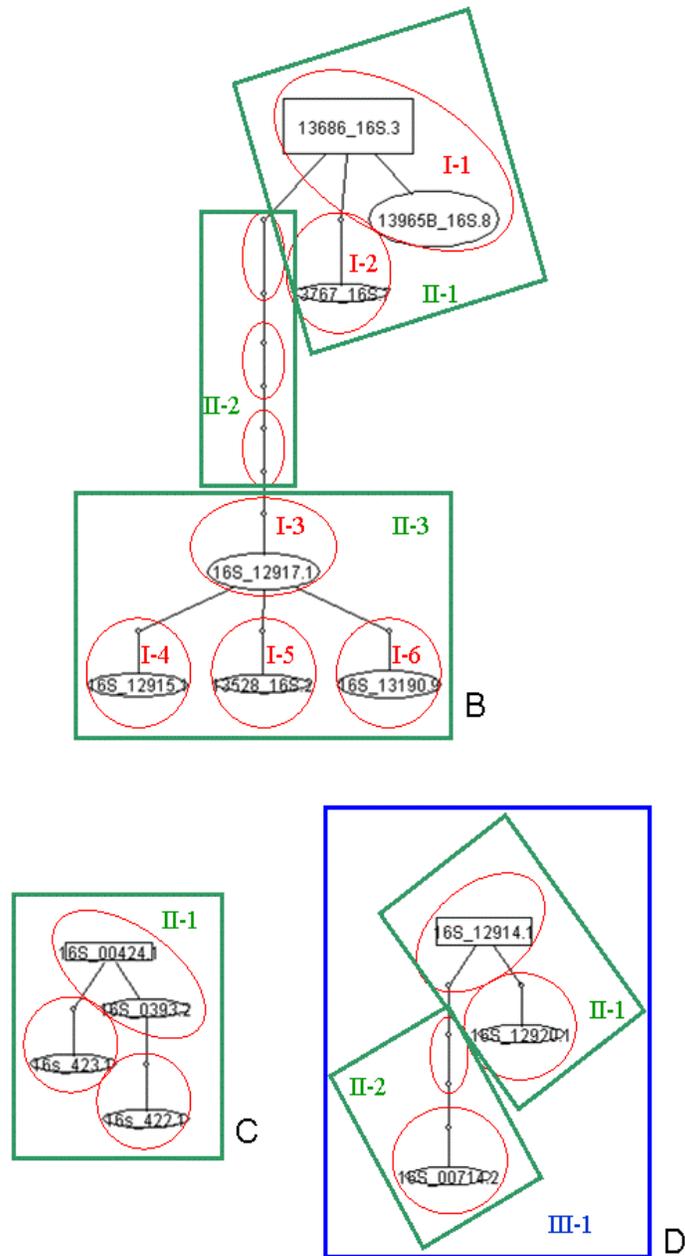


Figura 9: Redes de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede B corresponde a duas possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifera* e as redes C e D a uma linhagem cada. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

## 5.2 - 12S

### 5.2.1 - Filogenia

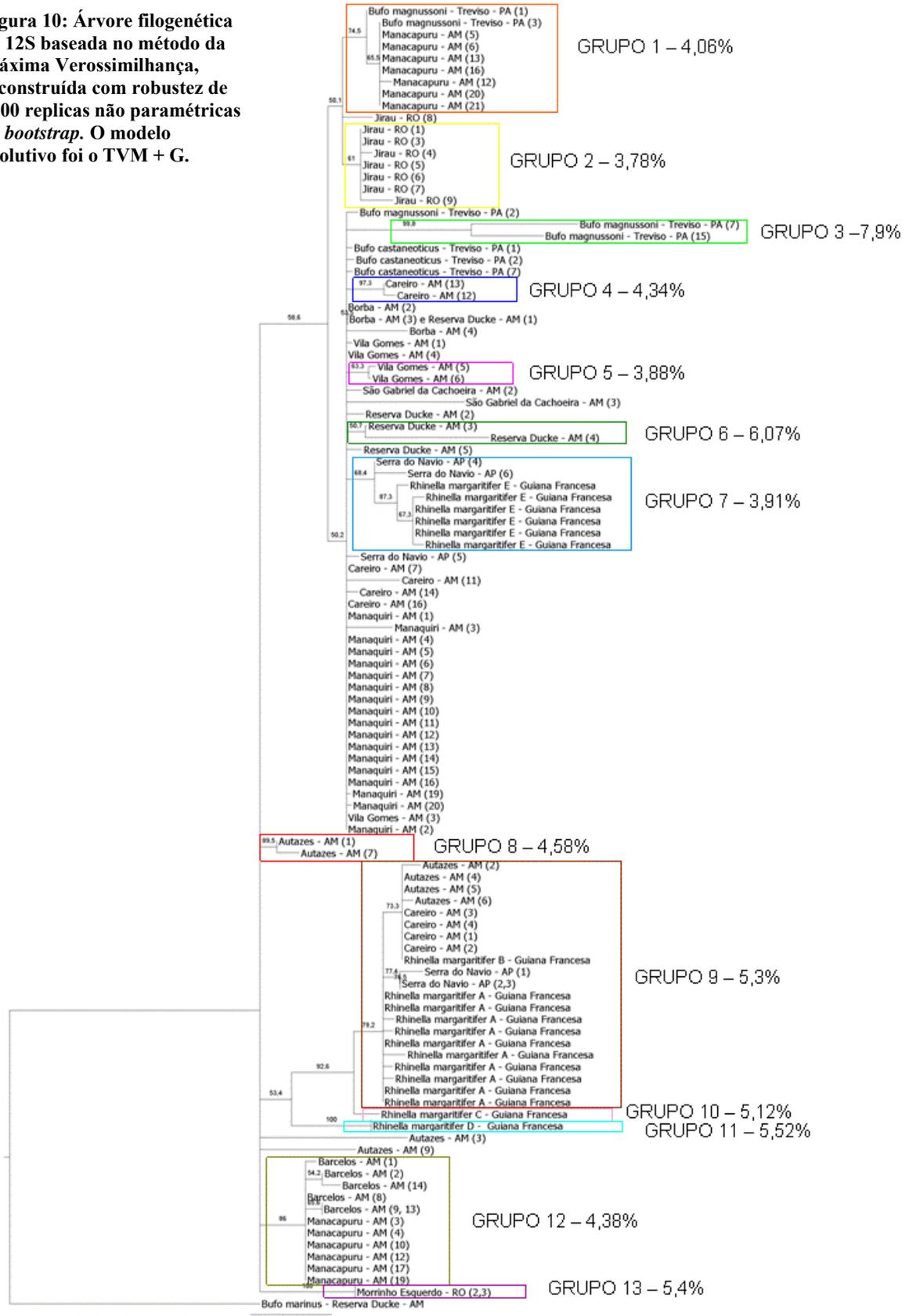
Para as análises do gene 12S, foi obtido um total de 377 pb para 94 indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifer*. Além disto, foram utilizadas 20 seqüências desta espécie, provenientes da Guiana Francesa, que se encontram depositadas no GenBank, e 1 seqüência de *Bufo marinus*, que serviu como grupo externo, num total de 115 seqüências de 12S. A composição das bases apresentou a proporção anti-guanina (A = 31,55%, C = 25,22%, G = 17,73%, T = 25,50%), sendo que a base adenina (A) se apresentou em maior proporção.

A árvore filogenética baseada no método de Máxima Verossimilhança foi proposta segundo o modelo molecular evolutivo de substituição nucleotídica TVM+G, que propõe taxas de transversões variáveis, porém taxas de transições iguais, além de uma discreta distribuição gamma, que prediz que os sítios evoluem diferentemente ([www.molecularevolution.org](http://www.molecularevolution.org) em 16/03/2010 às 12:58h).

Nesta análise (figura 10) foram obtidos 13 grupos com as amostras de *R. gr. margaritifer* e 1 clado para o grupo externo *B. marinus*. Muitos indivíduos não foram agrupados, não sendo utilizados, então, para fins de comparação nesta análise filogenética. Os valores de *bootstrap* foram, em sua maioria, muito baixos. Tudo isto pode ser explicado devido a pouca informação gerada, já que a seqüência é pequena e nem todos indivíduos foram seqüenciados, ou ainda pode haver uma grande quantidade de homoplasia. Talvez estes fatores possam ter contribuído para a falta de robustez de alguns dados gerados na análise desta hipótese filogenética. Os valores de divergência foram calculados utilizando somente os grupos irmãos, e estes variaram de 3,78% a 7,9%. Assim como ocorreu para o gene de 16S, alguns indivíduos simpátricos não se agruparam num mesmo clado.

Os 13 grupos obtidos nesta análise do gene 12S foram: clado 1, composto por *B. magnussoni* e alguns indivíduos de Manacapuru; grupo 2, com baixo valor de *bootstrap* (61%), não suportando robustez para monofilia, composto por indivíduos de Jirau; clado 3, formado por outros indivíduos de *B. magnussoni*; clado 4, composto por indivíduos do Careiro; frupos 4, 5, 6 e 7, todos sem valores de *bootstrap* suportando robustez suficiente para monofilia e formados por Careiro, Vila Gomes, Reserva Ducke e linhagem *R. margaritifer* E, respectivamente; clado 8, formado por alguns indivíduos de Autazes; clado 9, formado pela possível linhagem *R. margaritifer* A; clado 10, composto pela linhagem C; clado 11, formado pela linhagem D; clado 12, formado por Barcelos e Manacapuru; e clado 13, formado por indivíduos de Morrinho Esquerdo.

**Figura 10: Árvore filogenética de 12S baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o TVM + G.**



## 5.2.2 - Rede de haplótipos

Pela Análise dos Clados Agrupados (NCA ou Nested Clade Analysis), implementada no TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), a partir das 112 seqüências de 377 pb do gene 12S para *R. margaritifera*, foram geradas seis redes de haplótipos não conectadas entre si (figuras 11 e 12), sendo destas uma maior e mais abrangente e as outras cinco menores. Para melhor entendimento das redes formadas, a hierarquização completa dos haplótipos, que foi feita manualmente, foi omitida, ficando apenas os agrupamentos no nível hierárquico de interesse. Cada nível hierárquico foi representado por uma cor distinta nas figuras.

Uma rede formada por um único haplótipo foi omitida nesta discussão por envolverem apenas dois indivíduos da Guiana Francesa, representando a linhagem *R. margaritifera* D.

## 5.2.3 - NCPA

A análise prévia do gene 12S desenvolvida pelo software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) utilizando critérios de parcimônia estatística ao nível de confiança de 95%, gerou mais de uma rede de haplótipos sem conexão. As inferências filogeográficas (NCPA), então, foram feitas utilizando apenas os haplótipos das duas maiores redes, separadamente, através do pacote de programas ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). Duas novas redes haplotípicas foram construídas e a hierarquização foi feita automaticamente pelo programa. Após, a chave de inferência proposta por Templeton (2004) também foi inferida automaticamente pelo AneCA 1.2. Os resultados estão resumidos no Apêndice 2.

A maior rede formou clados hierarquizados de nível 5 e três possíveis eventos foram inferidos nesta análise de NCPA: dois eventos distintos de expansão contígua em diferentes localidades e um possível evento restringiu o fluxo gênico com isolamento por distância.

Já a rede menor formou clados hierarquizados até o nível 4 e foi sugerido apenas um evento de fragmentação alopátrica para todo o cladograma.

## 5.3 - Mitocondriais

### 5.3.1. - Filogenia

Como os genes 12S rRNA e 16S rRNA estão na mesma molécula e têm a mesma história evolutiva, os dois grupos de seqüências foram concatenados em um único banco de dados, para as amostras que as duas seqüências foram obtidas, num total de 734 pb para 73

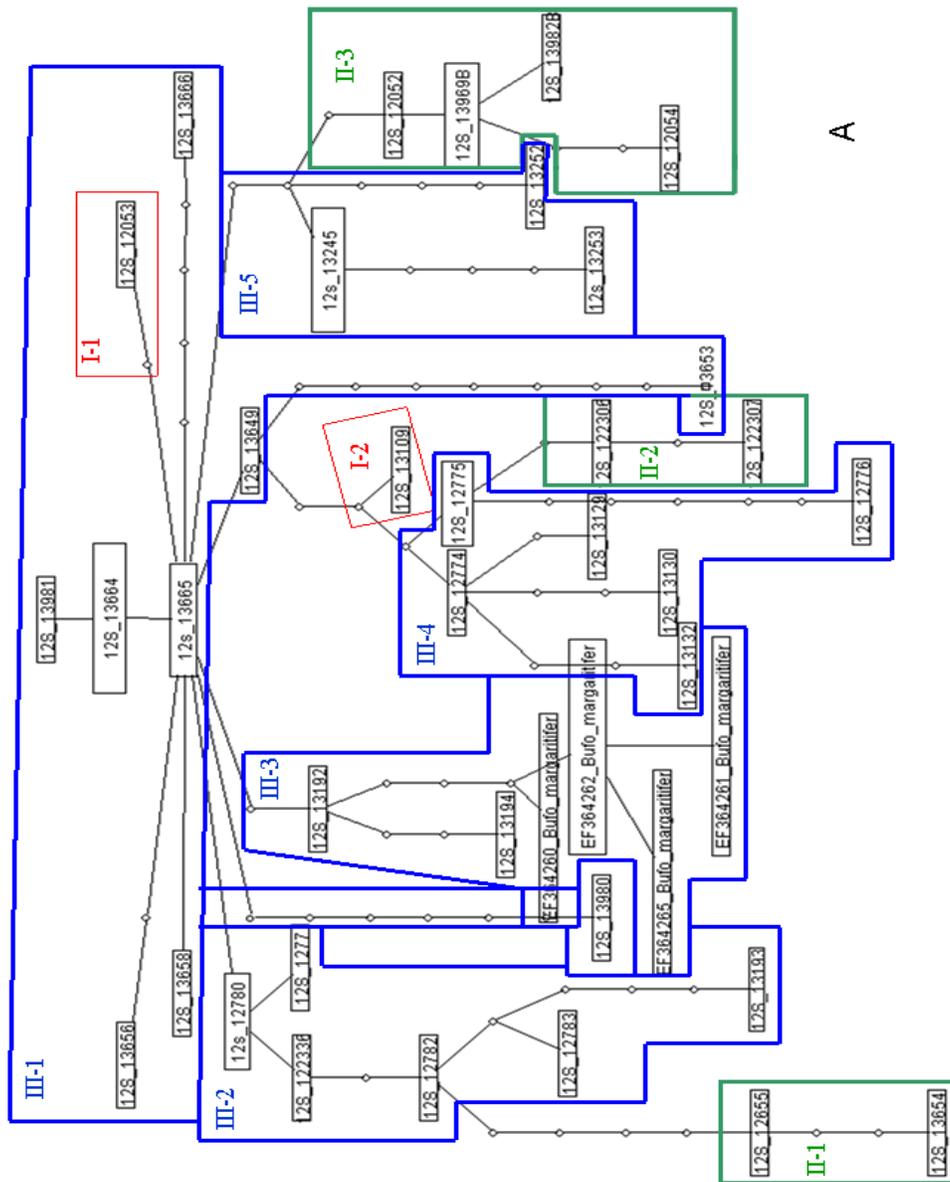


Figura 11: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 12S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a onze possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos cladros foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

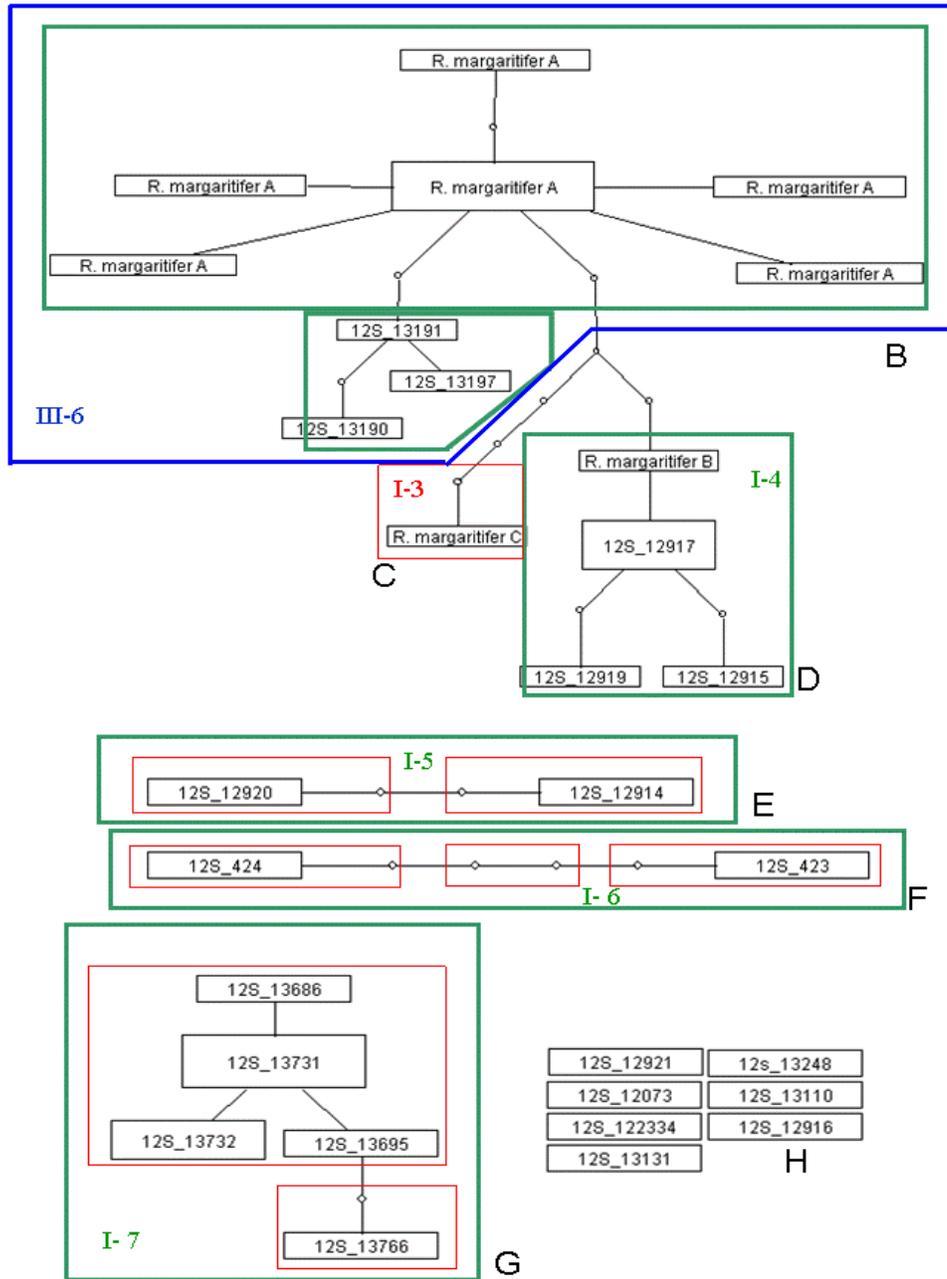


Figura12: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene 12S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. As redes de B a G correspondem a seis possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifer* e 1 indivíduo de *Bufo marinus*, utilizada como grupo externo, num total de 74 seqüências de dados mitocondriais. A composição das bases apresentou a proporção anti-guanina (A = 32,12%, C = 22,06%, G = 18,27%, T = 27,55%), sendo que a base adenina (A) se apresentou em maior proporção.

A árvore filogenética baseada no método de Máxima Verossimilhança foi proposta segundo o modelo molecular evolutivo de substituição nucleotídica GTR+ G + I, que propõe que cada nucleotídeo tem uma taxa de substituição própria, levando-se em consideração sua frequência, a proporção de sítios invariáveis (I) em que não há mudança nos sítios no banco de dados e a discreta distribuição gamma, que prediz que os sítios evoluem diferentemente (Felsenstein, 2004; [www.molecularevolution.org/resources/models/nucleotide](http://www.molecularevolution.org/resources/models/nucleotide) em 16/03/2010 às 12:58h). Este modelo também foi utilizado no estudo de *R. margaritifer* da Guiana Francesa (Fouquet *et al.*, 2007a).

Nesta análise (figura 13) foram obtidos 12 grupos com os espécimes de *Rhinella margaritifer* da Amazônia brasileira e o grupo externo *Bufo marinus*. Não foram incluídos os dados de seqüências da Guiana Francesa depositados no GenBank pois não foi possível identificar quais seqüências dos dois genes mitocondriais pertenciam a mesmo espécime. Esta separação em doze clados distintos foi feita baseada tanto na topologia filogenética gerada pela análise estatística de verossimilhança quanto nas distâncias genéticas em comparação par a par. Destes grupos, todos tiveram valores de suporte (*bootstrap*) robustos o suficiente para aceitar monofilia, exceto o clado composto por um único indivíduo de Manacapuru (grupo5). A menor distância genética média de um grupo em relação aos demais foi de 2,23%. Os clados formados foram os seguintes: clado 1, formado por Morrinho Esquerdo; clado 2, composto por Careiro, Autazes e Serra do Navio; clado 3, formado por Barcelos e alguns indivíduos de Manacapuru; clado 4, formado por Autazes; clado 6, correspondente à espécie já descrita *B. castaneoticus*; clado 7, formado por Reserva Ducke, Borba e São Gabriel da Cachoeira; clado 8, formado por alguns indivíduos da Serra do Navio; clado 9, composto por Careiro e Manaquiri; clado 10, correspondendo à Vila Gomes; clado 11, formado por Jirau; e clado 12, formado por alguns indivíduos de Manacapuru.

### 5.3.2 - Rede de haplótipos

Pela Análise dos Clados Agrupados (NCA ou Nested Clade Analysis), implementada no TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), a partir das 73 seqüências de 734 pb dos genes 12S+16S concatenados para *R. margaritifer*, foram geradas seis redes de haplótipos não conectadas

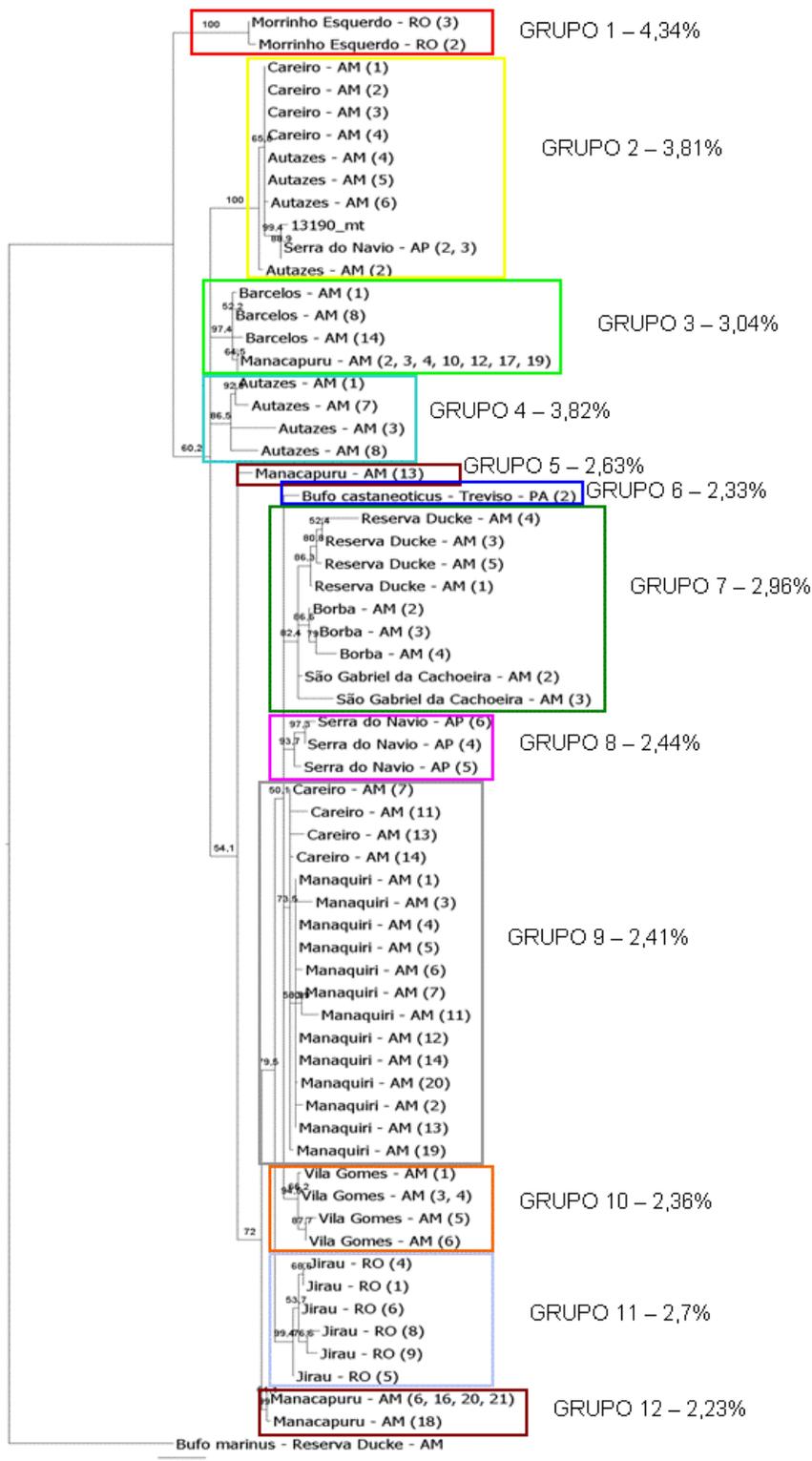


Figura 13: Árvore filogenética dos genes mitocondriais analisados de forma concatenada, baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o GTR + G + I.

entre si (figuras 14 e 15). Para melhor visualização das redes formadas, a hierarquização completa dos haplótipos, que foi feita manualmente, foi omitida, ficando apenas os agrupamentos no nível hierárquico de interesse. Cada nível hierárquico foi representado por uma cor distinta nas figuras.

De todas as seqüências, três formaram haplótipos únicos que não se conectaram em nenhuma rede. São eles: 13110 ou indivíduo 3 de São Gabriel da Cachoeira, que na árvore filogenética de máxima verossimilhança está dentro do clado 7, 12916 ou indivíduo 3 de Autazes, que na análise de MV está dentro do grupo 4 e 13977B ou espécime 13 de Manacapuru, que forma um clado sozinho na árvore, correspondente ao grupo 5.

### 5.3.3 - NCPA

A análise prévia dos genes mitocondriais concatenados desenvolvida pelo software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) utilizando critérios de parcimônia estatística ao nível de confiança de 95%, gerou mais de uma rede de haplótipos sem conexão. As inferências filogeográficas (NCPA), então, foram feitas utilizando apenas os dados separados da maior rede, através do pacote de programas ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). A nova rede haplotípica foi construída e a hierarquização foi feita automaticamente pelo programa. Após, as inferências foram feitas automaticamente pelo software utilizando a chave proposta por Templeton (2004). Os resultados estão resumidos no Apêndice 2.

A rede formou clados hierarquizados de nível 6 e quatro inferências foram obtidas nesta análise de NCPA. No nível 5, foram inferidos dois eventos de fluxo gênico restrito ou dispersão com alguma dispersão a longas distâncias e um evento de fragmentação alopátrica. Já o cladograma total evidenciou a possível ocorrência de expansão contígua.

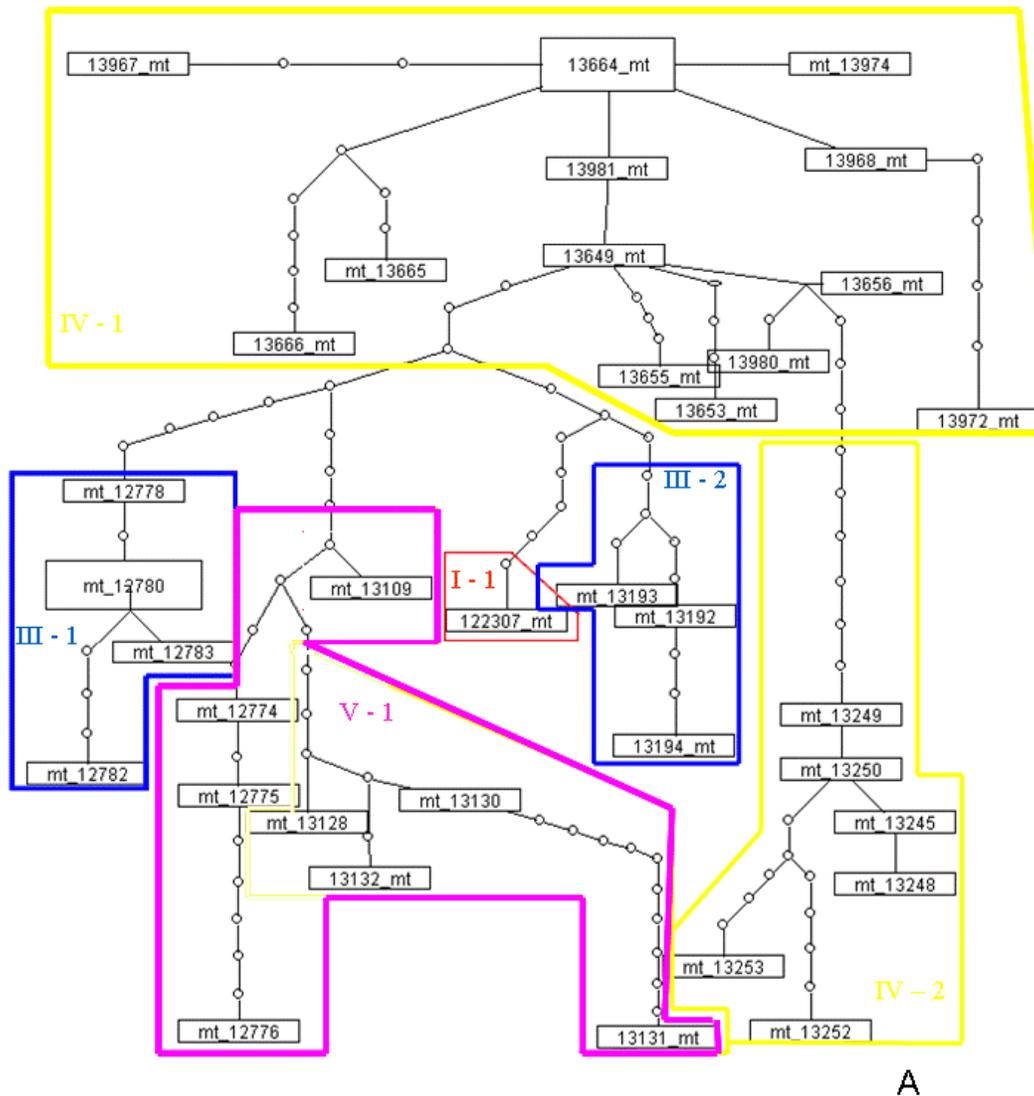


Figura 14: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências dos genes 12S+16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. A rede A corresponde a seis possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifera*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III; amarelo = nível IV; rosa = nível V). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

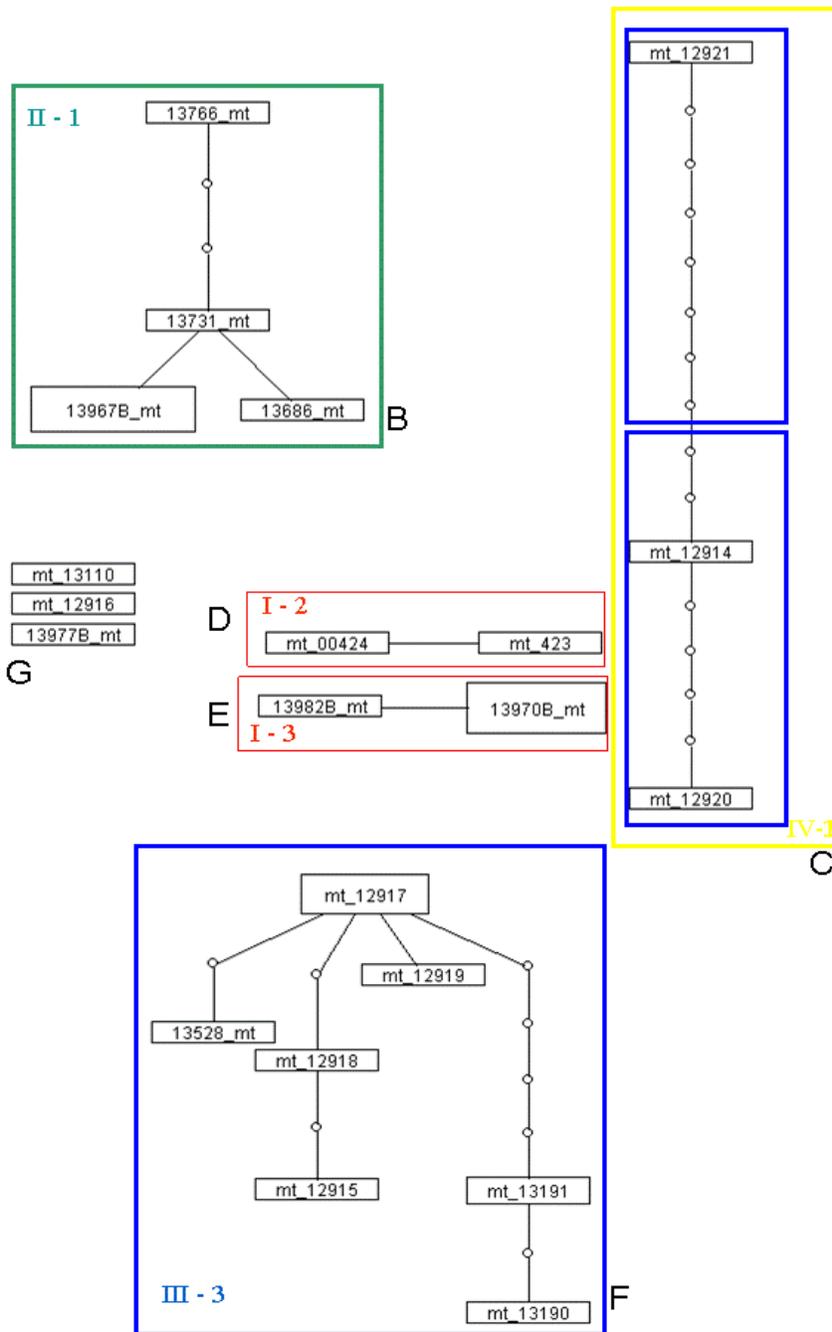


Figura 15: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências dos genes 12S+16S. Foram obtidas seis redes de haplótipos. As redes de B a F correspondem, cada uma, a uma possível linhagem existente dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III; amarelo = nível IV). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

## 5.4 - Tirosinase

### 5.4.1 - Filogenia

O gene nuclear tirosinase foi parcialmente seqüenciado para 127 indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifera* e 1 indivíduo de *Bufo marinus*, num total de 450 pb. Além disto, foram utilizadas 23 seqüências desta espécie, provenientes da Guiana Francesa, que se encontram depositadas no GenBank, para as análises filogenéticas. A composição das bases apresentou uma proporção similar de A+T/G+C (A = 25,57%, C = 25,36%, G = 24,28%, T = 24,49%, Y (C ou T) = 0,15%, R (A ou G) = 0,07%, M (C ou A) = 0,037%, K (G ou T) = 0,025%, S (C ou G) = 0,02%, W (A ou T) = insignificante (0,0025  $\approx$  0%)), sendo que das 176 seqüências utilizadas para as análises, 102 são heterozigotas em, pelo menos, um sítio.

A árvore filogenética (figura 16) baseada no método de Máxima Verossimilhança foi proposta segundo o modelo molecular evolutivo de substituição nucleotídica HKY+G.

Baseado nas análises prévias com os genes mitocondriais, 13 grupos representando possíveis unidades evolutivas significativas ou ESUs (Moritz, 1994) foram obtidos. Destes clados, todos tiveram amostras seqüenciadas para o gene tirosinase. Das 78 comparações de  $F_{st}$  par a par obtidas, 47 apresentaram diferenças significativas com os clados irmãos (tabela 8).

### 5.4.2 - Rede de haplótipos

A Análise dos Clados Agrupados (NCA ou Nested Clade Analysis), implementada no TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), foi feita a partir dos haplótipos obtidos para os genes nucleares. Os indivíduos que apresentaram um ou nenhum sítio heterozigoto por seqüência, tiveram sua seqüências transformada em dois haplótipos, o que também ocorreu para aqueles que tiveram dois ou mais sítios variáveis, sendo que foram obtidas duas seqüências de haplótipos mais prováveis, através do programa PHASE (Stephens *et al.*, 2004).

No total, 346 haplótipos para o gene tirosinase foram analisados, gerando seis redes não ligadas entre si e 7 indivíduos que não se agruparam (*B. magnussoni* 11, Vila Gomes 5, São Gabriel da Cachoeira 2, Manacapuru 9, 16 e 17, Manaquiri 19). A rede principal foi composta por 320 haplótipos e foi impossível encontrar qual haplótipo central, de onde partiam as principais ramificações da rede. Além disto, a enorme quantidade de loops não permitiu a escolha da melhor topologia da rede. As outras cinco redes menores foram formadas somente pelo agrupamento de haplótipos de um mesmo indivíduo. Destas, a primeira rede foi formada pelos dois haplótipos do indivíduo Autazes 3, a segunda e terceira



Tabela 8: Matriz de significância para os valores de P da análise de  $F_{st}$  par a par para o gene tirosinase. Valores significativos de comparações par a par estão assinalados com +. Valores não significativos estão marcados com -.

	1 Vila Gomes	2 São Gabriel Borba	3 Autazes	4 Careiro Autazes	5 Proboscidea	6 Careiro Manaquiri	7 Barcelos Manacapuru	8 Manacapuru	9 Jirau Morrinho	10 Linhagem E	11 magnussoni	12 castaneoticus	13 Teotônio Morrinho
<b>1</b>	*												
<b>2</b>	-	*											
<b>3</b>	-	-	*										
<b>4</b>	+	+	-	*									
<b>5</b>	+	+	+	+	*								
<b>6</b>	-	-	-	+	-	*							
<b>7</b>	-	+	-	+	+	+	*						
<b>8</b>	+	+	-	+	+	-	+	*					
<b>9</b>	+	+	-	+	+	+	-	+	*				
<b>10</b>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	*			
<b>11</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	*		
<b>12</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	*	
<b>13</b>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	*

pelos haplótipos de Manaquiri 13 e 15, respectivamente. A quarta rede individual foi composta pelos haplótipos de Barcelos 8 e, finalmente, a quinta rede pelos haplótipos de Barcelos 15.

### 5.4.3 - NCPA

A análise prévia de tirosinase desenvolvida pelo software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) utilizando critérios de parcimônia estatística ao nível de confiança de 95%, gerou mais de uma rede de haplótipos sem conexão. As inferências filogeográficas (NCPA), então, foram feitas utilizando apenas os dados separados da maior rede, através do pacote de programas ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). A nova rede haplotípica foi construída e a hierarquização foi feita automaticamente pelo programa. Após, as inferências foram feitas automaticamente pelo programa utilizando a chave de inferência de Templeton (2004). Os resultados estão resumidos no Apêndice 2.

A rede formou clados hierarquizados de nível 7 e cinco inferências foram obtidas nesta análise de NCPA: fluxo gênico restrito com isolamento por distância, dois eventos de expansão contígua, fluxo gênico restrito ou dispersão mas com alguma dispersão a longas distâncias e, por último, uma análise que sugeria ou fluxo gênico restrito ou dispersão com alguma dispersão a longas distâncias através de áreas intermediárias não ocupadas pela espécie ou ainda fluxo gênico passado seguido por extinção das populações intermediárias.

## 5.5 - Rodopsina

### 5.5.1 - Filogenia

O gene nuclear rodopsina foi parcialmente seqüenciado para 76 indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifera*, num total de 274pb. Além disto, foram utilizados 8 seqüências de outras espécies de bufonídeos (*Bufo arunco*, *B. arenarum*, *B. amboroensis*, *B. granulosus*, *B. marinus*, *B. paracnemis*, *B. spinulosus* e *B. viridis*), que se encontram depositadas no GenBank, para as análises filogenéticas. A composição das bases apresentou menor conteúdo de guanina (A = 23,55%, C = 29,37%, G = 16,61%, T = 30,42%, Y(C ou T) = 0,04%, R(A ou G) = 0,014%, M(C ou A) = 0,009%, K(G ou T) = insignificante  $\approx 0$ , S(C ou G) = insignificante  $\approx 0$ , W(A ou T) = 0,028), sendo que das seqüências de *R. margaritifera* utilizadas para as análises, 19 são heterozigotas em, pelo menos, um sítio.

A árvore filogenética (figura 17) baseada no método de Máxima Verossimilhança foi proposta segundo o modelo molecular evolutivo de substituição nucleotídica J2+G (posada, 2006).

Nesta análise de máxima verossimilhança para o gene rodopsina também não foi possível verificar a presença de grupos definidos na árvore filogenética.

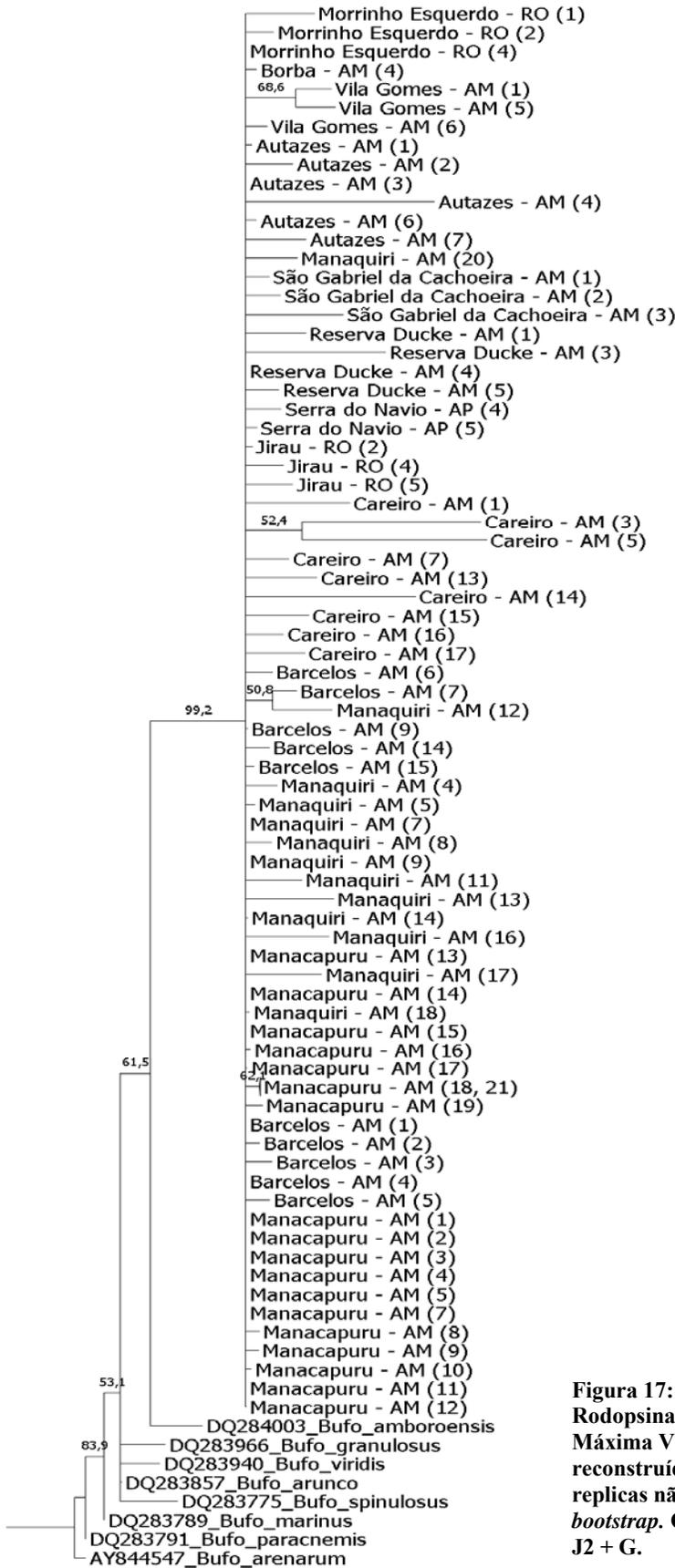
Baseado nas análises prévias com os genes mitocondriais, 13 grupos representando possíveis unidades evolutivas significativas ou ESUs (Moritz, 1994) foram obtidos. Destes clados, 11 tiveram amostras seqüenciadas para rodopsina. Para este gene, não foram obtidos dados para os clados representando as espécies já descritas do complexo *margaritifer*, *B. castaneoticus* e *B. magnussoni*. Das 65 comparações de  $F_{st}$  par a par obtidas, apenas 17 apresentaram diferenças significativas com os clados irmãos (tabela 9).

### 5.5.2 - Rede de haplótipos

A Análise dos Clados Agrupados (NCA ou Nested Clade Analysis), implementada no TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), foi feita a partir dos haplótipos obtidos para os genes nucleares. Os indivíduos que apresentaram um ou nenhum sítio heterozigoto por seqüência, tiveram sua seqüência transformada em dois haplótipos. O mesmo ocorreu para aqueles que tiveram dois ou mais sítios, sendo que foram obtidas duas seqüências consenso, com os haplótipos mais prováveis.

No total, 152 haplótipos para o gene rodopsina foram analisados, gerando doze redes (figuras 18 e 19) não ligadas entre si e 23 indivíduos que não se agruparam (Vila Gomes 6, São Gabriel 2 e 3, Autazes 2 e 7, Ducke 3, Careiro 1, 5, 7, 14, 15, 16 e 17, Manaquiri 12, 13, 17 e 20, Barcelos 6 e 7, Morrinho 2, Jirau 4 e 5 e Serra do Navio 4). A rede principal foi composta por 84 haplótipos e muitos loops. Entretanto, diferentemente do que aconteceu com o gene de tirosinase, nesta análise foi possível resolvê-los.

As onze redes menores foram formadas pelos dois haplótipos gerados de um único indivíduo. Foram estes: Vila Gomes 1 e 5, Autazes 4, Ducke 1 e 5, Careiro 3 e 13, Manaquiri 4, 11, e 16, Morrinho 1.



**Figura 17: Árvore filogenética de Rodopsina baseada no método da Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. O modelo evolutivo foi o J2 + G.**

Tabela 9 Matriz de significância para os valores de P da análise de  $F_{st}$  par a par para o gene rodopsina. Valores significativos de comparações par a par estão assinalados com +. Valores não significativos estão marcados com -.

	1 Vila Gomes	2 São Gabriel Borba	3 Autazes	4 Careiro Autazes	5 Proboscidea	6 Careiro Manaquiri	7 Barcelos Manacapuru	8 Manacapuru	9 Jirau Morrinho	10 Linhagem E	11 Teotônio Morrinho
<b>1</b>	*										
<b>2</b>	-	*									
<b>3</b>	-	-	*								
<b>4</b>	-	-	-	*							
<b>5</b>	+	-	-	-	*						
<b>6</b>	+	-	-	+	-	*					
<b>7</b>	+	+	-	+	+	+	*				
<b>8</b>	+	+	-	+	+	-	+	*			
<b>9</b>	+	-	-	-	-	-	+	-	*		
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	
<b>11</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	*

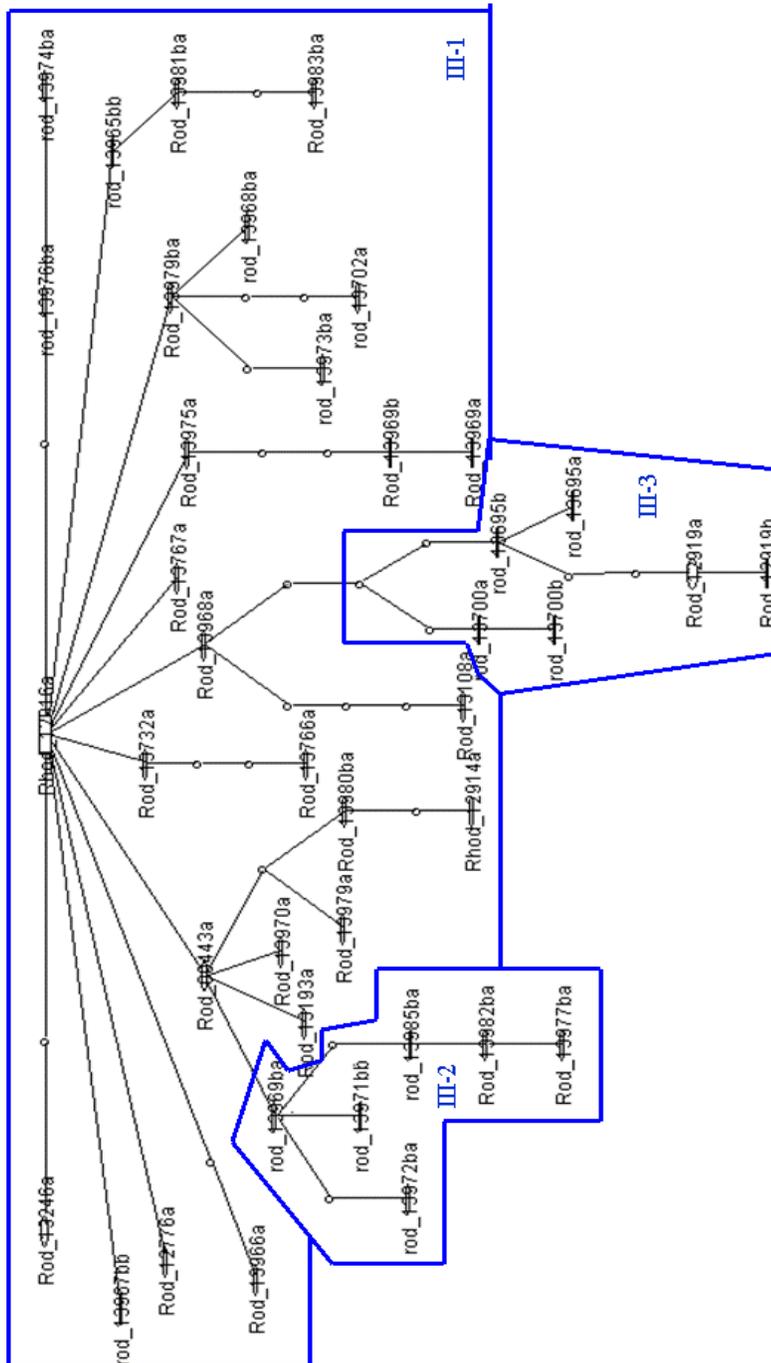
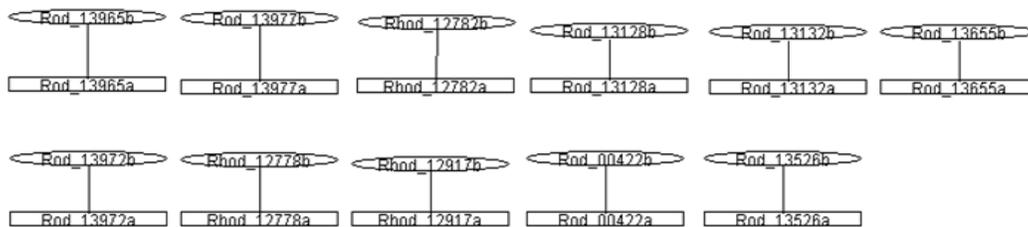


Figura 18: Rede de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene Rodopsina. Foram obtidas doze redes de haplótipos. Esta rede corresponde a três possíveis linhagens existentes dentro do complexo *margaritifer*. A hierarquização completa dos clados foi omitida para melhor entendimento da rede de haplótipos. Cada cor corresponde a um nível de hierarquização (preto = nível 0; vermelho = nível I; verde = nível II; azul = nível III). Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.



A



B

Figura 19: Redes de haplótipos geradas pelo programa TCS, usando critérios de máxima parcimônia, a partir das seqüências do gene Rodopsina. Foram obtidas doze redes de haplótipos. As redes em A foram geradas por haplótipos de um mesmo indivíduo. Os haplótipos em B não se ligaram a nenhuma rede. Os nomes originais de coleta foram mantidos e seu sinônimo na árvore filogenética se encontra no Apêndice 1.

### 5.5.3 - NCPA

A análise prévia do gene rodopsina desenvolvida pelo software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) utilizando critérios de parcimônia estatística ao nível de confiança de 95%, gerou mais de uma rede de haplótipos sem conexão. As inferências filogeográficas (NCPA), então, foram feitas utilizando apenas os dados separados da maior rede, através do pacote de programas ANeCA 1.2 (Panchal, 2007). A nova rede haplotípica foi desenhada e a hierarquização foi feita automaticamente pelo programa. Após, a chave de inferência proposta por Templeton (2004) também foi inferida automaticamente pelo software. Os resultados estão resumidos no Apêndice 2.

A rede formou clados hierarquizados de nível 5 e três inferências foram obtidas nesta

análise de NCPA. As duas primeiras, no nível 3, evidenciaram uma possível fragmentação alopátrica e um evento ou de fluxo gênico restrito ou dispersão com alguma dispersão a longas distâncias através de áreas intermediárias não ocupadas pela espécie ou ainda fluxo gênico passado seguido por extinção das populações intermediárias. Já a inferência de nível 4 foi constituída pelas mesmas amostras das duas anteriores e mostrou um presumível evento de expansão.

## 6 - DISCUSSÃO

### 6.1 - 16S

Na árvore filogenética da figura 7, clado 1 foi o mais basal e composto pelo indivíduo de Teotônio Esquerdo e três indivíduos de Morrinho Esquerdo, ambos provenientes de Rondônia, e apresentou um suporte de 93,4% de *bootstrap*. A distância genética média deste grupo em relação aos demais foi de 3,62%.

Um indivíduo de Morrinho Esquerdo se agrupou separadamente dos outros três, juntamente com as amostras de Cachoeira do Jirau, formando o clado 11, que parece ser exclusivamente da região do alto Rio Madeira. O suporte de *bootstrap* para este grupo foi de 96,7% e a divergência genética média em relação ao restante foi de 2,65%. Segundo Fouquet *et al.* (2007 a, b), divergências maiores que 3,8% são usadas para separar espécies crípticas. Quando os dois cladogramas (1 e 11) que contém indivíduos de Morrinho Esquerdo são comparados, a divergência encontrada é de 4%, o que indica a existência de possíveis espécies crípticas simpátricas.

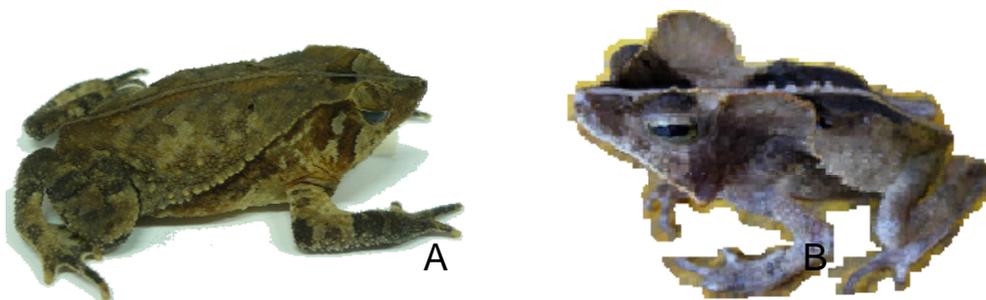
O clado 2 foi formado por uma espécie já descrita dentro do complexo *margaritifer*, *Bufo castaneoticus*, de Treviso, Pará. O valor de suporte de *bootstrap* não foi tão significativo (76%) e o valor de distância genética média do grupo em relação aos demais foi de 1,94%.

O clado 3 foi composto somente por indivíduos provenientes da Reserva Ducke. O valor de *bootstrap* deste clado foi alto (97,5%) e o valor de divergência em relação aos demais grupos, que foi de 2,4%. Este grupo provavelmente corresponde a uma das espécies já descrita do complexo *margaritifer*, *Rhinella proboscidea*. Esta espécie, comum da Amazônia central, tem o nariz mais proeminente que o comum para o grupo e é típica do local onde foi coletada, a Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas (A.P.L., comunicação pessoal).

O clado 4 foi composto tanto por alguns indivíduos (4, 5 e 6) da Serra do Navio, Amapá, quanto por espécimes da Guiana Francesa que não possuem crestas craniais. O valor de suporte de *bootstrap* para este grupo não foi alto (79,6%), mas a distância genética média deste grupo em relação aos demais foi de 2,34%.

Os outros espécimes da Serra do Navio (1, 2 e 3) formaram o clado mais diverso quanto ao número de localidades, o grupo 5, composto também por alguns indivíduos de Careiro, Autazes, ambos Amazonas, e duas diferentes linhagens da Guiana Francesa, *R. margaritifer* A e B. Segundo estudo de Fouquet e colaboradores (2007a), estas duas linhagens possuem grandes crestas craniais, o que estes autores sugerem ser uma sinapomorfia do

grupo. Entretanto, este não é o padrão refletido nesta análise com o gene 16S, pois os indivíduos de Careiro e Autazes apresentam crestas discretas, não expandidas lateralmente (figura 20). Ao verificar as distâncias genéticas par a par para averiguar se o agrupamento destes indivíduos realmente estava correto, foi possível notar valores muito baixos de divergências entre as localidades. As divergências entre Careiro/Serra do Navio e Autazes/Serra do Navio foram de 0,2%, entre Careiro/Guiana e Autazes/Guiana variou em 0,4 e 0,7% e entre Careiro/Autazes foi zero. Apesar do baixo valor de suporte de *bootstrap* (75,6%), a distância genética dentro do grupo foi muito baixa (0,4%) e a divergência deste grupo em relação aos demais foi alta, de 2,64%.



**Figura 20: Diferenças morfológicas entre um espécime de Autazes (AM) e da Guiana Francesa, pertencentes ao clado 5. Ao contrário do que foi proposto por Fouquet *et al.* (2007a), crestas craniais extremamente expandidas dorsolateralmente não parecem ser um sinapomorfia para o grupo.**

Fotos: A - Daniela Leroy; B – Fouquet *et al.* (2007a)

Outros indivíduos de Autazes ainda formaram um clado com a amostra de Mutum Esquerdo, Rondônia (grupo 9). O grupo teve um suporte baixo, de 72,1%, entretanto a divergência média em relação aos outros grupos foi de 2,67%. Apesar da grande distância geográfica entre as duas localidades, a distância dentro do grupo foi baixa, de 0,4%.

Os espécimes de Careiro se dividiram em dois grupos, no clado 5, conforme descrito acima, e no clado 10, juntamente com todos os indivíduos de Manaquiri. Este foi o maior clado formado, com 25 indivíduos, e apresentou a maior diversidade dentro do grupo, de 0,9%. Apesar de baixa robustez, com *bootstrap* de 72,7%, a distância genética média em relação aos outros clado foi de 2,25%, conforme indica a figura 7. As duas áreas amostrais se localizam na margem direita do rio Solimões e estão muito próximas geograficamente (aproximadamente 100 Km), permitindo o fluxo gênico entre as populações contínuas desta região, o que poderia explicar este agrupamento.

Já os espécimes de Manacapuru se dividiram em dois clados distintos. O clado 7 incluiu indivíduos desta localidade e também de Barcelos, Amazonas. O valor de suporte de *bootstrap* foi mediano, de 88,8%, e a divergência média em relação aos demais grupos foi de 2,57%. O outro grupo, o clado 14, foi composto somente por espécimes deste local, tem grande robustez (93,8% de *bootstrap*) e distância de 1,87% em relação aos outros grupos. Como só estas duas localidades amostradas pertencem à região geográfica da margem direita do rio Negro e o rio é uma barreira ao fluxo gênico, como proposto por Wallace (1849, 1876), podemos extrapolar o raciocínio para a existência de duas prováveis linhagens simpátricas e exclusivas desta região.

O grupo 12 foi formado por todos os indivíduos de Borba e São Gabriel da Cachoeira, ambos Amazonas. O valor de divergência genética média deste grupo em relação aos demais foi de 2,5% e o suporte de *bootstrap* foi de 65%, valor baixo para corroborar monofilia para o grupo.

Todos os indivíduos de Vila Gomes, Amazonas, se agruparam em um único grupo, o clado 13. Este grupo foi bem suportado, com valor de *bootstrap* de 94,4% e distância genética média em comparação com os grupos foi de 2,15%. Apesar da proximidade de menos de 10 Km com Borba e estar na mesma margem do rio Madeira, a distância genética é de 1,3% entre os clados 12 e 13, valor relativamente alto quando comparado com as divergências dentro dos grupos (0,4% para o clado 12 e 0,1% para o 13).

O último grupo, grupo 6, foi formado apenas pelo indivíduo da Guiana Francesa da linhagem *R. margaritifer* C.

Como se sabe, o gene inicialmente proposto para fazer identificação molecular de espécies (*barcoding*) foi o citocromo oxidase subunidade I. Entretanto, Vences e colaboradores (2005) verificaram que o gene mitocondrial 16S é muito mais informativo para anfíbios e deve ser usado também em estudos que visam à identificação e o esclarecimento de um táxon por ferramentas moleculares. Além disso, é útil tanto na resolução de divergências genéticas profundas quanto no esclarecimento das relações filogenéticas entre taxa que se divergiram mais recentemente (Graybeal, 1997). Tudo isto corrobora a existência de diferentes linhagens e fornece evidências de que há várias espécies em potencial dentro do complexo *margaritifer*.

Na análise de NCA, a maior rede de haplótipos (figura 8, A) foi composta por oito clados coincidentes com a árvore filogenética de máxima verossimilhança (MV). Estes clados foram agrupados em diferentes níveis hierárquicos. No nível hierárquico zero (na figura, representado por um grupo um nível hierárquico acima, I-2), sete indivíduos de Manacapuru

se agruparam num único haplótipo, correspondente ao clado 14 na árvore de MV. Este possui um haplótipo ancestral com os clados formados pelas duas amostras de *B. castaneoticus* (clado I-1) e três amostras da Serra do Navio + *R. margaritifera* E (clado III-3). Estes dois clado foram coincidentes com as análises de MV, corroborando a existência destas três possíveis linhagens de mesmo ancestral, representadas pelos clados I-1, I-2 e III-3.

Todos os indivíduos da Reserva Ducke se agruparam dentro de um único haplótipo no primeiro nível hierárquico (nível zero, representado no esquema da rede maior dentro no clado de nível hierárquico superior, I-3).

Os indivíduos de São Gabriel da Cachoeira formaram um único haplótipo e se agrupou no nível hierárquico II com a população de Borba, que compartilhou dois haplótipos, formando o clado II-1. A população de São Gabriel da Cachoeira parece ser ancestral da população formada por Vila Gomes (clado II-2), sendo que estas duas estão separadas por quatro passos mutacionais. Os clados II-1 e II-2 também foram coincidentes com a árvore de MV.

No segundo nível hierárquico, duas localidades de Rondônia se agruparam: Cachoeira do Jirau, com todos seus indivíduos, e Morrinho Esquerdo, com apenas um de seus indivíduos (clado III-2). Este grupo corresponde ao clado 11 da árvore de MV e está separado dos outros clados por muitos passos mutacionais.

O maior clado, tanto pela quantidade de haplótipos quanto pelo número de indivíduos, no nível hierárquico três, foi formado por todos os indivíduos de Manaquiri e a maioria dos indivíduos de Careiro (clado III-1). Este grande clado também foi coincidente com o gerado pela árvore de MV. Um grande número de indivíduos de Manaquiri compartilhou um único haplótipo (haplótipo 13664), de onde parece ter se originado todo o clado.

O possível haplótipo ancestral está representado pelo passo mutacional circulado de amarelo. Supõe-se, então, que a partir deste haplótipo foi originada esta grande rede haplotípica, que parece ter tido um ancestral na região da Amazônia central, de onde se dispersou para o leste, ao longo do Amazonas, até a região da Serra do Navio (Amapá), e para o oeste, subindo o rio Madeira.

A segunda maior rede (figura 9, B) foi formada por dois grupos coincidentes com os encontrados na árvore de MV. O primeiro clado (II-1) corresponde ao grupo 7 da árvore filogenética e compreende todos os indivíduos de Barcelos e alguns de Manacapuru. Este grupo está separado por sete passos mutacionais do clado II-3 que é composto por alguns indivíduos de Careiro, Autazes e Serra do Navio, todos também representados dentro de outros clados. Todos os indivíduos de Careiro estão representados por um único haplótipo,

situação que também ocorre com os espécimes de Serra do Navio. Este clado parece ter se divergido a partir de Autazes, pois esta é localidade do haplótipo central do grupo (representada na figura como 12917), que é possivelmente o ancestral, de onde partem os haplótipos dos outros dois pontos amostrais. Este clado indica, ainda, uma subdivisão do que foi proposto na árvore filogenética, dentro do clado 5, que incluía também as linhagens da Guiana Francesa *R. margaritifera* A e B. Esta inclusão foi feita baseada nas distâncias par a par, quando comparados os indivíduos de Careiro, Autazes e Serra do Navio com essas duas linhagens, que mostraram divergências variando de 0,4-0,9%, valores baixos para se considerar linhagens distintas. Ainda na árvore de MV, a linhagem *R. margaritifera* C não foi incluída dentro do clado 5, pois os valores de divergência par a par foram altos, variando de 1,6-1,8%.

A figura 9, C é uma pequena rede com somente haplótipos únicos, todos do estado de Rondônia. Este clado é coincidente com o grupo 1 da árvore filogenética de MV, e é composto por quatro de três indivíduos de Morrinho Esquerdo e um espécime de Teotônio Esquerdo. O outro indivíduo de Morrinho se encontra no clado III-2, da figura 8, A.

Outro indivíduo representante de Rondônia, proveniente de Mutum Esquerdo, se encontra no clado da figura 9, D agrupado com indivíduos de Autazes numa rede que corresponde ao clado 9 da árvore filogenética de máxima verossimilhança.

Estas duas análises, tanto na árvore filogenética quanto na rede haplotípica, mostram uma corroboração entre os dados do gene 16S quando analisados sob critério de máxima verossimilhança (árvore) ou sob critério de máxima parcimônia (rede). Esta concordância é mais um indicativo de que cada grupo definido com este gene mitocondrial possa realmente significar uma linhagem distinta dentro do complexo *margaritifera*.

A análise de NCPA com o gene 16S sugeriu que as populações de Vila Gomes, Borba e São Gabriel da Cachoeira tenham sofrido fragmentação alopátrica, num agrupamento de nível hierárquico III. Esses grupos correspondem aos cladogramas 12 e 13 da análise de MV (figura 7) e II-1 e II-2 da rede haplotípica (figura 9, organizada em um nível abaixo). Para corroborar se esta inferência tem suporte estatístico, foi feito um teste de AMOVA e  $F_{ST}$ . Forte estruturação foi encontrada nestas análises ( $\Phi_{ST}$  variando de 0,8424 a 0,89619 e 86,11% da variação entre as localidades e apenas 13, 29% dentro destas), mostrando que talvez os indivíduos aqui analisados já correspondam a unidades taxonômicas (espécies ou linhagens) diferentes.

Todos os indivíduos de Manaquiri, alguns de Careiro, todos do Jirau e o indivíduo 4 de Morrinho Esquerdo (correspondentes aos cladogramas 10 e 11 da análise de MV da figura 7 e aos cladogramas III-1 e III-2 da rede haplotípica da figura 9, organizados em um nível hierárquico

abaixo) formaram um clado para o qual foi inferido algum tipo de colonização à longa distância e/ou evento de fragmentação no passado. Para confirmar, realizaram-se os testes D de Tajima (1989) e Fs de Fu (1997) para verificar se as amostras das diferentes localidades (Manaquiri+Careiro+Rondônia) estão em desequilíbrio de mutação-deriva. Um desvio do equilíbrio é pressuposto para uma recente expansão populacional ou algum evento de gargalo de garrafa em situações em que não há nenhuma vantagem seletiva entre os haplótipos. Nem o teste de Tajima (-0,79240) nem o de Fu (-1,31567) foram significativos a  $P=0,1$ , não sendo possível corroborar estatisticamente o que foi proposto pela chave de inferência. As distâncias entre as populações de Rondônia e as do Amazonas são quase 800Km, o que explicaria os resultados obtidos. Também podemos considerar o surgimento do rio Madeira como uma barreira ao fluxo (conforme teoria proposta por Wallace, 1849) entre as populações dos dois estados, que estão em margens opostas, sendo que esta separação do rio como uma barreira possa ter levado a algum tipo de gargalo de garrafa entre a população ancestral e a nova população.

Por último, foi inferida fragmentação alopátrica entre alguns indivíduos de Manacapuru, alguns da Serra do Navio e a espécie já descrita *B. castaneoticus*, de Treviso, Pará (clados 2, 4 e 13 da árvore de MV da figura 7 e clados I-1, I-2 e III-1 da figura 9, com exceção dos indivíduos da Guiana Francesa que não foram analisados). Para confirmar estatisticamente esta inferência, um teste de  $\Phi_{ST}$  deveria ser feito. Entretanto, as populações têm um N muito baixo (menor que 5 indivíduos por localidade, sendo Manacapuru = 7 indivíduos, Serra do Navio = 3 e Treviso = 2), o que não dá suporte estatístico para as análises. Este efeito de fragmentação inferido pode ser resultado do simples fato de que não há amostragem entre as três localidades, ou seja, não existem amostras nas áreas intermediárias aos pontos de coleta.

A análise da segunda rede de 16S (figura 10-B) apontou a existência de fragmentação alopátrica entre a população de Barcelos e indivíduos de uma possível linhagem existente em Manacapuru (clado II-1 da figura 10, B ou grupo 7 da árvore de MV da figura 7). Para confirmar, testes de AMOVA e  $\Phi_{ST}$  foram feitos. Um alto valor de  $\Phi_{ST}$  (0,8249) e grande variação interespecífica (82,49%) são um forte indicativo da estruturação destas localidades. Isso pode ser um indicativo de que estas populações estão se separando e que formaram, ou ainda formam, uma única linhagem que devido a falta de indivíduos fazendo conexão nas áreas intermediárias, podem estar sofrendo algum processo de especiação ou diferenciação. Já a análise de todo cladograma da figura 10, B, que incluiu também possíveis linhagens existente em Careiro, Autazes e Serra do Navio, do mesmo modo apresentou um possível

evento que levou à fragmentação alopátrica das populações. Os mesmos testes foram feitos, apesar no baixo número de indivíduos de algumas populações. A AMOVA mostrou que 93,5% da diferenciação é entre as localidades e apenas 6,5% é dentro. Os valores de  $\Phi_{ST}$  não foram significativos para Careiro e Autazes, não mostrando nenhum tipo de estruturação entre estas duas, que, provavelmente, correspondem a uma linhagem (conforme dados que também foram obtidos com as análises de MV, como indica a figura 7). O valor de  $\Phi_{ST}$  total foi alto, 0,93497, mostrando forte estruturação entre as populações. Para se ter uma idéia desta diferenciação, o  $\Phi_{ST}$  entre Manacapuru e Serra do Navio foi igual a 1.

Stuart *et al.* (2008) utilizaram o gene 16S e outros genes mitocondriais para identificar linhagens dentro das espécies de anuros *Odorrana livida* e *Rana chalconota*. Segundo os autores, estas linhagens representam espécies distintas, pois vivem em simpatria e mostram longa história evolutiva de isolamento, como pode ser inferido pela profunda divergência genética. Como essa divisão em possíveis espécies ainda será confusa devido à similaridade morfológica e ao fato de que ocorrem em simpatria, os autores sugerem que este estudo seja complementado com investigações sobre vocalização e sobre o micro habitat de girinos e adultos, já que estes foram coletados em sintopia, a poucos centímetros um do outro. Os espécimes de *R. margaritifera* do presente trabalho também foram, em sua maioria, coletados em sintopia e possuem grande polimorfismo em coloração e em padrão de manchas do dorso e ventre, e não foram feitos estudos sobre os microhabitat, sugerindo que, assim como no trabalho de Stuart e colaboradores (2006), outras investigações devem ser feitas para corroborar o status de espécies das linhagens encontradas, além de ajudar na identificação das mesmas após uma possível descrição.

Fouquet e colaboradores (2007b) utilizaram 60 seqüências de 16S do DNA mitocondrial para realizar uma estimativa mínima do número de espécies de sapos ainda não descritas da Amazônia e das Guianas. Utilizando análises filogenéticas, isolamento por distância e valores de distância molecular, verificou-se uma variação de 0-3% dentro das populações das Guianas e valores de distância variando de 3-7% nas comparações entre Guianas e populações da América Sul. Os autores argumentam o uso de 3% de divergência para identificar candidatos a espécies de anuros neotropicais e rejeitam o valor de 6% que havia sido proposto previamente por Vences *et al.* (2005). Segundo os autores deste estudo de 2007, valores altos (como 6%) levam a riscos de encobrir potenciais espécies e subestimam a biodiversidade da anurofauna. Neste trabalho de Fouquet *et al.* (2007b) foi possível identificar de 170 a 460 taxa candidatos a espécie somente na amostragem de 60 espécies desta região. Já

no presente estudo, se considerarmos o valor de divergência proposto de 3%, teremos, pelo menos, quatro linhagens indicando potenciais espécies.

Uma análise filogenética do gene mitocondrial 16S, juntamente com estudos de morfologia externa e canto, foi feita por Padial e De la Riva (2009) para um estudo de taxonomia integrativa de anfíbios do gênero *Pristimantis*. *P. peruvianus*, do sul do Peru e do norte da Bolívia, não é a mesma espécie encontrada na terra firme da Amazônia, indicando a existência de linhagens crípticas, sendo descritas no trabalho como novas espécies. A descrição através do uso do gene 16S e ferramentas morfológicas e ecológicas (acústicas) mostraram que a taxonomia integrativa pode levar ao descobrimento de muitas espécies, solucionando alguns problemas taxonômicos antigos. Este estudo mostrou como diferentes evidências podem ser ferramentas poderosas para resolver problemas taxonômicos e descobrir linhagens crípticas dentro de grupos complexos de sapos. Os valores de divergência do estudo de Padial e De La Riva (2009) foram muito parecidos com o do presente trabalho. Neste sentido, o presente estudo colabora gerando informações sobre a diversidade genética em determinados locais, que pode ser evidenciada pela presença de diferentes linhagens ocorrendo em simpatria. Isto pode ser um indicativo da existência de outras espécies crípticas dentro do complexo *margaritifer*, pois estas já foram relatadas por Fouquet e colaboradores (2007a) na Guiana Francesa.

O gene mitocondrial 16S não se mostra eficaz apenas em estudos com anuros. Um exemplo é o trabalho de Sturmbauer *et al.* (1999) que estudaram a filogenia do oligoqueto bioindicador de poluição ambiental *Tubifex tubifex*. Cinco grandes clados foram identificados e a divergência variou de 5,9%-13%. Os indivíduos de diferentes linhagens variaram também na resistência ao cádmio, sugerindo que a evolução destes animais parece ter sido predominantemente por seleção natural atuando sobre os caracteres fisiológicos, do que nos caracteres morfológicos. *T. tubifex* não foi um táxon homogêneo, possivelmente consistindo de, pelo menos, duas diferentes linhagens genéticas que podem representar possíveis espécies, algumas com grandes distâncias evolutivas. Se o status de espécie for válido, não é possível distinguir as diferentes espécies por caracteres morfológicos externos. Este pensamento pode ser estendido para este trabalho com o complexo *margaritifer*, já que a seleção natural não parece atuar expressivamente nos caracteres morfológicos (pois o isolamento é pré-zigótico, feito pelo canto de chamada para acasalamento), as linhagens não podem ser distinguidas pela morfologia externa e as distâncias evolutivas no presente estudo com o grupo de sapos foram significantes (variando de 1,87%-3,62 % entre as possíveis linhagens de *R. margaritifer*).

## 6.2 - 12S

Na árvore filogenética de máxima verossimilhança para o gene 12S (figura 10), o clado 1 foi formado por alguns indivíduos de Manacapuru e dois espécimes da espécie já descrita do complexo *margaritifer*, *Bufo magnussoni*, que, segundo a distribuição proposta por Lima *et al.* (2007), se localiza no município de Belterra e na Floresta Nacional do Tapajós, ambos no Pará. O valor de suporte de *bootstrap* foi de 74,5% e a distância genética média em relação aos demais grupos foi de 4,06%.

O clado 3 foi formado somente por dois indivíduos de *B. magnussoni*, com distância genética em relação aos outros clados de 3,79% e alto valor de suporte de *bootstrap*. Este valor de divergência foi o mais baixo encontrado nesta análise com o gene 12S e o fato de que é formado por apenas dois espécimes, não incluindo outras amostras desta espécie, que ou ficaram agrupadas em outro clado ou sozinha na árvore, pode ser devido a algum tipo de erro de seqüenciamento ou na edição das seqüências.

O clado 4 foi composto somente por dois indivíduos do Careiro, com altos valores de *bootstrap* (97,3%) e de divergência (4,34%) . Assim como na análise anterior com o gene 16S, os indivíduos do clado 4 não se agruparam junto com os espécimes 1, 2, 3 e 4 da mesma localidade (que se encontram dentro do clado 9), dando indícios que no Careiro ocorrem, pelo menos, duas possíveis linhagens simpátricas distintas.

O grupo 7 foi composto por alguns indivíduos da Serra do Navio e pela linhagem descrita por Fouquet e colaboradores (2007a) como *R. margaritifer* E. O valor de suporte de *bootstrap* para o grupo foi baixo (68,4%), assim como a divergência média em relação aos demais clados (3,91%), entretanto, este padrão é bem explicado geograficamente devido à proximidade do local de coleta com a Guiana Francesa.

O clado 8 é composto por dois indivíduos de Autazes e pela inconsistência da topologia filogenética desta análise de máxima verossimilhança com 12S talvez os outros espécimes desta localidade possam ser agrupados juntos, formando um único clado. O valor de divergência do grupo em relação aos demais clados foi de 4,58%, suportado por um valor de *bootstrap* de 89,5%.

O clado 9 formado por alguns indivíduos de Autazes, alguns do Careiro, alguns da Serra do Navio e as linhagens da Guiana Francesa *R. margaritifer* A e B. Todas estas localidades já tiveram amostras em outros grupos, o que indica que estes quatro pontos amostrais possam ter linhagens diferentes ocorrendo em simpatria. O suporte de *bootstrap* deste grupo foi de 79,2% e a distância média em relação aos outros grupos foi de 5,3%. A

possível linhagem representada por este clado é de ampla distribuição amazônica, se estendendo, possivelmente, da Amazônia central até o Escudo das Guiana.

O grupo monofilético representado pelo clado 12 teve robustez média de 86% de suporte de *bootstrap* e englobou todos os indivíduos de Barcelos e alguns de Manacapuru, com valor de distância genética média em relação aos outros grupos de 4,38%. Este grupo pode representar uma linhagem que ocorre na margem direita do rio Negro. Além disto, indivíduos de Manacapuru estão presentes também no clado 1, como discutido anteriormente. Isso indica que nesta localidade pode haver duas possíveis linhagens vivendo em simpatria.

Na análise haplotípica de máxima parcimônia, a maior rede de haplótipos (figura 11, A) foi formada por 11 grupos. O maior e mais abrangente clado foi o III-1, composto por alguns indivíduos de Careiro e todos de Manaquiri. Entretanto, dentro deste clado III-1, neste terceiro nível de hierarquização, há um indivíduo num único haplótipo (12053, na rede haplotípica), o I-1, que é o mesmo do grupo 1 na árvore filogenética e corresponde a um indivíduo da espécie já descrita *B. magnussoni*.

Existem mais cinco grupos nesta figura 11, A do terceiro nível hierárquico. O grupo III-2 é composto por todos os indivíduos de Vila Gomes e um único indivíduo da Serra do Navio. Alguns destes espécimes do Amazonas formam o clado 5 nas análises de MV, sendo que nesta árvore o indivíduo 5 do Amapá (ou 13193 na rede de haplótipos) se encontra dentro do clado 1.

Todos os outros indivíduos do clado 7 da árvore de MV, com exceção do citado acima, estão representados na rede de haplótipos pelo grupo III-3 que é composto por Serra do Navio+*R. margaritifera* E.

O grupo III-4 é composto por todos os indivíduos de Borba e da Reserva Ducke, sem correspondência com algum clado da árvore filogenética mostrada anteriormente. Este grupo III-4 está conectado por dois passos mutacionais ao grupo I-2, que é formado apenas pelo indivíduo 2 (na rede representando por 13109) de São Gabriel da Cachoeira. O outro indivíduo desta localidade, o espécime 3, não teve seu haplótipo conectado a nenhuma rede (e corresponde a 13110, na figura 12, H).

Os haplótipos que compõem o grupo III-5 são todos da Cachoeira do Jirau e correspondem ao grupo 2 da análise de MV. Este grupo está ligado por dois passos mutacionais ao clado II-3, que é composto pelos mesmos indivíduos do clado 1 da árvore filogenética.

Esta rede maior formada na análise do gene 12S é ainda composta por dois grupos de segundo nível hierárquico. O clado II-1 é formado pelos indivíduos 12 e 13 de Careiro e se

encontram dentro do grupo 4 proposto na árvore de MV. Já o clado II-2 não corresponde a nenhum clado definido na árvore de MV, somente aos indivíduos *B. castaneoticus* 1 e 2, que estão a oito e nove passos mutacionais, respectivamente, do indivíduo 7.

A rede de haplótipos apresentada na figura 12, B é composta por um grupo (III-6), sendo formado pela linhagem *R. margaritifera* A e alguns indivíduos da Serra do Navio. Este grupo está conectado por dois passos mutacionais com o clado I-4, composto por Autazes + Careiro + *R. margaritifera* B, sendo, estes dois juntos análogos ao grupo 9 da árvore filogenética, e separados por quatro passos mutacionais do grupo I-3, composto pela linhagem C da Guiana Francesa e idêntico ao grupo 10 da análise de MV.

A rede composta por dois haplótipos da figura 12, E é formada por dois indivíduos de Autazes, correspondendo ao clado 8 da análise de MV. Já a pequena rede da figura 12, F também tem dois indivíduos de haplótipos únicos e corresponde ao clado 13 da árvore de verossimilhança.

A figura 12, G corresponde ao clado 12 e é formada por todos os indivíduos de Barcelos e alguns de Manacapuru.

A figura 12, H corresponde aos haplótipos que não se ligaram a nenhuma rede. São os indivíduos 12916 e 12921 correspondentes aos espécimes 3 e 9 de Autazes, 12073 e 122334 correspondentes ao grupo 3 da espécie *B. magnussoni*, um espécime de São Gabriel (13110 ou indivíduo 3), um da Reserva Ducke (13131 ou indivíduo 4) e o último do Jirau (13248 ou indivíduo 8).

As duas análises, tanto na árvore filogenética sob o critério da máxima verossimilhança quanto na rede haplotípica sob o critério de máxima parcimônia, mostram uma corroboração entre os dados do gene 12S, assim como aconteceu para o gene de 16S. Esta concordância é mais um indicativo de que cada grupo definido com este gene mitocondrial possa realmente significar uma unidade evolutiva distinta dentro do complexo *margaritifera*.

Para o gene 12S, as análises de NCPA tiveram dois cladogramas estudados. O maior gerou três possíveis inferências. No clado de segundo nível hierárquico, foi inferido para alguns indivíduos de Careiro, Manaquiri, Serra do Navio, um espécime de *B. magnussoni* e todos os indivíduos de Jirau um evento de expansão contígua, que não pode ser testado com um teste de Fu ou D de Tajima, pois o número amostral para as análises foi muito baixo (1 indivíduo para Serra do Navio e *B. magnussoni*, 2 para Careiro, 4 espécimes para Manaquiri e 5 para Jirau). Dois cladogramas hierárquicos de terceiro nível tiveram inferências feitas nesta análise. O primeiro contou com alguns indivíduos de Careiro e de Manaquiri, para os quais

foi inferida, também, um evento de expansão contígua. Testes de  $D$  de Tajima e  $F_s$  de  $F_u$  não foram significativos para a localidade de Careiro, não corroborando com a hipótese de expansão proposta pela análise de NCPA. Já o teste de  $F_s$  de  $F_u$ , que é mais sensível ao efeito de seleção que o teste  $D$  de Tajima, baseia-se na probabilidade de observar determinado número de alelos em uma amostra de determinado tamanho, condicionado ao número médio observado das diferenças par-a-par (Fu, 1997), foi significativo para Manaquiri, mostrando que aquela população está em expansão. Como na rede haplotípica, um haplótipo desta localidade é o mais central, isso pode ser um indício de que este possa ser um centro de origem de uma possível espécie composta por estas duas regiões (como informa a figura da árvore de MV para o gene 12S) ou um centro de origem, conforme teoria proposta por Hershkovitz (1977) e Reig (1984) a partir de onde houve a dispersão destes sapos.

Para o segundo clado de nível III, foi inferido algum tipo de restrição do fluxo gênico com isolamento por distância. Este evento ocorreu com toda população do Jirau, a espécie *B. magnussoni* e possíveis linhagens existentes em Manaquiri, Careiro, Serra do Navio e Manacapuru. Teste de AMOVA mostrou que há uma moderada estruturação, sendo 71,29% das divergências devido às diferenças entre as localidades e 28,71% dentre elas. O  $\Phi_{ST}$  foi de 0,71289. É compreensível entender que haja um isolamento entre as populações do Pará, Amapá e Amazonas devido às grandes distâncias geográficas entre elas.

O segundo cladograma analisado para 12S foi o da figura 12, correspondente ao dos grupos B, C e D. Um possível evento de fragmentação alopátrica pode ter separado estas populações/linhagens. Entretanto, não foi possível testar estatisticamente esta hipótese e corroborar estes resultados, já que o número de indivíduos das localidades foi muito baixo (4 indivíduos para Autazes e Careiro e 3 para Serra do Navio). Como as localidades do Amazonas estão muito distantes geograficamente da Serra do Navio, o resultado obtido pode ser um efeito da falta de amostragem entre os pontos de coleta. Entretanto, pode ter ocorrido realmente uma fragmentação que reteve esta linhagem dentro do refúgio da Guiana, proposto por Haffer (1969).

Dawood *et al.* (2002) utilizaram o gene mitocondrial 12S para propor a filogenia de sete espécies conhecidas e três ainda não descritas do gênero *Tomopterna* (Anura: Ranidae). Como estes anuros são crípticos, difíceis de distinguir utilizando caracteres morfológicos e amplamente distribuídos (três características comuns às espécies já conhecidas e às ainda não descritas de *Rhinella* gr. *margaritifera*) na África Subsaariana, ferramentas moleculares se mostraram úteis para gerar hipóteses sobre os limites das espécies e suas relações filogenéticas. As divergências entre as espécies de *Tomopterna* variaram de 1,6% a 7,6%,

sendo que no presente trabalho nenhuma divergência entre as possíveis linhagens foi menor que 2,43% com o gene 12S, indicando que para os anuros este pode ser um bom valor para indicar possíveis espécies, quando comparado com este estudo de sapos africanos, em que todas as espécies conhecidas formaram clados monofiléticos. *Tomopterna* também foi monofilético quando comparado com grupos externos de outros gêneros, assim como *R. margaritifer* foi monofilético quando comparado a *B. marinus*.

O gene 12S foi utilizado por Olsson e colaboradores (2005), juntamente com os genes citocromo b e o gene nuclear mioglobina íntron II, para estimar a filogenia de dois gêneros (*Phylloscopus* e *Seicercus*) de aves. As espécies inclusas nestes gêneros são difíceis de ser distinguidas morfológicamente, como ocorre com as espécies já descritas do complexo *margaritifer*. Nas análises, três clados bem suportados foram encontrados para os dois gêneros, com divergências de 6,2%-8,8%: o primeiro abrangendo do Himalaia até o sudeste de Ásia, o segundo compreendendo a região central da China e o terceiro clado agrupando as espécies do sudeste chinês. Alguns caracteres moleculares foram condizentes com características morfológicas/ecológicas, entretanto estas não podem ser usadas como diagnóstico para alguns grupos, pois as divergências morfológicas variam consideravelmente dentro dos mesmos, o que também ocorre em *R. margaritifer*. Como outros gêneros já haviam sido sugeridos para estas taxa, os autores enfatizam a importância de uma amostragem mais densa dessas aves para que sejam feitos estudos filogenéticos intra-gêneros que possam corroborar possíveis mudanças taxonômicas. Também sugerimos uma amostragem mais densa, principalmente ao longo do rio Amazonas, ponto deficiente em coletas.

Aguiar Jr. *et al.* (2007) utilizaram o gene 12S combinado com outros genes para verificar as relações filogenéticas dentro e entre os gêneros *Pseudis* e *Lysapsus*. Estas análises resultaram em três clados com valor suporte de 100% de bootstrap. O primeiro clado foi formado por todas as espécies analisadas do gênero *Lysapsus*. O clado dois foi formado por pelas subespécies de *P. paradoxa* e pelas espécies *P. fusca*, *P. tocantins* e *P. bolbodactyla*. Já o terceiro clado foi composto pelas espécies do sul do Brasil, *P. cardosoi* e *P. minuta*. Além disto, foi possível verificar que *Pseudis* não é monofilético em relação a *Lysapsus*. Estas análises corroboraram com estudos utilizando caracteres morfológicos, cariotípicos e de seqüências de DNA feitos anteriormente, mostrando que este marcador, principalmente quando associado a outros marcadores, como é o caso do presente trabalho, é muito útil no estabelecimento das relações filogenéticas entre as espécies

### 6.3 - Mitochondriais

Nas hipóteses filogenéticas obtidas na análise conjunta dos genes mitocondriais (figura 13), os espécimes oriundos de Rondônia foram agrupados em dois clados distintos e bem suportados: um clado mais basal, composto por dois indivíduos de Morrinho Esquerdo (grupo 1) e o outro incluindo as amostras da Cachoeira do Jirau (grupo 11). O primeiro apresentou suporte de *bootstrap* de 100% enquanto o segundo de 99,47%. Esta separação em dois grupos de indivíduos de uma mesma região macro-geográfica pode ser um indicio da existência de duas possíveis linhagens distintas ocorrendo em simpatria.

Os espécimes provenientes da Serra no Navio, Amapá, também se agruparam em dois clados distintos. O primeiro grupo foi formado apenas por indivíduos desta localidade, com suporte de *bootstrap* de 93,7% (grupo 8). O segundo grupo incluiu, além de três espécimes desta localidade, amostras de Autazes e do Careiro, ambos Amazonas, num valor de suporte de *bootstrap* de 100% (grupo 2). A distância genética entre estes dois clados foi de 4,1%. Essa grande distância genética ocorrendo entre indivíduos simpátricos é um indicativo da existência de duas possíveis linhagens evolutivas diferentes e independentes. Apesar da grande distância geográfica entre Careiro/Autazes e a Serra do Navio, o agrupamento de duas regiões tão distantes poderia indicar a existência de uma linhagem mais amplamente distribuída ao longo do rio Amazonas.

Indivíduos de Autazes também se agruparam em um clado exclusivo para este localidade (grupo 4; com valor suporte de *bootstrap* de 86,5%), distinguindo-se do outro grupo com representantes desta localidade (grupo 2) em 3,7%, num valor de distância genética alto, indicando, também, a possível existência de duas linhagens nesta localidade. Espécimes do Careiro se agruparam tanto neste grupo 2 quanto no grupo 9, junto com todas as amostras de Manaquiri, Amazonas, formando o maior grupo tanto em topologia quanto em número de espécies. A diferença genética entre estes dois grupos foi de 3,9%, novamente sugerindo a existência de grupos simpátricos diferentes na região do Careiro.

Os resultados desta hipótese filogenética apontaram também a existência de um único grupo (grupo 7) envolvendo três diferentes regiões macro-geográficas: alto rio Negro, alto rio Madeira e Manaus. Este grupo incluiu todos os espécimes de Borba, Reserva Ducke e São Gabriel da Cachoeira, todos Amazonas, num valor de suporte de 82,4%, com distâncias genética média deste grupo em relação aos demais de 2,96%. Este é um forte indicio da existência de outra linhagem mais amplamente distribuída pela Amazônia central, que provavelmente co-ocorre com outras linhagens. Isto pode ser suposto porque Barcelos, Amazonas, está na região macro-geográfica do alto rio Negro e entre a Reserva Ducke e São

Gabriel, mas foi agrupado em um clado distinto, juntamente com sete indivíduos de Manacapuru, Amazonas (clado 3). Este grupo formado por Barcelos e Manacapuru tem um valor alto de suporte, com 97,4% de *bootstrap*, e 3,04% de distância genética média em relação aos demais grupos.

Espécimes de Manacapuru formaram, ainda, dois grupos distintos. O primeiro (grupo 12) foi composto por cinco indivíduos e com valor de suporte de 99% e 2,23% de distância genética em relação aos outros grupos. O segundo clado (grupo 5) foi formado por apenas um indivíduo e o valor de suporte de *bootstrap* foi muito baixo (54,1%). Comparando-se as distâncias genéticas médias entre os grupos que são compostos por indivíduos de Manacapuru tem-se: 1,6% de distância entre os cladros 3 e 5, 2,8% entre os grupos 3 e 12 e apenas 1,3% entre os cladros 5 e 12, sendo que estes baixos valores associados ao clado 5 podem indicar algum tipo de erro de metodologia para o estabelecimento do grupo.

A espécie do grupo *margaritifera* já descrita, *Bufo castaneoticus*, formou um grupo em que seu único espécime foi o representante (grupo 6). Apesar do baixo valor de *bootstrap* (72%), a distância genética média deste grupo em relação aos demais é de 2,33%, mostrando que este valor é o suficiente para descrever espécies, já que corresponde a uma espécie já descrita do complexo *margaritifera*. Além disto, a região macro-geográfica de *B. castaneoticus*, Treviso, no Pará, não inclui nenhum outro indivíduo nestas análises, o que apóia a idéia de que cada grupo atribuído a esta hipótese filogenética possa representar uma linhagem evolutiva distinta, já que todos possuem distância genética maior do que a associada ao grupo composto pela espécie *B. castaneoticus*, que é endêmica da região do Tapajós, Pará, e ocorre em simpatria com outra espécie descrita do grupo, *B. magnussoni*.

Já na análise baseada no método da máxima parcimônia (MP), a maior rede de haplótipos (figura 14 A) foi formada por sete grupos. O maior em número de indivíduos e haplótipos foi o clado IV-1, composto por alguns indivíduos de Careiro e todos de Manaquiri, e este é idêntico ao grupo formado na árvore de MV pelo grupo 9.

Um grande grupo, no quinto nível hierárquico, abrangeu três localidades diferentes. O clado V-1 é composto por todos os indivíduos de Borba, da Reserva Ducke e o único indivíduo de São Gabriel da Cachoeira que teve seu haplótipo incluso dentro de uma rede. Este grupo corresponde ao mesmo obtido nas análises de MV, o grupo 7.

Dentro desta rede haplotípica também foi formado outro grupo de nível hierárquico quatro, o clado IV-2, formado por todos os indivíduos de Cachoeira do Jirau e correspondente ao grupo 11 da árvore filogenética para a combinação dos dois genes mitocondriais. Dois grupos no terceiro nível hierárquico foram formados: o primeiro, o clado III-1 abrangeu todos

os indivíduos de Vila Gomes e corresponde ao clado 10 da árvore de MV. O segundo clado, III-2, é formado pelos mesmos indivíduos da Serra do Navio presente no grupo 8 da análise filogenética.

Ainda dentro da rede haplotípica maior da figura 14, A está um pequeno clado, I-1, formado por um único indivíduo e haplótipo de *B. castaneoticus*, indivíduo 2, correspondente ao grupo 6 da árvore de verossimilhança.

A figura 15, B corresponde a uma rede formada por todos os indivíduos de Barcelos e alguns de Manacapuru, análoga ao clado 3 da análise de MV.

A rede com vários passos mutacionais entre os haplótipos mostrada na figura 16, C é similar ao clado 4 da árvore filogenética, exceto pelo fato que o indivíduo de Autazes que não teve seu haplótipo ligado a nenhuma rede, conforme já comentado anteriormente, ficou de fora.

A rede da figura 15, D é formada pelos indivíduos de Morrinho Esquerdo e corresponde ao clado 1, o mais basal, da árvore de MV. Já a figura 15, E, também no segundo nível hierárquico, corresponde ao clado 12 formado somente por indivíduos de Manacapuru.

A última rede haplotípica, figura 15, F, foi composta por alguns indivíduos das localidades de Autazes, Careiro e da Serra do Navio. Estas três áreas amostrais tiveram seus espécimes alocados em, pelo menos, dois cladogramas diferentes da rede haplotípica. Este grupo corresponde ao clado 2 da árvore filogenética construída utilizando o critério da máxima verossimilhança.

Estas duas análises sob diferentes critérios (máxima verossimilhança para a árvore filogenética e máxima parcimônia para a rede haplotípica) geraram resultados bastante similares para os dados mitocondriais concatenados, o que também aconteceu quando cada um dos genes foi analisado separadamente. Essa corroboração é mais um indício de que cada um dos grupos aqui definidos possa representar linhagens distintas ou unidades evolutivas significativas (ESU) dentro do grupo de espécies *Rhinella margaritifera*. Estas ESUs são definidas por Moritz (1994) como grupos reciprocamente monofiléticos para o mtDNA, que, por vezes, pode ser considerado um conceito de espécie (conforme utilizado por Cracraft, 1983; Frost e Hillis, 1990).

A análise de NCPA conjunta dos dois genes mitocondriais resultou em quatro possíveis inferências para o maior cladograma, apresentado na figura 15, A. A primeira inferência filogeográfica num clado de nível 5 composto pelos indivíduos de Manaquiri, Careiro, Jirau e a espécie *B. castaneoticus* (correspondente aos cladogramas I-1, III-2 e VI-2 da rede MV da figura 14) mostrou a existência de um fluxo gênico restrito e/ou dispersão com algum

tipo de dispersão a longas distâncias. Entretanto, o próprio software de análise propõe que há poucos clados sendo analisados, o que gera baixa resolução genética para discriminar entre expansão/colonização e dispersão restrita/fluxo gênico restrito. Levando-se em consideração as grandes distâncias geográficas, é compreensível que, se houver fluxo gênico entre as populações de Rondônia, médio Amazonas e Pará este seja restrito. Este agrupamento poderia, então, ser explicado por algum tipo de retenção de polimorfismo ancestral, já que, pelo menos para as amostras do Amazonas, as características ecológicas não são semelhantes com as da espécie já descrita, que são caracterizadas por viverem em cascas de castanhas (observação pessoal).

O segundo clado, de quinto nível hierárquico, foi formado pelos indivíduos de Borba, São Gabriel e Reserva Ducke, (correspondente ao clado 7 da árvore de MV e ao clado V-1 da rede haplotípica). As análises de NCA sugerem que estas populações estão passando por algum tipo de restrição ao fluxo gênico. É interessante notar que entre Borba e Reserva Ducke, que estão a menos de 150 Km de distância, existe o rio Negro, que pode atuar como uma barreira ao fluxo gênico. Como o N dessas populações é muito baixo (inferior a 5 indivíduos por população), não é possível fazer um teste para corroborar estatisticamente esta inferência.

O último clado no nível hierárquico 5 foi formado por uma possível linhagem da Serra do Navio e alguns indivíduos de Manaquiri, sugerindo que estes tenham sofrido fragmentação alopátrica. Apesar de apenas três indivíduos da Serra do Navio formarem este clado, foi feito um teste de AMOVA e  $F_{st}$  que mostrou estruturação entre as populações das duas localidades, com a variação inter-populacional (70,85%) maior que a intra-populacional (29,15%) e  $\Phi_{ST} = 0,70852$ .

O cladograma total da análise dos genes mitocondriais concatenados apresentou um processo de expansão contínua. Entretanto, como das 9 localidades que esta rede abrange apenas 3 têm cinco ou mais indivíduos, testes estatísticos para verificar equilíbrio mutação-deriva ( $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima) não teriam suporte, pois baixos números amostrais podem apresentar valores que ultrapassam o desvio padrão.

Yanek *et al.* (2006) analisaram a combinação dos genes mitocondriais 12S e 16S para avaliar se um dos padrões mais comuns que explicam a fauna das Antilhas também serve como modelo para *Leptodactylus validus*. *L. validus* formou com grupo monofilético com 100% de bootstrap com *L. pallidirostris*, que ocorre no Brasil e nas Guianas, sendo as distâncias genéticas par a par menores que 1%. Valores abaixo de 1% também foram utilizados no presente estudo para agrupar indivíduos em um único grupo. Como os caracteres

morfológicos são insuficientes para resolver os limites de espécies dentro deste complexo (o complexo *L. podicipinus-wagneri*), o status destas duas espécies era muito discordante, o que também ocorre dentro do complexo *margaritifer*. Com esta análise, os autores sugerem que *L. pallidirostris* é um sinônimo de *L. validus*, representando um único táxon. Este estudo mostra que assim como os genes mitocondriais conseguem resolver divergências genéticas profundas, entre gêneros e famílias, e entre taxa mais recentemente divergidos, estes possuem resolução filogenética adequada também para verificar apenas divergências intra-específicas, se mostrando úteis para a validação e identificação molecular de espécies, que é um dos objetivos do presente trabalho.

Ron *et al.* (2006) propuseram a filogenia dos anuros tropicais do gênero *Engystomops* (pertencentes ao grupo de espécies *Physalaemus pustulosus*) utilizando os dois genes codificantes de rRNA do DNA mitocondrial. A filogenia encontrada foi congruente com revisões sistemáticas anteriores baseadas em outros caracteres moleculares e também com características morfológicas. A filogenia incluiu todos os taxa conhecidos e duas espécies ainda não descritas. O gênero foi monofilético e acredita-se que seja constituído por 10 ou 11 espécies. *Engystomops* é filogeneticamente muito relacionado com *Physalaemus*, o que explica porque até recentemente estes dois foram considerados um único gênero (*Physalaemus*), com 49 espécies. Os autores discutem, ainda, a importância de se propor filogenias moleculares dos anfíbios neotropicais, pois estes ainda são subentendidos, e estas análises podem levar ao reconhecimento de um grande número de espécies, o que esperamos que aconteça à medida que *R. margaritifer* seja mais estudado..

Vallinoto e colaboradores (2010) conduziram uma análise filogenética do complexo de espécies *Rhinella marina* utilizando os genes mitocondriais 12S, 16S, além do citocromo b. Oito das dez espécies já reconhecidas do complexo foram analisadas e agrupadas em dois grandes clados, o primeiro formado por amostras do oeste andino (América Central e Equador) e o outro formado pelas amostras da bacia Amazônica e das áreas ao leste dos Andes. *R. marina* não foi um clado monofilético, suportando a seguinte tricotomia: o grupo correspondente ao primeiro clado informado acima, o segundo grupo com todos os membros do leste da bacia Amazônica e o terceiro grupo composto pela espécie *R. crucifer* do leste do Brasil (estes dois últimos formando o segundo maior clado, também já descrito anteriormente). Altos níveis de divergência (5,8-6,4%) foram encontrados quando comparados os clados do leste da Amazônia e do Peru com o clado da América Central e Equador. Altos valores de distância genética também foram encontrados na comparação entre o grande primeiro clado (4,5% de divergência entre Equador e América Central). Apesar das

evidências indicarem a existência de duas ou três espécies crípticas dentro do grupo *R. marina*, os autores afirmam a necessidade de evidências através estudos morfológicos e o uso de marcadores nucleares para definir o status taxonômico dentro das linhagens encontradas. Os valores de divergência encontrados para aceitar um possível status de espécie foram maiores do que os obtidos para *R. margaritifera*. Entretanto, a área amostral do presente trabalho foi bem menos ampla do que a do trabalho de Vallinoto *et al.* (2010), o que pode ser responsável pelos valores de divergências mais discretos.

Todos os trabalhos aqui citados mostram a eficácia dos genes mitocondriais para o estabelecimento das relações filogenéticas, principalmente entre grupos complexos de espécies. Os anfíbios são geralmente caracterizados por alta diferenciação genética e altas divergências par a par intra-específicas para os genes 12S e 16S do DNA mitocondrial (Vences *et al.*, 2005 a,b). Entretanto, segundo Meyer *et al.* (2006), o uso exclusivo de dados gerados por gene mitocondriais podem levar a interpretações errôneas devido a ocorrência de introgressão e separação incompleta de linhagens (incomplete ou divergential lineage sorting). Por isso é tão importante combinar marcadores mitocondriais com o uso de genes nucleares, como foi feito no presente trabalho

#### **6.4 - Tirosinase**

Na árvore filogenética do gene tirosinase (figura 16), os espécimes não se agruparam em clados nítidos, sendo que este gene na análise de máxima verossimilhança não apresentou resolução filogenética.

A análise de  $F_{st}$  par a par para verificar diferenças significativas para corroborar a existência de ESUs na amostragem (tabela 8) mostrou que das 78 comparações obtidas, 47 foram significativas, mostrando diferenças entre os clados irmãos. Estes resultados são úteis inclusive para esclarecer relações que não foram concordantes entre as análises dos genes mitocondriais. Um exemplo é que para a hipótese filogenética do gene 16S, Borba+São Gabriel da Cachoeira formam um clado independente da Reserva Ducke, o que não ocorre com a análise dos genes mitocôndrias concatenados, que forma um único grupo monofilético para as três localidades. Entretanto, a análise com o gene tirosinase mostrou diferenças significativas entre os dois clados, corroborando que estes formam duas ESUs independentes. Estes resultados também podem gerar subsídios para investigar a distribuição de uma espécie. Segundo a hipótese filogenética para o gene 12S, Manacapuru provavelmente abriga a espécie

*B. magnussoni*, resultado que pode ser confirmado pela falta de diferenças significativas na análise com tirosinase.

Estes resultados também mostraram diferenças significativas entre comparações de indivíduos de uma mesma localidade, como pode ser observado para Careiro e Manacapuru, o que enfatiza a existência de diferentes linhagens crípticas simpátricas.

A análise de NCA com o gene tirosinase sugeriu algumas hipóteses para explicar os possíveis eventos que levaram a grande diversidade dentro do complexo *margaritifera*. Três clados de terceiro nível hierárquico geraram hipóteses filogeográficas. O clado 3-1 foi formado por alguns indivíduos de Autazes, Manacapuru, Barcelos, Careiro, pelo único espécime de Mutum e Teotônio e por um indivíduo da espécie já descrita *B. magnussoni*, sugerindo que o fluxo gênico esteja restrito entre estes, com isolamento por distância. Obviamente, este isolamento pode ser explicado pela distância entre algumas localidades (como Treviso, no Pará, e Mutum e Teotônio, Rondônia, distantes aproximadamente 1800 Km) e a presença de diversas barreiras físicas entre estes, como rios, por exemplo. Para corroborar esta hipótese, deveria ter sido feita uma AMOVA, entretanto, apenas 2 localidades tem cinco indivíduos, sendo todas as outras com número amostral mais baixo que este valor, o que não dá suporte estatístico para esta análise. O clado 3-6 mostrou um processo de expansão de área contígua entre um indivíduo de Manaquiri, dois de Serra do Navio e dois espécimes de *Bufo castaneoticus*. Como o número amostral por localidade é baixo (menor que 5 indivíduos), um teste  $F_s$  de  $F_u$  ou  $D$  de Tajima também não teria suporte estatístico para confirmar esta hipótese, que pode ter sido gerada ao acaso, já que estas três localidades não são adjacentes. O último clado deste nível, o clado 3-8, foi formado por uma possível linhagem da Serra do Navio, um indivíduo de Barcelos, um de Autazes e dois de Manacapuru. Esta análise indicou fluxo gênico restrito ou dispersão com algum tipo de movimento a longas distâncias, mas como o número de indivíduos é baixo, também não foi possível aplicar um teste estatístico para corroborar o evento.

No quarto nível hierárquico, dois clados foram obtidos com algum tipo de resposta filogeográfica. O primeiro, clado 4-1, foi o maior e mostrou um evento de expansão entre alguns indivíduos de Manacapuru, Careiro, Manaquiri, Ducke, Vila Gomes, Borba, Autazes, Serra do Navio, Mutum, Jirau, quatro indivíduos de *B. castaneoticus* e um espécime sem identificação tido apenas como pertencente ao gênero *Rhinella*. Mesmo com o número de indivíduos baixo para algumas localidades, foram feitos testes de  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima para tentar confirmar esta expansão. O teste  $D$  de Tajima não foi significativo em nenhuma análise, enquanto o  $F_s$  de  $F_u$  foi significativo para Manaquiri, Careiro, Reserva Ducke, Serra do

Navio, *B. magnussoni* e *B. castaneoticus* a  $P=0,01$  e significativa para Borba a  $P=0,017$ . Isto significa que a hipótese de expansão é corroborada estatisticamente para estas localidades, ou que, como a região gênica examinada é intrônica e não há nenhum tipo de pressão nesta região que leve a vantagem seletiva entre os haplótipos, pode estar ocorrendo algum tipo de gargalo de garrafa. O segundo clado, 4-2, foi formado por alguns indivíduos de Autazes, Careiro, Manaquiri, Manacapuru, Barcelos, Serra do Navio e um espécime de Mutum e um de *B. magnussoni*. Foi inferida a possibilidade de o fluxo gênico estar restrito entre as localidades, assim como dispersão com dispersão a longas distâncias não estando as áreas intermediárias ocupadas e ainda fluxo gênico no passado seguido de extinção nas áreas intermediárias. Para verificar, foi feita uma AMOVA, sendo cada localidade tratada como uma população, que verificou a falta de estrutura populacional entre as localidades amostradas com  $\Phi_{ST}=0,25926$  e a variação intra-populacional (74,07%) maior que a inter-populacional (25,93%). Este resultado corrobora com a análise de máxima verossimilhança que mostrou que analisado sozinho, o gene tirosinase não possui sinal filogenético.

#### 6.5 – Rodopsina

Na árvore filogenética do gene rodopsina (figura 17), os espécimes não se agruparam em clados nítidos, sendo que este gene na análise de máxima verossimilhança não apresentou resolução filogenética.

A análise de  $F_{st}$  par a par para verificar diferenças significativas para corroborar a existência de ESUs na amostragem (tabela 9) mostrou que das 65 comparações obtidas, 17 foram significativas, mostrando diferenças entre os clados irmãos. Estes resultados podem mostrar diferenças significativas entre comparações de indivíduos de uma mesma localidade, como pode ser observado para Careiro e Manacapuru, o que enfatiza a existência de diferentes linhagens crípticas simpátricas.

Na análise baseada no método da máxima parcimônia (MP), a maior rede de haplótipos (figura 18) foi hierarquizada até o terceiro nível, onde três agrupamentos foram formados. O clado III -1 foi formado por alguns indivíduos de São Gabriel da Cachoeira, Autazes, Borba, Reserva Ducke, Manaquiri, Barcelos, Manacapuru, todos Amazonas, Morrinho Esquerdo, Cachoeira do Jirau, ambos Rondônia, e Serra do Navio, no Amapá. Este agrupamento, como já foi explicado anteriormente, não pode ser corroborado pelas análises de MV.

Outros dois clados de terceiro nível hierárquico foram obtidos nesta rede maior. O clado III-2 foi formado somente por indivíduos de Manacapuru, mas também não teve nenhuma correspondência com os clados que englobavam indivíduos desta localidade nas análises dos genes mitocondriais. O clado III-3 foi formado por dois indivíduos de Barcelos, um de Manaquiri e outro de Autazes, também sem nenhuma correlação com os clados obtidos nas análises anteriores.

Para o gene rodopsina foram encontradas três inferências filogeográficas nas análises de NCPA. O clado 3-1 foi formado por um indivíduo de Manacapuru e três de Manaquiri e Barcelos, mostrando um processo de fluxo gênico restrito ou dispersão a longas distâncias não estando as áreas intermediárias ocupadas ou ainda fluxo gênico no passado seguido de extinção nas áreas intermediárias. O clado 3-3 inferiu um processo de fragmentação alopátrica entre um indivíduo do Jirau e três de Manacapuru. Já o terceiro clado, de quarto nível hierárquico, é a junção dos dois clados apresentados anteriormente, mostrando um processo de expansão contígua. Apesar do baixo número amostral, apenas este último clado foi testado estatisticamente através de testes de D de Tajima e Fs de Fu. Estes mostraram no Fs de Fu para Manaquiri, Barcelos e Manacapuru, evidenciando a existência de algum tipo de evento de expansão nestas áreas. Jirau não foi significativo, provavelmente, porque neste clado incluía apenas os dois haplótipos de um mesmo indivíduo.

## 6.6 - Discussão geral

Duas hipóteses podem explicar esta falta de resolução na árvore filogenética e na rede de haplótipos para os dois genes nucleares analisados. A primeira suposição seria de que as possíveis linhagens dentro do complexo *margaritifera* são tão recentemente divergidas que as mutações ainda não foram fixadas no genoma nuclear. Entretanto, para anfíbios, as divergências genéticas são profundas (como pode ser visto nos trabalhos de Grant *et al.*, 2006, Elmer *et al.*, 2007; Lehtinen *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Vallinoto *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2010, dentre outros) o que provavelmente também ocorre dentro deste grupo de espécies, já que os valores de divergências para as análises de 12S, 16S e 12S+16S foram altos.

A outra hipótese é que estas análises filogenéticas não foram apropriadas para separar em grupos claros, pois estas variações podem ser intra-específicas. Entretanto, se utilizarmos o conceito filogenético muitas espécies já podem ser diferenciadas. Esta falta de resolução pode

ser, ainda, explicada devido à presença de muitos alelos ancestrais e a falta de um padrão de bifurcação que separasse os grupos.

Fouquet *et al.* (2007a) utilizaram para as análises filogenéticas de *R. margaritifer* da Guiana Francesa com genes nucleares apenas um indivíduo das linhagens previamente identificadas com os genes mitocondriais. Com isto, utilizando os grupos externos, os autores conseguiram estabelecer as posições filogenéticas dentro do complexo *margaritifer* e também em relação a outros anuros.

Faivovich *et al.* (2005), na sua revisão sobre a família Hylidae, utilizaram máxima parcimônia para a construção da árvore filogenética, o que permitiu a análise conjunta de dados nucleares e mitocondriais, sendo que assim há um balanço contra o excesso de mutações do mtDNA em relação à conservação do genoma nuclear. O mesmo pode ser dito para a árvore da vida dos anfíbios proposta por Frost e colaboradores em 2006.

Entretanto, como no presente trabalho as análises dos genes nucleares foram feitas separadamente entre si e também dos genes mitocondriais, podemos concluir que o estudo separado de seqüências nucleares não se mostrou útil para as reconstruções filogenéticas. Isto pode ser devido às diferentes taxas de substituição nucleotídica entre os genomas mitocondriais e nucleares, que tem suas taxas de mutação fortemente influenciadas pelo metabolismo, tempo de geração e história de vida (Rand, 1994). Acredita-se que as substituições no mtDNA ocorram de 5 a 16 vezes mais rapidamente que nos genes nucleares (Slade *et al.*, 1994; Moriyama e Powell, 1997; Johnson e Clayton, 2000; Sheldon *et al.*, 2000; Crawford, 2003). Entretanto, estes genes mostraram diferenças significativas entre as possíveis unidades evolutivas, como mostrado nas tabelas 7 e 8. Algumas destas diferenças foram concordantes entre os genes tirosinase e rodopsina e são um indício de divergências antigas entre os clados. Manacapuru e Manacapuru-Barcelos apresentam divergências profundas para os genes nucleares não somente entre si, mas também com Borba-São Gabriel, Careiro-Autazes (possivelmente representando *R. margaritifer* linhagem A) e Reserva Ducke (provavelmente correspondendo à espécie *R. proboscidea*); Vila Gomes tem divergências antigas com Reserva Ducke, Manacapuru e Jirau-Morrinho; Manaquiri-Careiro possui divergências antigas com a possível linhagem A e Manacapuru-Barcelos; e, por último, Teotônio-Morrinho mostra divergências profundas com a linhagem existente em Manaquiri-Barcelos.

Como não há, ainda, um status taxonômico definido entre os dados analisados e tudo está sendo tratado com pertencendo a uma única espécie, os dados e reais inferências biogeográficas podem ter sido mascarados e não corresponder aos ocorridos com uma

possível espécie deste complexo. Isto porque unidades taxonômicas diferentes têm histórias evolutivas distintas, o que pode explicar a imprecisão das análises filogeográficas, que foram pouco coincidentes. Para os genes mitocondriais ainda foi possível alguma resposta comparativa com as análises de máxima verossimilhança, o que ajudou para a constatação da ocorrência de diferentes linhagens, ou até mesmo espécies, dentro de *Rhinella* gr. *margaritifer*.

Quatro processos inferidos pela análise de NCPA mostraram concordância espacial. Tanto os genes de 16S quanto 12S indicaram que ocorreu algum evento de fragmentação alopátrica na região composta por Careiro, Autazes e Serra do Navio. Como estas localidades pertencem ao mesmo clado que as linhagens A e B da Guiana Francesa, estas provavelmente também foram afetadas pelo evento, que pode ser, então, uma explicação para o agrupamento de indivíduos de localidades tão distantes em um único clado. Além disto, a área intermediária deve ser amostrada para verificar se as populações estão realmente fragmentadas ou se isto é apenas devido à falta de amostragem nas áreas intermediárias. Para tanto, sugerimos futuras coletas ao longo da margem esquerda do rio Amazonas e mais amostras da região brasileira correspondente ao Escudo da Guianas. O segundo evento inferido e concordante para os genes 12S e mitocondriais concatenados foi uma expansão contígua em Manaquiri, Careiro, Treviso, Serra do Navio e Jirau. Também foi verificada uma expansão em Treviso, para os indivíduos de *B. castaneoticus*, e na Serra do Navio, para os indivíduos que se agrupam como *R. margaritifer* linhagem E. A expansão de um ancestral, como corroborado nas análises de NCPA com tirosinase e dados mitocondriais, com algum evento posterior que impediu contato entre as duas áreas pode ter levado à esta diferenciação. Por último, foi visto concordância espacial entre os dois genes nucleares para ou uma restrição ao fluxo gênico, ou para dispersão com algum contato a longas distâncias, mas sem populações nas áreas intermediárias ou, ainda, fluxo gênico passado seguido por extinção das populações intermediárias. Este evento ocorreu com a linhagem de Manacapuru e Barcelos, que tem baixo fluxo gênico ou retenção de polimorfismo ancestral com a região de Manaquiri.

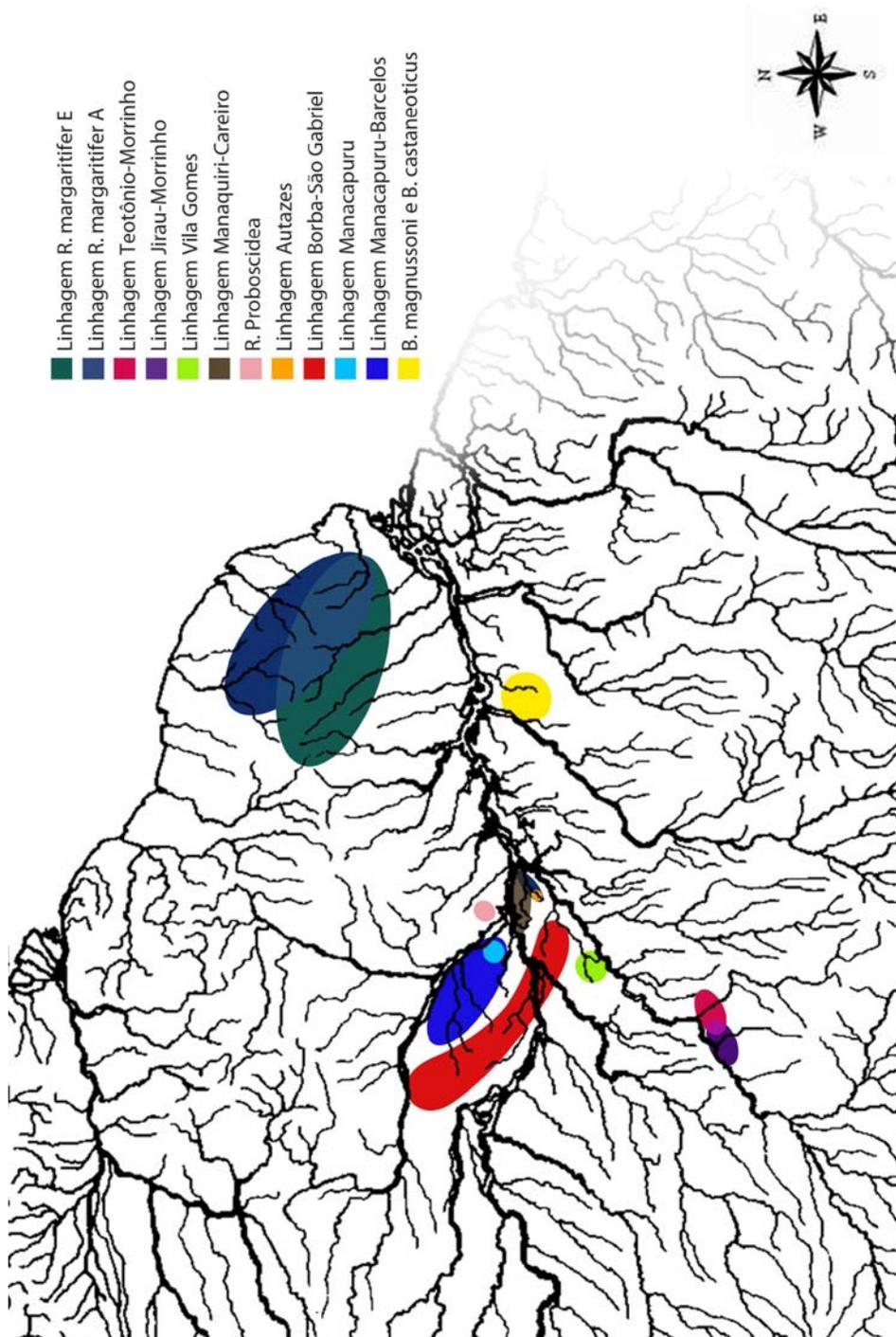
Visto isto, na região estudada e, ainda, utilizando dados da Guiana Francesa, foi possível chegar à conclusão que existem 13 possíveis linhagens dentro do grupo *Rhinella margaritifer* (conforme figura 21): a primeira linhagem correspondendo à espécie já descrita *B. magnussoni*; uma linhagem correspondente à espécie *B. castaneoticus*; uma linhagem com ampla ocorrência ou vivendo em áreas não contínuas, ocorrendo no Careiro, em Autazes, incluindo a linhagem da Guiana Francesa conhecida como *R. margaritifer* A que se estende até a região do Amapá, onde co-ocorre com outra linhagem que é a mesma proposta por

Fouquet *et al.* (2007a) e conhecida como *R. margaritifer* E; uma linhagem que ocorre na Reserva Ducke e corresponde à espécie já descrita *R. proboscidea*; uma linhagem que possivelmente tem ocorrência mais ampla, se estendendo, pelo menos, mas não necessariamente de maneira contínua, de Borba a São Gabriel da Cachoeira; uma linhagem ocorrendo na região de Autazes, que é simpátrica a uma linhagem que ocorre nesta localidade até Careiro; na região do Madeira é possível verificar duas linhagens também simpátricas, uma mais ampla, ocorrendo de Morrinho a Cachoeira do Jirau e uma de menor área, abrangendo Teotônio a Morrinho; uma linhagem ocorrendo ao longo de uma grande área do rio Negro, de Manacapuru a Barcelos e a última linhagem ocorrendo exclusivamente em Manacapuru.

Hass e colaboradores (1995) também sugerem que exista um grande número de populações simpátricas, isoladas reprodutivamente, que devem ser designadas como espécies. Os autores ainda acreditam, baseados apenas em observações morfológicas, que este complexo inclui um grande número de espécies, sendo a maioria de pequena distribuição, parcialmente sobreposta ou alopátrica, como pode ser comprovado com os resultados do presente trabalho.

Portanto, podemos levar em consideração a definição de ESU (Moritz, 1994), que define monofilia recíproca para o mtDNA e divergências significantes para *loci* nucleares. Esta pode ser usada como sinônimo de espécie, como já foi visto na literatura. Além disto, o autor sugere que o critério seja mais aplicável em espécies de baixa vagilidade, onde as populações locais são bastante diferenciadas, o que torna o conceito ainda mais forte no estabelecimento de possíveis espécies no presente estudo.

Entretanto, sabemos que uma definição meramente molecular não é aplicável na prática. Por isso sugerimos que estes dados atuem como base para indicar locais de alta diversidade, onde *R. margaritifer* deve ser melhor estudada.



**Figura 21: Mapa mostrando a distribuição das possíveis linhagens existentes de *R. margaritifer*. Cada cor corresponde a uma linhagem encontrada no presente trabalho. Mapa original de Marilyn J. Weitzman. Modificado por Tibério Gonzaga de Figueiredo.**

## 7 - CONCLUSÕES

Os sapos pertencentes ao complexo *Rhinella margaritifera* ainda causam grande confusão entre os herpetólogos e outros estudiosos pela complexidade para se entender o grupo. Sua história taxonômica é umas das mais complicadas dos anuros neotropicais e poucos esforços têm sido feitos para tentar entender este grupo de espécies. Assim sendo, grandes estudos envolvendo a anurofauna desta região acabam por organizar tudo dentro de um único complexo na tentativa de minimizar erros de classificação. A duas ou mais espécies erroneamente classificadas como uma única espécie é dada o nome de espécies crípticas (Bickford et al., 2006). Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo propor uma hipótese filogenética que tentasse estimar quantas possíveis espécies crípticas há dentro do grupo na região estudada.

Foram encontradas 11 linhagens e corroborada a distinção entre estas com duas espécies já descritas deste complexo, *Bufo magnussoni* e *B. castaneoticus*. Algumas destas linhagens foram simpátricas e mostraram altos valores de diferenciação genética (como apresentados nas árvores de máxima verossimilhança e na figura 20). Estas linhagens, assim como proposto por Hass e colaboradores (1995) são, em sua maioria, de pequena distribuição e parcialmente sobrepostas ou alopátricas. Na tentativa de obter novas evidências que definam mais fortemente o status de espécies destas linhagens, propomos que seja aumentada a área e número amostral e feitos outros estudos relacionados às características ecológicas, principalmente ao canto, já que o isolamento dentro deste complexo é pré-zigótico, feito pelo canto de anúncio para reprodução.

Como as linhagens não foram analisadas separadamente para as inferências filogeográficas, os dados não foram tão precisos para estas análises de máxima parcimônia. Entretanto, para os genes mitocondriais, foi possível corroborar estes dados com os obtidos filogeneticamente pelo método da máxima verossimilhança, dando mais indícios de que estas linhagens correspondam a possíveis espécies. Além disto, foi visto concordância espacial para um evento de fragmentação alopátrica que ocorreu entre Careiro, Autazes e Serra do Navio, um processo de expansão foi inferido ocorrendo em Manaquiri, Careiro, Treviso, Serra do Navio e Jirau. Também foi verificada uma expansão em Treviso, para os indivíduos de *B. castaneoticus*, e na Serra do Navio. Por último, foi visto concordância espacial para, ou uma restrição ao fluxo gênico, ou para dispersão com algum contato a longas distâncias, mas sem populações nas áreas intermediárias ou, ainda, fluxo gênico passado seguido por extinção das

populações intermediárias, ocorrendo com a linhagem de Manacapuru e Barcelos, que tem baixo fluxo gênico ou retenção de polimorfismo ancestral com a região de Manaquiri.

O complexo *Rhinella margaritifera* não parece mostrar um padrão morfológico diagnóstico e todas as linhagens distintas simpátricas foram coletadas em sintopia, isto é, vivendo uma ao lado da outra. Assim sendo, seqüências de DNA podem ser usadas da mesma maneira que outros dados para gerar hipóteses sobre o status e os limites de espécies. Por isso acreditamos que os grupos definidos nestas análises são unidades evolutivas significativas (ESU) e podem ser considerados possíveis espécies. Entretanto, acreditamos que o processo para a delimitação e descrição de uma espécie exige que se conheça sobre sua biologia, comportamento e outras características de vida.

Mas sabemos que as taxas da perda de diversidade são alarmantes. Muito da riqueza da região neotropical pode estar sendo perdida e por isso sugerimos esforços imediatos para se conhecer mais sobre este complexo de espécies crípticas. Com o colapso atual da biodiversidade, o entendimento e conhecimento da ocorrência de espécies é um fator mitigador da perda de diversidade.

## 8 – BIBLIOGRAFIA

Aguiar-Jr, O.; Bacci Jr, M.; Lima, A.P.; Rossa-Feres, D.C., Haddad, C.F.B.; Recco-Pimentel, S.M. 2007. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Cladistics*, 23: 455–463.

Alford, R.A.; Richards, S.J. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 133–165.

Ávila, R.W.; Pansonato, A.; Strüssmann, C. 2010. A new species of the *Rhinella margaritifera* group (Anura: Bufonidae) from Brazilian Pantanal. *Zootaxa*, 2339: 57-68.

Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C.; Stanton, L.H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceedings National Academy of Sciences*, 83: 4350-4354.

Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

Avise, J.C. 2004 *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Austin, J.D.; Loughheed, S.C.; Tanner, K.; Chek, A.A.; Bogart, J.P.; Boag, P.T. 2002. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 134: 335-346.

Beebee, T.J.C. 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall: London.

Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3): 148-155.

Bossuyt, F.; Milinkovitch, F. C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings National Academy of Sciences*, 97(12): 6585–6590.

Caldwell, J.P. 1991. A new species of toad in the genus *Bufo* from Pará, Brasil, with an unusual breeding site. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 37(26): 389–400.

Cantanhede, A.M.; da Silva, V.M.F.; Farias, I.P. et al. 2005. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). *Molecular Ecology*, 14: 401- 413.

Caramaschi, U.; Niemeyer, H. 2003. Nova espécie do complexo de *Bufo margaritifera* (Laurenti, 1768) do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Boletim do Museu Nacional de Zoologia*, 501: 1-16.

Carey, C.; Heyer, W.R.; Wilkinson, J.; Alford, R.A.; Arntzen, J.W.; Halliday, T.; Hungerford, L.; Lips, K.R.; Middleton, E.M.; Orchard, S.A.; Rand, A.S. 2001. Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. *Conservation Biology*, 15(4): 903–913.

Chaparro, J.C.; Pramuk, J.B.; Gluesenkamp, A.G. 2007. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica*, 63(2): 203–212.

Clabaut, C.; Salzburger, W.; Meyer, A. 2005. Comparative phylogenetics analyses of the adaptive radiation of Lake Tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less homoplasious but also less informative than mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 666-681.

Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.*, 1: 159–187.

- Crawford, A.J. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, 12: 2525–2540.
- Dawood, A.; Channing, A.; Bogart, J.P. 2002. A Molecular Phylogeny of the Frog Genus *Tomopterna* in Southern Africa: Examining Species Boundaries with Mitochondrial 12S rRNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(3): 407–413.
- De la Riva, I.; Köhler, J.; Lötters, S.; Reichle, S. 2000. Ten years of research on Bolivian amphibians : updates checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. *Rev. Esp. Herp.*, 14:19-164.
- Donnellan, S.C.; Aplin, K.P. 1989. Resolution of cryptic species in the New Guinean lizards, *Sphenomorphus joviensis* (Scincidae) by electrophoresis. *Copeia*, 1989:81-88.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13--15.
- Duellman, W.E. 1978. The biology of an Equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publication of the University of Kansas Museum of Natural History*, 65:1- 352.
- Elmer, K.R.; Dávila, J.A.; Lougheed, S.C. 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 247- 260.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A.; Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294: 240 pp
- Farias, I.P.; Da Silveira, R.; de Thoisy, B. et al. 2004. Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodylians. *Animal Conservation*, 7: 265-272.

- Flot, J.F. 2010. SeqPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, 10 (1): 162-166.
- Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M.D.; Meyer, A.; Marty, C.; Blanc, M.; Gilles, A. 2007a. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 567-582.
- Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C.; Blanc, M. 2007b. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *PLoS ONE*, 2(10).
- Frost, D.R.; Hillis, D.M. 1990. Species in concept and practice: Herpetological applications. *Herpetologica*, 46: 87-104.
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; De Sa, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M.; Wheeler, W.C. 2006. The Amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1-370.
- Frost, D.R. 2010. Amphibian Species of the World 5.3, an Online reference. (<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>). Acesso: 08/02/2010.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Gentry, A.H. 1992. Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. *Oikos*, 63: 19-28.
- Gerhardt, H.C.; Huber, F. 2002. Acoustic Communication In Insects And Anurans. *University Of Chicago Press*, Chicago. USA.
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, B.D.; Noonan, B.P.; Schargel, W.; Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-

poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299: 1–262.

Glaw, F.; Köhler, J. 1998. Amphibian diversity exceeds that of mammals. *Herpetological Review*, 29: 11-12.

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

\_. 2010. Global Amphibians. (<http://www.globalamphibians.org>). Acessos: 26/01/2010 e 09/02/2010.

Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M. et al. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, 8: 297-308.

Hanken, J. 1999. Why are there so many new amphibian species when amphibians are declining? *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 7-8.

Hass, C.A.; Dunki, J.F.; Maxson, L.R.; Hoogmoed, M.S. 1995. Divergente Lineages within *Bufo margaritifera* complex (Amphibia: Anura: Bufonidae) revealed by albumin immunology. *Biotropica*, 27(2): 238-249.

Hay, J.; Ruvinsky, I.; Hedges, S.B.; Maxson, L.R. 1995. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 928-937.

Hedges, S.B.; Tomas, R. 1991. Cryptic species of snakes (Thyphlopidae: *Thyphops*) from the Puerto Rico Bank detected by protein electrophoresis. *Herpetologica*, 47: 448-459.

- Hedges, S.B.; Maxson, L.R. 1993. A molecular perspective on Lissamphibian phylogeny. *Herpetological Monographs*, 7: 27-42.
- Heyer, W.R. 1976. Studies in larval amphibian habitat partitioning. *Smithsonian Contributions in Zoology*, 242: 1- 27.
- Heyer, W.R.; Rand, A.S.; Goncalves da Cruz, C.A.; Peixoto, O.L. 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica*, 20: 230–235.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.
- Hillis, D.M.; Ammerman, L.K.; Dixon, M.T.; de Sá, R.O. 1993. Ribosomal DNA and the phylogeny of frogs. *Herpetological Monographs*, 7: 118-131.
- Hoogmoed, M.S. 1989. South American Bufonids (Amphibia: Anura: Bufonidae), an enigma for taxonomists. In: X. Fontanet e N. Horta (Eds.). *Treballs d'ictiologia I herpetologia*, Treb. Soc. Cat. Ictio. Herp. 167-180.
- Jobb, G. TREEFINDER version of October 2008. 2008. (<http://www.treefinder.de>).
- Johnson, K.P.; Clayton, D.H. 2000. Nuclear and mitochondrial genes contain similar phylogenetic signal for pigeons and doves (Aves: Columbiformes). *Mol Phylogenet Evol*, 14: 141–151
- Köhler, J.; Lötters, S. 1999. Annotated list of amphibian records from the Departamento Pando, Bolivia, with description of some advertisement calls. *Bonner Zoologische Beitrage*, 48: 259–273.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

- Lehtinen, R.M. ; Nussbaum, R.A. ; Richards, C.M.; Cannatella, D.C.; Vences, M. 2007. Mitochondrial genes reveal cryptic diversity in plant-breeding frogs from Madagascar (Anura, Mantellidae, Guibemantis). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 1121–1129.
- Lima, A.P.; Menin, M.; de Araújo, M.C. 2007. A new species of *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Brazilian Amazon. *Zootaxa*, 1663: 1-15.
- Lougheed, S.C.; Gascon, C.; Jones, D.A.; Bogart, J.P.; Boag, P.T. 1999. Ridges and frog, *Epipedobates femoralis*. *Proceedings of Royal Society Series B*, 266:1829-1835.
- Lougheed, S.C.; Austin, J.D.; Bogart, J.P.; Boag, P.T.; Chek, A.A. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology*, 6:23-38.
- Marroig, G.; Cerqueira, R. 1997. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon Hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology*, 2: 103–119.
- Menin, M.; Rodrigues, D.J.; Lima, A.P. 2006. The tadpole of *Rhinella proboscidea* (Anura: Bufonidae) with notes on adult reproductive behavior. *Zootaxa*, 1258: 47–56.
- Meyer, C.P.; Paulay, G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3: 2229–2238
- Moriyama, E.N.; Powell, J.R. 1997. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: Mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 378–391.
- Moritz, C. 1994. Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- Olsson, U.; Alström, P.; Ericson, G.P. 2005. Non-monophyletic taxa and cryptic species - Evidence from a molecular phylogeny of leaf-warblers (*Phylloscopus*, Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 261–276.

- Padial, J.M.; de la Riva, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155: 97–122.
- Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W. O.; Stice, L.; Grabowski, G. 1991. “The Simple Fool’s Guide to PCR, Version 2.0.” Privately published document compiled by S. Palumbi, Dept. Zoology, *Univ. Hawaii*.
- Panchal, M. 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, 23:509-510.
- Pauly, G.B.; Hillis, D.M.; Cannatella, D.C.; 2004. The history of a nearctic colonization: Molecular phylogenetics and biogeography of the Nearctic toads (*Bufo*). *Evolution*, 58:2517–2535.
- Pearse, D.E.; Arndt, A.D.; Valenzuela, N.; et al. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15: 985-1006.
- Peres, C.A. 2005. Porque precisamos de megareservas na Amazônia. *Megadiversidade*, 1(1): 174-180.
- Phillips, K. 1990. Where have all the frogs and toads gone? *BioScience*, 40:422–424.
- Posada, D.; Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Posada, D. 2006. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research*, 1:34.
- Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; Wells, K.D. 1998. *Herpetology*. Upper Saddle River, NJ. Prentice Hall.

- Pramuk, J.B.; Hass, C.A.; Hedges, S.B. 2001. Molecular Phylogeny and Biogeography of West Indians Toads (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(2): 294–301.
- Pramuk, J.B.; Kadivar, F. 2003. A new species of *Bufo* (Anura: Bufonidae) from Southern Ecuador. *Herpetologica*, 59(2): 270–283.
- Pramuk, J.B. 2006. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146: 407–452.
- Rand, D.M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 125–131.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225.
- Rodríguez, L.O.; Duellman, W.E. 1994. Guide to the frogs of the Iquitos region Amazonian Peru. *The University of Kansas Natural History Museum Special Publication*, 22: 1–80.
- Ron, S.R.; Santos, J.C.; Cannatella, D.C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 392–403.
- Ruvinsky, I.; Maxson, L.R. 1996. Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 533–547.
- Salducci, M.D.; Marty, C.; Fouquet, A.; Gilles, A. 2005. Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana. *C. R. Biologies*, 328: 1009–1024.
- Santos, J.C.; Coloma, L.A.; Summers, K.; Caldwell, J.P.; Ree, R.; Cannatella, D.C. 2009. Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLoS Biology*, 3(7): 1–14.

Sheldon, F.H.; Jones, C.E.; McCracken, K.G. 2000. Relative patterns and rates of evolution in heron nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 17:437–450.

Sites, J.W.; Marshall, J.C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 462-470

Slade, R.W.; Moritz, C.; Heideman, A. 1994. Multiple nuclear-gene phylogenies: Application to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 341–356

Smith, T.B.; Kark, S.; Schneider, C.J.; Wayne, R.K.; Moritz, C. 2001. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 431.

Smith, M.A.; Poyarkov, N.A.; Hebert, P.D.N. 2008. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*, 8: 235-246.

Souza, V.M.; Souza, M.B.; Morato, E.F. 2008. Efeitos da sucessão florestal sobre a anurofauna (Amphibia: Anura) da Reserva Catuaba e seu entorno, Acre, Amazônia sul-ocidental. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(1): 49-57.

Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978-989.

Storfer, A. 2003. Amphibian declines: future directions. *Diversity and Distributions*, 9: 151–163.

Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Young, B.E.; Rodrigues, A.S.L.; Fischman, D.L.; Waller, R.W. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702): 1783 – 1786.

Stuart, L.B.; Inger, R.F.; Voris, H.K. 2008. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters*, 2: 470-474.

Sturmbauer, C.; Gbadebo, B.; Opadiya, H.N.; Dallinger, R. 1999. Mitochondrial DNA Reveals Cryptic Oligochaete Species Differing in Cadmium Resistance. *Mol. Biol. Evol.*, 16(7):967–974.

Swofford, D. L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Templeton, A.R.; Boerwinkle, E.; Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343-351.

Templeton, A.R.; Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.

Templeton, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789-809.

Thomé, M.T.C.; Zamudio, K.R.; Giovanelli, J.G.R.; Haddad, C.F.B.; baldissera, F.A. Alexandrino, F. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3): 1018-1031.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1996. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

Vallinoto, M.; Sequeira, F.; Sodre, D.; Bernardini, J.A.R., Sampaio, I.; Schneider, H. 2010. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoologica Scripta*, 39(2): 128–140.

Vasconcelos, W.R.; Hrbek, T.; Da Silveira, R.; de Thoisy, B.; Marioni, B.; Farias, I.P. 2006. Population genetic analysis of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology*, 21: 220-230.

Vences, M.; Thomas, M.; Bonett, R.M.; Vieites, D.R. 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360: 1859–1868.

Vences, M.; Thomas, M.; Van der Meijden, A.Y.; Chiari, Y.; Vieites, D.R. 2005a. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2.

Wallace, A.R. 1849. On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zoo. Soc. London*, 20:107-110.

Wallace, A.R. 1876. The geographical distribution of the animals. Vol.1. London: Macmillan.

Wells, K.D. 1979. Reproductive behavior and male mating success in a Neotropical toad, *Bufo typhonius*. *Biotropica*, 11(4): 301–307.

Yanek, K. Heyer, W.R.; Sá, R.O. 2006. Genetic resolution of the enigmatic lesser Antillean distribution of the frog *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology*, 1(3): 192-201.

Young, B.E.; Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Boucher, T.M. 2004. Disappearing Jewels: The Status of New World Amphibians. *Nature Serve*.

Zamudio, K.R.; Savage, W.K. 2003. Historical isolation, range expansion, and secondary contact of two highly divergent mitochondrial lineages in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Evolution*, 57:1631-1652.

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

Zhang, J.F.; Nie, L.W.; Wang, Y.; Hu, L.L. 2009; The complete mitochondrial genome of the large-headed frog, *Limnodynastes bannaensis* (Amphibia: Anura), and a novel gene organization in the vertebrate mtDNA. *Gene*, 442: 119-127.

Zimmerman, B.L.; Bogart, J.P. 1988. Ecology and calls of four species of Amazonian forest frogs. *Journal of Herpetology*, 22(1):97-108.

## APÊNDICES

### Apêndice 1

#### Tabela de amostras

A tabela abaixo mostra a localidade, coordenadas geográficas, nome da amostra na análise de NCA e seu correspondente na árvore filogenética de máxima verossimilhança dos indivíduos de *Rhinella* gr. *margaritifer*.

Localidade	Coordenadas	Nome da amostra na análise NCA	Nome da amostra na árvore filogenética
Vila Gomes	S 04°19'30.2' W 59°41'02.7''	12778	1
		12779	2
		12780	3
		12781	4
		12782	5
		12783	6
São Gabriel da Cachoeira	N 00°04'37.1' W 67°05'28.5''	13108	1
		13109	2
		13110	3
		13111	4
Autazes	S 03°36'35.7' W 59°30'49.5''	12914	1
		12915	2
		12916	3
		12917	4
		12918	5
		12919	6
		12920	7
		12921	8
Borba Novo Horizonte	S 04°16'28.6' W 59°39'20.2''	12773	1
		12774	2
		12775	3
		12776	4
Reserva Ducke	S 03°05'03.4' W 59°58'11.4''	13128	1
		13129	2
		13130	3
		13131	4
		13132	5
Lago Miriti – Careiro	S 03°20'43.4' W 59°31'33.3''	13524	1
		13525	2
		12526	3
		13528	4
		13647	5
		13648	6
		13649	7
		13650	8
		13651	9
		13652	10

		13653	11
		13654	12
		13655	13
		13656	14
		13657	15
		13658	16
		13659	17
		13660	18
Manaquiri	S 03°25'39.9' W 50°27'50.3''	13661	1
		13664	2
		13665	3
		13666	4
		13965	5
		13966	6
		13967	7
		13968	8
		13969	9
		13970	10
		13971	11
		13972	12
		13973	13
		13974	14
		13975	15
		13976	16
		13977	17
		13978	18
		13979	19
		13980	20
		13981	21
Barcelos – Rio Unini	S 01°40'47.4' W 61°49'28.9''	13686	1
		13695	2
		13700	3
		13701	4
		13702	5
		13703	6
		13719	7
		13731	8
		13732	9
		13733	10
		13734	11
		13737	12
		13750	13
		13766	14
		13767	15
São João do Ubin - Manacapuru	S 03°11'52.8' W 60°26'33.0''	13965-B	1
		13966-B	2
		13967-B	3
		13968-B	4

		13969-B	5
		13970-B	6
		13971-B	7
		13972-B	8
		13973-B	9
		13974-B	10
		13975-B	11
		13976-B	12
		13977-B	13
		13978-B	14
		13979-B	15
		13980-B	16
		13981-B	17
		13982-B	18
		13983-B	19
		13984-B	20
		13985-B	21
Morrinho Esquerdo - Rondônia	S 08°58'02.3' W 63°31'04.7''	422	1
		423	2
		424	3
		443	4
Teotônio Esquerdo - Rondônia	S 09°05'14.6' W 63°53'03''	393	1
Mutum Esquerdo - Rondônia	S 09°04'00.4' W 64°07'52''	714	1
Cachoeira do Jirau – Porto Velho – Rondônia	S 09°24'31' W 64°45'58.8''	13245	1
		13246	2
		13247	3
		13248	4
		13249	5
		13250	6
		13251	7
		13252	8
		13253	9
Serra do Navio - Amapá	N 05°56'75' W 51°51'05.3''	13190	1
		13191	2
		13197	3
		13192	4
		13193	5
		13194	6

A tabela abaixo mostra a localidade, coordenadas geográficas, nome da amostra na análise de NCA e seu correspondente na árvore filogenética de máxima verossimilhança dos indivíduos já descritos do *Rhinella* gr. *margaritifera* e de amostras que não foram identificadas até o nível de espécie.

Localidade	Coordenadas	Espécie	Nome da amostra na análise NCA	Nome da amostra na árvore filogenética
Parque Nacional do Viruá - Rondônia	N 01°29'55.1' W 61°07'26.6''	<i>Rhinella</i> sp.	13285	1
Ramal do Puru Puru	S 03°50'03' W 59°00'55.3''	<i>Rhinella</i> sp.	13235	1
Treviso - Pará	S 03°08'56.8' W 54°50'25''	<i>Bufo castaneoticus</i>	122306	1
			122307	2
			122308	3
			122309	4
			122310	5
			122335	6
			122336	7
			122337	8
	S 03°08'56.8' W 54°50'25''	<i>Bufo magnussoni</i>	12052	1
			12053	2
			12054	3
			12055	4
			12056	5
			12057	6
			12058	7
			12073	8
			12080	9
			12083	10
			12084	11
			12085	12
12088	13			
12090	14			
122334	15			
Reserva Ducke	S 03°05'03.4' W 59°58'11.4''	<i>Bufo marinus</i>	13126	<i>Bufo marinus</i>

## APÊNDICES

### Apêndice 2 Tabelas de NCPA

Tabela de NCPA para o gene 16S

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	$\chi^2$ P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
<b>3-1 Rede maior</b>	1	Tip	0	302,7929	0	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Todos indivíduos de Vila Gomes, Borba e São Gabriel da Cachoeira (clados 11 e 12 da análise de MV)
	4	Tip	0	302,7312				
	11	Interior	0	606,1932				
<b>4-1 Rede maior</b>	2	Tip	0	372,8440	0	1-2-11-12-13-14 No	Colonização a longas distâncias e/ou fragmentação passada	Todos os indivíduos de Manaquiri, todos do Careiro que estão no clado 9, todos indivíduos do Jirau e o indivíduo 4 de Morrinho Esquerdo (clados 9 e 10 na análise de MV)
	4	Tip	33,4620	405,5289				
	6	Interior	12,9961	438,4891				
<b>4-2 Rede maior</b>	3	Interior	217,5053	296,6079	0,0015	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Todos os indivíduos de <i>B. castaneoticus</i> , indivíduos 4, 5 e 6 da Serra do Navio e alguns indivíduos de Manacapuru (clados 2, 4 e 14 na análise de MV)
	5	Interior	0	540,7245				
<b>1-5 Rede menor</b>	1	Tip	0	218,5532	0,0002	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Todos indivíduos de Barcelos e alguns de Manacapuru (clado 7 na análise de MV)
	2	Interior	59,0567	160,2901				
<b>Total Rede menor</b>	1	Tip	410,1304	437,8684	0	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Todos indivíduos de Barcelos, alguns de Manacapuru, Careiro, Autazes e Serra do Navio (clado 7 e um pedaço do clado 4)
	2	Tip	86,0554	211,0291				

Tabela de NCPA para o gene 12S

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	$\chi^2$ P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
<b>2-4 Rede maior</b>	1-4	Tip	0	1125.9619	0,0086	1-2-11-12 No	Expansão contígua	Alguns indivíduos de Manaquiri e do Careiro, o indivíduo 5 da Serra do Navio, espécime 2 de <i>B. magnussoni</i> e alguns indivíduos do Jirau, correspondente ao clado 2 na análise de MV
	1-6	Tip	0	270.8914				
	1-8	Interior	208.0976	391.6045				
	1-5	Interior	0	605.1871				
<b>3-1 Rede maior</b>	1	Tip	0	54.3052	0,0059	1-2-11-12 No	Expansão contígua	Alguns indivíduos de Careiro e alguns de Manaquiri
	6	Tip	0	54.3052				
	14	Interior	31.8184	50.9094				
<b>3-2 Rede maior</b>	2	Tip	233.0292	283.6193	0,0002	1-2-3-4 No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância	Alguns indivíduos de Manaquiri, Careiro, Serra do Navio, Jirau, os indivíduo 2 de <i>B. magnussoni</i> e todo clado 1 da análise de MV
	3	Tip	0	849.8353				
	4	Interior	611.3320	653.0630				
<b>Total Rede menor</b>	1	Tip	14.7069	307.2958	0,0051	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Alguns indivíduos de Autazes e os indivíduos de Careiro e Serra do navio do clado 9 da análise de MV
	2	Tip	0	614.4390				

Tabela de NCPA para genes mitocondriais concatenados

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	$\chi^2$ P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
5-1	2	Tip	0	186.4610	0	1-2-3-5-6-7 Yes	Fluxo gênico restrito/dispersão com alguma dispersão a longas distâncias	Todos indivíduos de Manaquiri, alguns de Careiro, todos do Jirau e o indivíduos 2 de <i>B. castaneoticus</i> (clados 6, 9 e 11 da análise de MV)
	6	Tip	0	712.9427				
	7	Interior	260.4179	439.8366				
5-2	4	Tip	0	136.5243	0,0285	1-19-20-2-3-4 No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância	Todos indivíduos de Borba, São Gabriel e Reserva Ducke (clado 7 da análise de MV)
	3	Interior	403.8870	380.9683				
5-3	1	Interior	0	323.7175	0,0199	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Alguns indivíduos de Manaquiri (inclusos no clado 9) e alguns da Serra do Navio (clado 8 da análise de MV)
	5	Interior	0	648.2369				
Total	1	Tip	456.6113	427.9675	0	1-2-11-12 No	Expansão contígua	Correspondente aos clados de 5 a 11
	2	Tip	283.1907	237.5093				
	3	Interior	431.8906	350.0776				

Tabela NCPA para o gene Tirosinase

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	χ <sup>2</sup> P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
3-1	3	Tip	0	583.6777	0	1-2-3-4 No	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância	Alguns indivíduos de Autazes, Manacapuru, Barcelos, Careiro, todos de Mutum e Teotônio e o indivíduo 10 de <i>B. magnussoni</i>
	13	Tip	37.4775	358.5697				
	17	Tip	0	432.9914				
	43	Interior	422.3317	457.1359				
3-6	16	Tip	218.7501	256.3111	0,093	1-19-20-2-11-12 No	Expansão contígua	Um indivíduo de Manaquiri, dois de Serra do Navio e dois <i>B. castaneoticus</i>
	1	Interior	0	266.3700				
3-8	19	Tip	68.7037	646.9708	0,05	1-2-3-5-6-7 Yes	Fluxo gênico restrito/dispersão com algum movimento a longas distâncias	Alguns indivíduos de Autazes, Serra do Navio, Manacapuru e Barcelos
	26	Interior	0	483.8057				
	28	Interior	238.2407	480.4549				
4-1	2	Tip	0	161.1782	0,0143	1-2-11-12 No	Expansão contígua	Todos indivíduos da Reserva Ducke, Mutum e Borba, alguns de Manaquiri, Careiro, Manacapuru, Jirau, Serra no Navio, Autazes, Vila Gomes e quatro indivíduos de <i>B. castaneoticus</i>
	6	Tip	257.9845	726.2832				
	17	Interior	106.9613	154.7624				

Continuação da tabela de NCPA para o gene Tirosinase

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	χ <sup>2</sup> P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
4-2	3	Tip	0	214.4451	0,0001	1-2-3-5-6-7-8 Yes	Fluxo gênico restrito/ dispersão com alguma dispersão a longas distâncias com as áreas intermediárias não ocupadas pela espécie; ou fluxo gênico passado seguido de extinção das populações intermediárias	Todos indivíduos de Barcelos e Mutum, alguns de Autazes, Careiro, Serra do Navio, Manaquiri, Manacapuru e o indivíduo 10 de <i>B. magnussoni</i>
	4	Tip	122.7608	198.3777				
	8	Tip	543.7052	734.0476				
	9	Tip	0	115.2939				
	1	Interior	447.3059	442.5545				

Tabela de NCPA para o gene Rodopsina

Nível	Clados	Localização	D <sub>c</sub>	D <sub>n</sub>	χ <sup>2</sup> P value	Chave de Inferência	Inferência	Pontos amostrais analisados
3-1	3	Tip	30.3602	66.2391	0,0147	1-2-3-5-6-7-8 Yes	Fluxo gênico restrito/ dispersão com alguma dispersão a longas distâncias com as áreas intermediárias não ocupadas pela espécie; ou fluxo gênico passado seguido de extinção das populações intermediárias	Alguns indivíduos de Manaquiri, Barcelos e Manacapuru
	8	Tip	0	206.1436				
	6	Interior	133.2356	131.6001				
3-3	1	Interior	0	715.2288	0,05	1-19 No	Fragmentação alopátrica	Um indivíduo do Jirau e alguns de Manacapuru
	10	Interior	0	115.1133				
4-1	3	Tip	198.4627	579.7625	0,0008	1-2-11-12 No	Expansão contígua	Alguns indivíduos de Manaquiri, Barcelos e Manacapuru
	1	Interior	105.9954	257.3115				