



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

ESTRUTURA POPULACIONAL DE PERERECAS (GÊNERO *Boana*) AMAZÔNICAS COM BASE EM UM MARCADOR MITOCONDRIAL

ORIENTADOR: Dr DOMINGOS DE JESUS RODRIGUES

CUIABÁ – MT 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

ESTRUTURA POPULACIONAL DE PERERECAS (GÊNERO *Boana*) AMAZÔNICAS COM BASE EM UM MARCADOR MITOCONDRIAL

JONATHA EDSON DE PAULA LIMA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, do Instituto de Biociências, como requisito prévio para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

CUIABÁ – MT 2019

FICHA CATALOGRAFICA

ORIENTADOR: Dr DOMINGOS DE JESUS RODRIGUES

BANCA EXAMINADORA

Domingos de Jesus Rodrigues Universidade Federal de Mato Grosso Orientador

Cristine Strüssmann Universidade Federal de Mato Grosso Examinador Titular

Paulo Cesar Venere Universidade Federal de Mato Grosso Examinador Titular

Daniela Cristina Ferreira Universidade Federal de Mato Grosso Examinador Titular

Marielle Cristina Schneider Universidade Federal de Mato Grosso Examinador Titular

Michel Varajão Garey

Universidade Federal da Integração Latino-Americana Examinador externo Examinador Externo João Batista Pinho Universidade Federal de Mato Grosso Examinador suplente

Rogério Vieira Rossi Universidade Federal de Mato Grosso Examinador suplente

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida, mãe, vó e em especial à pequena Isadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus;

À minha companheira Fabiana;

À minha mãe e a vó Diomar, que sempre que necessitei de ajuda estiveram prontas;

À Dra. Rafa, que me deu suporte (correções e conversas) e me suportou por todos esses anos;

Ao meu orientador Dr. Vladimir;

Ao meu orientador Dr. Domingos;

À equipe, que embora segregada em dois times, de campo do Abam, Marção, Janaina, Robson, Juliana, Rainielen, Samuel e todos os estudantes de iniciação científica;

À todo o time da fazenda São Nicolau, um agradecimento especial ao Roberto;

Aos estudantes e pesquisadores do laboratório de genética molecular da UNIOESTE, Sama, Léo e outros envolvidos;

À Dra. Eliana pelo acolhimento em vários momentos, desde o café até a minha invasão na sua sala;

Ao Dr. Leonardo que me socorreu com o R e pelas nossas discussões científicas (ou não);

Ao Rogério pela ajuda nos mapas.

Sumário

1 INT	TRODUÇÃO GERAL	13
1.1	BIBLIOGRAFIA	21
2 Ana distance	alysis of the mitochondrial D-Loop reveals that neither river boundaries nor geogra structure the fine scale genetic variation of an Amazonian treefrog	aphic 26
2.1	Introduction	28
2.2	Material and methods	29
2.3	Results	32
2.4	Discussion	33
2.5	References	37
3 AM OF LOC	AZONIAN TREFROGS THE GENUS <i>Boana</i> SUFFER DIFFERENT INFLUEN CAL FACTORS AND LANDSCAPE IN GENE FLOW IN FINE SCALE	(CES 44
3.1	INTRODUCTION	45
3.2	MATERIAL AND METHODS	47
3.3	RESULTS	49
3.4	DISCUSSION	51
3.5	REFERENCES	59
3.6	IMAGES	63
4 POPULAÇÕES DE PERERECAS (<i>Boana</i>) DA AMAZÔNIA MERIDIONAL SE ESTRUTURAM EM UM SENTIDO LONGITUDINAL		
4.1	INTRODUÇÃO	71
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.3	RESULTADOS	76
4.4	DISCUSSÃO	77
4.5	BIBLIOGRAFIA	82
5 Her	petofauna da Estação Ecológica Rio Ronuro	91
5.1	Introdução	91
5.2	Material e Métodos	93
5.3	Resultados e Discussão	97

LISTA DE FIGURAS

Table 3-1 Genetic diversity indexes calculated for the population clusters of the Boana calcarata species based on the mtDNA D-loop......63 Table 3-2 Genetic diversity indexes calculated for the population groups of the species Boana fasciata based on the mtDNA D-loop......63 Table 3-3 Genetic diversity indexes calculated for population groups of the species Boana punctata based on mtDNA D-loop......64 Table 3-4 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) between sequences of the Dloop region of mtDNA of three species of the genus Boana in different geographic groupings.64 Table 3-5 Paired FST fixation indices (lower left matrix) and mean genetic distances of Kimura Table 3-6 Paired FST fixation rates (left lower matrix) and mean genetic distances of Kimura 2 Table 3-7 Paired FST fixation indices (left lower matrix) and mean genetic distances of Kimura Figure 3-1 Map of study area located in the Juruena River and São Nicolau Farm domains located in the municipality of Cotriguaçu and Japuranã in Nova Bandeirantes, Mato Grosso, Brazil. Collection points identified with circles, triangle and squares. 66 Figure 3-2 Bayesian analysis of the population structure in 25 (a, B. calcarata), 26 (b, B. fasciata) and 35 (c, B. punctata) sequences of Boana D-loop mtDNA at farm sites (P1 to P8), islands Figure 3-3 Haplotype network for species of the genus Boana. The lattice was constructed from 25 (a), 26 (b) and 35 (c) D'loop sequences. The size and color of each ellipse indicate the frequency and geographical origin of individuals with this haplotype. The black dots represent

Figura 4-3. Rede haplotípica de Boana albopunctata. A rede foi construída a partir de 20 sequências de D'loop, o tamanho e a cor de cada círculo indicam a frequência e a origem geográfica dos indivíduos desse haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos Figura 4-4. Análise bayesiana da estrutura populacional em 20 exemplares de B. albopunctata. Sequências de DNAmt D-loop em pontos onde PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop = área do município de Cotriguaçu, NMV = área no município de Figura 4-5. Rede haplotípica de Boana geographica. A rede foi construída a partir de 26 sequências de D'loop, o tamanho e a cor de cada círculo indicam a frequência e a origem geográfica dos indivíduos desse haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos Figura 4-6. Análise bayesiana da estrutura populacional em 26 exemplares de B. geographica. Sequências de DNAmt D-loop em pontos onde PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop, JAP = área no distrito de Japuranã no município de Nova Bandeirantes, JRM = área da margem direita do rio Juruena no município de Nova Bandeirantes.

ABSTRACT

Os anfíbios são considerados como organismos de dispersão limitada devido às suas restrições morfológicas e metabólicas, como ectotermia e pele altamente permeável, além disso possuem baixa vagilidade e alta filopatria. A Amazônia brasileira continua sendo um domínio pouco explorado, porém possui características que fazem da mesma um bom local de estudo, suas cadeias de montanhas, flutuações climáticas e sobretudo grandes rios são características importantes para a biogeografia de anfíbios. Os rios Juruena e Teles Pires ainda não foram testados com relação ao seu fator isolante ao fluxo gênico de animais. O marcador molecular D'loop possui elevada taxa de mutação, por isso é uma ferramenta genética efetiva em estudos de diferenciação genética, como estudos populacionais. Foi usada a RC do DNA mitocondrial para avaliar a estrutura de populações do gênero Boana na Amazônia meridional, para isso abordou-se rios e distância euclidiana como variáveis preditoras. As diferentes espécies de perereca Boana responderam de forma diferente aos preditores ambientais e suas estrutura populacionais variaram de panmixia até forte estrutura. Os resultados com esse grupo forneceram uma contribuição importante sobre a hipótese de barreira do rio e isolamento por distância em anuros.

1 INTRODUÇÃO GERAL

AMAZÔNIA

A Amazônia está presente em oito países da América do Sul e abrange mais de 6 milhões de km², esse bioma é um dos ambientes naturais mais críticos, tanto sustentando a biodiversidade quanto na regulação climática (CHARITY S., DUDLEY N., 2016; DAVIDSON et al., 2012). A Amazônia está ameaçada por várias pressões antrópicas, tais como construções de barragens, desmatamento (voltou a crescer em 2013) e incêndios, esses agentes estão ruindo os padrões de distribuição de espécies da maior floresta tropical (MMA, 2019). A Amazônia abriga a maior riqueza de espécies de antíbios do mundo, sendo esse grupo de vertebrados o mais ameaçado pelos riscos de reduções populacionais e até extinção de algumas espécies (CATENAZZI; GARCÍA; LEHR, 2015; FINER; JENKINS; POWERS, 2013).

Mesmo que pesquisadores, em boa parte do mundo, venham apresentando preocupação de realizar trabalhos em fina escala com anfíbios há mais de 30 anos (ROBERT et al., 2001), na Amazônia brasileira isso é algo pouco explorado. Cadeias de montanhas, flutuações climáticas e sobretudo grandes rios, como na Amazônia, são características importantes para a biogeografia de anfíbios (ZEISSET; BEEBEE, 2008). Os rios podem desempenhar um papel relevante na estruturação da diversidade genética de muitas espécies de anuros, embora a permeabilidade de tais barreiras fluviais seja altamente dependente de características espécie-específicas e da história da vida das espécies (FOUQUET et al., 2015; SANTORELLI; MAGNUSSON; DEUS, 2018).

O modelo apresentado por (GODINHO; DA SILVA, 2018) indica que o efeito independente da variabilidade nas regiões biogeográficas de anuros amazônicos é 3% da topografia, seguido de variáveis climáticas com 16% e barreiras ribeirinhas, o maior responsável, com 38%. Os rios contribuem de forma desigual para os padrões de distribuição de anfíbios na Amazônia. Visto que, o efeito barreira pode ser forte para alguns rios, como o Amazonas e o Madeira, mas outros rios podem não ser uma barreira efetiva (GODINHO; DA SILVA, 2018).

Investigações de amostragem hierárquica que contemplam amostras de populações em diferentes escalas espaciais são necessárias para estimar a escala geográfica em relação à qual ocorre o fluxo de genes e para inferir padrões de fluxo gênico. Consequentemente é importante para o gerenciamento das espécies, compreender a escala em que as populações estão essencialmente conectadas (MONSEN; BLOUIN, 2004).

GENÉTICA DE POPULAÇÕES E GENÉTICA DE PAISAGEM

A principal meta da genética de populações é delinear como a variação genética inter e intrapopulacional de uma espécie está distribuída, e usar esses padrões de variação para compreender como atuam os processos históricos que delimitam as espécies (ROSENBERG et al., 2002; TEMPLETON; ROUTMAN; PHILLIPS, 1995).

O câmbio genético entre subpopulações é uma variável determinante na divergência evolutiva. Metapopulações são definidas como populações locais que interagem através de indivíduos que se deslocam entre populações, e nos sistemas de metapopulação todos os demes são passíveis de extinção de tempos em tempos, além de todos receberem imigrantes (HANSKI; GILPIN, 1991; PANNELL; CHARLESWORTH, 2000). Compreender a dinâmica da metapopulação é importante para entender a especiação e microevolução e também tem um valor mais aplicado para a conservação (LAMPERT et al., 2003). Sendo assim, os marcadores moleculares permitem rigorosas estimativas do fluxo gênico (PANNELL; CHARLESWORTH, 2000).

O fluxo gênico se torna reduzido quando, com a ampliação das distâncias geográficas em muitas populações, isso leva a um aumento na diferenciação genética entre os indivíduos, essa variação genética espacial é conhecida como isolamento pela distância (WRIGHT, 1943). As análises de distribuição de estimativas em pares de distâncias genéticas entre indivíduos podem detectar esse tipo de isolamento (ALEXANDRE et al., 2013). Os níveis de fluxo genético podem afetar a estrutura, o tamanho da população, a sobrevivência da população a longo prazo e a diversidade genética (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999). Outra análise possível de ser realizada mensura o isolamento por distância ambiental, esse ramo pode demonstrar associações entre variação genética e variação ambiental (WANG, 2013).

A estruturação das populações pode ocorrer de diversas formas, o que se discute a mais tempo são os níveis de fluxo gênico sendo afetados pela distância geográfica ou IBD (WRIGHT, 1943). Depois de mais de meio século, houve a preocupação de se questionar se a redução no fluxo gênico é causada pela adaptação a ambientes seletivos divergentes, o isolamento por adaptação (IBA) ou pelo isolamento por ecologia (IBE) (EDELAAR; BOLNICK, 2012; NOSIL, 2008). Portanto, a distribuição da variação genética em uma espécie provavelmente não seja apenas moldada por distância e eventos históricos, mas tais restrições ecológicas também determinam esses limites (DUMINIL et al., 2007; RODRÍGUEZ et al., 2015).

No modelo numérico de TAKAHASHI e colaboradores (2018), um algoritmo simples prevê que somente sob seleção balanceadora a aptidão de uma população polimórfica seria maior do que o esperado com duas populações monomórficas. Concluindo que diversidade genética equilibrada melhora a aptidão da população.

ANFIBIOS

A vagilidade limitada e filopatria dos anfíbios são características que fazem os pesquisadores considerarem os anuros e caudados maus dispersores devido às suas restrições morfológicas e metabólicas, como ectotermia e pele altamente permeável (BLAUSTEIN; WAKE; SOUSA, 1994; COSTER et al., 2015; NOWAKOWSKI et al., 2015; RODRIGUEZ; DUELLMAN, 1994; SMITH; GREEN, 2005) Duellman e Trueb, 1994. Os anfíbios geralmente movimentam-se lentamente, possuindo corpo pequeno e fisiologicamente restrito a permanecerem perto de refúgios úmidos, pois seu ciclo de vida inclui mais comumente estágios na água e na terra (BLAUSTEIN; WAKE; SOUSA, 1994; LARSON; WAKET; YANEVT, 1984). Unindo sinergicamente todos esses fatores, fazem com que os anfíbios geralmente ocorram naturalmente em populações fragmentadas e mostrem um alto grau de estrutura genética (BEEBEE, 2005; NEWMAN; SQUIRE, 2001; PALO et al., 2004).

Assim, ocorre a alta diferenciação genética dos anfíbios em pequenas escalas geográficas (JAMES; MORITZ, 2000; SHAFFER H.B. et al., 2000). Entretanto, existe um fator importante que é a dispersão, sendo determinante na sobrevivência da população local dos anfíbios, aumentando o tamanho da população ou permitindo o restabelecimento de populações após sua extinção (GILL, 1978; GULVE, 1994).

Populações próximas podem interagir através da imigração/emigração e fluxo gênico, isto é confirmado por estudos de dispersão empregando métodos de recaptura (DODD, 1996; (SJÖGREN-GULVE, 1998), porém os anfíbios frequentemente exibem forte fidelidade ao sitio (KUSANO; MARUYAMA; KANENKO, 1999; READING; LOMAN; MADSEN, 1991) e esse atributo pode limitar suas trocas interpopulacionais. O balanço da filopatria e dispersão em conjunto com a dinâmica populacional torna este sistema ideal para o estudo de desdobramento da estrutura populacional (ROBERT et al., 2001).

Uma troca limitada entre populações é indicada por estudos genéticos na maioria das vezes, revelando assim uma subdivisão substancial entre as populações de anfíbios (ROUTMAN, 1993; SHAFFER H.B. et al., 2000). Embora esses tipos de estudos crescem, a maioria aborda estrutura genética populacional examinando padrões em uma escala acima do que poderia ser relevante para a dinâmica de população a curto prazo. E já se sabe que anfíbios podem exibir diferenciação significativa mesmo em uma escala fina (SHAFFER H.B. et al., 2000; WALDMAN; RICE; HONEYCUTT, 1992). Entretanto, ainda são escassos os estudos que investigaram a diferenciação entre populações adjacentes. Sendo assim, o fluxo gênico pode ser fundamental mesmo se as distâncias de movimento dos indivíduos forem curtas (SQUIRE; NEWMAN, 2002).

Em resumo, no campo das pesquisas filogeográficas, anfíbios anuros são elementos essencialmente informativos, devido à sua amostragem relativamente fácil, ampla distribuição no mundo e estruturação genética alta nas populações (ZEISSET; BEEBEE, 2008).

MARCADORES MOLECULARES

Os dados genéticos fornecem informações sobre a influência genética e o sucesso reprodutivo dos indivíduos dispersos, ao invés de apenas medir sua mobilidade (LAMPERT et al., 2003). Atualmente os marcadores moleculares já se tornaram ferramentas indispensáveis para determinar: variação genética e biodiversidade, além disso essa ferramenta fornece níveis de precisão poderosos e permite que essas técnicas sejam reproduzidas. Esses marcadores são classificados em dois tipos principais: marcadores nucleares e mitocondriais. Os marcadores nucleares habitualmente usados para DNA "fingerprint" incluem microssatélites, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) e polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação (RFLP). Os marcadores de DNA mitocondrial amplamente utilizados são DNAr 12S, DNAr 16S, citocromo b e região controle (CR) ou D-loop; sendo o CR altamente variável e o DNAr 12S altamente conservado (ARIF; KHAN, 2009).

No DNAmt se espera que a variabilidade seja maior e tempo de coalescência mais rápido do que no DNAn. Sob esse espectro a congruência global entre o DNAmt e a estrutura do DNAn é um indicador confiável do padrão filogeográfico observado (ZINK; BARROWCLOUGH, 2008). Ainda que o DNAmt possa apresentar estocasticamente rupturas filogeográficas e não estarem relacionadas a nenhuma estrutura de paisagem (IRWIN, 2002).

Esse tipo de material genético possui maior taxa de mutação por substituição de bases em comparação ao DNA nuclear, dessa forma é um marcador genético eficiente em estudos de diferenciação genética (TANG et al., 2006). O gene região controle ou laço de deslocamento (D-loop) é o único segmento não-codificante no DNAmt dos vertebrados (FABER; STEPIEN, 1998). O segmento D-loop sofre evolução muito mais rápido do que o restante dos genes mitocondriais (BROWN, 1985). Por causa dessa capacidade de mudança rápida, a região D-loop é uma das melhores opções para abordar questões genéticas em nível populacional (HOELZEL; HANCOCK; DOVER, 1991).

Vários estudos que abordam estrutura genética em populações usam marcadores moleculares neutros, essas investigações confirmam a hipótese de que populações de anfíbios tendem a ser relativamente isoladas umas das outras (SHAFFER H.B. et al., 2000). Além disso, algumas espécies exibem diferenciação significativa até mesmo em escala fina (ELMER; DÁVILA; LOUGHEED, 2007; SIMÕES et al., 2014; SMITH; GREEN, 2005). Esses marcadores moleculares tem o poder de fornecer uma maior compreensão das interações entre as populações locais, mesmo em escalas espaciais e temporais finas para padrões atuais de movimento e de fluxo gênico (IGAWA et al., 2013; KOBAYASHI; ABE; MATSUKI, 2013).

Quando o tamanho efetivo da população é grande com deriva genética limitada, a diferenciação genética pode não ser aparente até que as distâncias sejam muito maiores do que um quilômetro, sendo assim, pequeno fluxo gênico já é suficiente para inibir a divergência de populações em investigações com marcadores neutros (BERVEN e GRUDZIEN, 1990; HEDRICK, 2000; SMITH; GREEN, 2005).

Nas investigações em que a estrutura genética derivada da análise de agrupamento de microssatélites foi comparada à do DNAmt, obtiveram resultados quase idênticos, apesar de alguns detalhes terem sido diferentes (COLLIARD et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2018). Visto a agilidade e o baixo custo do marcador D-loop em relação ao microssatélite, é bastante vantajoso optar por esse marcador mitocondrial em estudos onde tempo e recursos financeiros são limitados.

Primeiramente, os genes mitocondriais normalmente possuem um quarto do tamanho populacional efetivo dos genes nucleares. Resultando, se uma espécie é dividida em duas populações, o DNA mitocondrial está propenso a se tornar monofilético mais rápido que o DNA nuclear. Além disso, o DNA mitocondrial não sofre recombinação, devido a isso, padrões genealógicos bem definidos podem ser reconstruídos. Sob esse panorama, os marcadores mitocondriais mais capazes (apropriados) de mostrar lacunas filogeográficas que não são causadas por barreiras geográficas (IRWIN, 2002). Por isso, o DNA mitocondrial evidencia barreiras ao fluxo gênico mais do que marcadores nucleares.

DO MICRO AO MACRO

Abordagens genéticas e genômicas podem complementar muitos estudos ecológicos, especialmente em anfíbios. Particularmente interessante para a compreensão ecológica na biologia de conservação, pode ser habilitado por transcriptoma, análises gene-específicas que nos ajudam a compreender, fundamentalmente, porquê certas populações estão prosperando enquanto outras declinam. Trabalhos adicionais que conciliem e utilizem observações de campo e dados com análises de variação genética são especialmente úteis para alavancar ambos os campos (MCCARTNEY-MELSTAD; SHAFFER, 2015).

Descrever os efeitos das características da paisagem na variação genética é essencial para entender como as paisagens modelam a dispersão, o fluxo gênico, a divergência populacional e a especiação (MANEL et al., 2003). Além disso, os dados genéticos fornecem informações sobre a influência genética e o sucesso reprodutivo dos indivíduos dispersos, ao invés de apenas medir sua mobilidade (PRUGNOLLE e DE MEEUS, 2002). Resolver a extensão espacial das populações de anfíbios usando dados genéticos é uma abordagem útil para determinar a unidade geográfica mais apropriada para o manejo (MORITZ, 1994).

As investigações multiespecíficas, e em uma abordagem ampla que vai da finaescala até a média-escala, podem ser bastante esclarecedoras no que diz respeito à declínio e crescimento populacional, deslocamento, fluxo gênico, microevolução, especiação, conservação e manejo. Porém, temos um desafio que é articular claramente como as tecnologias genômicas podem e devem beneficiar estudos em ecologia molecular à medida que a tecnologia se desenvolve (MCCARTNEY-MELSTAD; SHAFFER, 2015). Lagos e lagoas são considerados sinônimo de populações reprodutiva em vários estudos ecológicos e genéticos sobre reprodução de anfíbios (HECNAR e M'CLOSKEY 1996; TALLMON et al. 2000). Essa definição de população é bastante oportuna, já que a linha da margem delimita lagoas e lagos, sendo assim unidades físicas distintas. Entretanto, essa conveniência pode ser colocada em cheque facilmente, uma vez que dados mostram movimentos de permuta interpopulacional em anfíbios e sugerem que as populações podem incluir mais de uma única lagoa (MARSH e TRENHAM, 2001; TRENHAM et al., 2001).

Nos últimos anos, a combinação de dados genéticos, geográficos e ecológicos tem sido utilizada para vários fins de conservação (FARASAT; AKMALI; SHARIFI, 2016). No entanto, como pouco se sabe sobre os efeitos dessas características na variação genética de animais neotropicais, é difícil prever seu potencial para causar divergência populacional (SANTORELLI; MAGNUSSON; DEUS, 2018). Uma visão bastante forte é que o campo emergente da genômica da conservação é especialmente adequado para anfíbios e répteis, dada a dificuldade de fazer observações diretas da maioria das espécies (SHAFFER et al., 2015).

Análises teóricas de árvores filogenéticas têm geralmente se concentrado em como a estrutura filogeográfica pode ser causada por barreiras ao fluxo gênico (por exemplo, (ALEIXO, 2004; CHEK et al., 2001; CHEVRON et al., 2005; MCCARTNEY-MELSTAD; SHAFFER, 2015; SYMULA et al., 2003) ou estrutura de metapopulação (BAGUETTE 2003; COSTER et al., 2015; KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2005; WAKELEY e ALIACAR, 2001).

GÊNERO Boana

Os complexos de espécies que contêm uma grande proporção de riqueza de espécies ocultas são os grupos *Boana calcarata-fasciata* (FUNK et al., 2012). Ambas as espécies estão amplamente distribuídas na bacia amazônica (AZEVEDO-RAMOS et al., 2010; ICOCHEA; COLOMA; RON, 2004) e se caracterizam por ter coloração dorsal marrom, membrana interdigital basal e presença de marcas ou barras escuras nos flancos e superfícies ocultas das coxas (DUELLMAN, 1973). Já *Boana punctata* é um hilídeo neotropical amplamente distribuído (área de área total = 11 306 927km²). Esta espécie ocorre em toda a bacia amazônica na América do Sul, ao sul da região do Chaco no Paraguai e ao longo das margens dos rios Paraguai-Paraná na Argentina. Também está presente na ilha de Trinidad, em Trinidad e Tobago (LA MARCA et al., 2010).

A perereca-de-flanco-azul (em inglês fica melhor) *B. calcarata* vive em florestas tropicais úmidas (em várzeas). É normalmente encontrada próximo a córregos, lagoas e brejos, os indivíduos dessa espécie se empoleiram em vegetação cerca de 15 a 200 cm de altura. A reprodução de *B. calcarata* é esporádica e oportunista. Sua ocorrência em florestas secundárias e áreas abertas artificiais sugere pelo menos alguma tolerância a perturbações do habitat antrópico (CAMINER; RON, 2014; DUELLMAN, 1978).

Boana fasciata é registrada em áreas de floresta primária e secundária, empoleirando-se em vegetação de 30 a 200 cm acima do solo em áreas alagadas, lagoas e margens de córregos. Indivíduos foram registrados em alagados cobertos por gramados entre 30 e 110 cm acima do solo (CAMINER; RON, 2014).

Boana punctata, conhecida como perereca-de-bolinhas, é comum e ocorre em florestas primárias e secundárias (frequentemente em gramíneas ou arbustos) da América do Sul em toda a bacia amazônica, ao sul da região oriental do Chaco no Paraguai (DUELLMAN, 1978). Esta espécie tem a temporada reprodutiva prolongada e se reúne durante o período de acasalamento em locais com grandes massas d'água, geralmente associada a rios, mas é comum encontrá-la em pastagens e em terras bastante abertas (DUELLMAN, 1978; MARQUEZ et al., 1993; PRADO; UETANABARO; HADDAD, 2005). Pode ocorrer em habitats degradados como lagoas rurais e urbanas (RODRIGUEZ; DUELLMAN, 1994).

1.1 BIBLIOGRAFIA

ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals : a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32, n. 1, p. 9–17, 2009.

AZEVEDO-RAMOS, C. et al. **Hypsiboas calcaratus**. Disponível em: <<u>http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T55426A11308862.en%0ACopyright</u>:>.

BEEBEE, T. J. C. Conservation genetics of amphibians. Heredity, v. 95, n. 6, p. 423-427, 2005.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, n. 1, p. 60–71, 1994.

CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the hypsiboas calcaratus and hypsiboas fasciatus species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **ZooKeys**, v. 370, n. 1, p. 1–68, 2014.

CATENAZZI, A.; GARCÍA, V. V.; LEHR, E. A new species of Telmatobius (Amphibia, Anura, Telmatobiidae) from the Pacific slopes of the Andes, Peru. **ZooKeys**, n. 480, p. 81–95, 2015.

CHARITY S., DUDLEY N., O. D. AND S. S. Living Amazon Report 2016 A regional approach to conservation in the Amazon. [s.l: s.n.].

CHEK, A. A. et al. Perception and History: Molecular Phylogeny of a Diverse Group of Neotropical Frogs, the 30-Chromosome Hyla (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, n. 3, p. 370–385, 2001.

COLLIARD, C. et al. Strong reproductive barriers in a narrow hybrid zone of West-Mediterranean green toads (Bufo viridis subgroup) with Plio-Pleistocene divergence. **BMC** evolutionary biology, v. 10, p. 232, 2010.

COSTER, S. S. et al. Limited influence of local and landscape factors on finescale gene flow in two pond-breeding amphibians. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 742–758, 2015.

DAVIDSON, E. A. et al. The Amazon basin in transition. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 321–328, 2012.

DUELLMAN, W. E. The Biology o£ an Equatorial Herpetofauna in Amazonian Ecuador. **Museum of Natural History Miscellaneous Publications**, v. 65, p. 1–352, 1978.

DUMINIL, J. et al. Can Population Genetic Structure Be Predicted from Life-History Traits? **the american naturalist**, v. 169, n. 5, p. 662–672, 2007.

EDELAAR, P.; BOLNICK, D. I. Non-random gene flow: An underappreciated force in evolution and ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 12, p. 659–665, 2012.

ELMER, K. R.; DÁVILA, J. A.; LOUGHEED, S. C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaflitter frog, Eleutherodactylus ockendeni. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1–14, 2007.

FABER, J. E.; STEPIEN, C. A. Tandemly Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region and Phylogeography of the Pike-PerchesStizostedion. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 310–322, 1998.

FARASAT, H.; AKMALI, V.; SHARIFI, M. Population genetic structure of the endangered Kaiser's mountain newt, Neurergus kaiseri (Amphibia: Salamandridae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

FINER, M.; JENKINS, C. N.; POWERS, B. Potential of Best Practice to Reduce Impacts from Oil and Gas Projects in the Amazon. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

FOUQUET, A. et al. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, v. 31, n. 04, p. 361–373, 2015.

FUNK, W. C. et al. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 9, p. 489–496, 2012.

GILL, D. E. The Metapopulation Ecology of the Red-Spotted Newt, Notophthalmus viridescens (Rafinesque). **Ecological Monographs**, v. 48, n. 2, p. 145–166, 1978.

GODINHO, M. B. D. C.; DA SILVA, F. R. The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

GULVE, P. S. Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog, Rana lessonae. **Ecology**, v. 75, n. 5, p. 1357–1367, 1994.

HANSKI, I.; GILPIN, M. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. **Biological Journal of the Linnean Sociely**, v. 42, p. 3–16, 1991.

HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. A.; DOVER, G. A. Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region '. v. 8, n. 3, p. 475–493, 1991.

ICOCHEA, J.; COLOMA, L. A.; RON, S. **Hypsiboas fasciatus**. Disponível em: <<u>http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55480A11303722.en%0ACopyright</u>:>.

IGAWA, T. et al. Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus Odorrana: Different scenarios on two islands. **Heredity**, v. 110, n. 1, p. 46–56, 2013.

IRWIN, D. Phylogeographic breaks without geograpic barriers to gene flow. **Evolution**, v. 56, n. 12, p. 2383–2394, 2002.

JAMES, C. H.; MORITZ, C. Intraspecific phylogeography in the sedge frog Litoria fallax (Hylidae) indicates pre-Pleistocene vicariance of an open forest species from eastern Australia. **Molecular ecology**, v. 9, n. 3, p. 349–58, 2000.

KOBAYASHI, S. et al. Fine-scale Genetic Structure and Estimation of Gene Flow of the Japanese Brown Frog Rana japonica in a Satoyama Landscape on the Western Side of Inba Lake, Eastern Japan. **Current Herpetology**, v. 37, n. 1, p. 11–22, 2018.

KOBAYASHI, S.; ABE, S.; MATSUKI, R. Genetic structure of a Japanese brown frog (Rana japonica) population implies severe restriction of gene flow caused by recent urbanization in a satoyama landscape. **Mitochondrial DNA**, v. 24, n. 6, p. 697–704, 2013.

KRAAIJEVELD-SMIT, F. J. L. et al. Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad Alytes muletensis. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3307–3315, 2005.

KUSANO, T.; MARUYAMA, K.; KANENKO, S. BREEDING SITE FIDELITY IN THE JAPANESE TOAD, BUFO JAPONICUS FORMOSUS. **HERPETOLOGICAL JOURNAL**, v. 9, p. 9–13, 1999.

LA MARCA, E. et al. **Hypsiboas punctatus (errata version published in 2016)**. Disponível em: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T55620A11341287.en>.

LAMPERT, K. P. et al. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the t??ngara frog, Physalaemus pustulosus. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3325–3334, 2003.

LARSON, A.; WAKET, D. B.; YANEVT, K. P. MEASURING GENE FLOW AMONG POPULATIONS HAVING HIGH LEVELS OF GENETIC FRAGMENTATION HE importance of gene flow as a factor maintaining phenotypic cohesion. **Genetics**, v. 1984, n. 106, p. 293–308, 1984.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 189–197, 2003.

MCCARTNEY-MELSTAD, E.; SHAFFER, H. B. Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 20, p. 5084–5109, 2015.

MONSEN, K. J.; BLOUIN, M. S. Extreme isolation by distance in a montane frog Rana cascadae. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 6, p. 827–835, 2004.

NEWMAN, R. A.; SQUIRE, T. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (Rana sylvatica). **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1087–1100, 2001.

NOSIL, P. Speciation with gene flow could be common. **Journal compilation**, p. 2103–2106, 2008.

NOWAKOWSKI, A. J. et al. Mechanistic insights into landscape genetic structure of two tropical amphibians using field-derived resistance surfaces. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 3, p. 580–595, 2015.

PALO, J. U. et al. High degree of population subdivision in a widespread amphibian. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 9, p. 2631–2644, 2004.

PANNELL, J. R.; CHARLESWORTH, B. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1404, p. 1851–1864, 2000.

PRADO, C. P. DE A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. **Healing East and West: Ancient wisdom and modern psychology**, v. 26, p. 211–221, 2005.

READING, C. J.; LOMAN, J.; MADSEN, T. Breeding pond fidelity in the common toad, Bufo bufo. **Journal of Zoology**, v. 225, n. 2, p. 201–211, 1991.

RODRÍGUEZ, A. et al. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 765–785, 2015.

RODRIGUEZ, L. O.; DUELLMAN, W. E. Iquitos Region, Amazonian Peru. Lawrence, Kansas: [s.n.].

ROSENBERG, N. A. et al. Genetic structure of human populations. Science, v. 298, n. 5602, p. 2381–2385, 2002.

ROUTMAN, E. Population structure and genetic diversity of metamorphic and paedomorphic populations of the tiger salamander, Ambystoma tigrinum. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 6, n. 3, p. 329–357, 1993.

SANTORELLI, S.; MAGNUSSON, W. E.; DEUS, C. P. Most species are not limited by an Amazonian river postulated to be a border between endemism areas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2294, 2018.

SHAFFER, H. B. et al. Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. **Annual review of animal biosciences**, v. 3, n. December 2014, p. 113–38, 2015.

SHAFFER H.B. et al. The genetic of amphibian decline: populaiton substructure and molecular diffrenciation in the yosemite toad, Bofu canorus (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformatin polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 245–257, 2000.

SIMÕES, P. I. et al. The value of including intraspecific measures of biodiversity in

environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (Allobates femoralis). **Tropical Conservation Science**, v. 7, n. 4, p. 811–828, 2014.

SJÖGREN-GULVE, P. Spatial movement patterns in frogs: target-oriented dispersal in the pool frog, Rana lessonae. **Ecoscience**, v. 5, n. 1, p. 31–38, 1998.

SMITH, M. A.; GREEN, D. M. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? **Ecography**, v. 28, n. 1, p. 110–128, 2005.

SQUIRE, T.; NEWMAN, R. A. Fine-Scale Population Structure in the Wood Frog (Rana Sylvatica) in a Northern Woodland. **Herpetologica**, v. 58, n. 1, p. 119–130, 2002.

TAKAHASHI, Y. et al. Balanced genetic diversity improves population fitness. 2018.

TANG, Q. et al. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 2, p. 347–357, 2006.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, Ambystoma tigrinum. **Genetics**, v. 140, n. 2, p. 767–782, 1995.

WALDMAN, B.; RICE, J. E.; HONEYCUTT, R. L. Kin recognition and incest avoidance in toads. **Integrative and Comparative Biology**, v. 32, n. 1, p. 18–30, 1992.

WANG, I. J. Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation : a multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. **The Society for the Study of Evolution**, v. 67, n. 12, p. 3403–3411, 2013.

WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. Creating a research agenda. Heredity, v. 82, p. 117–125, 1999.

WRIGHT, S. Isolation by distance. Genetics, v. 28, p. 114–138, 1943.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T. J. C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, v. 101, n. 2, p. 109–119, 2008.

ZINK, R. M.; BARROWCLOUGH, G. F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 9, p. 2107–2121, 2008.

CAPÍTULO II

O seguinte artigo foi submetido na revista científica Hydrobiologia (Qualis Periódicos Capes: A1), o manuscrito retornou com "maiores revisões" e foi submetido novamente no mês de março, até o presente momento os autores aguardam a nova resposta do editor do periódico.

2 Analysis of the mitochondrial D-Loop reveals that neither river boundaries nor geographic distance structure the fine scale genetic variation of an Amazonian treefrog

Jonatha Edson de Paula Lima^{1,2}, Vladimir Pavan Margarido^{3,4}, Rafaela Maria Moresco³, Domingos de Jesus Rodrigues^{1,2}.

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

²Universidade Federal de Mato Grosso, Núcleo de Estudos em Biodiversidade da Amazônia Mato-grossense – NEBAM, Sinop, Mato Grosso, Brazil.

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Cascavel, Paraná, Brazil.

⁴Universidade Estadual de Maringá, Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá, Paraná, Brazil

Corresponding author: e-mail: Vladimir.Margarido@unioeste.br; Tel.: +55 45 3220-3235; Fax: +55 45 3224-4566;

Abstract

While most anurans have limited vagility and local fidelity, there are some exceptions. In the present study, we used *Boana boans*, a large treefrog found throughout most of the Amazon basin, as a model organism. We investigated the possible isolation of the *B. boans* demes located on opposite margins of the Juruena River and their population structure. We sampled 14 individuals of *B. boans* and analyzed the mitochondrial D-Loop to verify whether the river or Euclidean distance are acting as barriers to the dispersal of this frog. The sequencing revealed 12 haplotypes, with global *Fst* values of -0.079, K2P values ranging from -0.187 to 0.054, and primarily intra-population (81.78%) genetic diversity, with only 18.22% of the variation being found among populations. Analysis of Molecular Variance and Bayesian cluster analysis detected a lack of genetic structuring within the study area. The model species presented a capacity for dispersal over long distances in comparison with most other amphibians, which, together with its resistance to desiccation and reproductive mode, enable this treefrog to disperse across rivers and overland. In the specific case of Juruena River, many fluvial islands present within the study area may also be favorable to the dispersal of the species.

Keywords: Anura, Boana boans, D-loop, landscape genetics, river barriers.

2.1 Introduction

The limited vagility and local fidelity of most amphibians have led researchers to consider anurans and caudates (less vagile) to be poor dispersers, given their morphological and metabolic constraints (COSTER et al., 2015; NOWAKOWSKI et al., 2015). This designation of amphibians as poor dispersers generates a degree of inconsistency, especially considering that many species are widely-distributed, in particular in the Neotropics (Gascon, Lougheed, & Bogart, 1998; Reading, Loman, & Madsen, 1991). In fact, anurans may often cover distances of up to 10 km (SMITH; GREEN, 2005). At this spatial scale, gene flow may be hampered primarily by major barriers such as rivers (ANGELONE; KIENAST; HOLDEREGGER, 2011) which play a fundamental role in the maintenance of species diversity in the tropics, by impeding gene flow between populations on their opposite margins, and reinforcing possible allopatric speciation (GASCON; LOUGHEED; BOGART, 1998).

Two theories have been proposed to account for the role of rivers in the zoogeography of vertebrates: Wallace's (1854) river barrier hypothesis and the river refuge hypothesis of Ayres & Clutton-Brock (1992). While the river barrier hypothesis has been tested in multiple vertebrate taxa over the past 160 years (BATES; HAFFER; GRISMER, 2004; DUARTE et al., 2014; GASCON; LOUGHEED; BOGART, 1998; SOUZA; RODRIGUES; COHN-HAFT, 2013; WALLACE, 1854). The displacement and gene flow of terrestrial animals are influenced by a series of barriers, whether they of anthropic or natural origin, emphasizing that the rivers exert the barrier function at all *taxa* (WAITS; CUSHMAN; SPEAR, 2015). The Amazonian rivers are able to isolate populations and species of anurans, shaping the intraspecific population structure and contributing to the biogeographic regionalization of the Anura group (GODINHO; DA SILVA, 2018; ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018). These rivers may act as a barrier to dispersion, but do not present population structure correlated with body size (FOUQUET et al., 2015); or in other cases, size may be a determining factor in the isolation and distribution of amphibian species (MORAES et al., 2016).

Studies of river barriers in amphibians based on molecular markers have revealed a number of different scenarios, ranging from highly structured populations forming welldefined clusters (FOUQUET et al., 2012; KAEFER et al., 2013; MAIA; LIMA; KAEFER, 2017), to reduced structuring and limited genetic distance between demes (FUNK et al., 2007; GASCON; LOUGHEED; BOGART, 1998; LOUGHEED et al., 1999), and even panmixia (CRAWFORD, 2003; ZEISSET; BEEBEE, 2008). Rivers may play a relevant role in the genetic structuring of many anuran species, although the degree of permeability of these barriers depends fundamentally on the specific characteristics of each species (FOUQUET et al., 2015), the application of molecular markers as an analytical marker is a relatively new approach that may help to answer many unanswered or poorly-resolved questions.

Amphibians are considered to be valuable models for investigating the processes that shape the genetic structure of populations (ZEISSET; BEEBEE, 2008). In the Amazon region, most of the studies have focused on dendrobatoids models, and there has been little work on hylids (AMÉZQUITA et al., 2009; KAEFER et al., 2013; MAIA; LIMA; KAEFER, 2017). In contrast with these models (MAIA; LIMA; KAEFER, 2017; SIMÕES et al., 2014), *Boana boans* (Linnaeus, 1758) is a species of large frog and its males have the habit of vocalizing on the banks of the Amazonian rivers in their reproductive period, however these males are also territorialist and philopatric to the reproductive site (MAGNUSSON; LIMA; HERO, 1999).

Among the mitochondrial molecular markers is the D-loop or Control Region (CR), this region evolves much faster than the rest of the mitochondrial gene (BROWN et al., 1986). This rapid change capacity (changeability) makes the D-loop segment an appropriate marker to address genetic issues at the population level (HOELZEL; HANCOCK; DOVER, 1991), such as population diversity, (CHEN et al., 2012; KAWABE et al., 2014), besides (as well as) being useful to test evolutionary relations and biodiversity (ARIF; KHAN, 2009). Although genetic studies of landscape and diversity are essential, there are few studies that use the D-loop in anuran amphibians, which would reveal important information about intra and interpopulation genetic diversity (SEGELBACHER et al., 2010). Genetic diversity among individuals of the same population is an important factor for fitness to environmental conditions (TAKAHASHI et al., 2018). Therefore, knowledge of the genetic variability status and its spatial-temporal distribution are fundamental for a correct analysis of the situation and detection of possible threats to a species (ESCUDERO; IRIONDO; TORRES, 2003). In the present study, we investigated the possible genetic isolation of demes in a local population of B. boans through the analysis of molecular diversity and population structure.

2.2 Material and methods

Sampling

We captured the *Boana boans* specimens in the municipality of Cotriguaçu (09°49'09.0" S, 58°15'31.1" W), in northwestern Mato Grosso, Brazil. The study area encompassed a stretch of approximately 6 km of the Juruena River, a third-order tributary of the Amazon, which is 2,700–3,100 m wide at this point (Fig. 1). The level of the Juruena varies by up to 5 m between the rainy and the dry seasons. The margins of the river in this area are covered with well-preserved riparian forest with large trees, but few streams. This stretch of the rivers also has a number of rapids and rocky outcrops, and many islands, some of which are relatively large, with an area of over one hectare.

We conducted nocturnal visits to both left (LM) and right (RM1 and RM2) margins of the Juruena, and an island in the middle of the river, during which we located *B. boans* specimens through visual and auditory searches. While Vitt & Caldwell (2014) reported the aggregation of choirs of *B. boans* during the mating season, on the margins of the Juruena River, individual frogs were separated by distances exceeding 200 m. We collected 14 specimens of *B. boans* (13 males and one females), four from the island, three from the LM, four from RM1 and three from RM2 (the female was captured at the last mentioned location). Specimen collection was authorized by SISBIO permanent license 18573-1. We extracted a sample of liver tissue from each specimen and preserved it in 100% ethanol for the subsequent extraction of the mitochondrial DNA. We fixed all the specimens and deposited them as vouchers in the herpetological sector of the Biological Collection of Southern Amazonia (ABAM: *Acervo Biológico da Amazônia Meridional*) in Sinop, Mato Grosso (Brazil).

Extraction of the DNA

We extracted the total DNA using the GenElute [™] Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, Buchs, SG, Switzerland), following the manufacturer's recommendations. We quantified the DNA in a NanoK (Kasvi) spectrophotometer.

Sequencing the mitochondrial DNA

We used the IP-H Control and Wrev-L Control primers - both described by Goebel, Donnelly, & Atz (1999) - to amplify the mitochondrial D-Loop. The reaction solution contained 1x PCR reaction buffer (Promega), 3 mM of MgCl₂, 4.6 mM of dNTPs, 0.6 mM of each primer, 2 U of Taq DNA polymerase (Promega), and 10 ng of the DNA. We ran the PCR in a thermocycler under the following conditions: 1 min at

94°C, followed by 36 cycles of 94°C (1 min), 48°C (40 s) and 72°C (1 min and 30 s), and then a final extension of 7 min at 72°C. We loaded the final PCR product into a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide. We purified the PCR products using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. We then sent the samples to the Human Genome Research Center at the University of São Paulo, in São Paulo, Brazil, where they were sequenced with the same primers used in the amplification. We deposit the sequences on the GenBank - NCBI platform under the following numbers MK690361 to MK690374.

Analysis of the mitochondrial D-Loop sequences

We obtained the consensus sequence for each specimen in the Electropherogram Quality Analysis software (TOGAWA et al., 2006). We used BIOEDIT (HALL, 1999) to edit the sequences, and MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) to align them and confirm the polymorphic sites and haplotype affinities.

We verified the saturation of substitutions in DAMBE (XIA, 2013), and selected the best nucleotide substitution model in MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), based on the Akaike Information Criterion (AIC). The software selected the Hasegawa, Kishino and Yano model with a discrete Gamma distribution (HKY + G), and the phylogenetic analyses were based on this model, using the Neighbor-Joining (NJ) algorithm (SAITOU; NEI, 1987) in PAUP 4.0 and the Maximum Likelihood (ML) algorithm in PHYML (GUINDON; GASCUEL, 2003). The support for the NJ and ML analyses was based on 1,000 replicates. We analyzed the molecular fixation index (*Fst*) in ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) with the significance being tested by 20,000 permutations. We divided the genetic variation into intra- and interpopulation levels for the AMOVA, also run in ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). We estimated the pairwise genetic differentiation between sites based on the Kimura 2-parameter model (KIMURA, 1980) in the Mega 7 program (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

We estimated the genetic relationships between individual samples in relation to their source populations, through a TCS haplotype network produced by the PopART program (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). We used BAPS v 6.0 (CORANDER et al., 2013) to identify discrete genetic clusters within the dataset, with the most probable number of genetic groups formed by the sequences being inferred by a Bayesian analysis of the population structure. Bayesian statistics provide an inference framework that calculates probability distributions for the parameters of interest, using previous distributions of these parameters, updated according to the empirical data (SEGELBACHER et al., 2010).

2.3 Results

After the editing and alignment of the sequences, we obtained a consensus D-Loop sequence of 656 base pairs (bps), of which only three bps were not useful for analysis. We found no evidence of saturation found in any of the sequences and, overall, we detected 55 polymorphic traits in the 656 bps. Thymine (38.31%) and adenine (31.04%) were the most common nucleotides, followed by guanine (18.47%) and cytosine (12.18%).

Nucleotide diversity was low in all demes, being 0.010 ± 0.007 on the island, 0.041 ± 0.031 on the LM, 0.036 ± 0.024 at RM1 and 0.016 ± 0.013 at RM2. Overall, 81.78% of this diversity was derived from intra-population variation and 18.22% from interpopulation variation. The overall F_{ST} was -0.079, indicating a lack of genetic structure.

The 14 individuals had 12 haplotypes (Hap), and haplotype diversity (Hd) was 0.978. Two haplotypes were shared, Hap-4 was shared by one individual from the RM1 and one from the island, while Hap-6 was shared by individuals from the RM1 and the LM, as shown in the haplotype network (Fig. 2).

The most genetically distant haplotypes (9 and 11) were separated by a Euclidean distance of 2,870 m, although both were collected on the same margin, while Hap-1 (Island) and Hap-7 (LM) were separated by a distance of 2,050 m (930 m over water), and Hap-3 and Hap-4 were collected at the same site. These findings reflect considerable dispersal over both land and water, given that the genetically most distant pair was found on the same margin, while individuals with the same haplotypes were separated by a large body of water. Haplotype 4 was shared by one specimen from the island and another from the RM1, at point separated by a Euclidean distance of 4,000 m, including 1,750 m of water. The other pair of specimens that shared a haplotype were collected on the LM and the RM1, at sites separated by a Euclidean distance of 4,500 m, including 2,900 m of water.

Neither the NJ nor the ML algorithm identified genetic structure in the haplotypes. The low F_{ST} values, which were close to zero and negative in all cases, further confirmed the absence of population structure, indicating a lack of any significant genetic differentiation in the proposed demes (Tab. 1).

The Bayesian analysis generated three groups which did not correspond to the geographic localities (Fig. 3). Most individuals were assigned to one group, while the second group contained two individuals from opposite margins, and the third group, a single specimen.

2.4 Discussion

Most of the studies that have recorded negative molecular variance in the analysis of population structure have shown an absence of genetic structure and high connectivity between populations (COSTER et al., 2015; VÁSQUEZ et al., 2013). When the molecular variance is only slightly positive or negative, the estimator can effectively be considered to be equal to zero (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). This appears to be the case in the *B. boans* populations analyzed in the present study, with genes from different populations being more closely related than those from the same population. The results of the AMOVA showed that most of the variation was found within each deme, indicating the occurrence of gene flow among demes, and that the distance between the margins of the river does not represent a barrier to the dispersal of individuals, which are able to move freely between margins. This was further reinforced by the sharing of haplotypes (4 and 6) across the river. Fouquet et al. (2015) also found that *B. boans* had dispersed across a smaller river (200–500 m wide) in the Amazon basin, based on the analysis of a much more conserved molecular marker (the 16S gene) in only four specimens.

Tao et al. (2005) sequenced the mitochondrial D-Loop to assess the genetic structure of Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*), and found a similar lack of population structure in relation to the presence of rivers, with the AMOVA indicating that less than 1% of the genetic variation was found between groups. In a study of Kaiser's spotted newt (*Neurergus kaiseri*), however, also based on the D-Loop, Farasat et al. (2016) found that 94.03% of the variation was distributed among the populations, and only 5.97% within populations. In the toad *Rhinella arunco*, neither the limits of the hydrographic basin nor the rivers within the geographic distribution of the species represented geographic barriers to the dispersal of individuals, as indicated by a combined Geneland, AMOVA and haplotype network analysis, which indicated low levels of phylogeographic structure in this species (VÁSQUEZ et al., 2013). Degner et al. (2010) used a combination of mitochondrial sequences and seven nuclear microsatellite markers

to assess the genetic structure of the ornate chorus frog, *Pseudacris ornata*, and found that the haplogroups of this species were not determined by physical barriers (i.e., major rivers or mountain ranges), although the observed pattern of genetic variation was associated with the geographic distance among sites.

Extremely low genetic distances indicate the sharing of alleles, and reduced differentiation between populations, with ample variation within populations. In the present study, the differentiation and distance values did not point to a significant pattern of population structure, given that the F_{ST} values between demes were close to zero, and the K2P values were negative, indicating that the genetic distances among populations were not consistent with their geographical locations, further supporting the conclusion that the species is panmictic in this region. Other types of barrier may influence the dispersal of anurans more effectively. Funk et al. (2005) demonstrated the effects of isolation by mountain ridges on the Columbia spotted frog, Rana luteiventris, based on the pairwise F_{ST} values between sites in adjacent basins with those recorded within each basin. The analysis of microsatellite markers indicated that mountain peaks and the variation in elevation were reflected in genetic divergence between sites. In this case, a model of landscape resistance indicated that different features of the landscape influence the genetic patterns observed in Rana sylvatica. In the analysis of the top ten models based on the F_{ST} , isolation by distance was the best, and all the other nine were associated with roads, indicating that both the presence of roads and geographic distance shape the spatial genetic structure of these frogs (RICHARDSON, 2012).

In a landscape genetic analysis of the European treefrog, *Hyla arborea*, based on pairwise F_{ST} values for 11 microsatellite loci, Angelone et al. (2011) found that, at distances of less than 2 km, only one large river acted as a barrier to gene flow, but at distances over 2 km, geographical distance, as well as forests and roads, all had a negative effect on gene flow. While we did not aim to analyse isolation by geographic distance, the *B. boans* specimens separated by a distance of approximately 6 km, which included the river, presented a F_{ST} value effectively equal to zero. In *Andrias davidianus*, Tao et al. (2005) found very low levels of F_{ST} (< 0.01) overall, but significant levels of population differentiation between individuals from the Pearl river and the Yellow and Yangtze rivers (although no difference was found between the Yellow and Yangtze rivers).

In recent years, molecular analyses have increasingly applied Bayesian clustering techniques to provide a more objective approach to landscape genetics (STORFER et al., 2010) and phylogeography (BRUNES et al., 2015; FOUQUET et al., 2012). Bayesian

techniques can be used to identify discontinuities that may reflect the presence of major barriers or historical effects within the genetic clusters (BORN et al., 2008). In the present study, the results of the Bayesian analysis indicated no genetic structuring related to either Euclidian distances or the presence of the river.

The absence of genetic structure found in the present study may be reflecting recent genetic exchange, as indicated by the distribution of haplotypes between the demes within and between the sampling points. The lack of significant correlation between geographic and genetic distances refutes role of riverine barriers or geographic divergence in the formulation of the genetic variation in these anurans. Fouquet et al. (2015) found less genetic variation between river margins in tree-dwelling anuran species in comparison with litter-dwelling species. In a study of 26 amphibian species in the Amazon basin, Moraes et al. (2016) found that the Tapajós River, a major Amazon tributary, was the principal barrier, whereas the much smaller Jamanxin River played only a minor role. The functional groups most affected by these barriers were small, terrestrial, diurnal anurans, and the assemblage most affected was that of the non-riparian amphibians. The abundance of some species increased in proximity to the bodies of water, while *B. boans* and its congeners, *Boana multifasciatus* and *Boana leucocheilus*, occurred exclusively in these areas.

Boana boans is considered to be territorial, with males exhibiting high fidelity to spawning sites, due to the construction of nests in the clay or sand (MAGNUSSON; LIMA; HERO, 1999). The results of the present study, nevertheless suggest that this species is a good disperser, which may range over substantial areas. As Oliveira et al. (2016) recorded a similar pattern in *Boana faber*, the evidence indicates clearly that some species tropical and subtropical anurans may not be sedentary. In a 15-year study of *B. boans*, however, Magnusson et al. (1999) rarely found specimens more than 100 m from the monitoring site. The dispersal capacity of a species may be especially important when it is vulnerable to local extinction, with more vagile taxa being able to recolonise an area from a source population more easily (MAGNUSSON; LIMA; HERO, 1999).

In a review of landscape genetic studies of terrestrial animals, Waits et al. (2015) identified a set of natural and anthropogenic barriers to dispersal and gene flow, with rivers being identified as barriers in all taxonomic groups. In the case of the principal rivers of the Amazon basin, however, the available studies are limited to the analysis of isolation and dispersal in leaf-litter anurans with direct development driven by a combination of life history traits (small size, no larval dispersion, territoriality, low

resistance to desiccation), attributes that intuitively reflect reduced dispersal capacity (VAN BOCXLAER et al., 2010). Rivers are no longer considered to be geographic barriers, although their margins may be refuges of biodiversity. In a review of the data on 1952 species representing 14 taxonomic groups found in the basin of the Madeira River, Santorelli et al. (2018) found evidence that the river barrier hypothesis accounted for less than 1% of the diversity of species found in the region. These findings were corroborated by our results, including the low pairwise *Fst* values, the lack of influence of the Juruena River on the haplotype network or the sharing of haplotypes, and less than a fifth (18.22%) of the genetic variability being distributed among demes. these data are contrary the hypotheses of a lack of anuran vagility and the role of one the main Amazonian rivers as barrier to amphibian's dispersal.

The lack of genetic structuring found in the present study may be related to the capacity of *B. boans* to climb, swim, and jump long distances (pers. obs.), its tolerance of desiccation, and its reproductive mode (spawning directly into the river, with large tadpoles). Trees falling into the river, with frogs attached, may also to their dispersal between margins. Intrinsic features of the Juruena may also facilitate river crossings, including its slow currents and many islands, including relatively large islands that effectively reduce the course of the river to a number of small channels. In this landscape, *B. boans* may form a single, panmictic population. Considering the idiosyncrasies of the model organism and the intrinsic features of the Juruena River, the findings of this study of *B. boans* provide an important insight into the river barrier hypothesis for amphibians.

Acknowledgments

We thank CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), Fundação Araucária, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMAT (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso). We are also grateful to the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA ICMBio) for the authorization of the collection of anuran specimens (license number: SISBIO 31060-1). We also thank the Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), and the Cuiabá and Sinop *campi* of the Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Moreover, we will always be grateful to the ONF (Office National des Forêts) Brazil and entire team of the São Nicolau Farm for the reception and support in the field period.
2.5 References

AMÉZQUITA, A. et al. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog Allobates femoralis. v. 98, p. 826–838, 2009.

ANGELONE, S.; KIENAST, F.; HOLDEREGGER, R. Where movement happens: scaledependent landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. v. 34, n. November 2010, p. 714–722, 2011.

ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals : a brief review. Animal Biodiversity and Conservation, v. 32, n. 1, p. 9–17, 2009.

AYRES, J. M.; CLUTTON-BROCK, T. H. River boundaries and species range size in amazonian primates. **The American Naturalist**, v. 140, n. 3, p. 531–537, 1992.

BATES, J. M.; HAFFER, J.; GRISMER, E. Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the Rio Tapajós, a major Amazonian river. **Journal of Ornithology**, v. 145, n. 3, p. 199–205, 2004.

BORN, C. et al. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species Aucoumea klaineana: A stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 8, p. 2041–2050, 2008.

BROWN, G. G. et al. Structural Conservation and Variation in the Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. 1986.

BRUNES, T. O. et al. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic forest. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 15, n. 4, p. 695–710, 2015.

CHEN, S. Y. et al. Extremely low genetic diversity indicating the endangered status of Ranodon sibiricus (amphibia: Caudata) and implications for phylogeography. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

CORANDER, J. et al. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v 6.0. **Bioinformatics**, p. 1–28, 2013.

COSTER, S. S. et al. Limited influence of local and landscape factors on finescale gene flow in two pond-breeding amphibians. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 742–758, 2015.

CRAWFORD, A. J. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 10, p. 2525–2540, 2003.

DEGNER, J. F. et al. Fat frogs, mobile genes: unexpected phylogeographic patterns for the ornate chorus frog (Pseudacris ornata). **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2501–2515, 2010.

DUARTE, L. D. S. et al. Phylobetadiversity among forest types in the Brazilian Atlantic Forest complex. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–10, 2014.

ESCUDERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, M. E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. v. 113, p. 351–365, 2003.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FARASAT, H.; AKMALI, V.; SHARIFI, M. Population genetic structure of the endangered

Kaiser's mountain newt, Neurergus kaiseri (Amphibia: Salamandridae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

FOUQUET, A. et al. The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog historical events shapes the genetic structure of an. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 106, n. April 2012, p. 356–373, 2012.

FOUQUET, A. et al. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, v. 31, n. 04, p. 361–373, 2015.

FUNK, W. C. et al. Population structure of Columbia spotted frogs (Rana luteiventris) is strongly affected by the landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 483–496, 2005.

FUNK, W. C. et al. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, Physalaemus petersi. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 825–837, 2007.

GASCON, C.; LOUGHEED, S. C.; BOGART, J. P. Patterns of Genetic Population Differentiation in Four Species of Amazonian Frogs: A Test of the Riverine Barrier Hypothesis. **Biotropica**, v. 30, n. February 2015, p. 104–119, 1998.

GODINHO, M. B. D. C.; DA SILVA, F. R. The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

GOEBEL, A. M.; DONNELLY, J. M.; ATZ, M. E. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochromebin Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 163–199, 1999.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 2003.

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

HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. A.; DOVER, G. A. Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region '. v. 8, n. 3, p. 475–493, 1991.

KAEFER, I. L. et al. The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. **Evolutionary Biology**, v. 40, n. 2, p. 228–245, 2013.

KAWABE, K. et al. Genetic diversity of mtDNA D-loop polymorphisms in laotian native fowl populations. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 27, n. 1, p. 19–23, 2014.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LOUGHEED, S. C. et al. Ridges and rivers : a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (Epipedobates femoralis). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, p. 1829–1835, 1999.

MAGNUSSON, W. E.; LIMA, A. P.; HERO, J. The Rise and Fall of a Population of Hyla boans : Reproduction in a Neotropical Gladiator Frog. v. 33, n. 4, p. 647–656, 1999.

MAIA, G. F.; LIMA, A. P.; KAEFER, I. L. Not just the river: genes, shapes, and sounds reveal

population-structured diversification in the Amazonian frog Allobates tapajos (Dendrobatoidea). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 20, n. February, p. 1–14, 2017.

MORAES, L. J. C. L. et al. The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. **Journal of Biogeography**, v. 43, n. 11, p. 2113–2124, 2016.

NOWAKOWSKI, A. J. et al. Mechanistic insights into landscape genetic structure of two tropical amphibians using field-derived resistance surfaces. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 3, p. 580–595, 2015.

OLIVEIRA, M. DE et al. Daily Movement and Microhabitat Use by the Blacksmith Treefrog Hypsiboas faber (Anura: Hylidae) during the Breeding Season in a Subtemperate Forest of Southern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 11, n. 2, p. 89–97, 2016.

ORTIZ, D. A.; LIMA, A. P.; WERNECK, F. P. Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. **Evolutionary Ecology**, 2018.

READING, C. J.; LOMAN, J.; MADSEN, T. Breeding pond fidelity in the common toad, Bufo bufo. **Journal of Zoology**, v. 225, n. 2, p. 201–211, 1991.

RICHARDSON, J. L. Divergent landscape effects on population connectivity in two co-occurring amphibian species. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 18, p. 4437–4451, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SANTORELLI, S.; MAGNUSSON, W. E.; DEUS, C. P. Most species are not limited by an Amazonian river postulated to be a border between endemism areas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2294, 2018.

SEGELBACHER, G. et al. Applications of landscape genetics in conservation biology: Concepts and challenges. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 375–385, 2010.

SIMÕES, P. I. et al. The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (Allobates femoralis). **Tropical Conservation Science**, v. 7, n. 4, p. 811–828, 2014.

SMITH, M. A.; GREEN, D. M. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? **Ecography**, v. 28, n. 1, p. 110–128, 2005.

SOUZA, S. M.; RODRIGUES, M. T.; COHN-HAFT, M. Are Amazonia Rivers Biogeographic Barriers for Lizards? A Study on the Geographic Variation of the Spectacled Lizard Leposoma osvaldoi Avila-Pires (Squamata, Gymnophthalmidae). **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 3, p. 511–519, 2013.

STORFER, A. et al. Landscape genetics: Where are we now? **Molecular Ecology**, v. 19, n. 17, p. 3496–3514, 2010.

TAKAHASHI, Y. et al. Balanced genetic diversity improves population fitness. 2018.

TAO, F. et al. Genetic Structure and Geographic Subdivision of Four Populations of the Chinese Giant Salamander (Andrias davidianus). **Zoological Research**, v. 26, n. 2, p. 162–167, 2005.

TOGAWA, R. C. et al. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in Musa acuminata35th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil: [s.n.].

VAN BOCXLAER, I. et al. Gradual Adaptation Toward a Range-Expansion Phenotype Initiated the Global Radiation of Toads. **Science**, v. 327, p. 679–682, 2010.

VÁSQUEZ, D. et al. Low phylogeographic structure of Rhinella arunco (Anura: Bufonidae), an endemic amphibian from the Chilean Mediterranean hotspot. **Zoological Studies**, v. 52, n. 35, p. 1–11, 2013.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Amphibians and Reptiles Herpetology Fourth Edition. Fourth edi ed. New York NY: Elsevier Inc., 2014.

WAITS, L. P.; CUSHMAN, S. A.; SPEAR, S. F. Applications of landscape genetics to connectivity research in terrestrial animals. In: BALKENHOL, N. et al. (Eds.). . Landscape Genetics: concepts, methods, aplications. [s.1.] Wiley Online Library, 2015. v. 1p. 199–214.

WALLACE, A. R. On the Monkeys of the Amazon. Journal of Natural History, v. Series 2, n. 14:84, p. 451–454, 1854.

XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720–1728, 2013.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T. J. C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, v. 101, n. 2, p. 109–119, 2008.

Figure Caption



Figure 2. 2-1. Graphic representation study area located in the Juruena River domains located in the municipality of Cotriguaçu, Mato Grosso, Brazil. Collection points identified with red circles.



Figure 2. 2-2. Molecular Phylogenetic analysis of B. boans by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-1269,11) is shown. The analysis involved 14 nucleotide sequences. Evolutionary analyses conducted in MEGA7.



Figure 2. 2-3. Haplotype network for Boana boans. The network built from 14 D-loop sequences. The size and color of each ellipse indicate the frequency and geographical

origin of individuals with this haplotype. The black dots and the crossbars represent the intermediate haplotypes and the mutational processes, respectively.



Figure 2. 2-4. Graph of the Bayesian Analysis of Population Structure in 14 sequences of Boana boans D-loop mtDNA on both banks of the river and an island. Where LM = left margin, RM 1 = right margin 1 e RM 2 = right margin 2.

CAPÍTULO III

O manuscrito a seguir está sendo formatado para a posterior submissão no periódico Population Ecology.

3 AMAZONIAN TREEFROGS THE GENUS *Boana* SUFFER DIFFERENT INFLUENCES OF LOCAL FACTORS AND LANDSCAPE IN GENE FLOW IN FINE SCALE

Jonatha Edson de Paula Lima^{1,2}, Rafaela Maria Moresco³, Domingos de Jesus Rodrigues^{1,2}, Vladimir Pavan Margarido^{3,4}.

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

²Universidade Federal de Mato Grosso, Núcleo de Estudos em Biodiversidade da Amazônia Mato-grossense – NEBAM, Sinop, Mato Grosso, Brazil.

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Cascavel, Paraná, Brazil.

⁴Universidade Estadual de Maringá, Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá, Paraná, Brazil

Corresponding author: e-mail: Vladimir.Margarido@unioeste.br; Tel.: +55 45 3220-3235; Fax: +55 45 3224-4566;

3.1 INTRODUCTION

The boundaries of a population are defined as geographic boundaries of a habitat, vicarious barriers (e.g., rivers and roads) or geographic distance (which derived isolation by distance - IBD) (HUTCHISON; TEMPLETON, 1999; ZINK; BLACKWELL-RAGO; RONQUIST, 2000). However, studies involving isolation by resistance (IBR) have been increasingly addressed (MCRAE, 2006). In megadiverse tropical regions, species boundaries are not clearly defined, amplitude and spatial structure configuration of intraspecific genetic relationships are typically unknown to natural populations (e.g., GROENEVELD et al., 2009; HUBERT et al., 2012; VIEITES; NIETO-ROMAN; WAKE, 2009).

The amphibian dispersion capacity was rarely tested directly and, when this approach was applied, only the isolation was evaluated (SMITH; GREEN, 2005). For this group, isolation becomes special because of the physiological constraints that make the animal taxon more unfit to deal with environmental changes associated with habitat fragmentation and loss, since they are small and physiologically restricted organisms in the vicinity of humid resources (LARSON; WAKET; YANEVT, 1984). And the low dispersion capacity directly affects the connectivity between populations and, in the extreme, influences the genetic structure over time and space (CLOBERT et al., 2001).

Although low vagility of anurans is almost always generalized to the group, and some studies do indeed show that at very small spatial scales some species show genetic structure, other investigations between relatively distant reproductive aggregates exhibit panmixia (e.g., BURNS; ELDRIDGE; HOULDEN, 2004; JEHLE et al., 2005; KATHRIN P. LAMPERT, A. STANLEY RAND, 2003; MAIA; LIMA; KAEFER, 2017; SHAFFER et al., 2004; SIMÕES et al., 2014; ZAINUDIN et al., 2010; ZEISSET; BEEBEE, 2008; LIMA et al., in press). Even with the increase of publications in the field of molecular ecology of amphibians, there is still a lack of basic information on local dispersal capacity and the scale of population differentiation for the vast majority of species in tropical regions (JEHLE et al., 2005; LOWE, 2003; MCCARTNEY-MELSTAD; SHAFFER, 2015; SPEAR et al., 2005). Although rainforests occupy only 7% of the land area, these domains contain more than half of the world's known species (CORLETT; PRIMACK, 2011), and yet only 10% of landscape genetics studies have been used in tropical regions until the year 2010 (STORFER et al., 2010).

The concept of metapopulation applies to local populations interacting through the migration of individuals (HANSKI; GILPIN, 1991), and may result in an allele exchange, and for evolutionary divergence this genetic exchange within subdivided populations is a crucial variable (LAMPERT et al., 2003). Molecular tools allow us to know the haplotypes of these populations, and today, rather than just measuring individuals' mobility, genetic data provide information on the genetic influence and reproductive success of dispersed individuals. It is advantageous to understand the dynamics of metapopulations in order to interpret speciation and microevolution due to their importance for species conservation (LAMPERT et al., 2003). If decision-makers know where populations and metapopulations are limited, they may possibly be able to conduct efforts and resources more effectively.

In his bibliographic review SMITH; GREEN (2005) reported that all 53 studies addressing amphibian metapopulations tested or assumed that pond populations were isolated due to limited philopatry / or dispersal of amphibians. Ten of the 53 studies rejected the metapopulation pattern, since the distance between the fragments was large for the dispersion patterns of the group. Although the conclusion that the restricted dispersion of amphibians may be true for some species, it is clearly not valid for all species (SMITH; GREEN, 2005). For anurans, almost half (44%) of the species exhibited maximum distances of one kilometer, although this proportion is expressive, could be expected to be greater when it comes to this group. Also, 7% of these anurans had maximum dispersion distances greater than 10 km, with a maximum migratory range of 15 km (SINSCH, 1990).

Many researchers have been demonstrating interest in the conservation and management of declining amphibian populations (BEHR; KOENIG, 2018; BRUM et al., 2013; FARASAT; AKMALI; SHARIFI, 2016; FERRAO et al., 2016; TOBLER; GARNER; SCHMIDT, 2013). However, molecular data on lower taxonomic levels (that is, from species to populations) and gene flow on a fine geographic scale in neotropical anurans species remain incomplete (FOUQUET et al., 2012; MONSEN; BLOUIN, 2004). Therefore, we asked whether: at the fine spatial scale there is genetic differentiation? Does genetic differentiation increase with increasing spatial separation of populations? Is there a distance below which genetic differentiation is insignificant in *Boana*? Does the Juruena River play an effective barrier to gene flow?

3.2 MATERIAL AND METHODS

Area of study and sampling

We performed the study at the São Nicolau farm in the municipality of Cotriguaçu (09 ° 49'09.0 " S; 58 ° 15'31.1 " O) located in the northwestern region of Mato Grosso, Brazil. The property owns about 10.000 hectares and is home to the Peugeot / ONF Carbon Well Project (www.reflorestamentoecarbono.com.br), this farm has a pasture area, open and dense ombrophylous native forest, native and teak reforestation (DOMINGOS DE JESUS RODRIGUES, THIAGO JUNQUEIRA IZZO, 2010; NORONHA; RODRIGUES, 2018). The eastern boundary of the farm demarcated by the Juruena River, one of the largest rivers in southern Amazonia, replete with large islands (Figure 1).

In total we obtained eight collection points at the São Nicolau farm, four islands from Juruena riverine point on the right bank of the river and one point in the district of Japuranã (JP) distant ~ 20 km from the farm, covering an area of 131 km2. Visual and auditory searches were carried out at night (7:00 pm to 11:00 p.m.) for the capture of three species of the genus *Boana*: *B. calcarata* (P01, P03, P04, P06, RM, JP), *B. fasciata* (P03, P04, P06, P12, I02 RM, JP) and *B. punctata* (P02, P7, P8, LM, I01, I04, I05) (Figure 1). Liver samples were taken from these specimens for DNA extraction, these samples were kept in absolute ethanol.

Sample processing

We extracted the total DNA using the GenElute [™] Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, Buchs, SG, Switzerland), following the manufacturer's recommendations. We quantified the DNA in a NanoK (Kasvi) spectrophotometer.

We use the IP-H Control and Wrev-L Control primers - both described by (GOEBEL; DONNELLY; ATZ, 1999) to amplify the mitochondrial D-Loop. The reaction solution contained 1x PCR reaction buffer (Promega), 3 mM of MgCl₂, 4.6 mM of dNTPs, 0.6 mM of each primer, 2 U of Taq DNA polymerase (Promega), and 10 ng of the DNA. We ran the PCR in a thermocycler under the following conditions: 1 min at 94°C, followed by 36 cycles of 94°C (1 min), 48°C (40 s) and 72°C (1 min and 30 s), and then a final extension of 7 min at 72°C. We loaded the final PCR product into a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide. We purified the PCR products using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega Corporation, Madison,

Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. We then sent the samples to the Human Genome Research Center at the University of São Paulo, in São Paulo, Brazil, where they were sequenced with the same primers used in the amplification. *Sequence analysis*

We obtained the consensus sequence for each specimen in the Electropherogram Quality Analysis software (TOGAWA et al., 2006). We use BIOEDIT (HALL, 1999) to edit the sequences, and MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) to align them and confirm the polymorphic sites, haplotype affinities and nucleotides diversity (π). In DnaSP we make the haplotypes and their diversity (Hd) was calculated.

We verified the saturation of substitutions in DAMBE (XIA, 2013), and selected the best nucleotide substitution model in MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), based on the Akaike Information Criterion (AIC). We analyze the molecular fixation index (*Fst*), π of demes, neutrality test [Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's Fs (Fu 1997)] in ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) with the significance being tested by 20.000 permutations. We divided the genetic variation into intra- and inter-population levels for the AMOVA, also run in ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). We estimated the pairwise genetic differentiation between sites based on the Kimura 2-parameter model (KIMURA, 1980) in the MEGA 7 program (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

We estimated the genetic relationships between individual samples in relation to their source populations, through a TCS haplotype network produced by the PopART program (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). We use BAPS v 6.0 (CORANDER et al., 2013) to identify discrete genetic clusters within the dataset, with the most probable number of genetic groups formed by the sequences being inferred by a Bayesian analysis of the population structure. Bayesian statistics uses the Markov chain Monte Carlo algorithm, and provide an inference framework that calculates probability distributions for the parameters of interest, using previous distributions of these parameters, updated according to the empirical data (SEGELBACHER et al., 2010). In order to verify the relationship between Euclidean and genetic distances, besides IBD, the Mantel test we performed in the R software with the Vegan package (R Core Team 2017).

3.3 RESULTS

After editing and aligning the sequences, the product of these processes was 657 base pairs for *B. calcarata* and of these, only six base pairs not used in the analysis; we obtained 609 sites (monomorphic) and 42 variable sites (polymorphic). The percentage composition of nucleotides was 12.15% of cytosine, 36.21% of thymine, 31.86% of adenosine and 19.79% of guanine. For *B. punctata*, 652 base pairs generated, two pairs not used, and 645 sites were monomorphic and only five polymorphic sites. The percentages of nucleotides were 13.52% cytosine, 35.16% thymine, 30.55% adenosine and 20.77% guanine. In the *B. fasciata* species, we obtained 656 base pairs (three unused base pairs), generating 622 monomorphic sites and 31 polymorphic sites. The nucleotide composition was 11.45% cytosine, 35.42% thymine, 33.59% adenosine and 19.54% guanine.

Boana punctata showed few polymorphic (S) sites in haplotype (5 for both) although it was a species with the highest number of individuals collected (35), compared with *B. calcarata* with the lowest n (27) showed a very high S (S = 42). The polymorphic sites of *B. boans* ranged from 13 to 42 among demes and was 52 for the total population, while Hd was 1 for demes and 0.978 for the total population (unpublished data).

Considering each sampling point as a subpopulation, in *B. punctata* the mean diversity in the entire population was $0.003 (\pm 0.001)$ and the mean diversity within the subpopulations was $0.002 (\pm 0.001)$. Considering continent and independent islands, the diversity in subpopulations and in the entire population was $0.003 (\pm 0.001)$, and the interpopulational diversity was zero. That is, the islands are not representing a "sample unit" disconnected from the continent (areas sampled on the farm).

The nucleotide diversity was low for all *B. calcarata* demes, and the haplotypic diversity was high for the P01 group and low for P06 and RM (Table 1). The diversity of *B. fasciata* haplotypes was high for three demes (P4, P6, RM, JP) and zero for two demes (P03 and P12) (Table 2). In *B. punctata* the diversity of haplotypes was slightly different among the seven groups with the highest value recorded in group P08 (Table 3).

Population growth tests rejected the hypothesis of expansion for the populations of *B. punctata* and *B. fasciata*, both in the Fu' Fs and in the Tajima's D of the demes and the total population. The results were not significant in the *B. calcarata* demes neutrality

tests, however for the entire population the Fs was significantly positive, indicating a demographic reduction.

The Bayesian grouping method revealed two well-defined haplogroups in *B. calcarata*, visibly separating the demes from the farm area and RM/Japuranã, indicating that the river was an isolating factor for this species, but the geographical distance did not (Fig. 2a), however the Mantel test (r = 0.69; p < 0.01) resulted in a high correlation between Euclidean distance and genetic differentiation. The clustering test in *B. fasciata* (Fig. 2b) revealed that the geographic distance and the river (partially) are elements that isolate demes, also the Mantel test (r = 0.46, p < 0.05) showed correlation, although weak, of distance as a segregating factor. For *B. punctata*, the Bayesian grouping (Fig. 2c) and the Mantel test (r = -0.20, p = 0.88) revealed that water bodies and distance of up to 10 km did not indicate genetic discontinuities.

The percentage of interpopulational variation (94.59%) of *B. calcarata* species and Fst 0.95 was very high (Table 4), when using three parameters the results were: 95.66% variation between the margins, 1.69% in the same margin between the demes and 2.65% within the demes. The interpopulational variation of the species *B. fasciata* was 42.28% and the Fst 0.42, the intrapopulational variation was 57.72% (Table 4). However, *B. punctata* groups showed a low percentage of variation between the populations (21.26%) and Fst (0.21), and the variation within the populations was high (78.74%; Tab.4).

The genetic differentiation (Fst) and the genetic distance (K2P) among the pairs of demes of *B. calcarata* was quite high in JP and RM when compared on a par with farm points. In the *B. fasciata* species, the deme P03 showed high differentiation when faced with all other demes (emphasis on the deme P12), the demes JP, RM and I02 also exhibited significant Fst values (exception for I02-RM and I02- P12), and a genetic distance around 1 to 2%. For *B. punctata* the deme LM presented a high differentiation when related to the islands, and I04 showed high Fst when compared to the others (Table 5-7).

For the *B. calcarata* species the haplotype network showed a great distance between the JP and RM demes compared to the others, forming a predominant haplogroup with individuals from all points of the farm and exclusive haplotypes of P01 (3), P03 (1) and JP (1) (Fig. 3a). The haplotype network has revealed a pattern that suggests little or

no gene flow between the margins, since farm and JP/RM haplotypes are not mixed. The network also showed that the farm haplogroup is more genetically distant from JP than RM. In *B. fasciata*, the haplotype network presented exclusive haplogroups of JP, RM and IO2. However, two haplogroups (IO2 and RM) presented a large number of mutational rates that separate them from the haplogroups of the farm and JP (Fig. 3b). The haplotype network of *B. punctata* showed three main haplogroups, of which two were shared by specimens of the points within the farm and the islands of the Juruena river, and all the specimens of the LM belonged to one of these large haplogroups; only one individual from P08 and two from IO5 shared haplotypes and formed a small group and three individuals from IO1 presented an exclusive haplotype (Fig 3c).

The distribution of haplotypes between the sampled locations and the large number of mutations that separate the genealogical groups showed a pronounced genetic structure among the populations of *B. calcarata*. While these mutational rates could present a high structure in the populations of *B. fasciata* (among some IO2 and RM haplotypes versus farm haplotypes) due to the presence of the river, but the few mutations between the JP and farm populations contradict this assertion.

3.4 DISCUSSION

For *B. calcarata*, the distance of 8 km (LM) and 20 km (RM) did not impede gene flow, but the presence of the Juruena River interfered with the migration. The species *B. fasciata*. In *B. punctata* 12 km (containing stretches of water of 6 km) did not prevent the crossing. Although the islands are close to each other, the demes of these places were genetically closer to the demes of the farm than to the islands themselves. These distances are within the limit of migration considered normal for anurans, but in the work done with *Hyla arborea*, the 12.5 km stretch was considered as an atypical migration distance, especially in fragmented landscapes (ANGELONE; HOLDEREGGER, 2009; ARENS et al., 2006; GUISAN; PERRIN; PELLET, 2004). Therefore, to conclude that the totality of amphibians are poor dispersers is as misleading as stating that all mammals move by large tracts (SMITH; GREEN, 2005).

We observed that in this area *B. calcarata* and *B. fasciata* are synoptic species that use vegetal substrate on streams and bathed for their reproduction, the first species has

the habit of vocalizing in trees (2-4 m above the ground) while the second vocalizes on bushes (0.2-0.5 m above ground). *B. punctata* has been shown to be tolerant to anthropogenic areas, reproducing in artificial ponds of open areas, and also vocalizes in rivers (0-0.4 m above water surface).

Our results indicate that, according to what is found in other amphibians, besides rivers and distance, the attributes of the life history influence the structure of the population (e.g. ANGELONE; KIENAST; HOLDEREGGER, 2011; FOUQUET et al., 2012; FUNK et al., 2007; LAMPERT et al., 2003; NOONAN; GAUCHER, 2006). ANGELONE; KIENAST; HOLDEREGGER (2011) failed to find an explanation neither in the geographic distance nor in any other element of the landscape for the patterns of gene flow in the spatial scale of 0 to 2 km. For small Amazon rainforest frogs, in addition to much of the genetic variation being correlated with geographic distance, the genetic discontinuities are associated with the transposition of the great Amazonian rivers, and the river did not constitute a significant barrier genetic differentiation only of Allobates *paleovarzensis*, however, the role of distance was very evident for this species, in which the Mantel tests indicated a correlation pronounced between genetic and geographic distances (KAEFER et al., 2013). The Japanese brown toad (Rana japonica) showed no significant correlation between geographic and genetic distances as indicated by the Mantel test (r = 0.0057, p = 0.37), and the genetic structure from the microsatellite cluster analysis was (KOBAYASHI et al., 2018; KOBAYASHI; ABE; MATSUKI, 2013). In the present work, the Mantel test also showed a significant correlation of genetic and Euclidean distances in *B. calcarata* species, but there was no correlation in *B. punctata*, and low correlation in B. fasciata. The species B. calcarata and B. fasciata found in the same environments, but the Euclidean distance and the river played different roles in the isolation of their subpopulations or the species responded differently to this barrier and geographic range. Although the two species are taxonomically close and syntopic, life strategies and responses to the local environment seem to be structuring these metapopulations. Such opposing strategies can dramatically influence the pattern of biodiversity on a large scale (VAN BOCXLAER et al., 2010). B. punctata, which belongs to the same genus as the other species studied, presents a very different life strategy and microhabitat. This species not influenced on a small scale (10 km) and the great river like the Juruena did not affect its gene flow. This reinforces that the population structure is strongly linked to the biological characteristics of the species, and a river or geographic distance, considered barriers for many species, may not represent isolations for others that are even of the same genus (MORESCO et al., 2013).

In the present work the highest value of paired Fst was from 1 to B. fasciata between points P03 and P12, these demes do not share alleles, although they are separated by a range of 6 km. Possibly this Fst was the maximum (1) because there were no shared haplotypes among demes, since all the representatives of the subpopulations presented only one haplotype. Therefore, the two subpopulations fixed different alleles. The paired comparisons Fst significantly different in all cases, were JP (calcarata B. and B. fasciata), P03 (B fasciata) and half of the breeding sites comparisons between LM and I04 (B punctata) were different (p <0.05). For Rana japonica, more than half of Fst paired comparisons were significantly different and the pair of sites that showed the highest value of Fst (0.408) separated by a distance of ~ 900m. (KOBAYASHI; ABE; MATSUKI, 2013). On the other hand, Adenomera andreae failed to display allele sharing at a distance of only 100 m (FOUQUET et al., 2012). Considering these results, it is expected that with large distances (~ 40-200 km) and the presence of a river, Fst values would show a high and significant level of structure of the population of another small frog Amazon litter (Allobates tapajos) whose dispersion hypothesis is already low, showing all pairs of sites with high levels of significance in the Fst values (MAIA; LIMA; KAEFER, 2017).

In other areas around the world, anuran populations are a non-standard (heterogeneous) portrait. In the study model for tungara frog (*Physalaemus pustulosus*) the paired Fst values were low at all distances but began to become significant from 5 km (LAMPERT et al., 2003). In all *H. arborea* populations, matched Fst levels varied from no differentiation between two populations separated by a distance of 5 km to elevated 0.36 between the distant populations 18 km (ARENS et al., 2006). *Fejervarya limnocharis* showed low genetic differentiation between populations ranging from 25 to 200 km (containing demes in islands); this distinction indicated by the low Fst values and each pair comparison between the two regions showed significant genetic differentiation, being a mountain chain an effective divisor. This shows that for this species, only Euclidean distances in fine scale, as well as bands of water (50 km), do not cause genetic discontinuities (HURZAID et al., 2014).

In fine scale (2 to 4 km) *H. arborea* gene flow can be inhibited by geographic distance and the proportion of wetlands. In this research it was evidenced that different

landscape elements affect the genetic differentiation and gene flow in different spatial scales. Frogs often cover distances of 2 km and, at this spatial scale, gene flow seems to be mainly hampered by substantial barriers such as rivers. At a distance greater than 2km, the gene flow depends more on the geographic distance and the matrix of the landscape (ANGELONE; KIENAST; HOLDEREGGER, 2011).

It was very evident for *B. calcarata* that genetic discontinuities are associated with the transposition of a large Amazonian river, as well as the results also suggest that a great part of its genetic variation is correlated with the geographic distance, since the river effect and the distance does not was so pronounced for B. fasciata, and B. punctata had no vicarious effect on the river (~ 500 m), as well as ~ 6 km on land. The effect of distance and of rivers was also very evident in studies with Amazonian anurans (GASCON; LOUGHEED; BOGART, 1998; LOUGHEED et al., 1999; MAIA; LIMA; KAEFER, 2017) where Mantel's tests also indicated a strong correlation between genetic and geographic distances, while the river was not a significant barrier to genetic differentiation (KAEFER et al., 2013). Distance effects were reported in phylogeographic studies involving Amazonian frogs (AMÉZQUITA et al., 2009; FUNK et al., 2007; ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018; SIMÕES et al., 2014) and have suggested an important role for distance isolation and genetic drift in their evolutionary diversification. As the tests demonstrated in B. punctata, the demes of B. boans also did not suffer vicariance due to the presence of the Juruena river (LIMA et al., in press). The populations of A. andreae of each margin of a wide river (~ 300m) immensely differentiated from their neighboring populations on the opposite side; this river represents a considerable barrier to the flow of genes. However, a narrow tributary (~ 30 m wide), with the presence of islands, where migrants were detected in both directions, was a less effective barrier to migration, although it was still a barrier (FOUQUET et al., 2012). For Allobates paleovarzensis the Amazon River did not represent a barrier, promoting differentiation in genetic or phenotypic distances. In contrast, a role of the Madeira low river as a vicarious barrier for two Allobates species was revealed by the Mantel partial test (KAEFER et al., 2013). In an investigation, ANGELONE e HOLDEREGGER (2009) using Hyla arborea, found contemporary migrant events from the River Thur in almost their entire sampled area at distances of 1.5 to 16 km. This suggests that the frogs can periodically cross a 30m wide river and scatter for long distances across the landscape.

Most amphibian species do not move for long stretches, but surprisingly, a review revealed that more than 7% of the anurans surveyed were able to disperse by more than 10 km. The amphibian group exhibits a wide range of dispersant strategies (SMITH; GREEN, 2005). Some species of amphibians are capable of movements that are admirable for animals, supposedly, poorly dispersed (HAYES; ROMBOUGH; HAYES, 2007; OLIVEIRA et al., 2016). The review by SMITH and GREEN (2005) suggests that these anurans have a displacement twice as large as the commonly reported distance as broad enough to result in population isolation, averaging at most 2.02km. Although it is not uncommon for neotropical amphibians to have significant spatial genetic structuring at short distances in mitochondrial and nuclear genes (CRAWFORD, 2003), current studies are increasingly revealing dispersive and transposing abilities (SANTORELLI; MAGNUSSON; DEUS, 2018; LIMA et al., in press). Contemporary migration can occur in less than 2 km with H. arborea or may occur as in Allobates femoralis, where populations separated by hundreds of kilometers (~ 800 km) have shared haplotypes, suggesting recent migration (AMÉZQUITA et al., 2009; ANGELONE; HOLDEREGGER, 2009). Our results indicate that recent migration may be somewhat common for *B. punctata*, which is quite unusual for *B. calcarata* and intermediate for *B.* fasciata. When there are shared haplogroups at great distances, and this sharing does not occur over short distances, there are signs of contemporary migration (AMÉZQUITA et al., 2009). This fact occurred with *B. punctata*, where even the subpopulations of the islands being geographically closer to each other, the demes of these sites were genetically closer to the continent's demes (farm). Alternatively, these factors can correlate with geographic distance and may be the result of migration that promotes similarity between adjacent populations in the face of local selective pressures. A homogenizing effect of migration between adjacent populations is very unlikely (AMÉZQUITA et al., 2009).

Genetic structure

The results of the analysis of the molecular variance reveal the effects of high presumed philopatry in anurans (CUSHMAN et al., 2006; SINSCH, 1990), as occurred in *B. calcarata* (5.39% intrapopulational variation), however *B. punctata* contrasted this conjecture (78.74% intrapopulational variation). *Allobates* (*A. nidicola* and *A. masniger*) also had low molecular variability within populations, with extreme philopatry and low vagility (only 2.02% of total variation) (KAEFER et al., 2013). In *Osteocephalus*.

taurinus the AMOVA test for the 16S marker indicated that between the two forest ecotypes there was the greatest genetic variation (72.86%); in contrast, the variability was low among the localities within the forest ecotypes (7.14%) and slightly higher within the localities (20%).(ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018). In the Neurergus kaiseri triton, the mitochondrial D-loop marker exhibited significant genetic differences attributed to all hierarchical levels tested in three population groups examined. Most of the genetic variation was significantly explained by the differences between the regions (94.31% genetic variation, $\theta CT = 0.94$, P <0.01) and, among the populations within the regions, little genetic difference was detected (2. 69% genetic variation, θ SC = 0.47254, P < 0.001) (FARASAT; AKMALI; SHARIFI, 2016). In an investigation COSTER et al. (2015) indicated in their findings that there was high connectivity between the study area for two species of amphibians (Ambystoma maculatum and Lithobates sylvaticus), this was evidenced by low Fst values and a lack of genetic structure, using the Bayesian cluster analysis. Thus, they concluded that in conducting the genetic differentiation between the populations of the two species studied, ecological factors do not play an important role. In the present work, B. punctata also presented low Fst values, both global and peer-topeer, and Bayesian grouping revealed a complete absence of genetic structure indicating that there was a connection between the subpopulations.

The configuration of genetic clusters recovered in the Bayesian analyzes showed a significant genetic structure in short geographical distances for *B. calcarata*, the same pattern observed in the haplotype networks. Similar results were obtained in other Amazonian species (ELMER; DÁVILA; LOUGHEED, 2007; SIMÕES et al., 2014). Bayesian analyzes may also recover genetic clusters representing panmitic demes over short geographic distances (ZAMUDIO; WIECZOREK, 2007), in such cases, networks may (e.g. *B. punctata*) or not (e.g. *B. fasciata*) reinforce these clusters. (HURZAID et al., 2014; KOBAYASHI; ABE; MATSUKI, 2013). The trend of low intrapopulational variability was also supported by the genetic distances observed based on the Kimura-2 parameters.

Species of Amazonian tropical anurans with open and aquatic habitats have less genetic structure/divergence than forest species at great distances, where forest habitat may show three times greater genetic divergence than open habitat (FOUQUET et al., 2007; RODRÍGUEZ et al., 2015). This inference corroborates the data of the genetic structure existing in a few kilometers, although weak, presented by *B. calcarata* and *B.*

fasciata, since these two syntopic species inhabit environments of closed forest. The third species, *B. punctata*, is an example of a widely distributed anuran in South America that lives in open areas. It is possible to identify unique responses of species and to evaluate if the patterns are consistent between them, confronting the ecological influences on the gene flow for different species within the same landscape (COSTER et al., 2015). In this study, we find different influences of the landscape on the three species. Two or more species interact with the environment in distinct ways, where factors affecting gene flow may vary according to the life history attributes of each species (BAGUETTE; VAN DYCK, 2007).

The results of the population structure of *B. punctata* corroborate the new findings of frogs that have the ability to cross large portions of water (LIMA, et al., in press; FOUQUET et al., 2015). The stratified microhabitat promotes greater variation in temperature and humidity, and the selective pressure on tree species compels them to resist desiccation and heat, giving this community greater dispersion capacity (FOUQUET et al., 2015).

Although the haplotype network are poorly structured, non-significant results in neutrality tests across all genetic clusters did not support past events of demographic expansion in *B. punctata*. Contradictory results were also observed in the *A. nidicola* and *A. masniger* systems, where growth tests accepted population expansion while the network of haplotypes and neutrality tests did not support the same (KAEFER et al., 2013). The population of *B. calcarata* presented Fu's Fs indicating a past population bottleneck and a structured haplotype network reinforcing the neutrality test. The neutrality tests (Fs and D) indicated that three species of *Allobates* underwent very subtle demographic changes. In *A. paleovarzensis* the test results indicated that this species experienced recent demographic changes. However, the species *A. nidicola* and *A. masniger* presented less pronounced patterns in the molecular data ((KAEFER; TSUJI-NISHIKIDO; LIMA, 2012).

The DNAmt D-loop gene indicated low nucleotide population diversity ($\pi = 0.000$ to 0.006) observed in all *Fejevarya limnocharis* populations, while haplotype diversity (Hd) was very low to moderate in each locality (Hd = 0 to 0.83), for *Rana japonica* the diversity of haplotypes ranged from 0.44 to 0.91 at each breeding site (KOBAYASHI; ABE; MATSUKI, 2013).

CONCLUSION

In this work two species with habitat requirements and similar life history traits were studied and a third one with habitat requirements and life history different from the others, but occurring in sympatry. In this way, it was possible to evaluate the ability to generalize landscape genetic patterns among these species. *Boana punctata* behaved as a single population, and *B. calcarata* presented as a metapopulation in the farm area as *B. fasciata*, and the Japuranã demes as distinct populations.

Significant correlations between our mitochondrial data and the main geographical barrier of the study area and distance suggest that the D-loop marker was sensitive to the recent history of connection between these populations. It is remarkable that the distance on such a fine scale is behaving like a population-isolating agent. Thus, we believed that the scale dependence of landscape effects on gene flow is a relevant field of future research in landscape genetics.

3.5 REFERENCES

AMÉZQUITA, A. et al. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog Allobates femoralis. v. 98, p. 826–838, 2009.

ANGELONE, S.; HOLDEREGGER, R. Population genetics suggests effectiveness of habitat connectivity measures for the European tree frog in Switzerland. **Journal of Applied Ecology**, v. 46, n. 4, p. 879–887, 2009.

ANGELONE, S.; KIENAST, F.; HOLDEREGGER, R. Where movement happens: scaledependent landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. v. 34, n. November 2010, p. 714–722, 2011.

ARENS, P. et al. Microsatellite variation and population structure of a recovering Tree frog (Hyla arborea L.) metapopulation. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 825–835, 2006.

BAGUETTE, M.; VAN DYCK, H. Landscape connectivity and animal behavior: Functional grain as a key determinant for dispersal. Landscape Ecology, v. 22, n. 8, p. 1117–1129, 2007.

BEHR, N.; KOENIG, A. Captive management, reproduction, and comparative larval development of Klappenbach's Red-bellied Frog, Melanophryniscus klappenbachi Prigioni and Langone, 2000. n. July, 2018.

BRUM, F. T. et al. Land Use Explains the Distribution of Threatened New World Amphibians Better than Climate. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

BURNS, E. L.; ELDRIDGE, M. D. B.; HOULDEN, B. A. Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid Litoria aurea. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 7, p. 1745–1757, 2004.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

CLOBERT, J. et al. Dispersal. New York: Oxford University Press, 2001.

CORANDER, J. et al. BAPS : Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v 6.0. **Bioinformatics**, p. 1–28, 2013.

CORLETT, R. T.; PRIMACK, R. B. **Tropical Rain Forests. An Ecological and Biogeographical Comparison**. 2^a Edition ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. v. 38

COSTER, S. S. et al. Limited influence of local and landscape factors on finescale gene flow in two pond-breeding amphibians. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 742–758, 2015.

CRAWFORD, A. J. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 10, p. 2525–2540, 2003.

CUSHMAN, S. A et al. Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with causal modeling. **The American naturalist**, v. 168, n. 4, p. 486–99, 2006.

DOMINGOS DE JESUS RODRIGUES, THIAGO JUNQUEIRA IZZO, L. D. B. (ORGANIZADORES). Descobrindo a Amazônia Meridional: biodiversidade da Fazenda São Nicolau. Cuiabá-MT: Pau e Prosa Comunicação Ltda., 2010.

ELMER, K. R.; DÁVILA, J. A.; LOUGHEED, S. C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaflitter frog, Eleutherodactylus ockendeni. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1–14, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10,

n. 3, p. 564–567, 2010.

FARASAT, H.; AKMALI, V.; SHARIFI, M. Population genetic structure of the endangered Kaiser's mountain newt, Neurergus kaiseri (Amphibia: Salamandridae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

FERRAO, M. et al. High species richness of scinax treefrogs (hylidae) in a threatened amazonian landscape revealed by an integrative approach. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–16, 2016.

FOUQUET, A. et al. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, 2007.

FOUQUET, A. et al. The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog historical events shapes the genetic structure of an. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 106, n. April 2012, p. 356–373, 2012.

FOUQUET, A. et al. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, v. 31, n. 04, p. 361–373, 2015.

FUNK, W. C. et al. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, Physalaemus petersi. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 825–837, 2007.

GASCON, C.; LOUGHEED, S. C.; BOGART, J. P. Patterns of Genetic Population Differentiation in Four Species of Amazonian Frogs: A Test of the Riverine Barrier Hypothesis. **Biotropica**, v. 30, n. February 2015, p. 104–119, 1998.

GOEBEL, A. M.; DONNELLY, J. M.; ATZ, M. E. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochromebin Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 163–199, 1999.

GROENEVELD, L. F. et al. Species delimitation in lemurs: Multiple genetic loci reveal low levels of species diversity in the genus Cheirogaleus. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, 2009.

GUISAN, A.; PERRIN, N.; PELLET, J. A Concentric Analysis of the Impact of Urbanization on the Threatened European Tree Frog in an Agricultural Landscape. **Conservation Biology**, v. 18, n. 6, p. 1599–1606, 2004.

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

HANSKI, I.; GILPIN, M. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. **Biological Journal of the Linnean Sociely**, v. 42, p. 3–16, 1991.

HAYES, M. P.; ROMBOUGH, C. J.; HAYES, C. B. Rana aurora Movement. Herpetological Reveiw, v. 38, n. 2, p. 192–193, 2007.

HUBERT, N. et al. Cryptic diversity in indo-pacific coral-reef fishes revealed by DNA-barcoding provides new support to the centre-of-overlap hypothesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

HURZAID, A. et al. Genetic structure of the Asian Grass Frog, Fejevarya limnocharis (Amphibia: Anura: Dicroglossidae) of Peninsular Malaysia: a preliminary report. **Zoological Studies**, v. 53, p. 1–7, 2014.

HUTCHISON, D. W.; TEMPLETON, A. R. Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. **Evolution**, v. 53, n. 6, p. 1898–1914, 1999.

JEHLE, R. et al. Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (Triturus cristatus, T. marmoratus). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n.

3, p. 619–628, 2005.

KAEFER, I. L. et al. The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. **Evolutionary Biology**, v. 40, n. 2, p. 228–245, 2013.

KAEFER, I. L.; TSUJI-NISHIKIDO, B. M.; LIMA, A. P. Beyond the river: Underlying determinants of population acoustic signal variability in Amazonian direct-developing Allobates (Anura: Dendrobatoidea). Acta Ethologica, v. 15, n. 2, p. 187–194, 2012.

KATHRIN P. LAMPERT, * A. STANLEY RAND, † ULRICH G. MUELLER *† AND MICHAEL J. RYAN *†. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, Physalaemus pustulosus. p. 3325–3334, 2003.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KOBAYASHI, S. et al. Fine-scale Genetic Structure and Estimation of Gene Flow of the Japanese Brown Frog Rana japonica in a Satoyama Landscape on the Western Side of Inba Lake, Eastern Japan. **Current Herpetology**, v. 37, n. 1, p. 11–22, 2018.

KOBAYASHI, S.; ABE, S.; MATSUKI, R. Genetic structure of a Japanese brown frog (Rana japonica) population implies severe restriction of gene flow caused by recent urbanization in a satoyama landscape. **Mitochondrial DNA**, v. 24, n. 6, p. 697–704, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LAMPERT, K. P. et al. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the tungara frog, Physalaemus pustulosus. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 12, p. 3325–3334, 2003.

LARSON, A.; WAKET, D. B.; YANEVT, K. P. MEASURING GENE FLOW AMONG POPULATIONS HAVING HIGH LEVELS OF GENETIC FRAGMENTATION HE importance of gene flow as a factor maintaining phenotypic cohesion. **Genetics**, v. 1984, n. 106, p. 293–308, 1984.

LOUGHEED, S. C. et al. Ridges and rivers : a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (Epipedobates femoralis). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, p. 1829–1835, 1999.

LOWE, W. H. Linking dispersal to local population dynamics: A case study using a headwater salamander system. **Ecology**, v. 84, n. 8, p. 2145–2154, 2003.

MAIA, G. F.; LIMA, A. P.; KAEFER, I. L. Not just the river: genes, shapes, and sounds reveal population-structured diversification in the Amazonian frog Allobates tapajos (Dendrobatoidea). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 20, n. February, p. 1–14, 2017.

MCCARTNEY-MELSTAD, E.; SHAFFER, H. B. Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 20, p. 5084–5109, 2015.

MCRAE, B. H. Isolation by resistance. Evolution, v. 08, n. 8, p. 27–29, 2006.

MONSEN, K. J.; BLOUIN, M. S. Extreme isolation by distance in a montane frog Rana cascadae. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 6, p. 827–835, 2004.

MORESCO, R. M. et al. The pioneering use of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) in Neotropical anurans : preliminary assessment of genetic diversity in populations of Physalaemus cuvieri (Amphibia, Leiuperidae). p. 53–57, 2013.

NOONAN, B. P.; GAUCHER, P. Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog Dendrobates tinctorius. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4425–4435, 2006.

NORONHA, J. DA C. DE; RODRIGUES, D. DE J. Reproductive behaviour of the glass frog Hyalinobatrachium cappellei (Anura: Centrolenidae) in the Southern Amazon. Journal of Natural History, v. 52, n. 3–4, p. 207–224, 2018.

OLIVEIRA, M. DE et al. Daily Movement and Microhabitat Use by the Blacksmith Treefrog Hypsiboas faber (Anura: Hylidae) during the Breeding Season in a Subtemperate Forest of Southern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 11, n. 2, p. 89–97, 2016.

ORTIZ, D. A.; LIMA, A. P.; WERNECK, F. P. Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. **Evolutionary Ecology**, 2018.

RODRÍGUEZ, A. et al. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 765–785, 2015.

SANTORELLI, S.; MAGNUSSON, W. E.; DEUS, C. P. Most species are not limited by an Amazonian river postulated to be a border between endemism areas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2294, 2018.

SEGELBACHER, G. et al. Applications of landscape genetics in conservation biology: Concepts and challenges. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 375–385, 2010.

SHAFFER, H. B. et al. The molecular phylogenetics of endangerment: Cryptic variation and historical phylogeography of the California tiger salamander, Ambystoma californiense. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 10, p. 3033–3049, 2004.

SIMÕES, P. I. et al. The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (Allobates femoralis). **Tropical Conservation Science**, v. 7, n. 4, p. 811–828, 2014.

SINSCH, U. Migration and orientation in anuran amphibians. Ethology Ecology and Evolution, v. 2, n. 1, p. 65–79, 1990.

SMITH, M. A.; GREEN, D. M. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? **Ecography**, v. 28, n. 1, p. 110–128, 2005.

SPEAR, S. F. et al. Landscape genetics of the blotched tiger salamander (Ambystoma tigrinum melanostictum). **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2553–2564, 2005.

STORFER, A. et al. Landscape genetics: Where are we now? **Molecular Ecology**, v. 19, n. 17, p. 3496–3514, 2010.

TOBLER, U.; GARNER, T. W. J.; SCHMIDT, B. R. Genetic attributes of midwife toad (Alytes obstetricans) populations do not correlate with degree of species decline. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 9, p. 2806–2819, 2013.

TOGAWA, R. C. et al. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in Musa acuminata35th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil: [s.n.].

VAN BOCXLAER, I. et al. Gradual Adaptation Toward a Range-Expansion Phenotype Initiated the Global Radiation of Toads. **Science**, v. 327, p. 679–682, 2010.

VIEITES, D. R.; NIETO-ROMAN, S.; WAKE, D. B. Reconstruction of the climate envelopes of salamanders and their evolution through time. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences, v. 106, n. Supplement_2, p. 19715–19722, 2009.

XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720–1728, 2013.

ZAINUDIN, R. et al. Genetic structure of Hylarana erythraea (Amphibia: Anura: Ranidae) from Malaysia. **Zoological Studies**, v. 49, n. 5, p. 688–702, 2010.

ZAMUDIO, K. R.; WIECZOREK, A. M. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (Ambystoma maculatum) breeding populations. p. 257–274, 2007.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T. J. C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, v. 101, n. 2, p. 109–119, 2008.

ZINK, R. M.; BLACKWELL-RAGO, R. C.; RONQUIST, F. The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1442, p. 497–503, 2000.

3.6 IMAGES

Table 3-1 Genetic diversity indexes calculated for the population clusters of the Boana calcarata species based on the mtDNA D-loop.

Demes	n	S	Η	Hd ± SD	$\pi \pm SD$	D	Fs
Pop	27	42	9	0.72 ± 0.00751	0.02516 ± 0.00501	1.63938	7.611*
P01	5	6	4	0.90 ± 0.1610	0.003963 ± 0.002963	-0.66823	-0.56745
P03	5	1	2	0.40 ± 0.2373	0.000610 ± 0.000775	-0.81650	0.09021
P04	5	1	2	0.60 ± 0.1753	0.000915 ± 0.001002	1.22474	0.62615
P06	5	0	1	0 ± 0	0 ± 0	0	0
RM	2	0	2	0 ± 0	0.007610 ± 0.008337	0	0
PJ	5	2	2	0.40 ± 0.2373	0.001218 ± 0.001213	-0.97256	1.04042

Table 3-2 Genetic diversity indexes calculated for the population groups of the species Boana fasciata based on the mtDNA D-loop.

Demes	n	S	H	Hd ± SD	$\pi \pm SD$	D	Fs
Pop	37	31	16	0.94 ± 0.00041	0.01302 ± 0.00204	0.38276	-0.510
P03	5	0	1	0 ± 0	0 ± 0	0	0
P04	6	5	3	0.80 ± 0.1217	0.004885 ± 0.003382	1.21883	1.94878
P06	6	6	5	0.93 ± 0.1217	0.005802 ± 0.003918	1.39170	-0.83934
P12	3	0	1	0 ± 0	0 ± 0	0	0
I02	5	27	3	0.70 ± 0.2184	0.022561 ± 0.014277	0.71356	1.04128

RM	6	26	4	0.87 ± 0.1291	0.020763 ± 0.012590	4.74724	3.26669
PJ	6	4	4	0.80 ± 0.1721	0.002036 ± 0.001683	-1.29503	-1.25217

Table 3-3 Genetic diversity indexes calculated for population groups of the species Boana punctata based on mtDNA D-loop.

Demes	n	S	H	Hd ± SD	$\pi \pm DP$	D	Fs
Pop	35	5	5	0.77±0.00117	0.00276	1.25606	1.202
P02	5	3	3	0.70 ± 0.2184	0.002765 ± 0.002220	-0.17475	0.46900
P07	5	3	3	0.80± 0.1640	0.003379 ± 0.002604	0.69900	0.80363
P08	5	4	4	0.90 ± 0.1610	0.003687 ± 0.002796	0.27345	-0.70118
LM	5	0	2	0.60 ± 0.1753	0.000922 ± 0.001010	0	0.62615
I01	5	4	2	0.60 ± 0.1753	0.003687 ± 0.002796	1.64070	3.02249
I04	5	2	3	0.80 ± 0.1640	0.002151 ± 0.001830	-0.97256	0.06069
105	5	3	3	0.80 ± 0.1640	0.002151 ± 0.001830	-0.17475	0.06069

Definition of acronyms: Pop = total population; P01 = point 01, P03 = point 03, P04 = point 04, P06 = point 06 are located on the farm, RM = right margin of the river Juruena; JP = Japuranã point. n = sample number, S = segregating sites, H = haplotype number, Hd = haplotypes diversity, SD = standard deviation, π = nucleotide diversity, D = Tajima D test and Fs = Fu Fs test; * = p <0.01.

Table 3-4 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) between sequences of the D-loop region of mtDNA of three species of the genus Boana in different geographic groupings.

Source of variation	Percentage of variation					
bource of variation	B. calcarata	B. fasciata	B. punctata			
Among populations	94.59	42.28	21.26			
Within Population	5.41	57.72	78.74			
Índice de fixação	0.95	0.42	0.21			
(Fst global)	0.95	0.42	0.21			

** Valor de p < 0.01.

Table 3-5 Paired FST fixation indices (lower left matrix) and mean genetic distances of Kimura 2 parameters (upper right matrix) among populations of B. calcarata.

P1	P3	P4	P6	MD	PJ

P01	0.00	0.002	0.003	0.002	0.063	0.063
P03	0.06	0.00	0.001	0.00	0.064	0.064
P04	0.11	0.16	0.00	0.001	0.064	0.063
P06	0.07	0.00	0.25	0.00	0.064	0.064
RM	0.95*	0.99*	0.99*	1.00*	0.00	0.005
JP	0.96**	0.99**	0.98**	0.99**	0.81*	0.00

Table 3-6 Paired FST fixation rates (left lower matrix) and mean genetic distances of Kimura 2 parameters (upper right matrix) among populations of B. fasciata.

	P03	P04	P06	P12	I02	MD	PJ
P03	0.00	0.006	0.005	0.002	0.023	0.017	0.010
P04	0.63*	0.00	0.005	0.005	0.023	0.016	0.010
P06	0.51*	-0.03	0.00	0.006	0.024	0.017	0.009
P12	1*	0.44	0.45	0.00	0.022	0.016	0.011
I02	0.54**	0.46**	0.46**	0.40*	0.00	0.020	0.024
RM	0.38**	0.24**	0.27**	0.21	-0.02	0.00	0.017
JP	0.88**	0.69**	0.62**	0.87**	0.55**	0.35**	0.00

Table 3-7 Paired FST fixation indices (left lower matrix) and mean genetic distances of Kimura 2 parameters (upper right matrix) among populations of B. punctata.

	P2	P7	P8	ME	I1	I4	I5
P2	0.00	0.002	0.002	0.001	0.004	0.002	0.003
P7	-0.06	0.00	0.002	0.002	0.004	0.002	0.003
P8	-0.17	-0.15	0.00	0.002	0.004	0.002	0.003
LM	0.03	0.33	0.18	0.00	0.003	0.003	0.003
I01	0.17	0.24	0.12	0.38*	0.00	0.005	0.003
I04	0.22	-0.07	0.01	0.60**	0.45*	0.00	0.003
I05	0.22	0.13	0.12	0.58*	0.15	0.44*	0.00

Fst (matriz inferior esquerda) e distâncias Kimura (matriz superior direita). * p < 0.05; ** p < 0.01



Figure 3-1 Map of study area located in the Juruena River and São Nicolau Farm domains located in the municipality of Cotriguaçu and Japuranã in Nova Bandeirantes, Mato Grosso, Brazil. Collection points identified with circles, triangle and squares.



(a) B. calcarata









Figure 3-2 Bayesian analysis of the population structure in 25 (a, B. calcarata), 26 (b, B. fasciata) and 35 (c, B. punctata) sequences of Boana D-loop mtDNA at farm sites (P1 to P8), islands (Island 01, 04 and 05), where JP = Japuranã Point and LM = Left margin.

(a) B. calcarata









Figure 3-3 Haplotype network for species of the genus Boana. The lattice was constructed from 25 (a), 26 (b) and 35 (c) D'loop sequences. The size and color of each ellipse indicate the frequency and geographical origin of individuals with this haplotype. The black dots represent intermediate haplotypes and the crossbars represent the mutational processes.

CAPÍTULO IV

4 POPULAÇÕES DE PERERECAS (*Boana*) DA AMAZÔNIA MERIDIONAL SE ESTRUTURAM LONGITUDINALMENTE

Jonatha Edson de Paula Lima^{1,2}, Rafaela Maria Moresco³, Vladimir Pavan Margarido^{3,4}, Domingos de Jesus Rodrigues^{1,2}

¹Universidade Federal de Mato Grosso, Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

²Universidade Federal de Mato Grosso, Núcleo de Estudos em Biodiversidade da Amazônia Mato-grossense – NEBAM, Sinop, Mato Grosso, Brazil.

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Cascavel, Paraná, Brazil.

⁴Universidade Estadual de Maringá, Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá, Paraná, Brazil

Corresponding author: e-mail: Vladimir.Margarido@unioeste.br; Tel.: +55 45 3220-3235; Fax: +55 45 3224-4566;

4.1 INTRODUÇÃO

A distribuição biogeográfica de populações e espécies pode ser modelada por características como bacias, rios, cumes, estradas, biomas, ecótipos florestais (FUNK et al., 2005; GARDA; CANNATELLA, 2007; LEITE; ROGERS, 2013; MURPHY et al., 2010; ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018; SOUZA; RODRIGUES; COHN-HAFT, 2013; VAN BUSKIRK, 2012). Algumas dessas características (especialmente as flutuações climáticas, cadeias de montanhas e grandes rios amazônicos, reconhecidamente importantes para a biogeografia de anfíbios, são compartilhadas com múltiplos *taxa* (ZEISSET; BEEBEE, 2008). A topografia heterogênea pode restringir a vagilidade de anfíbios e produzir uma subdivisão populacional acentuada, possivelmente padrões de radiação adaptativa ou padrões de isolamento e potencialmente altas taxas de especiação (HOORN et al., 2010). Até o ano passado nenhum estudo havia avaliado a importância de múltiplos cenários moldando os padrões atuais da composição de espécies de anfíbios ao longo da Amazônia, assim um estudo testou várias hipóteses: clima contemporâneo, variação climática do Pleistoceno, topografia, estrutura da vegetação e barreira fluvial (GODINHO; DA SILVA, 2018).

HOLT et al., (2013) identificaram 20 regiões zoogeográficas distintas, agrupadas em 11 reinos maiores e OLSON e colaboradores (2001) subdividiram o mundo terrestre em 14 biomas e oito reinos biogeográficos, aninhados dentro destes estão 867 ecorregiões. Embora essas unidades biogeográficas sejam organizadas categoricamente nenhuma estrutura biogeográfica padrão foi modelada para todos os *taxa* (HOLT et al., 2013; OLSON, 2001). A maior contribuição para explicar a variabilidade nas regiões biogeográficas de anuros foi dos principais rios da Amazônia, segundo as variáveis climáticas e terceiro a topografia (GODINHO; DA SILVA, 2018). O que sabemos é que a estrutura genética exibida por populações de organismos, contida na biogeografia, em diferentes escalas espaciais difere radicalmente entre as espécies (RODRÍGUEZ et al., 2015). Entretanto ao passo que se aglomeram dados genéticos de vários grupos taxonômicos e ferramentas estatísticas robustas são desenvolvidas, a filogeografia se destaca por agregar diversos campos da biologia evolutiva e por abordar os processos que geraram a distribuição da biodiversidade manifesta (HICKERSON et al. 2010).

A filogeografia de anfíbios tem sido amplamente estudada nas últimas duas décadas (BEDDEK, 2018; COSTA LEONORA P., 2003; DITCHFIELD, 2000; HOORN et al., 2010; LEACHÉ; CREWS; HICKERSON, 2007). Entretanto uma das demandas

pendentes na ecologia poderá ser desvendada quando um número pequeno de padrões filogeográficos globais explicar a distribuição da maioria da biota mundial, nomeando a importância relativa dos processos históricos e as interações específicas das espécies na estruturação de comunidades biológicas e a diversidade genética dentro delas (ZEISSET; BEEBEE, 2008). Estudos futuros podem revelar se os padrões de distribuição dos anuros nos vários continentes são característicos de outros tipos de abordagens terrestres e de baixa mobilidade.

Os anfíbios são organismos que exibem um modelo clássico de uma estrutura filogeográfica profunda do tipo I (*árvores profundas de haplótipos que são estruturadas geograficamente*), ao que tudo indica devido à sua capacidade de dispersão relativamente baixa (AVISE, 2009; RODRÍGUEZ et al., 2015). Essa estruturação filogeográfica frequentemente forte nos anfíbios (Avise 2000), pode ser explicada na maioria das vezes porque as espécies desse grupo são profundamente filopátricos e com dispersão modesta (BLAUSTEIN; WAKE; SOUSA, 1994), isso se deve à tolerância osmótica e dessecação limitada (BALINSKY, 1981). Tudo isso torna as espécies de anuros bem estruturadas filogeneticamente, com haplogrupos mitocondriais particulares que caracterizam a maioria das subpopulações territoriais (VENCES et al., 2005). Por outro lado, alguns anfíbios são conhecidos por terem a capacidade de superar (transpor) barreiras oceânicas (VENCES et al., 2004).

Por outro lado, a hipótese do gradiente (ENDLER, 1977) recebeu consideravelmente menos atenção na filogeografia amazônica (ver revisões em MORITZ et al. 2000; LEITE e ROGERS 2013). Esta hipótese prevê a estruturação parapátrica das populações ao longo de um clone geográfico ou ambiental contínuo (ENDLER 1977); portanto, envolvendo potencial de fluxo gênico entre populações divergentes (MORITZ et al., 2000). Sob esse cenário, as populações diferenciam-se seguindo um modelo de isolamento por distância, muitas vezes facilitado pela adaptação ecológica das populações a ambientes adjacentes, mas diferentes (ENDLER, 1977; NOSIL, 2012).

Ao contribuir com padrões temporais e geográficos de diversidade nos estudos filogeográficos é possível discernir entre algumas das hipóteses de diversificação. Especialmente na região amazônica que sofre cada vez mais desmatamento, é fundamental investigar padrões para apontar os fatores (agentes) de diversificação inter e intraespecífica e a origem da biodiversidade de anuros (ELMER; DÁVILA; LOUGHEED, 2007). Uma abordagem biogeográfica regionalizada contribui para a compreender se os processos que influenciam a distribuição de espécies são determinados
por barreiras físicas, oscilações climáticas passadas ou atuais ou histórias evolutivas compartilhadas (FICETOLA; MAZEL; THUILLER, 2017; HOLT et al., 2013; KREFT; JETZ, 2010).

Estudos de amostragem hierárquica incluindo populações amostradas em diferentes escalas espaciais são necessários para inferir padrões de fluxo genético e para categorizar a escala geográfica na qual o fluxo gênico ocorre (MONSENY e BLOUIN, 2004).

Na Amazônia, uma região tropical megadiversa, suas populações naturais são especialmente desconhecidas, onde muitas vezes limites das espécies estão claramente definidos, a extensão e a forma da estrutura espacial das relações genealogicas intraespecíficas permanecem majoritariamente incompletas (KAEFER et al., 2013). Neste trabalho objetivamos particularizar as respostas multiespecíficas, mesoescala, de pererecas à características orográficas, distância euclidiana e rios da Amazônia sul moldando as distribuições de anuros. A hipótese é que, mesmo pertencendo ao mesmo gênero, cada espécie responde de maneira diferente aos atributos ambientais e geográficos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

A região estudada pertence ao bioma amazônico, onde a área de captura em Cotriguaçu está situada na ecorregião Floreta Úmida Madeira-Tapajós (FUMT), o sítio de coleta em Sinop está na Floresta Seca Tropical do Mato Grosso (FSTMT) e as áreas pertencentes ao Cristalino e Juara/Nova Bandeirantes estão situadas em zonas de transição entre as ecorregiões FUMT e FSTMT (Dinerstein et al., 2017). Toda a área de captura se encontra inclusa na bacia amazônica, e próximos ao limite das sub-bacias Madeira (15) e Tapajós (17) estão todos os sítios ocidentais, os sítios orientais estão localizados na zona de transição entre as sub-bacias 17 e Xingu e Paru (18). Segundo a classificação climática de Köppen, o clima das áreas é do tipo Aw - clima tropical com estação seca no inverno, com exceção para o sítio em Cotriguaçu que pertence à classificação Am - clima de monção.

Amostragem

As áreas de coleta selecionadas foram a Fazenda São Nicolau no munícipio de Cotrituaçu (COT), total 35 indivíduos (B. punctata) distribuídos em sete pontos; dois pontos localizados em Nova Bandeirantes: um no distrito de Japuranã (JAP) e outro na margem direita do rio Juruena (JRM) onde coletamos respectivamente seis e sete exemplares de B. geographica; um ponto na divisa entre o os municípios de Juara e Nova Bandeirantes (JNB), capturamos cinco representantes da espécie B. albopuncata; no município de Nova Monte Verde (NMV) também foram capturados cinco exemplares de B. abopunctata; já na região de Sinop (OPS) foram coletados exemplares de duas espécies (B. puntata (5) e B. albopunctata (5)); por fim, a área com mais espécies foi o Parque Estadual Cristalino (PEC) (localidade de Novo Mundo), com B. punctata (5), B. albopunctata (5) e B. geographica (13 distribuídos por dois pontos). Todas as áreas pertencem ao território da unidade federativa do Mato Grosso. Os métodos de buscas, para captura manual dos exemplares, foram visuais e auditivos e realizados no período noturno (7:00 pm as 11:00 pm). O limite que divide as localidades de Nova Bandeirantes e Cotriguaçu é o rio Juruena, nisto observamos que a espécie B. geographica é encontrada apenas na margem direita do rio. As espécies *B. punctata* e *B. albopuncta* estão na grande maioria das vezes associadas a áreas antrópicas, sendo a última bastante comum em beira de estradas e autoestradas, ambiente bastante degradado. Foram retiradas amostras de fígado desses espécimes para extração de DNA, esses tecidos foram mantidos em etanol 100%.

Processamento de amostras

Extraímos o DNA total usando o kit GenElute ™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Buchs, SG, Suíça), seguindo as recomendações do fabricante. Quantificamos o DNA em um espectrofotômetro NanoK (Kasvi).

Utilizamos os primers IP-H Control e Wrev-L Control - ambos descritos por (GOEBEL; DONNELLY; ATZ, 1999) - para amplificar o D-Loop mitocondrial. A solução reacional conteve 1x reação tampão de PCR (Promega), 3 mM de MgCl2, 4,6 mM de dNTP, 0,6 mM de cada iniciador, 2 U de DNA polimerase Taq (Promega) e 10 ng do ADN. Fizemos a PCR em um termociclador sob as seguintes condições: 1 min a 94 ° C, seguido por 36 ciclos de 94 ° C (1 min), 48 ° C (40 s) e 72 ° C (1 min e 30 s) e depois uma extensão final de 7 min a 72 ° C. Carregámos o produto de PCR final num gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio. Purificamos os produtos de PCR usando o sistema Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, enviamos as

amostras para o Centro de Pesquisa do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, em São Paulo, onde foram sequenciados os mesmos primers utilizados na amplificação. *Análise de sequencias*

Obtivemos a sequência de consenso para cada amostra no software Electropherogram Quality Analysis (TOGAWA et al., 2006). Utilizamos BIOEDIT (HALL, 1999) para editar as sequências e MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) para alinhá-las e confirmar os sítios polimórficos, afinidades haplotípicas e diversidade de nucleotídeos (π). Na DnaSP fazemos os haplótipos e sua diversidade (Hd) foi calculada.

Verificamos a saturação de substituições em DAMBE (XIA, 2013), e selecionamos o melhor modelo de substituição de nucleotídeos em MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), baseado no Akaike Information Criterion (AIC). Analisamos o índice de fixação molecular (Fst), π de demes, teste de neutralidade [Tajima's D (TAJIMA, 1989)] e Fu's Fs (FU, 1997)] em ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) com o significância sendo testada por 20.000 permutações. Dividimos a variação genética em níveis intra e interpopulacionais para a AMOVA, também em ARLEQUIN v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Estimamos a diferenciação genética pareada entre locais baseada no modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980) no programa MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Nós estimamos as relações genéticas entre amostras individuais em relação às suas populações de origem, através de uma rede de haplótipos TCS produzida pelo programa PopART (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). Utilizamos o BAPS v 6.0 (CORANDER et al., 2013) para identificar agrupamentos genéticos discretos no conjunto de dados, com o número mais provável de grupos genéticos formados pelas sequências sendo inferidos por uma análise Bayesiana da estrutura populacional. A estatística bayesiana utiliza o algoritmo Monte Carlo da cadeia de Markov e fornece uma estrutura de inferência que calcula as distribuições de probabilidade para os parâmetros de interesse, usando distribuições prévias desses parâmetros, atualizadas de acordo com os dados empíricos (SEGELBACHER et al., 2010). A fim de verificar a relação entre as distâncias euclidiana e genética, além do IBD, o teste estatístico de Mantel baseado na correlação de Pearson foi realizado no software R com o pacote Vegan (R Core Team 2017).

4.3 RESULTADOS

B. punctata

Após a edição e o alinhamento das sequências, ao final do alinhamento foram obtidos 652 pares de base para *B. punctata* e apenas três pares de base não foram utilizados na análise, obtivemos 596 sítios invariáveis (monomórficos) e 53 sítios variáveis (polimórficos). A composição percentual de nucleotídeos foi 13,40% de citosina, 35,39% de timina, 32,73% de adenina e 20,49% de guanina, gerando 12 haplótipos no software DNASP6. Onde os 45 exemplares geraram oito haplótipos em COT; em OPS apresentaram dois haplótipos; cada indivíduo de PEC apresentou um haplótipo diferente. A diversidade de nucleotídeos foi baixa para todos as populações de *B. punctata*, e a diversidade haplotípica foi máxima para a população do PEC e baixa para OPS (Tab. 4.1). O resultado do teste de Mantel foi r = 0,9085 (p = 0.01), quando consideramos todos os demes COT apenas uma população, não houve isolamento significativo por distância e (r = 0.5468; p = 0.16667).

A porcentagem de variação foi interpopulacional foi de 95.35%, e intrapopulacional foi de 4.65%, o Fst global foi 0.95. O índice de diferenciação par a par demonstrou alto índice de fixação entre as populações, e a distância genética também foi de aproximadamente 7% entre COT e OPS/PEC. A rede de haplótipos foi bem estruturada e a análise bayesiana agrupou PEC e OPS, e segregou COT.

B. albopunctata

Nessa espécie foram gerados 664 pares de base, desse total, sete não foram utilizados, 521 sítios se apresentaram monomórficos e 136 sítios polimórficos. Gerou 14 haplótipos e os percentuais de nucleotídeos foram 11,37% de citosina, 35,22% de timina, 33,49% de adenina e 19,93% de guanina. Nesse caso, cada uns dos cinco espécimes do PEC apresentaram um haplótipo diferente; o mesmo ocorreu com a população de OPS; população de NMV revelou três haplótipos diferentes; já os indivíduos de JNB revelaram apenas dois haplótipos. As populações de NMV e JNB, separadas por aproximadamente 105 km, compartilharam um haplogrupo. A diversidade de haplótipos na população de *B. albopunctata* foi o valor máximo no PEC e em OPS, e alta para NMV (Tab. 3.3), a diversidade de nucleotídeos foi bastante elevada na população do PEC, e alta para OPS e NMV. Embora houve compartilhamento de haplótipos entre as populações de NMV e JNB, separadas por 105 km, cada espécime de PEC e OPS apresentou haplótipo exclusivo. Encontramos isolamento por distância significativo (r = 0.9064; p < 0.05). A

variação molecular entre as populações foi de 71.98% e a variação molecular dentro das populações foi de 28.02. O índice de fixação global foi de 0.72.

B. geographica

Obtivemos 660 pares de base (5 pares de base não utilizados), gerando 644 sítios monomórficos e onze sítios polimórficos. A composição de nucleotídeos foi 11.78% de citosina, 38.83% de timina, 32.41% de adenina e 16.98% de guanina, e obtivemos oito haplótipos no DNASP6. Nessa espécie, em JAP dois exemplares apresentaram dois haplótipos diferentes; os quatro espécimes de OPS geraram dois haplótipos; no PEC 13 indivíduos apresentaram cinco haplótipos; já os sete exemplares da população JMD apresentaram quatro haplótipos. Houve um grande haplogrupo que apresentou representantes tanto da população do PEC quanto de OPS, esse compartilhamento de haplótipos é muito surpreendente, visto que essas áreas estão separadas por aproximadamente 265 km.

Em *B. geographica* a diversidade de haplótipos foi elevada para JAP e JMD (sendo que o primeiro possui apenas dois indivíduos). A diversidade de nucleotídeos foi baixa para todos o demes. Os testes de crescimento populacional (D e Fs) não foram significativos tanto para as populações em conjunto quanto consideradas separadas (Tab. 4.5). Considerando a distância entre as populações, a porcentagem de variação interpopulacional foi bastante baixa (25.43%), entre os grupos foi de 20.03 %, e entre as populações dentro dos grupos foi muito alta (54.53%) dentro das populações, e o índice de fixação global foi 0.45.

A rede revelou três grandes haplogrupos e um desse haplogrupos compartilharam OPS e PEC, e um foi compartilhado por indivíduos de JAP e JRM (Fig. 4.5). Agrupamento Bayesiano revelou compartilhamento de características entre PEC e OPS e entre JRM (o último já era esperado), porém surpreendentemente alguns indivíduos do local JRM se agruparam com PEC e OPS (Fig. 4.6). O teste de Mantel para verificar o isolamento por distância foi r = 0.7706 (p < 0.017)

4.4 DISCUSSÃO

Obtivemos três cenários diferentes com relação a estrutura populacional dos organismos estudados, sendo que cada espécie apresentou um quadro exclusivo. *Boana geographica* apresentou uma rede haplotípica pouco estruturada, com poucos haplótipos (8) e haplogrupos compartilhados por populações de PEC e OPS (~264 km); JAP e JRM

(~15 km), além de que o agrupamento Bayesiano revelou agrupamento de JRM com PEC e OPS. Apesar da distância geográfica, as variações genéticas intra e interpopulacional que indicam baixa estrutura genética. O rio explicou o agrupamento, e a correlação entre a distância genética e a distância euclidiana foi significativa. Estudos abordando o efeito do rio como parte na estruturação de populações de anuros amazônicos indicam que grandes rios como o Amazonas podem não sinalizam barreira (KAEFER et al., 2013); ou opostamente, a variabilidade genética pode ser fortemente particionada pelos sistemas fluviais (SIMÕES et al., 2014).

A rede haplotípica de B. punctata foi bem estruturada correspondendo a localização geográfica (Mantel 0,9085), as populações de OPS e PEC foram mais relacionadas que OPS e COT, embora a distância de PEC e os outros dois pontos é a mesma (~260 km para ambos) (Fig. 4.1). A população de COT ficou bastante isolada das outras duas populações, talvez isso seja devido a presença de dois rios (Juruena e Teles Pires) que estejam exercendo efeito isolante, ou pelo menos afetando a permeabilidade do fluxo gênico. Visto que as populações de PEC e OPS se agruparam e tiveram menor diferenciação genética, e a população de COT foi isolada dessas outras duas (Fig. 4.2) sugerindo que a última praticamente fixou alelos diferentes. Quando utilizamos os sete demes de COT independentemente, comparamos as distâncias (genética e geográfica) com PEC e OPS, os resultados indicaram alta correlação; quando unimos todos os demes e consideramos COT apenas uma população, novamente calculamos a correlação de genética e geográfica, os resultados foram bastante diferentes, onde essa correlação foi média e não significativa. Em escala regional, a distância geográfica surge várias vezes como maior contribuinte para a diferenciação genética entre populações (RICE et al., 2016; WANG, 2013). Essa correlação significativamente positiva entre distâncias geográficas e genéticas, na maioria dos sistemas de estudo anuros da Floresta Amazônica, indica o papel fundamental dos processos estocásticos no processo de diversificação evolutiva do marcador molecular em questão (KAEFER et al., 2013).

Em *B. albopunctata*, as populações de NMV e JNB se agruparam e as outras populações (PEC e OPS) segregaram. A rede de haplótipos foi estruturada, porém as relações genealógicas não foram relacionadas com a distância geográfica, apresentando haplogrupos compartilhados entre locais distantes (> 100 km) e diferentes haplogrupos no mesmo local. Observe na figura 4.4 que nenhum indivíduo de OPS compartilhou haplótipos com seus simpátricos, porém não revelaram a alta diferenciação genética como nos representantes de PEC. Os agrupamentos genéticos de *A. nidicola* e *A. masniger*

foram bem definidos, onde seis populações corresponderam a aglomerados completamente segregados (KAEFER et al., 2013). Para uma assembleia de anuros do alto rio Madeira, o rio exerceu um efeito significativo como barreira e, os lados do rio possuem variáveis ambientais estruturantes diferentes as assembleias destes sapos. Na referida área de estudo, essa mesma pesquisa revelou que tanto fatores ambientais quanto elementos históricos moldam a ocorrência e distribuição de espécies (DIAS-TERCEIRO et al., 2015).

A população de PEC está separada de OPS e COT pela mesma distância geográfica (~260km), além disso, PEC e COT estão na mesmo quadrante geográfico e sua localização aparentemente está muito mais inserida no domínio amazônico do que OPS. Apesar disso, as áreas onde se situam o Parque Estadual Cristalino e o município de Sinop compartilham muito mais elementos do que se espera: (1) estão inseridas na mesma ecorregião (Floresta tropical seca do Mato Grosso); (2) dividem a mesma subbacia (Tapajós); (3) estão na margem direita do rio Teles Pires compartilhando o mesmo interflúvio. Supomos que o clima não pareceu estar relacionado com os níveis diferenciação genética, pois PEC e COT pertencem a mesma classificação climática (Am). Já os tipos de sub-bacias e ecorregião parecem ter uma, ainda que não comprovada, relação com a diferenciação genética e variação molecular. Pois em duas espécies (B. punctata e B. geographica), as localidades de PEC e OPS a frequência de alelos foi além do esperado. Tanto que indivíduos de B. geographica pertencentes à sítios separados por 260 km partilharam o mesmo haplogrupo. Em todas as espécies, os locais que estão próximos da fronteira entre as sub-bacias 15 e 17 apresentaram diferenciação genética significativa em relação aos sítios ocidentais. Em anuros amazônicos, as maiores porcentagens de variância na distribuição das regiões biogeográficas foram explicadas por rios (1^{a}) , pelas variáveis climáticas (2^{a}) e topográficas (3^{a}) , respectivamente (GODINHO; DA SILVA, 2018). A espécie B. albopuctata apresentou populações bastante isoladas entre os locais PEC, OPS e NMV/JNB, ressaltando que nesse modelo apenas NMV e JNB apresentaram o mesmo haplogrupo, se agruparam geneticamente e a sua diferenciação genética foi moderada.

GODINHO e DA SILVA (2018) mostraram que múltiplos fatores moldam as regiões biogeográficas de anuros na Amazônia, neste estudo descobriu que os principais rios da Amazônia explicam profundamente a variabilidade de anuros nas regiões biogeográficas. Entretanto, o efeito de ecótonos se somam a barreiras ribeirinhas e são bastante efetivos na estrutura populacional de *O. taurinus*, ao contrário da distância (ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018). As pererecas de COT e PEC/OPS tiveram pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas, os altos índices de fixação entre as regiões e par-apar reflete muitas gerações de evolução independente. No entanto, o Fst elevado pode ser gerado em uma fina escala espacial (SQUIRE; NEWMAN, 2002 - 5 a 10 km, LIMA et al., *no prelo* - 10 a 20 km) com fluxo gênico em andamento.

Os processos evolutivos e ecológicos implícitos às distribuições atuais podem ser representados pela estrutura da regionalização biogeográfica (Godinho e da Silva, 2018). DEGNER et al. (2010) indicou que *P. ornata* foi historicamente difundida no sudeste dos Estados Unidos, e que um equilíbrio entre deriva genética e migração foi a raiz da divergência genética entre as populações. Pois em seus resultados os clados estudados não foram delimitados por barreiras filogeográficas típicas. Longe disso, o isolamento pela distância foi responsável pelo padrão de variação genética observado.

As espécies de anfíbios generalistas na maioria das vezes apresentam pouco ou nenhuma estrutura filogeográfica (CARNAVAL; BATES, 2007); os anfíbios que se reproduzem em água lêntica (FOUQUET et al., 2007)(VENCES e WAKE, 2007) e vivem em áreas abertas (MAKOWSKY et al. 2009) também apresentam essa desestruturação (RODRÍGUEZ et al., 2015). Descobertas recentes anunciam que a principal influência da divergência genética são a complexidade topográfica e o tipo de macrohabitat (estratificação vegetal), os autores sugerem a estrutura filogeográfica em anuros tropicais é determinada, de forma relevante, pelos preditores ecológicos. Além disso, anuros especialistas em florestas tendem a ter uma estrutura genética mais acentuada do que espécies de habitat aberto (Rodriguez, 2015). Embora as três espécies do nosso estudo sejam conhecidamente de área aberta, foram encontradas tanto em ambiente antropizado aberto (lagoas artificiais, cidades, margem de estradas e rodovias) quanto em ambientes altamente preservados (córregos de Unidades de Conservação e margem intacta de rios). Isso mostra como alguns anuros podem ser oportunistas e nos impede de traçar um panorama comparativo de espécies de área aberta/fechada.

Embora as quebras filogeográficas estejam geralmente atreladas à pressão duradoura de barreiras ao fluxo gênico. Alguns estudos mostram que, mesmo não havendo barreiras ao fluxo gênico, rupturas filogeográficas profundas podem compor uma espécie continuamente distribuída. Nesses eventos as rupturas filogeográficas aumentam proporcionalmente à medida que a padrão de dispersão dos indivíduos e o tamanho populacional decrescem (IRWIN, 2002).

Os rios e fatores ambientais moldando a estrutura populacional em assembleia de pequenos anuros diurnos de serrapilheira já estão bem supridos de estudos tanto com marcadores moleculares (KAEFER et al., 2013; LOUGHEED et al., 1999; NOONAN; GAUCHER, 2006) quanto com modelos estatísticos complexos (DIAS-TERCEIRO et al., 2015) Porém comprovações desses fatores na formatação da estrutura de populações de hilídeos começou trazer novas descobertas recentemente (ORTIZ; LIMA; WERNECK, 2018; LIMA et al., no prelo).

Visto que as características importantes para a biogeografia de anfíbios são compartilhadas a muitos outros *taxa* (ZEISSET; BEEBEE, 2008). E nossos resultados indicam que os interflúvios afetam na estruturação das populações de *Boana* mais que outros fatores de paisagem, fornecemos uma importante contribuição para estudos biogeográficos futuros na Amazônia Meridional.

4.5 **BIBLIOGRAFIA**

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, n. 1, p. 60–71, 1994.

CARNAVAL, A. C.; BATES, J. M. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. **Evolution**, v. 61, n. 12, p. 2942–2957, 2007.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

CORANDER, J. et al. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v 6.0. **Bioinformatics**, p. 1–28, 2013.

COSTA LEONORA P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71–86, 2003.

DEGNER, J. F. et al. Fat frogs, mobile genes: unexpected phylogeographic patterns for the ornate chorus frog (Pseudacris ornata). **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2501–2515, 2010.

DIAS-TERCEIRO, R. G. et al. A Matter of Scale : Historical and Environmental Factors Structure Anuran Assemblages from the Upper Madeira River , Amazonia. v. 47, n. 2, p. 259–266, 2015.

DITCHFIELD, A. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA Molecular Ecology, p. 1307–1318, 2000.

ELMER, K. R.; DÁVILA, J. A.; LOUGHEED, S. C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaflitter frog, Eleutherodactylus ockendeni. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 1–14, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FICETOLA, G. F.; MAZEL, F.; THUILLER, W. Global determinants of zoogeographical boundaries. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1–7, 2017.

FOUQUET, A. et al. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, 2007.

FUNK, W. C. et al. Population structure of Columbia spotted frogs (Rana luteiventris) is strongly affected by the landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 483–496, 2005.

GARDA, A. A.; CANNATELLA, D. C. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 104–114, 2007.

GODINHO, M. B. D. C.; DA SILVA, F. R. The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

GOEBEL, A. M.; DONNELLY, J. M.; ATZ, M. E. PCR Primers and Amplification Methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochromebin Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 163–199, 1999.

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

HOLT, B. G. et al. An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. Science, v. 339, n. January, p. 74–79, 2013.

HOORN, C. et al. Amazonia Through Time : Andean. **Science**, v. 330, n. November, p. 927–931, 2010.

IRWIN, D. Phylogeographic breaks without geograpic barriers to gene flow. **Evolution**, v. 56, n. 12, p. 2383–2394, 2002.

KAEFER, I. L. et al. The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. **Evolutionary Biology**, v. 40, n. 2, p. 228–245, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KREFT, H.; JETZ, W. A framework for delineating biogeographical regions based on species distributions. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 11, p. 2029–2053, 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LEACHÉ, A. D.; CREWS, S. C.; HICKERSON, M. J. Two waves of diversification in mammals and reptiles of Baja California revealed by hierarchical Bayesian analysis. **Biology Letters**, v. 3, n. 6, p. 646–650, 2007.

LEITE, R. N.; ROGERS, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: Insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 13, n. 4, p. 639–664, 2013.

LOUGHEED, S. C. et al. Ridges and rivers : a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (Epipedobates femoralis). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 266, p. 1829–1835, 1999.

MORITZ, C. et al. DIVERSIFICATION OF RAINFOREST F AUNAS: An Integrated Molecular Approach. 2000.

MURPHY, M. A. et al. Landscape genetics of high mountain frog metapopulations. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 17, p. 3634–3649, 2010.

NOONAN, B. P.; GAUCHER, P. Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog Dendrobates tinctorius. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4425–4435, 2006.

ORTIZ, D. A.; LIMA, A. P.; WERNECK, F. P. Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. **Evolutionary Ecology**, 2018.

RICE, A. M. et al. Population differentiation at a regional scale in spadefoot toads: Contributions of distance and divergent selective environments. **Current Zoology**, v. 62, n. 2, p. 193–206, 2016.

RODRÍGUEZ, A. et al. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 5, p. 765–785, 2015.

SEGELBACHER, G. et al. Applications of landscape genetics in conservation biology: Concepts and challenges. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 375–385, 2010.

SIMÕES, P. I. et al. The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (Allobates

femoralis). Tropical Conservation Science, v. 7, n. 4, p. 811–828, 2014.

SOUZA, S. M.; RODRIGUES, M. T.; COHN-HAFT, M. Are Amazonia Rivers Biogeographic Barriers for Lizards? A Study on the Geographic Variation of the Spectacled Lizard Leposoma osvaldoi Avila-Pires (Squamata, Gymnophthalmidae). **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 3, p. 511–519, 2013.

SQUIRE, T.; NEWMAN, R. A. Fine-Scale Population Structure in the Wood Frog (Rana Sylvatica) in a Northern Woodland. **Herpetologica**, v. 58, n. 1, p. 119–130, 2002.

TOGAWA, R. C. et al. The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in Musa acuminata35th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil: [s.n.].

VAN BUSKIRK, J. Permeability of the landscape matrix between amphibian breeding sites. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 12, p. 3160–3167, 2012.

VENCES, M. et al. High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 2, p. 295–307, 2004.

VENCES, M. et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in zoology, v. 2, p. 5, 2005.

WANG, I. J. Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation : a multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. **The Society for the Study of Evolution**, v. 67, n. 12, p. 3403–3411, 2013.

XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720–1728, 2013.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T. J. C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, v. 101, n. 2, p. 109–119, 2008.

IMAGENS

Demes	n	S	Η	Hd ± SD	$\pi \pm SD$	D	Fs
POP	45	53	15	0.857 ± 0.028	$0.02538 \pm 0,00454$	1.26089	8.521*
COT	35	6	8	$0.8588 {\pm} 0.0317$	0.003315 ± 0.002095	1.25606	-0.74254
OPS	5	1	2	0.4000 ± 0.2373	0.000614 ± 0.000781	-0.81650	0.09021
PEC	5	5	5	1 ± 0.1265	0.003379 ± 0.002604	-0.56199	-2.8620**

Tabela 4-1. Índices de diversidade genética calculados para as populações da espécie *Boana punctata* com base no DNAmt D-loop.

Definição das siglas: POP = população total, COT = área do município de Cotriguaçu, OPS = área do município de Sinop, PEC = área do Parque Estadual Cristalino, n = número amostral, S = sítios segregantes, H = número de haplótipos, Hd = diversidade de haplótipos, SD = desvio padrão, π = diversidade nucleotídica, D = teste D de Tajima e Fs = teste Fs de Fu. * = p < 0,01.

Tabela 4-2. Índices de fixação FST emparelhados (matriz inferior esquerda) e distâncias genéticas médias de Kimura 2 parâmetros (matriz superior direita) entre populações de *B. punctata.*

	СОТ	PEC	OPS
СОТ	0.00	0.071*	0.068*
PEC	0.95307**	0.00	0.012*
OPS	0.95586**	0.83750*	0.00

* p < 0.01; ** p < 0.001;



Figura 4-1. Rede haplotípica de *Boana punctata*. A rede foi construída a partir de 45 sequências de D'loop, o tamanho e a cor de cada círculo indicam a frequência e a origem geográfica dos indivíduos desse haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos intermediários e as barras transversais os processos mutacionais.



Figura 4-2. Análise bayesiana da estrutura populacional em 45 exemplares de *B. punctata*. Sequências de DNAmt D-loop em pontos onde PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop, COT = área do município de Cotriguaçu.

Tabela 4-3. Índices de diversidade genética calculados para as populações da espécie *Boana albopunctata* com base no mtDNA D-loop.

Demes	n	S	H	$Hd \pm SD$	$\pi \pm SD$	D	Fs
POP	20	119	14	0.937 ± 0.043	0.06670 ± 0.00750	0.10293	3.330
PEC	5	87	5	1.0000 ± 0.1265	0.060935 ± 0.037516	-0.23619	1.31031
OPS	5	20	5	1.0000 ± 0.1265	0.015129 ± 0.009765	0.30802	-0.33819
NMV	5	21	3	0.8000 ± 0.1640	0.015408 ± 0.009934	0.22656	3.84934
JNB	5	4	2	0.6000±0.1753	0.003636 ± 0.002757	1.64070	3.02249

Definição das siglas: POP = população total, PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop, NMV = área no município de Nova Monte Verde, JNB = áreas entre os municípios de Juara e Nova Bandeirantes, n = número amostral, S = sítios segregantes, H = número de haplótipos, Hd = diversidade de haplótipos, SD = desvio padrão, π = diversidade nucleotídica, D = teste D de Tajima e Fs = teste Fs de Fu. * = p < 0,01.

Tabela 4-4. Índices de fixação FST emparelhados (matriz inferior esquerda) e distâncias genéticas médias de Kimura 2 parâmetros (matriz superior direita) entre populações de *B. albopunctata*.

	PEC	OPS	NMV	JNB
PEC	0.00	0.120**	0.104**	0.105**
OPS	0.66507**	0.00	0.094**	0.094**
NMV	0.62662**	0.83122**	0.00	0.010**
JNB	0.68585**	0.89569**	0.07353	0.00

* p < 0.05** p < 0.01



Figura 4-3. Rede haplotípica de *Boana albopunctata*. A rede foi construída a partir de 20 sequências de D'loop, o tamanho e a cor de cada círculo indicam a frequência e a origem geográfica dos indivíduos desse haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos intermediários e as barras transversais os processos mutacionais.



Figura 4-4. Análise bayesiana da estrutura populacional em 20 exemplares de *B. albopunctata.* Sequências de DNAmt D-loop em pontos onde PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop = área do município de Cotriguaçu, NMV = área no município de Nova Monte Verde, JNB = áreas entre os municípios de Juara e Nova Bandeirantes.

Tabela 4-5. Índices de diversidade genética calculados para as populações da espécie *Boana geographica* com base no mtDNA D-loop.

Demes	n	S	Η	$Hd \pm SD$	$\pi \pm SD$	D	Fs
POP	26	11	10	0.849 ± 0.042	$0.00359 \pm 0,00047$	-0.61318	-1.031
PEC_S	3	3	2	0.6667 ± 0.3143	0.003049 ± 0.00287	0	1.60944
PEC_PR	10	5	3	0.6444 ± 0.1012	0.002608 ± 0.001876	-0.12777	1.60724

OPS	4	2	2	0.6667 ± 0.2041	0.002033 ± 0.001866	1.89306	1.52981
JAP	2	2	2	1.0000 ± 0.5000	0.003053 ± 0.003740	0	0.69315
JRM	7	6	4	0.8095 ± 0.1298	0.003030 ± 0.002215	0.20619	-0.13194

Definição das siglas: POP = população total, PEC_S = ponto Sede na área do Parque Estadual Cristalino, PEC_PR = ponto da Lagoa do Paraná na área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop, JAP = área no distrito de Japuranã no município de Nova Bandeirantes, JRM = área da margem direita do rio Juruena no município de Nova Bandeirantes, n = número amostral, S = sítios segregantes, H = número de haplótipos, Hd = diversidade de haplótipos, SD = desvio padrão, π = diversidade nucleotídica, D = teste D de Tajima e Fs = teste Fs de Fu. * = p < 0,01.

Tabela 4-6. Índices de fixação FST emparelhados (matriz inferior esquerda) e distâncias genéticas médias de Kimura 2 parâmetros (matriz superior direita) entre populações de *B. geographica*.

	PEC_S	PEC_PR	OPS	JAP	JRM
PEC_S	0.00	0.003**	0.003**	0.005**	0.004**
PEC_PR	0.13752	0.00	0.004**	0.005**	0.005**
OPS	0.18644	0.31606*	0.00	0.005**	0.004**
JAP	0.50000	0.59040*	0.61905	0.00	0.002**
JRM	0.39130**	0.48739**	0.47045**	0.36364	0.00

* p < 0.05** p < 0.01



Figura 4-5. Rede haplotípica de *Boana geographica*. A rede foi construída a partir de 26 sequências de D'loop, o tamanho e a cor de cada círculo indicam a frequência e a origem

geográfica dos indivíduos desse haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos intermediários e as barras transversais os processos mutacionais.



Figura 4-6. Análise bayesiana da estrutura populacional em 26 exemplares de *B. geographica.* Sequências de DNAmt D-loop em pontos onde PEC = área do Parque Estadual Cristalino, OPS = área do município de Sinop, JAP = área no distrito de Japuranã no município de Nova Bandeirantes, JRM = área da margem direita do rio Juruena no município de Nova Bandeirantes.

ANEXOS



Capítulo 17

5 Herpetofauna da Estação Ecológica Rio Ronuro

Domingos J. Rodrigues^{1, 2,3}; Janaina C. Noronha ^{1,2,3}; Marcelo M. Lima²; Jonatha E. P. Lima^{1,2,3}; Ana P. M. Zopeletto¹; Alexandre N. Farias; Fabrício H. Oda⁴, Robson Moreira², Samuel F. Anjos^{1,5}; Marcos Penhacek^{1,2}.

¹Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. Núcleo de Estudos em Biodiversidade da Amazônia Matogrossense – NEBAM. *Campus* Universitário de Sinop. Av. Alexandre Ferronato 1200, Setor Industrial, CEP: 78557- 267. Sinop, MT

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica – INCT-CENBAM/CNPq/MCTI.

 ³Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociências, Doutorado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade. Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Boa Esperança.CEP: 78060-900. Cuiabá, MT, Brasil.
⁴Universidade Regional do Cariri, Laboratório de Zoologia, Rua Coronel Antônio Luiz 1161, Pimenta, CEP: 63105-000. Crato, CE.

⁵Universidade Federal de Mato Grosso, ICNHS, Mestrado em Ciências Ambientais. Av. Alexandre Ferronato 1200, Setor Industrial, CEP: 78557-267. Sinop, MT.

E-mail: djmingo23@gmail.com

Resumo: A Estação Ecológica (ESEC) Rio Ronuro está localizada no bioma Amazônia, na ecorregião de florestas secas tropicais de Mato Grosso, próximo ao ecótono Cerrado/Amazônia. A ESEC Rio Ronuro possui uma área de 102.000 (ha) e está situada em uma região considerada como prioritária pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) para a conservação da biodiversidade, principalmente anfíbios e répteis. Neste estudo, apresentamos a lista de espécies de anfíbios e répteis registradas na área da ESEC Rio Ronuro e seu entorno. Amostramos 12 pontos na ESEC Rio Ronuro e mais quatro áreas próximas à ESEC. Nossas amostragens incluíram métodos de armadilhas de interceptação e queda (*pitfall-traps*), procura visual e auditiva, encontros ocasionais, e revisão de literatura sobre a herpetofauna da área estudada. Registramos 32 espécies de anfíbios, sendo 31 da ordem anura e um da ordem Gymnophiona e 26 espécies de répteis durante as amostragens. Embora esta riqueza seja ainda baixa para os padrões amazônicos, com este trabalho elevamos de nove para 58 o número de espécies da herpetofauna nesta região. Nossos resultados indicam ainda, que se empregado um adequado esforço amostral, inventariando todos os habitas disponíveis, a diversidade da região poderá aumentar, visto que os estudos herpetofaunísticos são excassos na região.

5.1 Introdução

A herpetofauna é constituída por vertebrados das Classes Amphibia e Reptilia, os quais estão distribuídos pelas mais variadas ecorregiões mundiais, exceto nos polos. O Brasil tem a mais diversificada riqueza de anfíbios no mundo, contendo ao menos 1080 espécies, distribuídas em 1039 espécies de anuros, cinco espécies de caudata e 36 gymnophionas (Segalla *et al.* 2016). Temos a terceira maior riqueza de répteis do planeta, com ao menos 773 espécies, que inclui 36 quelônios, seis crocodilianos, 266 lagartos, 392 serpentes e 73 anfisbenas (Bernarde, 2012; Costa & Bérnils 2015; Uetz e Hošek 2015).

A herpetofauna da Amazônia brasileira inclui atualmente 247 espécies de anfíbios e 273 espécies de répteis (Avila-Pires et al. 2007; Frost 2018). Essa rica herpetofauna apresenta elevado grau de endemismos, dos quais 82% dos anfíbios e 62% dos répteis são endêmicos (Duellman 1999; Avila-Pires *et al.* 2007). Há grandes lacunas de amostragem na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007; Rodrigues *et al.*, 2013; 2015), que estão relacionadas ao seu extenso complexo heterogêneo de fitofisionomias formado por florestas de terra firme, florestas secas, matas de cipós, florestas inundáveis e floresta de igapó (SEMA 2009). Nos últimos anos, novas espécies de anfíbios foram descritas para a região amazônica nos últimos anos, resultado da amostragem de novas áreas por meio da ampliação do sistema de amostragem padronizada da fauna e flora do Programa de Pesquisa em Biodiversidade – PPBio (por ex. Gordo *et al.* 2013; Simões *et al.* 2013; Haga *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018; Ferrão *et al.*, 2018). Essas novas descobertas denotam importantes avanços no conhecimento da biodiversidade amazônica, a qual tem sido fortemente afetada pelo avanço do desmatamento.

O combate ao desmatamento bem como a ampliação e fortalecimento da fiscalização nas áreas de proteção, constituem as principais estratégias para garantir a conservação da biodiversidade. Além disso, a criação de novas Unidades de Conservação (UCs) tem um papel crucial na proteção da biodiversidade, por serem instrumentos eficazes para reverter e/ou conter o avanço do desmatamento local e regional (Dos Santos *et al.*, 2006; Paiva, 2017). No sul do Pará e norte de Mato Grosso foram criadas novas UCs, estabelecendo o corredor de conservação Teles Pires/Tapajós (Laurent *et al.*, 2006).

O Estado de Mato Grosso apresenta 4,6% de seu território protegido por 42 UCs, que somam 41 mil km² (Santos *et al.*, 2006). Desse total, 30,8 mil km² correspondem a 35 UCs de proteção integral e 10,2 mil km² a 7 UCs de uso sustentável. O governo federal administra 6 UCs de proteção integral e 1 de uso sustentável, enquanto o governo estadual gerencia 29 UCs de proteção integral e 6 de uso sustentável (Dos Santos *et al.*, 2006). Entre as UCs localizadas no norte do estado de Mato Grosso, apenas o Parque Estadual do Cristalino (PEC) possui um levantamento sistemático da diversidade de anfíbios e répteis (Rodrigues et al. 2015). O Parque Nacional do Juruena possui plano de manejo, mas sem o estudo da herpetofauna. A Estação Ecológica Rio Ronuro (ESEC) possui apenas inventários que foram realizados para a sua criação (CEPEMAR, 1998).

A ESEC do Rio Ronuro está localizada no bioma Amazônico, na ecorregião de florestas secas tropicais, uma zona de contato dos biomas Cerrado-Amazônia no estado de Mato Grosso. A região é considerada uma área prioritária para a conservação de anfíbios e répteis (MMA, 2002). Neste capítulo, apresentamos uma lista de espécies da herpetofauna da ESEC Rio Ronuro, que foi comparada com a composição de espécies de outras localidades amostradas na região amazônica. Também apresentamos informações sobre o uso do habitat e o status de conservação das espécies.

5.2 Material e Métodos

Área de Estudo

A ESEC Rio Ronuro está localizada no município de Nova Ubiratã, na porção central do estado Mato Grosso (13°05'55.01"S e 54°26'37.04"O; Fig. 1). A vegetação original na ESEC tem característica de transição entre Floresta Ombrófila e Floresta Estacional Semidecidual submontana (CEMEPAR, 1998). Espécies típicas do bioma Amazônia, como *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Castanheira), *Swietenia macrophylla* King. (Mogno), e *Mesilaurus itauba* Meissn (Itaúba) são frequentemente encontradas em toda a área da ESEC (Mais detalhes nos capítulos 1 e 8).

O solo encontrado na ESEC Rio Ronuro é neossolo quartzênicos e argissolo vermelho-amarelo (CEMEPAR, 1998). O clima na região é classificado como tipo Am no sistema de classificação climática de Köppen, um clima quente e úmido, com chuvas do tipo monçônico, uma transição entre o clima equatorial super-úmido (Af) da Amazônia e o tropical úmido (Aw) do Planalto Central (Alvares *et al.* 2014). A ESEC Rio Ronuro apresenta duas estações bem definidas, a chuvosa, que ocorre de outubro a maio e concentra 80% do volume de chuva; e a seca, que ocorre de junho a setembro. A temperatura média anual é de 25 °C e a precipitação anual varia de 2.000 a 2.500 mm (SEMA 2009).



Figura 1. Mapa da Estação Ecológica Rio Ronuro com a distribuição dos pontos de amostragem da herpetofauna (Fonte Celso A. Souza).

Figure 1. Map of Ronuro River Ecological Station showing the distribution of herpetofauna sampling points (By Celso A. Souza).

Coletas dos anfíbios e répteis

Foram realizadas quatro campanhas com duração média de seis dias, abrangendo períodos de seca e chuva, entre julho de 2016 e junho de 2017. O inventário da herpetofauna foi realizado por meio de buscas diurnas (das 08:00 - 16:00h; Fig. 2) e noturnas (das 18:30 - 23:30h; Fig. 3). Cada ponto de amostragem foi inventariado, por no mínimo, duas pessoas, as quais vistoriaram diferentes tipos de microambientes terrestres e aquáticos, tais como cavidades de árvores, troncos caídos, serrapilheira, vegetação, buracos no solo e corpos d'água. Os métodos de busca visual (*visual encounter surveys*, com uso de lanterna de cabeça) e auditiva foram usados para detectar os anuros a noite (Crump & Scott 1994; Zimmerman 1994). O método de busca visual (com o auxílio de gancho e pinção) foi usado para detectar lagartos e serpentes em todos os microambientes acessíveis (Crump & Scott 1994; Martins & Oliveira 1998).



Figura 2. Amostragem de anfíbios e répteis diurnos que vivem na serapilheira na margem de córregos. Figure 2. Sampling of diurnal amphibians and reptiles residing in the leaf litter of river banks.



Figura 3. Amostragem de anfíbios e répteis noturnos. Figure 3. Sampling of nocturnal amphibians and reptiles.

Armadilhas de interceptação e queda (*pitfall traps with drift-fences*; Heyer *et al.* 1994) foram instaladas em dois pontos de amostragem. Cada grupo de armadilhas de queda foi constituído por 4 baldes de 60 litros enterrados a cada 10 m no formato de Y. Os baldes foram ligados por uma cerca-guia de plástico de 50 cm de altura e enterrada 10 cm no solo. Os baldes ficaram, em média, seis dias abertos por campanha e foram vistoriados diariamente (Fig. 4).



Figura 4. Instalação das armadilhas de interceptação e queda na ESEC Rio Ronuro. Figure 4. Pitfall trap installation at Ronuro River ESEC.

Alguns espécimes de répteis e de anfíbios foram coletados, anestesiados com solução injetável de xilocaína a 5%, fixados em formalina a 10%, conservados em álcool 70%, e depositados na Coleção Zoológica de Referência da Universidade Federal de Mato Grosso, no *campus* de Sinop, MT (ABAM-H). Os anfíbios visualizados e/ou ouvidos foram identificados com base em suas características morfológicas e do canto através de literatura e sites especializado (por exemplo, De La Riva *et al.* 2000; Faivovich *et al.* 2005; Grant *et al.* 2006; Lima *et al.* 2006; Frost 2006; Amphibiaweb 2017). Os répteis foram identificados usando a literatura (Avila-Pires 1995; Martins & Oliveira 1988; Vitt *et al.* 2008; Fraga *et al.* 2013; Uetz 2015).

Dados secundários obtidos através de revisão de literatura foram utilizados para compor a lista de espécies para a ESEC Rio Ronuro. Porém, o relatório incluído (Estudo ecológico rápido para a criação e implantação de Unidade de Conservação do Rio Ronuro), abrangeu uma área de amostragem maior que o presente estudo. O estado de conservação de cada espécie foi definido conforme a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (Status IUCN: União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) e foram definidas como menor preocupação (LC), dados insuficientes (ID), vulnerável (VU) e não avaliado (NA).

5.3 Resultados e Discussão

Na ESEC Rio Ronuro e seu entorno (zona de amortecimento) foram identificadas 58 spécies. Para os anfíbios, registramos 32 espécies distribuídas em 18 gêneros e 7 famílias, incluindo 31 anuros e uma Gymnophiona (*Siphonops annulatus*). A família com a maior riqueza de espécies foi Hylidae (13 espécies), seguida por Leptodactylidae (10 espécies); Bufonidae e Mycrohylidae (3 espécies cada), Phyllomedusidae, Craugastoridae e Siphonopidae (uma espécie cada) (Tabela 1).

Tabela 1. Lista das espécies de anfíbios registradas na ESEC Rio Ronuro. Uso do habitat: Floresta e/ou Área Aberta. Fonte dos dados: presente estudo (1); CEPEMAR, 1998 (2). Status de conservação (critérios da IUCN): menor preocupação (LC), dados insuficientes (ID), vulnerável (VU) e não avaliado (NA).

Table 1. List of amphibian species recorded at Ronuro River ESEC. Habitat use: Forest and/or Open Area. Data source: present study (1); CEPEMAR, 1998 (2). Conservation status (IUCN criteria): least concern (LC), insufficient data (ID), vulnerable (VU) and not assessed (NA).

Ecnédics/Spacies	Fitofisio Phytophys	Fonte/	Status IUCN/	
Especies/species	Floresta/ Forest	Área Aberta/ Open area	Source	IUCN Status
ANURA				
Bufonidae				
Rhaebo guttatus (Schneider, 1799)		Х	1	LC
Rhinella schneideri (Werner, 1894)		Х	1	LC
Rhinella marina (Linnaeus, 1758)		Х	1	LC
Craugastoridae				
Pristimantis sp.	Х	Х	2	NA
Hylidae				
Dendropsophus minutus (Peters, 1872)		Х	1	LC
Dendropsophus sp.		Х	1	NA
Dryaderces sp.	Х		1	NA

Boana albopunctata (Spix, 1824)		Х	1	LC
Boana boans (Linnaeus, 1758)	Х		1	LC
Boana cinerascens (Spix, 1824)		Х	1	LC
Boana geographica (Spix, 1824)	Х	Х	1	LC
Osteocephalus leprieurii (Duméril & Bibron, 1841)	Х		1	LC
Osteocephalus taurinus Steindachner, 1862	Х		1	LC
Scinax garbei (Miranda-Ribeiro, 1926)	Х	Х	1	LC
Scinax nasicus (Cope, 1862)		Х	1	LC
Scinax ruber (Laurenti, 1768)		Х	1	LC
Trachycephalus coriaceus (Peters, 1867)	Х		1	LC
Leptodactylidae				
Adenomera andreae (Müller, 1923)	Х	Х	1	LC
Leptodactylus cf. chaquensis (Cei, 1950)		Х	1	LC
Leptodactylus fuscus (Schneider, 1799)		Х	1	LC
Leptodactylus knudseni Heyer, 1972	Х		1	LC
Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)		Х	1	LC
Leptodactylus mystaceus (Spix, 1824)	Х		1	LC
Leptodactylus pentadactylus (Laurenti, 1768)	Х		1	LC
Leptodactylus petersii (Steindachner, 1864)	Х		1	LC
Leptodactylus rhodomystax Boulenger, 1884	Х		1	LC
Physalaemus centralis Bokermann, 1962	Х		1	LC
Mycrohylidae				
Elachistocleis sp.	Х		1	NA
Chiasmocleis sp.		Х	1,2	NA
Ctenophryne geayi (Mocquard, 1904)	Х		1;2	LC
Phyllomedusidae				
Phyllomedusa vaillanti (Boulenger, 1882)		Х	1	NA
GYMNOPHIONA				
Siphonopidae				
Siphonops annulatus (Mikan, 1820)	Х		1	LC
Total espécies/ Total species	18	18		

Registramos 26 espécies de répteis pertencentes a 23 gêneros e 14 famílias, incluindo três quelônios, quatro crocodilianos, sete lagartos, duas anfisbenas e 10 serpentes. As famílias com maior número de espécies foram Alligatoridae e Teidae (quatro espécies cada), seguidas por Boidae (três espécies), Podocnemididae, Amphisbaemidae, Dipsadidae e Viperidae (duas espécies cada), Chelidae, Mabuyidae, Iguanidae, Gymophthalmidae, Aniliidae, Colubridae e Elapidae (uma espécie cada) (Tabela 2).

Tabela 2. Lista das espécies de répteis registradas na ESEC Rio Ronuro. Uso do habitat: Floresta e/ou Área Aberta. Fonte de dados: presente estudo (1); CEPEMAR, 1998 (2). Status de conservação (critérios da

IUCN): menor preocupação (LC), dados insuficientes (ID), vulnerável (VU) e não avaliado (NA). *Espécies que sofreram alterações taxonômicas.

Table 2. List of reptile species recorded at Ronuro River ESEC. Habitat use: Forest and/or Open Area. Data source: present study (1); CEPEMAR, 1998 (2). Conservation status (IUCN criteria): least concern (LC), insufficient data (ID), vulnerable (VU) and not assessed (NA). * Species that underwent taxonomic change.

	Fitofisonomia/ Phytophysiognomy			Status
Família/Espécie Family/Species	Floresta/Forest	Área Aberta/Open area	Fonte/ Source	IUCN/ IUCN Status
TESTUDINES				
Chelidae				
Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812)		Х	2	NA
Podocnemididae				
Podocnemis expansa (Schweigger, 1812)		Х	2	LC
Podocnemis unifilis (Troschel, 1848)	Х		1	VU
CROCODYLIA				
Alligatoridae				
Caiman c. crocodilus (Linnaeus, 1758)			2	LC
Melanosuchus niger (Spix, 1825)			2	NA
Paleosuchus trigonatus (Schneider, 1801)	Х		1	LC
Paleosuchus palpebrosus (Cuvier, 1807)	Х		2	LC
SQUAMATA				
Mabuyidae				
Copeoglossum nigropunctatum (Spix, 1825)	Х	Х	1,2	LC
Iguanidae				
Iguana iguana iguana (Linnaeus, 1758)	Х		1	NA
Gymnophthalmidae				
Bachia cf. flavescens (Bonnaterre, 1789)	Х		1	LC
Teiidae				
Ameiva ameiva ameiva (Linnaeus, 1758)		Х	1,2	NA
Kentropyx calcarata Spix, 1825	Х	Х	1	NA
Salvator merianae (Duméril & Bilbron, 1839)	Х		1	LC
Tupinambis teguixin (Linnaeus, 1758)	Х		1	LC
Amphisbaenidae				
Amphisbaena alba (Linnaeus, 1758)	Х		1	LC
Amphisbaena cf. vermicularis Wagler in Spix, 1824			2	NA
Aniliidae				
Anilius scytale (Linnaeus, 1758)	Х		1	NA
Boidae				
Boa constrictor (Linnaeus 1758)	Х	Х	1	NA
Corallus hortulanus (Linnaeus, 1758)	Х		1	LC
Eunectes murinus (Linnaeus, 1758)	Х		1	NA
Colubridae				
Spilotes pullatus (Linnaeus, 1758)	Х		1	NA
Dipsadidae				

Х		1	NA
Х		1	LC
Х		1	LC
Х		1	NA
Х		1	NA
20	6		
	X X X X X 20	X X X X X 20 6	X 1 X 1 X 1 X 1 X 1 X 1 X 1 X 1 X 1

A riqueza de espécies da herpetofauna da ESEC Rio Ronuro é menor do que em outras localidades no domínio Amazônico: Reserva Ducke, AM (153 espécies; Lima et al. 2006; Vitt et al. 2008; Fraga et al. 2013), Baixo Rio Purus, AM (160 espécies; Waldez et al. 2013), Caxiuanã, PA (144 espécies; Bernardi et al. 2002; Prudente e Santos-Costa 2005), Volta Grande do Xingu, PA (259 espécies; Vaz-Silva et al. 2015), Espigão do Oeste, RO (132 espécies; Bernarde 2007; Macedo et al. 2008), Alto Juruá, AC (245 espécies; Bernarde et al. 2011) e Reserva Extrativista Riozinho da Liberdade, AC (162 espécies; Bernarde et al. 2011). Na Amazônia mato-grossense outras localidades também mostram maior riqueza do que a ESEC (Fig. 5): Aripuanã e Juruena (80 e 72 espécies, respectivamente; Camargo, 2011), porção noroeste do Parque Estadual do Cristalino (142 espécies; Rodrigues et al. 2015), e Fazenda São Nicolau (168 espécies; Kawashita-Ribeiro et al. 2013; Noronha et al. 2015). A riqueza da herpetofauna da ESEC não é tão expressiva como nas localidades supracitadas. Entretanto, o número de espécies registradas na região passou de nove para 58 com a realização das campanhas de amostragem deste estudo, indicando que outras espécies poderão ser registradas na ESEC com o inventário de novas áreas e o aumento do esforço amostral.

Table 3. Locations of the Mato Grosso Amazon with the greatest amphibian and reptile species richness. Only studies with information on the two groups amphibians and reptiles cited. Locations of PPBio plots installed in bold.

Localidade/ Location	Número de espécies/ Number of Species	Fonte/ Source
Fazenda São Nicolau/ São Nicolau Farm	168	Rodrigues et al., 2013; Kawashita-Ribeiro et al., 2013
Parque Estadual Cristalino/ Cristalino State Park	142	Rodrigues et al., 2015
Aripuanã	80	Camargo, 2011

Tabela 3. Locais da Amazônia mato-grossense com a maior riqueza de espécies de anfíbios e répteis. Citados apenas os estudos com informação dos dois grupos anfíbios e répteis. Em negrito os locais onde estão instalados plots do PPBio.

Juruena	72	Camargo, 2011
Cláudia/Sinop	130	Carvalho, 2006; Dados PPBio; Jensen, 2010

101



Figura 5. Distribuição dos estudos herpetofaunísticos na Amazônia mato-grossense. A numeração dentro dos círculos representa o número de espécies. Referência: círculos amarelos: Camargo 2011; círculo azul: Rodrigues *et al.* 2013; círculo cinza: Ávila & Kawashita-Ribeiro 2010; círculo vermelho: Rodrigues et al. 2015; círculo rosa: presente estudo. Foram incluídos apenas trabalhos que abrangeram amostragens de anfíbios e répteis concomitantemente.

Figure 5. Distribution of herpetofaunistic studies in the Mato Grosso Amazon. The number within the circles represents the number of species. Reference: yellow circles: Camargo 2011; blue circle: Rodrigues *et al.* 2013; gray circle: Ávila & Kawashita-Ribeiro 2010; red circle: Rodrigues et al. 2015; pink circle: present study. Only papers covering amphibian and reptile samples were included.

Das 58 espécies registradas na ESEC Ronuro, 19 não possuem informações na base de dados da IUCN. Essa falta de informação sobre o status de conservação de algumas espécies da herpetofauna registrada é preocupante pois isso torna difícil a tomada de decisões, já que é necessário planejamentos pontuais de conservação de espécies que podem desaparecer antes de serem conhecidas pela ciência.

A herpetofauna da ESEC Rio Ronuro é composta por espécies predominantemente do Bioma Amazônico, mas espécies do Bioma Cerrado também estão presentes. Estudos feitos na Amazônia mostram que há uma divisão clara nas comunidades, principalmente de anfíbios, pois as características estruturais do ambiente definem sua distribuição espacial. Por exemplo, algumas espécies registradas são exclusivas de lagoas e lagos, enquanto outras são encontradas apenas em riachos perenes. A esec Rio Ronuro possui um grande mosaico de ambientes que são recursos chaves para a presença de sua rica herpetofauna, já que são organismos que necessitam de micro-habitats específicos para reprodução (Bell & Donnelly 2006).

O estudo da herpetofauna amazônica é imprescindível, pois esse bioma vem sofrendo uma acelerada perda de habitat nessa região, que está situada no "arco do desmatamento". Atividades agropecuárias, madeireiras e a construção de estradas e usinas hidrelétricas ameaçam áreas florestadas nesse local (Ávila & Kawashita-Ribeiro 2011). Portanto, se faz necessário conhecer a biodiversidade, pois a presença de determinadas espécies podem ser objetos de estudo que poderão subsidiar planos de conservação. Vale ressaltar que os anfíbios são sensíveis a alterações ambientais e tem sido reconhecido como indicadores de qualidade ambiental (Lima *et al.*, 2006).

A elaboração de uma lista oficial de espécies da herpetofauna, mostrando a presença de novas ocorrências e até possivelmente de novas espécies, dá ensejo a novas pesquisas com ecologia e a atenção merecida a essa área megadiversa e localizada nessa região de transição Amazônia - Cerrado.

Agradecimentos

Chapter 17 Herpetofauna of Ronuro River Ecological Station

Abstract: Ronuro River Ecological Station (ESEC) is located within the Amazon biome, in the tropical dry forest ecoregion of Mato Grosso near the Cerrado-Amazon Ecotone. Ronuro River ESEC has an area of 102,000 ha and is located in a region considered a priority by the Ministry of the Environment (MMA) for the conservation of biodiversity, primarily amphibians and reptiles. In this study, we present the list of amphibian and reptile species recorded in the Ronuro River ESEC area and its surrounds. We sampled 12 points throughout Ronuro River ESEC and four areas in proximity to the ESEC. Our sampling methods included pitfall traps, visual and auditory survey, random encounters, and literature review of herpetofauna in the study area. We recorded 32 species of amphibians; 31 from the order Anura and one from the order Gymnophiona, as well as 26 reptile species during the surveys. Despite the species richness recorded, the numbers are low in comparison to other similar surveys performed within the Amazon. This study increased the known number of herpetofauna species for this region from nine to 58. Our results also indicate that if

Agradecemos aos alunos da UFMT pelo suporte nas atividades de campo. A SEMA pelo apoio financeiro através do FUNBIO e ARPA e permissão para acessar a área de estudo. À UFMT pelo suporte logístico. Ao ICMBio e Sisbio pela licença de coleta nº 30034-1.

an adequate sampling effort were to be employed, surveying all available habitats, the recorded diversity of the region may increase, as herpetofaunistic studies are rare in this region.

Introduction

Herpetofauna consists of vertebrates of the Classes Amphibia and Reptilia, which are distributed throughout the most varied ecoregions worldwide, with the exception of the polar regions. Brazil has the most diverse amphibian richness in the world, possessing at least 1080 species, distributed in 1039 anurans, five caudata species and 36 gymnophionas (Segalla *et al.* 2016). Brazil also has the third highest amount of reptile species on the planet, with at least 773 species, including 36 chelonians, six crocodilians, 266 lizards, 392 snakes and 73 amphibians (Bernarde, 2012; Costa & Bérnils 2015; Uetz e Hošek 2015).

The herpetofauna of the Brazilian Amazon currently includes 247 species of amphibians and 273 species of reptiles (Avila-Pires et al. 2007; Frost 2018). This rich herpetofauna has a high degree of endemism, of which 82% of amphibians and 62% of reptiles are endemic (Duellman 1999; Avila-Pires *et al.* 2007). There are large sampling gaps in the Brazilian Amazon (Avila-Pires *et al.* 2007; Rodrigues *et al.*, 2013; 2015) which are related to its extensive heterogeneous complex of phytophysiognomies formed by terra firme forests, dry forests, seasonal decidual forests, flooded forests and swamp forests (SEMA 2009). In recent years, new species of amphibians have been described for the Amazon region as a result of sampling new areas through the expansion of the Biodiversity Research Program's (PPBio) standardized sampling system for fauna and flora (e.g. Gordo *et al.* 2013; Simões *et al.* 2013; Haga *et al.* 2017; Simões *et al.*, 2018; Ferrão *et al.*, 2018). These new discoveries denote important advances in the knowledge of Amazonian biodiversity, which has been heavily affected by the advance of deforestation.

The fight against deforestation, as well as the implementation and strengthening of monitoring in protected areas, are the principal strategies in guaranteeing the conservation of biodiversity. In addition, the creation of new Conservation Units (CUs) has played a crucial role in the protection of biodiversity, as they are effective instruments in the reversing and/or containment of advancing local and regional deforestation (Dos Santos *et al.*, 2006; Paiva, 2017). In southern Pará and northern Mato Grosso, new CUs were created, establishing the Teles Pires/Tapajós conservation corridor (Laurent *et al.*, 2006).

The State of Mato Grosso currently has 4.6% of its total territory protected by 42 CUs totaling 41,000 km² (Santos *et al.*, 2006). Of this, 30,800 km² is allocated to 35 full protection CUs, and 10,200 km² to 7 sustaianable use CUs. The federal government administers 6 full protection CUs and 1 sustainable use CU, while the state government manages 29 full protection CUs and 6 sustainable use CUs (Dos Santos *et al.*, 2006). Among the CUs located in northern Mato Grosso, only Cristalino State Park (PEC) has a systematic survey of amphibians and reptiles (Rodrigues et al. 2015). A management plan exists for the Juruena National Park, but does not include the study of herpetofauna. The Ronuro River Ecological Station (ESEC) has only baseline surveys that were performed at its inception (CEPEMAR, 1998).

Ronuro River ESEC is located within the Amazon biome in an ecoregion of tropical dry forests, situated within the ecotone of the Cerrado-Amazon biomes in the state of Mato Grosso. The region is considered an area of priority for the conservation of amphibians and reptiles (MMA, 2002). In this chapter, we present a list of herpetofauna species from Ronuro River ESEC, which was compared to species compositions of other localities sampled in the Amazon region. We also provide information on habitat use and species conservation status.

Material and Methods

Study Area

Ronuro River ESEC is located in the municipality of Nova Ubiratã, in the central area of Mato Grosso (13°05'55.01"S and 54°26'37.04"O; Fig. 1). Remnant vegetation within the ESEC presents a transitional characteristic between Ombrophylous Forest and Submontane Semi-deciduous Seasonal Forest (CEMEPAR, 1998). Species typical of the Amazon biome such as *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Brazil Nut), *Swietenia macrophylla* King. (Mahogany), and *Mesilaurus itauba* Meissn (Itaúba) are often found throughout the ESEC area (see chapters 1 and 8 for more details).

The soil found within Ronuro River ESEC is a quartzene and red-yellow argisol (CEMEPAR, 1998). The region's climate is type Am under the Köppen classification system, described as a hot and humid climate with monsoon rains, transitioning between the superhumid equatorial climate (Af) of Amazonia and the tropical humid climate (Aw) of the Central Plateau (Alvares *et al.* 2014). Ronuro River ESEC presents two well

defined seasons; a rainy season, which occurs from October to May and holds 80% of the volume of rainfall; and a dry season which occurs from June to September. The annual average temperature is 25 °C and annual precipitation varies from 2,000 to 2,500 mm (SEMA 2009).

Amphibian and reptile collection

Four survey campaigns were carried out with an average duration of six days, covering dry and rainy periods between July 2016 and June 2017. The surveying of herpetofauna was carried out by means of diurnal (from 08:00 – 16:00; Fig. 2) and nocturnal (from 18:30 – 23:30; Fig. 3) searches. Each sampling point was surveyed by a minimum of two people searching different types of terrestrial and aquatic microenvironments such as tree cavities, fallen logs, leaf litter, vegetation, holes in the ground and bodies of water. Visual encounter (with the use of head lamps) and auditory searches were used to detect anurans at night (Crump & Scott 1994; Zimmerman 1994). The visual search method (with the aid of hook and pole) was used to detect lizards and snakes in all accessible microenvironments (Crump & Scott 1994; Martins & Oliveira 1998).

Pitfall traps with drift-fences (Heyer *et al.* 1994) were installed at two sampling points. Each set of pitfall traps consisted of 4x60 liter buckets buried every 10 m in a Y-shape. The buckets were connected by a 50 cm high plastic fence with the bottom edge buried 10 cm into the ground. The buckets were open on average six days per campaign and were inspected daily (Fig. 4).

A number of captured reptiles and amphibians were retained, anesthetised with injectable 5% xylocaine solution, fixed in 10% formalin, preserved in 70% alcohol and deposited at the Federal University of Mato Grosso's Zoological Reference Collection, Sinop campus MT (ABAM-H). Auditory or visually recorded amphibians were identified based on their morphological and calling characteristics through specialised literature and sites (e.g. De La Riva *et al.* 2000; Faivovich *et al.* 2005; Grant *et al.* 2006; Lima *et al.* 2006; Frost 2006; Amphibiaweb 2017). Reptiles were identified using literature (Avila-Pires 1995; Martins & Oliveira 1988; Vitt *et al.* 2008; Fraga *et al.* 2013; Uetz 2015).

Secondary data obtained through literature reviews were used to compose the list of species for Ronuro River ESEC. However, the included report (Rapid Ecological Study for the creation and implementation of the Ronuro River Conservation Unit) covered a larger sampling area than the present study. The conservation status of each species was defined according to the IUCN Red List of Threatened Species (IUCN Status: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) as either least concern (LC), insufficient data (ID), vulnerable (VU) or not assessed (NA).

Results and Discussion

Fifty eight species were identified at Ronuro River ESEC and its surrounds (buffer zones). For amphibians, we recorded 32 species distributed in 18 genera and 7 families, including 31 anurans and one Gymnophiona (*Siphonops annulatus*). The family with the greatest species richness was Hylidae (13 species), followed by Leptodactylidae (10 species); Bufonidae and Mycrohylidae (3 species each), Phyllomedusidae, Craugastoridae and Siphonopidae (one species each) (Table 1).

We recorded 26 species of reptiles belonging to 23 genera and 14 families, including three chelonians, four crocodilians, seven lizards, two amphibians and 10 snakes. The most species families were Alligatoridae and Teidae (four species each), followed by Boidae (three species), Podocnemididae, Amphisbaemidae, Dipsadidae and Viperidae (two species each), Chelidae, Mabuyidae, Iguanidae, Gymophthalmidae, Aniliidae, Colubridae and Elapidae (one species each) (Table 2).

The species richness of herpetofauna at Ronuro River ESEC is lower than in other locations within the Amazon biome: Ducke Reserve AM (153 species; Lima et al. 2006; Vitt et al. 2008; Fraga et al. 2013), Lower Purus River AM (160 species; Waldez et al. 2013), Caxiuanã PA (144 species; Bernardi et al. 2002; Prudente and Santos-Costa 2005), Volta Grande do Xingu PA (259 species; Vaz-Silva et al. 2015), Espigão do Oeste RO (132 species; Bernarde 2007; Macedo et al. 2008), Alto Juruá AC (245 species; Bernarde et al. 2011) and the Riozinho da Liberdade Extractive Reserve AC (162 species; Bernarde et al. 2011). In the Amazon of Mato Grosso, other localities also show greater richness than that recorded for the ESEC (Fig. 5): Aripuanã and Juruena (80 and 72 species, respectively; Camargo, 2011), the northwestern area of Cristalino State Park (142 species, Rodrigues et al. 2015) and São Nicolau Farm (168 species, Kawashita-Ribeiro et al. 2013; Noronha et al. 2015). Herpetofauna richness recorded in the ESEC is not as significant as in the above-mentioned localities. However, the number of known species recorded in the region increased from 9 to 58 resulting from the sampling campaigns of this study, indicating that other species could be recorded in the ESEC with the surveying of new areas and increased sampling effort.

Of the 58 species recorded at Ronuro ESEC, 19 have no available information in the IUCN database. This lack of information on the conservation status of some species of recorded herpetofauna is concerning, as it renders decision making difficult in planning the conservation of species that may disappear before they are known to science.

The herpetofauna of Ronuro River ESEC is primarily composed of species common to the Amazon Biome, however species of the Cerrado Biome are also present. Studies undertaken in the Amazon show that there is a clear division of communities, mainly for amphibians, because the structural characteristics of the environment define their spatial distribution. For example, some recorded species are unique to ponds and lakes, while others are found only in perennial streams. Ronuro River ESEC has a large mosaic of environments that are key resources for the perseverence of its rich herpetofauna, as they are organisms that require specific microhabitats for reproduction (Bell & Donnelly 2006).

The study of Amazonian herpetofauna is essential, as this biome has suffered accelerated habitat loss in this region which is situated in the "deforestation arc". Agricultural and logging activities and the construction of roads and hydroelectric power plants are threatening forested areas (Ávila & Kawashita-Ribeiro 2011). Therefore, it is necessary to gain an understanding of the area's biodiversity, as the presence of certain species can become objects of study that help subsidise conservation plans. It is worth noting that amphibians are sensitive to environmental changes and have been recognised as indicators of environmental quality (Lima *et al.*, 2006).

The elaboration of an official list of herpetofauna species, showing the presence of new occurrences and possibly even new species is needed, which will provide further opportunities for new research in the field of ecology and deserved attention to this megadiverse area located in the Amazon–Cerrado transition region.

Acknowledgements

Referências/ References

Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L.M.; Sparovek, G. 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrif, 22: 711-728.

We thank the students of UFMT for their support during field activities. To SEMA for their financial support through FUNBIO and ARPA and permission to access the study area. To UFMT for logistical support. To ICMBio and Sisbio for collection license No. 30034-1.

- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2015. Berkeley, California: AmphibiaWeb. http://amphibiaweb.org/. (Accessed: Março de 2018).
- Ávila, R.W.; Kawashita-Ribeiro, R.A. 2011. Herpetofauna of São João da Barra Hydroelectric Plant, state of Mato Grosso, Brazil. Checklist, 7: 750-755.
- Avila-Pires, T.C.S. 1995. Lizards of brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). Zoolochische Verhandelingen, 299:1-706.
- Avila-Pires, T.C.S., Hoogmoed, M.S., Vitt, L.J. 2007. Herpetofauna da Amazônia. In: Nascimento, L.B., Oliveira, M.E. (eds.) Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte, p.13-43.
- Bell, K.E. & Donnelly, M.A. (2006). Influence of forest fragmentation on community structure of frogs and lizards in Northeastern Costa Rica. Conservation biology, 20, 1750-1760.
- Bernarde, P.S. 2007. Ambientes e temporada de vocalização da anurofauna no Município de Espigão do Oeste, Rondônia, Sudoeste da Amazônia Brasil (Amphibia: Anura). Biota Neotropica, 7 (2): 87-92
- Bernarde, P.S. 2012. Anfíbios e Répteis: Introdução ao estudo da herpetofauna brasileira. Anolisbook. Curitiba-PR. 320p.
- Bernarde, P.S.; Macedo, L.C. 2008. Impacto do desmatamento e formação de pastagens sobre a anurofauna de serapilheira em Rondônia. Iheringia, 98: 454-459.
- Camargo, L. 2011. Atlas de Mato Grosso. Abordagem socioeconômico-ecológica. Editora Entrelinhas. Cuiabá-MT. 96p.
- Carvalho, M.A. 2006. Composição e história natural de uma comunidade de serpentes em área de transição Amazônia-Cerrado, ecorregião florestas secas de Mato Grosso, município de Cláudia, Mato Grosso, Brasil. Tese de doutorado. PUC Rio Grande do Sul. 90p.
- CEPEMAR. Estudo ecológico rápido para a criação e implantação de unidade(s) de conservação do rio Ronuro. Cuiabá: CEPEMAR, 1998 (Trabalho Técnico).
- Costa, H.C.; Bérnils, R.S. 2015. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Herpetologia Brasileira, 4: 75-93.
- Crump, M.L.; Scott, J.R. 1994. Visual encounter surveys. In: W.R. Heyer; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.-A.C.; Foster, M.S. (Eds.). Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, USA. p. 84-92.
- De-la-Riva, I.; Kohler, J.; Lotters, S.; Reichle, S. 2000. Ten years of research on Bolivian amphibians: updated checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. Revista Espanola de Herpetologia, 14: 19-164.
- Dos Santos, R. Laurent, M.; Irgang, G. & Vasconcellos, J. 2006. O desmatamento nas Unidades de Conservação em Mato Grosso^{1, 2.}
- Duellman, W.E. 1999. Distribution patterns of amphibians ins South America. In: Duellman, W.E (Ed.). Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. Baltimore: John Hopkins University Press, 1999. P. 255-328.
- 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: 1-240.
- Ferrão, M., de Fraga, R., Moravec, J., Kaefer, IL., and Lima, AP., 2018. A New species of Amazonian snouted treefrog (Hylidae: Scinax) With description of a novel species-habitat association for an aquatic breeding frog PeerJ6:e4321.
- Fraga, R.; Lima, A.P.; Prudente, A.L.C.; magnusson, W.E. 2013. Guia de Cobras da região de Manaus – Amazônia Central/Guide to the Snakes of the Manaus Region – Central Amazonia. 1. Ed. Manaus: Editora INPA. 303p.
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich. J.; Bain, R.; Hass, A.; Haddad, C.F.B.; De-Sa, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworty, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M.; Wheeler, W.C. 2006. The amphibian tree of life. Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 297:1-370.
- Frost, D. R. 2018. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0 (10 março/2018). Eletronic Database. Acessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, Usa
- Gordo, M.; Toledo, L.P.; Suarez, P.; Kawashita-Ribeiro, R.A.; Ávila, R.W.; Morais, D.H.; Nunes, I. 2013. A new species of Milk Frog of the genus Trachycephalus Tschudi (Anura, Hylidae) from the Amazonian rainforest. Herpetologica, 69: 466-479
- 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. Phylogenetics systematics of dart poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull. Am. Mus. Nat. Hist., 299:1-262.
- Haga, I.A., Andrade, F.S., Bruschi, D.P., Recco-Pimental, Giaretta, A.A 2017. Unrevealing the leaf frogs Cerrado diversity: A New species of Pithecopus (Anura, Arboranae, Phyllomedusidae) from the Mato Grosso state, Brazil. PLoSONE 12(9):e0184631.
- Heyer, R.H.; Donnelly, M.A.; Mcdiarmid, R.W.; Hayek, L.C.; Foster, M.S. 1994. Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, 364p.
- Jensen, P.D. 2010. Estudos de Impacto Ambiental. Volume vi. Diagnóstico Ambiental da AID Meio Biótico tomo 1/5 texto. 288p.
- IUCN. 2015. IUCN Red list of threatened species. Versão 2015.1. http://www.iucnredlist.org. Acessado: 15 de março de 2018.
- Kawashita-Ribeiro, R.A.; Ávila, R.W.; Morais, D.H. 2013. A new snake of the Genus Helicops Wagler, 1830 (Dipsadidae, Xenodontinae) from Brazil. Herpetologica 69: 80-90.
- Kawashita-Ribeiro, R.A.; Silva, J.P.; Silva, A.F.; Arruda, L.A.G.; Mott, T.; Carvalho, M.A 2013. Os Répteis Escamosos (Reptilia, Squamata) da Fazenda São Nicolau, Cotriguaçu, Mato Grosso, Brasil, um Estudo Preliminar. In Rodrigues, D.J., Izzo, T.J., Battirola, L.D. (coord) Descobrindo a Amazônia Meridional: Biodiversidade da Fazenda São Nicolau. Pau e Prosa comunicações, Cuiabá, Mato Grosso. p. 145-167.
- Laurent, M.; Irgang, G.V. Oliveira, A.G. Riva, A.L.M. Laranja, L.F.. Farias, R. & Muller, Z., 2006. Corredor de Conservação Teles Pires/ Tapajós - Diagnóstico preliminar das áreas protegidas e da região de entorno. Oficina de Planejamento – Brasília 26-27/04/06 – Realização: FFI, ICV, FEC, IOV.

- Lima, A. P.; Magnusson, W.; Menin, M., Erdtmann, L.K., Rodrigues, D.J., Keller, C., Hödl, W. 2006. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central. Áttema Design Editorial, Manaus, Brasil, 168pp.
- Martins, M.; Oliveira, M.E. 1998. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. Herpetological Natural History, 6:78-150.
- MMA. 2002. Biodiversidade Brasileira. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 404 p.
- Noronha, J.C.; Lima, M.M.; Velasquez, C.L.; Almeida, E.J.; Barros, A.B.; Rodrigues, D.J. 2015. Update das Espécies de Anuros da Fazenda São Nicolau, Mato Grosso, Brasil. Sci. Elec. Arch., 8:15-25.
- Paiva, R. J. O. 2017. O papel das áreas protegidas na contenção do desmatamento no bioma cerrado. Rodrigo José Oliveira Paiva; orientação de Ricardo Seixas Brites. Brasília, p.278. 2017.
- Prudente, A.L.C.; Santos-Costa, M.C. 2005. Checklist of snakes from "Estação Científica Ferreira Penna", eastern Amazonia, Pará state, Brazil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Ciências Naturais, 1: 153-180
- Rodrigues, D.J., Lima, M.M., Velasquez, C.L., Konkol, F. 2013. Composição da Anurofauna da Fazenda São Nicolau e sua comparação com outras localidades amazônicas. In Rodrigues, D.J., Izzo, T.J., Battirola, L.D. (coord) Descobrindo a Amazônia Meridional: Biodiversidade da Fazenda São Nicolau. Pau e Prosa comunicações, Cuiabá, Mato Grosso. p. 127-143.
- Rodrigues, D.J., Noronha, J.C., Vindica, V.F., Rodrigues, F., 2015. Biodiversidade do Parque Estadual Cristalino / Organização Domingos de Jesus Rodrigues... [et al.]. – Sinop (MT): Áttema Editorial, 2015. 284p. : il. ; 16 x 23 cm
- Segalla, M.V.; Caramaschi, U.; Cruz, C.A.G.; Garcia, P.C.A.; Grant, T.; Haddad, C.F.B.; Langone, J. 2016. Brazilian amphibians – List of species. Herpetologia Brasileira, 5 (2):34-46.
- SEMA Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 2009. Plano de manejo do Parque Estadual do Cristalino Volume I: diagnóstico ambiental e socioeconômico. 130p.
- <u>Simões, P.I.; Sturaro, M.J.</u>; Peloso, P.L.V.; Lima, A.P. 2013. A new diminutive species of Allobates Zimmermann and Zimmermann, 1988 (Anura, Aromobatidae) from the northwestern Rio Madeira Rio Tapajós interfluve, Amazonas, Brazil. Zootaxa, 3609: 251-273.
- Simões PI, Gagliardi-Urrutia G, Rojas-Runjac FJM, Castroviejo-Fisher S. 2018. A new species of nurse-frog (Aromobatide, Allobates) from the Juami River basin, northwestern Brazilian Amazonia Zootaxa 4387. 109-133.
- Uetz, P. & Jirí Hosek (eds). 2015. The Reptile Database, http://www.reptile-database.org, accessed 05 Março/2018.
- Vaz Silva, et al. 2015. Contributions to the knowledge of amphibians and reptiles from Volta Grande do Xingu, northern Brazil. Brazilian Journal of Biology. J. Biol.75 (3).
- Vitt, L.; Magnusson, W. E.; Avila-Pires, T. C.; Lima, A. P. 2008. Guia de lagartos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central - Guide to the lizards of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazônia. Attema, Manaus, 176p.
- Zimmerman, B.L. 1994. Audio Strip Transects. In: Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.-A.C.; Foster, M.S. (Eds.). Measuring and monitoring

biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, USA. p. 92-97.

Waldez, F.; Menin, M.; Vogt, R.C. 2013. Diversity of amphibians and Squamata reptilians from lower Purus River Basin, Central Amazonia, Brazil. Biota Neotropica, 13: 300-316.



A) Rhinella schneideri; B) Rhaebo guttatus; C) Elachistocleis sp.; D) Ctenophryne geayi; E) Leptodactylus cf. petersii; F) Leptodactylus labyrinthicus; G) Leptodactylus rhodomystax; H) Leptodactylus pentadactylus



A) Dendropsophus minutus; B) Dendropsophus sp.; C) Dryaderces sp.; D) Osteocephalus taurinus; E) Boana albopunctata; F) Osteocephalus leprieurii; G) Boana cinerascens; H) Boana geographica



A) Scinax fuscovarius; B) Phyllomedusa vaillantii; C) Imantodes cenchoa; D) Xenopholis scalaris; E) Anilius scytale; F) Paleosuchus trigonatus; G) Kentropyx calcarata; H) Bachia cf. flavescens