

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Programa de Pós Graduação em Ecologia - PPGECO

**Diversificação evolutiva e limite entre espécies de *Allobates*
(Anura: Aromobatidae) na Amazônia: Uma abordagem integrativa**

Gabriela Farias Maia

Manaus - Amazonas

Abril de 2025

Gabriela Farias Maia

**Diversificação evolutiva e limite entre espécies de *Allobates*
(Anura: Aromobatidae) na Amazônia: Uma abordagem
integrativa**

Orientador: Igor L. Kaefer (UFAM)

Coorientadora: Albertina P. Lima (INPA)

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ecologia - PPGECO- do
Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia - INPA, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia, área concentração
em Ecologia.

Manaus, Amazonas

Abril de 2025

Banca Julgadora

Ficha Catalográfica

Sinopse:

Investigou-se os padrões de diversidade críptica e a distribuição potencial de linhagens do complexo *Allobates tinae* na região sudoeste da Amazônia por meio da integração de dados moleculares, análises biogeográficas e modelagem de nicho ecológico para investigar os padrões de diversificação, os fatores ambientais determinantes da distribuição e possíveis lacunas de amostragem relevantes para conservação.

Palavras-chave: Aromobatidade, diversidade críptica, biogeografia, modelagem de nicho

Agradecimentos

Começo estes agradecimentos ainda sem acreditar que finalmente cheguei até aqui. O caminho, normalmente longo para quem aceita o desafio de um doutorado, foi, para mim, muito além do que poderia imaginar. Entre tantos acontecimentos, o fluxo da vida, uma pandemia, eu cheguei. E, para isso, não foram poucas as pessoas que me ergueram e reergueram inúmeras vezes para a concretização do que, até agora, considero um sonho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Igor Kaefer, pela parceria desde o mestrado. Sou grata pela oportunidade, pelas conversas, pelo apoio e aprendizado ao longo desses anos, pela paciência em me ver crescer e desbravar tanto conhecimento. Agradeço também à minha coorientadora, Albertina Lima, a quem admiro profundamente, por seu domínio sobre os anfíbios amazônicos como ninguém, mas, sobretudo, por ter acreditado em mim e me mostrado que eu era capaz até o fim. Não há palavras que expressem minha gratidão.

Agradeço às Dras. Marina Anciães, Noemia Ishikawa e Beatriz Ronchi Teles, que estiveram à frente da coordenação do PPG Ecologia durante esse período, sempre oferecendo o suporte necessário. Meu agradecimento também ao Conselho do Programa, sempre solícito e, principalmente, compreensivo, conferindo um tom de humanidade às burocracias. À Juliane, da secretaria, pelo excelente trabalho diante das demandas do programa. E a cada professor e professora doutor (a) que me proporcionou viver o melhor que o INPA tem a oferecer, vocês fazem desse Instituto um lugar de excelência.

Sou grata à CAPES pela bolsa de estudos (CAPES; #88882.347457/2019-01), por meio do Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX). Agradeço aos integrantes do Kaefer Lab, pelas contribuições e discussões acadêmicas ao longo desses anos, e ao grupo de pesquisa da Dra. Albertina Lima, por ceder amostras essenciais à existência desta tese, e pelas trocas, conversas e esclarecimentos - em especial à Jussara Dayrell. Ao Laboratório de Biologia Molecular (LTBM/INPA), pela estrutura e pela convivência com colegas de diferentes programas, que se uniam e se ajudavam em todos os turnos (inclusive madrugada adentro) para fazer dar certo. E deu! Aos meus colaboradores, que tornaram possíveis as publicações, seres maravilhosos e pacientes,

sem os quais, sem dúvida, não teríamos artigos. Minha gratidão a Miquéias Ferrão, Leandro Carneiro e Josué Anderson Azevedo.

Escrever essa parte foi, sem dúvida, a mais difícil da tese. Entre tantas pessoas, momentos, idas e vindas, chegadas e partidas, lembrar de quem fez parte desse processo nas mais diferentes fases foi nostálgico, feliz e até doloroso.

Aos amigos de longa data, de colégio e cursinhos em Natal, com quem ainda compartilho a vida: Daiane Neri, Rebeka Fernandes, Priscila Maurmann, Gabriela Toscano, Carol Furtado e Morgana de Carvalho. Aos amigos que encontrei no Parque das Dunas, em um dos momentos mais importantes da minha formação: Marina Silva, Marília Teixeira, Daniel Silva e Layana Alves.

Também agradeço aos amigos que a pós-graduação me trouxe: Deco Lima, Giulliana Appel, Clarice e Lídia Martins. Um agradecimento especial às amigas com quem cruzei nos laboratórios da vida e que ganharam meu coração — Pham e Gabi — com quem compartilhei momentos bons e ruins, e que sempre estiveram ao meu lado. Durante a pós, conheci uma pessoa essencial para que eu alcançasse este momento: minha psicóloga Mariana. Sou profundamente grata. Dentro do contexto acadêmico, tive a alegria de praticar esportes e fazer amizades especiais — pessoas com quem compartilhei muitas endorfinas e risadas: Gabi Maciel (minha gêmea perdida), Dan, Rubana Palhares, Gabriela (parceira de pedal) e Karol Andrade. Vocês ultrapassaram os limites da academia e seguiram comigo para a vida.

Do INPA para as Tucumas FC, onde tive o prazer de conhecer pessoas maravilhosas, algumas de passagem, outras que vieram para ficar: Thaissa Cordeiro, Amanda Duhau, Beatriz Neves, Sara e Maria Ligia, que sempre está disposta a bater, apanhar por mim (no bom sentido) e resolver qualquer problema com parceria e bom humor. Tudo se tornou mais leve com vocês. À Glenda Alencar, que, mesmo com relutância, me permitiu dividir momentos especiais, admiro sua história, sua força e ambição. Obrigada por segurar a barra nos momentos mais difíceis e por me mostrar como a vida pode ser mais leve. E, claro, ao meu ajudante e amigo, Antônio (topa tudo!)

À família Oliveira, que me acolheu, abriu suas portas e compartilhou tantos momentos incríveis, sempre com apoio e carinho. Alana, pelas saídas; seu Mimi, por me

fortalecer com cuscuz; dona Ana (*in memoriam*), que me tratava e amava como filha e a quem considerarei como uma mãe. Nunca duvidou do meu potencial, nem por um dia. E Alan, com quem cresci e dividi metade da minha vida, sempre admirei, admiro e me orgulho do homem que você se tornou. Me inspiro em você.

Por fim, e não menos importante, agradeço àqueles por quem dou a vida: minha família. Maia, Dora, Laís, Alexandre e Rafaela, não consigo falar de vocês sem me emocionar. É com vocês que conto quando preciso de apoio em qualquer jornada. Vocês são meu porto seguro. Tenho profunda gratidão e admiração pelos meus pais, que nunca mediram esforços para garantir que seus filhos pudessem se dedicar aos estudos- os maiores incentivadores de tudo isso acontecer. Obrigada. Aos meus irmãos, que me reergueram nos momentos mais delicados da minha saúde mental, com amor e cuidado, e com quem compartilho perrengues e conversas filosóficas que só nós somos capazes de ter. Que sorte a minha ter vocês. Amo vocês!

Resumo

Esta tese buscou investigar a diversidade críptica, biogeografia histórica e padrões de distribuição do complexo *Allobates tinae*, um grupo amplamente distribuído na região sudoeste da Amazônia brasileira. No primeiro capítulo, foram realizadas análises filogeográficas e filogenéticas integrando dados multilocus para revelar a existência de múltiplas linhagens dentro do complexo. Os resultados indicaram que a diversidade de *Allobates* na região é subestimada, com linhagens geneticamente distintas, algumas das quais associadas a barreiras geográficas como os rios Madeira e Purus, evidenciando eventos históricos de diversificação. No segundo capítulo, a distribuição potencial das linhagens foi investigada por meio de modelagem ecológica de nicho, considerando variáveis ambientais atuais, sobreposição de nicho e adequabilidade espacial. Os resultados indicaram baixa sobreposição entre a maioria das linhagens, sugerindo especializações ecológicas distintas associadas a gradientes de umidade, temperatura e altitude. Foram identificadas áreas com alta adequabilidade ambiental ainda não amostradas, o que indica lacunas no conhecimento da distribuição real das linhagens e aponta regiões prioritárias para futuras coletas e estudos de diversidade. De forma integrada, os resultados indicam que a diversidade do complexo *Allobates tinae* encontra-se profundamente estruturada por processos evolutivos e ecológicos, sendo moldada por eventos paleogeográficos e por filtros ambientais atuais. Esses achados reforçam a relevância de abordagens integrativas na delimitação de espécies e na compreensão dos mecanismos que geram e sustentam a biodiversidade amazônica.

Evolutionary diversification and species boundaries in *Allobates* (Anura: Aromobatidae) in Amazonia: An integrative approach

Abstract

This thesis aimed to investigate the cryptic diversity, historical biogeography, and distribution patterns of the *Allobates tinae* complex, a group widely distributed in the southwestern Brazilian Amazon. In the first chapter, phylogeographic and phylogenetic analyses integrating multilocus data were conducted to reveal the existence of multiple lineages within the complex. The results indicated that *Allobates* diversity in the region is underestimated, with genetically distinct lineages, some of which are associated with geographical barriers such as the Madeira and Purus rivers, highlighting historical events of diversification. In the second chapter, the potential distribution of the lineages was investigated through ecological niche modeling, considering current environmental variables, niche overlap, and spatial suitability. The results showed low niche overlap among most lineages, suggesting distinct ecological specializations associated with gradients of humidity, temperature, and elevation. Areas of high environmental suitability not yet sampled were identified, indicating gaps in the current knowledge of the true distribution of these lineages and highlighting priority regions for future surveys and diversity assessments. Taken together, the results indicate that the diversity within the *Allobates tinae* complex is deeply structured by both evolutionary and ecological processes, shaped by paleogeographic events and contemporary environmental filters. These findings reinforce the relevance of integrative approaches to species delimitation and to understanding the mechanisms that generate and sustain Amazonian biodiversity.

Sumário

Lista de tabelas	XII
Lista de figuras	XIV
Introdução Geral	16
Objetivos	20

Capítulo 1 – Cryptic diversity and historical biogeography of a nurse-frog species complex (*Allobates tinae*): Insights on biotic diversification in Brazilian southwestern Amazonia

Abstract	22
Introduction	23
Materials and Methods	26
Study area and collection procedure	26
Molecular data collection	26
Phylogenetic relationships	28
Species delimitation and phylogeographic analyses	30
Divergence time and biogeographic analysis	32
Results	32
Phylogenetic relationship and special distributions	32
Species delimitation and phylogeographic analyses	33
Divergence time and biogeographic history	35
Discussion	37
References	43

Capítulo 2 - Linhas invisíveis: nichos ecológicos e fatores ocultos moldando a distribuição do complexo <i>Allobates tinae</i>	64
Resumo	66
Introdução	67
Material e Métodos	71
Área de estudo	71
Distribuição geográfica	71
Variáveis ambientais	73
Sobreposição de nicho	76
Modelagem de distribuição de linhagens	77
Resultados	79
Importância relativa das variáveis ambientais	83
Distribuição potencial das linhagens	84
Discussão	87
Referências	91

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Sampling localities of the *Allobates tinae* complex in Brazilian Southwestern Amazonia, with their geographical coordinates59

Capítulo 2

Tabela 1. Variáveis ambientais selecionadas com base na análise de VIF (valores menores que cinco) e em critérios biológicos, de forma a minimizar a colinearidade ao mesmo tempo que capturar os principais gradientes ambientais relevantes para os anfíbios75

Tabela 2 – Sobreposição de nicho ambiental entre todos os pares de linhagens do complexo *Allobates tinae*. A sobreposição de nicho ambiental calculada a partir do método PCA-env com base na métrica D de Schoener (0 = sem sobreposição; 1 sobreposição total). O teste de equivalência de nicho avalia se as linhagens ocupam nichos indistinguíveis, enquanto o teste de similaridade de nicho verifica se os nichos são mais semelhantes do que o esperado ao acaso. Os valores de P indicam a significância estatística dos testes, baseados em 1000 permutações aleatórias dos dados ambientais 81

Tabela 3. Desempenho dos modelos distribuição (ensemble of small models) por linhagem. AUC = Área Sob a Curva; TSS = True Skill Statistic; Max SE + SP = Limiar maximizando (sensibilidade + especificidade); Boyce = Índice de Boyce; Sørensen = Índice de Similaridade de Sørensen83

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1 - Geographic distribution of sampling localities of the *Allobates tinae* complex, with its internal major clades represented by different colors.....60

Figura 2 - Phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex reconstructed through Bayesian inference from four mitochondrial DNA genes (12S, 16S, COI, Cytb) 61

Figura 3 - Haplotype network with 59 sequences of 16S mitochondrial DNA gene for the *Allobates tinae* complex. The size of each circle indicates the relative haplotype frequency, and their distinct color indicates the geographical origin of individuals according to the map depicted in Fig. 162

Figura 4 - Bayesian time-calibrated phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex and the results of the BioGeoBears analysis (A). Nodal support values are shown at branches (asterisks: posterior probability = 1.0), and blue horizontal bars on nodes correspond to their 95% HPD. Black dots on nodes represent calibration points. Colored terminals correspond to those identified as distinct species according to our delimitation analyses (Fig. 2), also representing their geographical distribution for the BioGeoBears analysis. In (B), the hypothetical evolutionary history of dispersals and speciations indicated by the BAYAREA+J model in the BioGeoBears, following the major landscape changes in Brazilian Southwestern Amazonia..... 63

Capítulo 2

Figura 1. Distribuição geográfica das linhagens do complexo *Allobates tinae* no sudoeste da Amazônia brasileira72

Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos valores ambientais extraídos para as ocorrências das linhagens de *Allobates*. (a) Biplot dos escores da PCA ilustrando a direção e a magnitude dos gradientes ambientais na área de estudo – as setas indicam a contribuição das variáveis: Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI), Precipitação do Mês Mais Úmido (bio_13), Precipitação do Trimestre Mais Quente (bio_18), Variação Diurna Média da Temperatura (bio_2), Sazonalidade da Temperatura (bio_4), Balanço Hídrico (water_balance) e Elevação. (b) Dentro do espaço ambiental definido pelos PCs, cada ponto representa uma

localidade por linhagem (definido a partir da precisão do grid de ~1 por 1 km), e os mínimos polígonos convexos (MCP) delimitam a variação ambiental experimentada por cada linhagem.....79

Figura 3 - Importância das variáveis ambientais utilizadas na modelagem de nicho para linhagens do complexo *Allobates tinae*. Os modelos foram ajustados utilizando *ensemble of small models* do Maxent e as estimativas de importância das variáveis foram obtidas a partir da média ponderada (AUC) das contribuições das variáveis em cada rodada.....84

Figura 4. Mapas preditivos de adequabilidade ambiental para diferentes linhagens modeladas utilizando *ensemble of small models* (ESMs) com o MaxEnt. À esquerda, os mapas contínuos representam a adequabilidade ambiental prevista pelos modelos, variando de <0.1 (baixa, tons laranja e amarelados) a >0.9 (alta, tons roxos e preto). Os pontos indicam as localidades conhecidas das linhagens. À direita, os mapas binários mostram as áreas classificadas como adequadas pelo critério de Máxima Sensibilidade + Especificidade, destacando regiões onde a linhagem é mais provável de ocorrer (em roxo). Os rios principais são representados em azul86

Introdução Geral

A compreensão dos padrões de biodiversidade é fundamental para o entendimento de processos ecológicos e evolutivos, e, conseqüentemente, para a conservação de linhagens e espécies em diferentes contextos espaciais. Tais padrões de distribuição revelam informações fundamentais sobre os processos que moldam a distribuição geográfica das espécies (Guaysamin *et al.*, 2024). Além de refletir a integridade dos ecossistemas, a diversidade ecológica desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio ambiental, sendo essencial para a resiliência frente a perturbações naturais ou antrópicas. Ela promove a estabilidade dos processos ecológicos, como a ciclagem de nutrientes, a regulação climática e a conservação da qualidade do solo e da água (Dias *et al.*, 2023). A biodiversidade também sustenta o funcionamento dos ecossistemas ao preservar as interações entre espécies e seus ambientes, interações estas que são cruciais para a manutenção dos serviços ecológicos responsáveis pela saúde ambiental em escala global (Steur *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2024). Nesse contexto, investigar os fatores determinantes da diversidade biológica é especialmente relevante em regiões tropicais megadiversas, onde significativa parte da diversidade permanece desconhecida ou subestimada (Jenkins *et al.*, 2013; Antonelli *et al.*, 2018).

A Amazônia é amplamente considerada como um reservatório global de biodiversidade terrestre, com excepcional riqueza de espécies e alto grau de endemismo (Myers *et al.*, 2000; Antonelli *et al.*, 2018). Essa diversidade é resultado de interações entre processos históricos e ecológicos que moldaram a paisagem ao longo de milhões de anos. Eventos como a elevação dos Andes durante o Mioceno, mudanças nos padrões de drenagem da bacia amazônica e as flutuações climáticas do Quaternário criaram barreiras geográficas que promoveram o isolamento populacional e a especiação

alopátrica (Réjaud *et al.*, 2020; Hoorn *et al.*, 2022; Ribas *et al.*, 2025). Essas barreiras também contribuíram para a formação das áreas de endemismo na Amazônia, regiões que concentram grupos únicos de espécies espacialmente restritas com histórias evolutivas comuns (Cracraft, 1985; Silva *et al.*, 2005). Além dos fatores históricos, variáveis ambientais em escala temporal ecológica desempenham um papel importante na definição da distribuição das espécies na Amazônia. Gradientes climáticos, como precipitação sazonal, equilíbrio hídrico e heterogeneidade topográfica, influenciam diretamente os padrões ecológicos em múltiplas escalas espaciais (Menger *et al.*, 2017; Brun *et al.*, 2022; Rocha e Sollmann 2023). Esses fatores são particularmente relevantes para grupos sensíveis às condições microclimáticas locais, como os anfíbios anuros. Esses organismos são altamente dependentes da disponibilidade de água e da estabilidade térmica, sendo considerados importantes indicadores biológicos de alterações em ecossistemas tropicais (Godinho e da Silva 2018; Juarez *et al.*, 2024).

A diversidade críptica tem sido reconhecida como uma parte importante da biodiversidade amazônica. Espécies crípticas são aquelas que, apesar de serem geneticamente distintas, apresentam pouca ou nenhuma diferenciação fenotípica, dificultando sua identificação por métodos taxonômicos tradicionais (Bickford *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2012). Na Amazônia, essa diversidade oculta tem levado à subestimação significativa da riqueza real de espécies, como evidenciado por estudos que revelaram linhagens independentes não reconhecidas (e.g., Vacher *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020; Ferrão *et al.*, 2022; Franco-Mena *et al.*, 2023). Esses achados têm implicações diretas para a compreensão dos processos evolutivos que moldam as comunidades biológicas e para o planejamento de estratégias de conservação face às crescentes ameaças ambientais. Compreender os fatores que influenciam a diversidade ecológica e espacial destas linhagens é fundamental para elucidar os processos

evolutivos subjacentes à sua diversificação. Nesse contexto, esta tese busca integrar abordagens moleculares, ecológicas e biogeográficas para investigar os padrões de diversidade críptica no complexo de rãs-cuidadoras, também popularmente conhecidos como sapinhos-ponta-de-flecha, *Allobates tinae* (Melo-Sampaio *et al.*, 2018).

No primeiro capítulo, realizamos densa amostragem em meso-escala espacial associada a múltiplas análises baseadas em caracteres moleculares para avaliar rigorosamente a riqueza real de espécies dentro deste complexo. Além disso, investigamos suas relações filogenéticas e padrões espaciais de distribuição. Buscamos compreender os processos biogeográficos responsáveis pela geração e manutenção da diversidade atual do complexo *A. tinae*, fornecendo assim *insights* relevantes sobre o papel relativo dos determinantes históricos e ecológicos na diversificação biológica do sudoeste da Amazônia brasileira.

No segundo capítulo desta tese aprofundamos nossa compreensão sobre os fatores ambientais atuais que influenciam diretamente as distribuições dessas linhagens por meio da modelagem preditiva baseada no nicho ecológico. Especificamente investigamos quais variáveis ambientais são mais determinantes para explicar as distribuições potenciais previstas para cada linhagem do complexo *Allobates tinae*. Adicionalmente quantificamos o grau de diferenciação ecológica entre essas linhagens por meio da análise quantitativa da sobreposição dos nichos ambientais. Finalmente identificamos áreas ainda não amostradas com alta adequabilidade ambiental prevista pelos modelos, regiões potenciais prioritárias para futuros esforços amostrais e ações de conservação.

Ao integrar abordagens moleculares com modelagem ecológica preditiva, esta tese busca contribuir para a compreensão dos processos evolutivos e ecológicos que geram e mantêm a biodiversidade amazônica. A combinação de análises filogeográficas,

biogeográficas e modelagem de distribuição de espécies visa elucidar padrões de diversidade, identificar os principais fatores ambientais que a determinam e antecipar as respostas da biota frente às mudanças climáticas e às crescentes pressões antrópicas. Com isso, almeja-se consolidar uma base científica robusta que aprofunde o conhecimento em ecologia evolutiva e subsidie estratégias eficazes de conservação em um cenário de transformações ambientais contínuas.

Objetivo Geral

Investigar a diversidade evolutiva e os limites entre espécies do complexo *Allobates tinae* na Amazônia, utilizando uma abordagem integrativa que combine dados moleculares, filogenéticos e ecológicos.

Capítulo 1 – Cryptic diversity and historical biogeography of a nurse-frog species complex (*Allobates tinae*): Insights on biotic diversification in Brazilian southwestern Amazonia

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a riqueza real de espécies dentro do complexo *Allobates tinae* com base em densa amostragem em meso-escala espacial e múltiplas análises moleculares;
- ✓ Investigar as relações filogenéticas entre as linhagens reconhecidas e seus padrões espaciais de distribuição;
- ✓ Compreender os processos biogeográficos responsáveis pela geração e manutenção da diversidade atual do grupo;
- ✓ Fornecer subsídios para a delimitação de espécies com base em dados integrativos e espacialmente explícitos.

Capítulo 2 – Linhas invisíveis: nichos ecológicos e fatores ocultos moldando a distribuição do complexo *Allobates tinae*.

Objetivos Específicos

- ✓ Investigar quais variáveis ambientais são mais determinantes para explicar a distribuição potencial de cada linhagem do complexo;
- ✓ Quantificar o grau de diferenciação ecológica entre as linhagens por meio da análise da sobreposição dos nichos ambientais;
- ✓ Identificar áreas com alta adequabilidade ambiental ainda não amostradas, apontando regiões prioritárias para novos esforços de coleta e estratégias de conservação.

Capítulo 1

Gabriela Farias Maia, Miquéias Ferrão, Leandro J.C.L. Moraes, Igor L. Kaefer, Albertina P. Lima. Cryptic diversity and historical biogeography of a nurse-frog species complex (*Allobates tinae*): Insights on biotic diversification in Brazilian southwestern Amazonia. Artigo publicado na revista *Zoologica Scripta*.

DOI:10.1111/zsc.12711

Abstract

Amazonia continuously reveals outstanding biotic diversity and endemism, but our comprehension regarding their underlying processes has been impaired by knowledge gaps on cryptic taxonomic diversity. Here, we clarified the diversity and historical biogeography of nurse-frogs typical from Brazilian Southwestern Amazonia, the *Allobates tinae* species complex, using fine-scale population sampling and molecular-based analyses. Fieldwork was conducted at 23 localities across three major interfluves encompassing two well-recognized areas of endemism. Fragments of three mitochondrial DNA genes were sequenced and compared through phylogeographic and phylogenetic analyses. Based on these results, we estimated the species limits and inferred the historical biogeography. We found seven highly supported clades, which were considered as distinct species according to delimitation analyses. However, only two of these clades are taxonomically described, indicating a nearly threefold underestimation of the complex species richness. Major clades showed pronounced genetic distances, strong spatial structuring, and restricted or absent haplotype sharing. However, genetic structure was not predicted by geographic distance, and strong genetic structure among major clades was evident even at smaller geographical scales lacking evident physical barriers. Biogeographic analysis indicated diversification of the *A. tinae* complex most likely occurred through dispersals followed by speciations. These events started southward from the Guiana Shield during the Miocene, and were followed by sequential secondary northward dispersals along the Pliocene and Pleistocene. Our results indicate combined roles of historical (landscape dynamism) and ecological (environmental heterogeneity) factors driving biotic diversification in Brazilian Southwestern Amazonia.

Introduction

The Amazonian megadiversity is the result of a complex geological, climatic and ecological history (Antonelli et al., 2018; Hoorn et al., 2010, 2017). Such diversity occurs through a myriad of historical and ecological factors that currently results in contrasting terrestrial environments such as savannahs, flooded forests, as well as open and dense upland forests (Myers et al., 2000; Rossetti et al., 2014). The patchy distribution of these environments forms mosaics within different terrestrial biogeographic units, which are mostly delimited by Amazonian rivers that have acted as vicariant barriers to the dispersal of organisms (Ribas et al., 2011). The first attempts to understand the biotic regionalization within Amazonia highlighted the roles of large rivers such as the Amazon, Negro and Madeira as such geographical barriers (Cracraft, 1985; Wallace, 1852). Subsequent approaches have refined this understanding by appointing the role of smaller current river channels (Fernandes et al., 2014), paleochannels (Rossetti et al., 2014; Ruokolainen et al., 2019), geographic distance (Dambros et al., 2017), paleo wetlands (Réjaud et al., 2020), structural arches (Lougheed et al., 1999), and vegetation types (Ferreira et al., 2020; Ortiz et al., 2018) in the regionalization of the Amazonian biota. Recently, fine-scale phylogeographic (Fernandes, 2013; Fernandes et al., 2021; Ferreira et al., 2020; Menger et al., 2017) and ecological approaches (Ferrão et al., 2018; Ferreira et al., 2018; Peixoto et al., 2023) have played a pivotal role in revealing the importance of these overlooked, subtle historical and ecological factors in the distribution of intraspecific lineages and species throughout the so-called ‘continuous’ interfluvial Amazonian environments.

Among terrestrial vertebrates, anuran amphibians (frogs and toads) form a diverse and widely distributed group in Amazonia, having its large-scale regionalization

mostly explained by the large rivers as geographic barriers, climatic variation and topography (Godinho & Da Silva, 2018; Vacher et al., 2020). At regional and local scales, historical factors such as the riverine barriers are still relevant in shaping assemblage compositions, but ecological variables such as elevation, soil and vegetation types also play significant roles (Dias-Terceiro et al., 2015; Moraes et al., 2016). The high sensitivity of these anamniote vertebrates to geographic and ecological factors is likely due to a combination of traits such as small body size, philopatry, and low vagility (Paz et al., 2015; Vences & Wake, 2007). This often produces spatial genealogical signatures within and among species evidenced by spatially restricted lineages, high genetic structure, and cryptic speciation (Ferrão et al., 2016; Fouquet et al., 2015; Rojas et al., 2018, 2020). These life-history traits are all observed in *Allobates* nurse-frogs (Aromobatidae), which is the most species-rich dendrobatoid genus with 63 species described to date, most of them in the XXI century (Frost, 2024). This genus is particularly diverse in Amazonia, where many strongly-structured, phenotypically-conserved genetic lineages occur (Kaefer et al., 2013; Maia et al., 2017). In fact, many *Allobates* nominal species deserve taxonomic scrutiny because they represent cryptic species complexes along their geographical ranges (Grant et al., 2006, 2017; Réjaud et al., 2020; Vacher et al., 2020). Several recently described species of *Allobates* came from species complexes that were better understood in light of integrative taxonomic approaches (Simões et al., 2010; Moraes et al., 2019; Lima et al., 2020; Moraes & Lima, 2021; Ferrão et al., 2022, Souza et al., 2023).

The *Allobates tinae* species complex, widely distributed across Brazilian Southwestern Amazonia, is an example of such complex with irresolute taxonomic and phylogenetic understanding (Melo-Sampaio et al., 2018). The nominal species was formerly supposed to occur along three large Amazonian interfluves (Juruá-Purus,

Purus-Madeira and Madeira-Tapajós) and also in different forest types (dense and open lowland forests). However, a recent taxonomic reassessment considering multiple phenotypic and genetic data sources revealed that multiple evolutionary units were contained under nominal species (Lima et al., 2020). In the light of these evidences, *A. tinae* is currently considered to be geographically restricted to the Open Ombrophilous Forests with palm trees in the southern Purus-Madeira interfluvium, whereas the populations from the Dense Ombrophilous Forests in the northern Purus-Madeira interfluvium were described as a new species, *A. caldwella* Lima et al., 2020. Also, there is evidence of strong genetic structure among populations from the east bank of the upper Madeira River, northern portion of the Purus–Madeira Interfluvium, and municipality of Tefé. This indicates that additional lineages might deserve specific status, and their geographic occurrence must be assessed to understand the historical and ecological context of their evolutionary diversification.

In this study, we combined fine-scale population sampling and the use of multiple molecular-based analyses to assess the species richness within the *Allobates tinae* species complex, their phylogenetic relationships and spatial distributions. Also, we sought to investigate the biogeographic processes that generated and maintained the extant diversity of this species complex. Ultimately, we expect that these elucidations provide relevant insights into the relative roles of historical and ecological determinants of biotic diversification at Brazilian Southwestern Amazonia.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area and collection procedure

The study area is composed of different phytophysiognomies such as Dense Ombrophylous Forest, Open Ombrophylous Forest, Seasonal Semideciduous Forest, Alluvial Plains, Savanna, as well as degraded areas. (IBGE, 2012). Adult individuals of *Allobates tinae* species complex were collected in 23 localities (Table 1) distributed along three major interfluves (Juruá-Purus, Purus-Madeira and Madeira-Tapajós) across heterogeneous landscapes in Brazilian Southwestern Amazonia (Figure 1). Specimen collection was carried out during the rainy season, through field expeditions between November 2009 and March 2018.

2.2 Molecular data collection

We extracted total DNA from muscular tissues of *A. tinae* complex specimens using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison-WI, USA) according to the manufacturer's protocols. Via polymerase chain reaction (PCR), we amplified fragments of the mitochondrial genes 16S rRNA, cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) and cytochrome b gene (Cytb). The 16S rRNA ($n=28$) was amplified using the universal primers 16sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') and 16sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi, 1996). The COI ($n=16$) and Cytb ($n=8$). Were amplified using primers AnF1 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGACHAAYCAYAAGAYATYGG-3') and AnR1 (5'-AATACGACTCACTATAGCCRAARAATCA RAADARRTGTTG-3') (COI; Lyra et al., 2017) and AF.f (5'286 GACACCTCAATAGCYTTCTC 3') and AF.r (5'CGAAATGTTAGGSTRCGTTGAT 3') (Cytb; Simões et al., 2010). PCR reactions were performed following the protocols of Maia et al. (2017) (16S and Cytb) and Lyra

et al. (2017) (COI). PCR products were purified with polyethyleneglycol (PEG) 8000 and sequenced using standard protocols of the Big Dye™ Terminator Kit (Applied Biosystems) in an ABI PRISM® 3500 (Applied Biosystems) automated sequencer. All laboratory procedures, including sequencing, were conducted within the installations of the Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brazil. The sequences were checked and quality trimmed using Geneious 5.3.4 (Kearse et al., 2012).

In order to construct our molecular dataset integrating the large sampling for phylogenetic inference and investigate the relative timeframe of the *A. tinae* complex diversification, we obtained additional mitochondrial homologous gene sequences and fragments for our study species complex (ingroup) and other species of *Allobates* from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): 12S rRNA ($n=61$), 16S rRNA ($n=125$), COI ($n=58$), and Cytb ($n=32$). These sequences represented additional 31 individuals of the *A. tinae* complex and 62 individuals from other *Allobates* species (49 nominal and 13 undescribed species) (see Table S1). We opted not to use additional sequenced and published nuclear gene data because few samples from the *A. tinae* complex are available for them. Including these genes would have resulted in a high proportion of missing data in our dataset. While some studies suggest that including additional markers, particularly nuclear ones, can improve phylogenetic inference despite high levels of missing data (Wiens & Morrill, 2011), Bayesian inference methods are often cited as being particularly sensitive to missing data due to their reliance on probabilistic models to estimate evolutionary relationships (Roure et al., 2013; Yang & Rannala, 2012). Therefore, to avoid potential inaccuracies in our phylogenetic reconstruction, we decided to exclude these markers. We aligned the sequences on the MAFFT online server with default parameters except for use of the E-INS-i strategy for the rRNAs 12S and 16S, and the G-

INS-i strategy for the protein-coding COI and Cytb (Kato & Standley, 2013). The resulting gene alignments consisted of 956 bp (12S), 545 bp (16S), 1545 bp (COI) and 1139 bp (Cytb).

2.3 Phylogenetic relationships

We performed four phylogenetic inferences using both Bayesian and Maximum Likelihood frameworks. We concatenated the gene alignments, resulting in a final alignment comprising 125 terminals and 4185 base pairs. Outgroup sampling included representative species from most of the major clades of the genus (Réjaud et al., 2020). The first Bayesian tree was inferred from the entire dataset using MrBayes (v3.2.6; Ronquist et al., 2012). We employed PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear et al., 2017) to identify the best-fit partition schemes under the corrected Akaike Information Criterion (AICc). This method likely uses a greedy algorithm to determine the optimal partitioning strategy for the data (Lanfear et al., 2017). These partition schemes were then used to define models of nucleotide evolution for each data partition: one for each codon position of COI and Cytb, and one for the rRNAs. The models selected were GTR + G + I (for tRNAs and the third codon position of COI and Cytb), SYM + G + I (for the first codon position of COI and Cytb), and HKY + G + I (for the second codon position of COI and Cytb). The analysis was conducted with two parallel runs of MCMC chains, each with 10 million iterations, with thinning every 10,000 steps and a 10% initial burn-in. Convergence of parameters (standard deviation of split frequencies <0.01 and estimated sample size >200) was assessed in Tracer (v1.7; Rambaut et al., 2018) using combined data from both independent MCMC runs. The maximum clade credibility (MCC) tree was then constructed from the combined MCMC samples.

We used the same dataset to reconstruct a second, and ultrametric, Bayesian tree, used as an input in a delimitation analysis. This ultrametric tree was inferred using BEAST 2.6.3 (Bouckaert et al., 2014), with the best-fitting model set as GTR+G+X according to the AICc from a PartitionFinder analysis. In the absence of fossil records for the genus *Allobates* and closely related genera, we calibrated this tree using eight secondary node constraints based on a recent time-calibrated phylogeny of the genus inferred from a mitogenomic dataset (Réjaud et al., 2020). These dates were constrained with a normal prior distribution and detailed in Table S2 at the Supporting Information. The MCMC parameters were set to four independent runs with 20 million generations, thinning intervals of 10,000 steps, and a 10% initial burn-in. We checked the convergence of parameters (Effective sample size (ESS)>200) from the combined log file of the four runs using Tracer 1.7 (Bouckaert et al., 2014; Rambaut et al., 2018), and extracted the MCC tree using TreeAnnotator 2.6.3 (Bouckaert et al., 2014).

Based on the results of the species delimitation, we selected a single representative terminal per species and reconstructed another time-calibrated BEAST Bayesian tree using this sampling. For this reconstruction, we divided the dataset into the same seven partitions used in the MrBayes analysis and applied the corresponding bestfitting models identified by the AICc in a PartitionFinder analysis: GTR+G+X for the tRNAs, the first codon position of Cytb, and the third codon position of COI; TRN+G+X for the first codon position of COI and the third codon position of Cytb; HKY+I+X for the second codon position of COI; and HKY+X for the second codon position of Cytb. We employed a birth–death process to model speciation and extinction (Gehring et al., 2012) and an uncorrelated relaxed clock to account for evolutionary rate variation among branches (Drummond et al., 2006). The date calibrations for the nodes were the same as those used for the BEAST tree with the complete dataset, as well as the methods for extracting the

MCC tree. Finally, we estimated a Maximum Likelihood tree using the entire dataset with the IQ-TREE algorithm (Nguyen et al., 2015) on its web server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>), employing the best automatically inferred nucleotide substitution model (K2P+G4).

2.4 Species delimitation and phylogeographic analyses

To investigate the cryptic diversity within the *A. tinae* complex, we delimited putative species through the congruent results of three molecular methods: *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP), *multi-rate Poisson Tree Processes* (mPTP) and *Generalized Mixed Yule Coalescent*, with a Bayesian implementation for a single locus (bGMYC). The 16S gene was selected as the target marker for these delimitation analyses because of its wider coverage in our dataset and by the fact that it is widely used in both taxonomic delimitation (Lima et al., 2020; Moraes & Lima, 2021) and phylogeographic (Fernandes et al., 2021; Maia et al., 2017) studies on *Allobates*. The ASAP hierarchical clustering algorithm uses pairwise genetic distances to estimate multiple potential barcode gaps and sets minimum distance thresholds, which are used to partition samples into putative species; the selection of the best species partition in ASAP is based on a scoring system (Puillandre et al., 2021). ASAP was run using uncorrected distances on the web server [https:// bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/](https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/). The mPTP infers speciation events based on a shift in the number of substitutions between internal nodes, using a phylogenetic tree as input (Kapli et al., 2016; Zhang et al., 2013). We used the Maximum Likelihood tree as the input for the mPTP, which was then conducted at its web server <https://mptp.h-its.org>. The bGMYC delimitation is based on branching patterns in an ultrametric tree in which shallow and deeper branchings indicate coalescent and speciation processes (Fujisawa & Barraclough, 2013; Monaghan et al., 2009). We

used the Bayesian ultrametric tree estimated for the entire sampling as the input for this analysis. The bGMYC was performed in the R software (R Core Team, 2019), through the bGMYC package (Reid & Carstens, 2012). Finally, we define consensus species limits based on congruence between results from at least two of these three methods.

We calculated p genetic distances for the 16S among the newly delimited species of the *A. tinae* complex in MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Statistical significance for these distances was assessed through 1000 bootstrap replicates. The relative genetic structure among sampling sites was calculated using the fixation index (F_{ST} : Wright, 1949). The statistical significance of F_{ST} values was accessed through 1000 permutations in Arlequin software (Excoffier & Lischer, 2010)

We obtained a haplotype network for the 16S in *Haploview* (Barrett et al., 2005) using the previously generated maximum likelihood tree inferred through the IQTREE algorithm (Nguyen et al., 2015) on its web server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>). Each specimen sequence was assigned to a specific location according to sampling information. Haplotype networks are important phylogeographic tools as they graphically express the relationship between genetic and geographic data (Gehring et al., 2012).

We performed a multiple matrix regression with randomization (MMRR) analysis to estimate the effects of geographic distance (predictor variable) on genetic differentiation (response variable) through pairwise distance matrices between sampled locations. To estimate the geographic distance, we calculated a Euclidean distance matrix in kilometres from the GPS coordinates between each of the sampling sites. The statistical significance of the tests was accessed through 10,000 permutations (Wang & Tan, 2013), using the function ‘lgrMMRR’ of *PopGenReport* package (Adamack & Gruber, 2014) in the R software.

2.5 Divergence time and biogeographic analysis

The time-calibrated BEAST tree estimated with a single terminal per species was used to perform an ancestral area reconstruction using the ‘BioGeoBEARS’ R package (Matzke, 2013). As the newly delimited species have restricted distribution ranges, mostly in a single historically recognized Amazonian area of endemism, we considered the current species distributions as the proxies of biogeographic regions. We constrained the maximum number of occurrence areas for the ancestors to two, and limited the dispersal between non-adjacent areas. However, delineating non-adjacency in our context is challenging due to the restricted geographical space and a dynamic landscape history. Therefore, we considered riverine barriers, both current and hypothesized for the past, as the primary constraints for non-adjacency. Three diversification models were compared: Dispersal extinction cladogenesis (DEC) (Ree & Smith, 2008), Dispersal-Vicariance (DIVALIKE; Ronquist, 1997), and BayArea (BAYAREA; Landis et al., 2013), as well as those three models including founder-event speciation (J parameter; Matzke, 2013). Model fit was assessed under the AICc.

3 RESULTS

3.1 Phylogenetic relationships and spatial distributions

The Bayesian phylogenetic inference based on MrBayes recovered most of the recognized major clades of *Allobates* with high support, a result similar to that of was found by Rejaud et al. (2020). However, the relationships between the major clades mostly received intermediate to low supports, with the exception of relationships at the base of the tree (See Figure S1). Within the *A. tinae* complex, at least seven strongly

structured clades were recovered with high support, as well as most of the relationships among these clades (however, support values were lower for the relationships between two clades: *Allobates caldwellae* and *A. aff. tinae* 5). Only two of the seven recovered clades can be attributed to formally described species: *Allobates tinae* and *Allobates caldwellae*, represented by sequences of their type series. These nominal species are distributed in both latitudinal extremes of Purus-Madeira interfluve, with *A. tinae* occurring at the southernmost section and *A. caldwellae* at the northernmost one. The clade *A. aff. tinae* 1 groups individuals from the west bank of the lower Madeira River (Vila Rica do Caviana, in the Manacapuru municipality, and RAPELD sampling site—Module M3), and the east bank of this river section (Borba municipality). The clade *A. aff. tinae* 2 only nests individuals from the east bank of the upper Madeira River (Jaciparaná river region). Both *A. aff. tinae* 3 and *A. aff. tinae* 4 clades were more geographically constrained, grouping individuals from the west bank of the Purus River, in the Tefé municipality region and Indigenous Territory Camicua, respectively. Lastly, the *A. aff. tinae* 5 clade includes individuals distributed along the central portion of the Purus-Madeira interfluve (from the Beruri municipality and RAPELD sampling modules M5–M8). Interestingly, some geographically close clades were not evidenced as sister taxa, indicating a complex evolutionary history.

3.2 Species delimitation and phylogeographic analyses

The ASAP method mirrored the results obtained from the initial species delimitation analyses, where seven distinct clades were identified as separate species. The bGMYC analysis delimited the seven highly supported clades as distinct species, but it also indicated a subdivision of *A. tinae* into three species. (Figure 2). This subdivision

segregates both sympatric individuals and from its type series, we consider that it most likely represents an over splitting of the delimitation method. In contrast, the mPTP delimited only four species, and can be considered as over conservative since it clumped geographically distant populations. The consensus result of these three delimitation methods (seven species) can therefore be considered to adequately reflect this clade diversification at the species level. Interspecific genetic distances within the *Allobates tinae* complex were considerably high compared to the typically low variation observed in the 16S gene among frog species (Vences et al., 2005). This suggests a deeper evolutionary divergence within the complex. Higher interspecific genetic distances were found mainly between geographically distant species and between species from opposite riverbanks. The highest interspecific genetic distances (7.3% and 6.9%) were found between individuals of *A. aff. tinae* 3 (Juruá-Purus interfluve) and *A. aff. tinae* 1 (MadeiraTapajós interfluve). The lowest interspecific genetic distances observed between geographically separated species were 2.1% and 2.2%, found between specimens of *A. aff. tinae* 5 and *A. tinae* in the Purus-Madeira interfluve. Intraspecific genetic distances varied between 0.2% and 0.6% (Table S3). F_{ST} values showed a significant level of general groups structuring, demonstrating high structuring and, consequently, low sharing of mitochondrial DNA haplotypes between localities, where most were restricted to a single locality (Figure 3). The MMRR analysis showed that the genetic dissimilarity in this species complex was not directly influenced by linear geographical distances ($R^2 = .0089, p = .178$).

3.3 Divergence time and biogeographic history

According to the inferred time-calibrated Bayesian tree, the split between the *A. tinae* complex and its sister taxon (*Allobates granti* complex) was dated to the middle Miocene [ca. 11 million years ago (mya) (9.5–12.5 HPD)]. Within the *A. tinae* complex, the first species to diverge was the *A. aff. tinae* 1, during the late Miocene, at ca. 8 mya (6.4–9.7 HPD). The following splits within this complex correspond to the divergences of *A. aff. tinae* 2, during the middle Pliocene, at ca. 4.7 mya (3.7–5.7 HPD) and *A. aff. tinae* 4, during the late Pliocene, at ca. 3.3 mya (2.4–4.1 HPD). The remaining, and most recent, divergences within this complex initiated during the Pleistocene, with a split at ca. 2.6 mya (1.9–3.2 HPD). This split ultimately led to the divergence between *A. caldwellae* and *A. aff. tinae* 5, at ca. 2.3 mya (1.4–3.2 HPD), and between *A. tinae* and *A. aff. tinae* 3, at ca. 2.1 mya (1.4–2.9 HPD) (Figure 4).

Regarding the BioGeoBears analysis, the best-fitted model to the diversification of the *A. tinae* complex was the BAYAREA with the consideration of jump dispersal (BAYAREA+J–Table S4). The cladogenetic context and its timeframe indicate that the diversification of the *A. tinae* complex occurred mainly through dispersals followed by speciations. These dispersal/vicariant events started southward, and were followed by sequential secondary northward dispersals. The initial Miocene divergence (or vicariant event) that originated the most recent common ancestor of the entire *A. tinae* complex would be the result of a dispersal from the Guiana Shield region to the western Amazonian sedimentary basin (Figure 4). This dispersal event was followed by a southward dispersal during the Pliocene, culminating in the speciation of *A. aff. tinae* 2. Another Pliocene dispersal from that southern clade would have generated *A. aff. tinae* 4, currently

restricted to the west bank of the Purus River. Following events of diversification within this complex would have originated from the ancestor of *A. aff. tinae* 4, during the Pleistocene. The first dispersal event originated from this ancestral area and reached the southern Purus-Madeira Interfluve region. This dispersal culminated in the speciation of *A. tinae*. This was followed by two other dispersals/speciations from the *A. tinae* ancestor, the first through the central interfluve region, and the second again to the left bank of the Madeira River). Lastly, the ancestors that inhabited the central and southern region of the Purus-Madeira interfluve would have dispersed to the northernmost section of this interfluve and to the western bank of the Purus River respectively, originating *A. caldwellae* and *A. aff. tinae* 3 (Figure 4).

Recognizing the ongoing debate on a potentially biased model selection when including the +J parameter (Ree & Sanmartin, 2018), we also explore the biogeographic history of *A. tinae* complex without considering this parameter. The results from the best-fitted model (DIVA) indicate that the earliest diversification events within the species complex were instead likely generated by dispersal and vicariance. The most recent diversification events, generated by dispersals followed by speciation, involves the area currently occupied by *Allobates aff. tinae* 3 (Tefé region) and dispersed eastward and southward, originating *A. tinae*, *A. caldwellae* and *A. aff. tinae* 5. Thus, when we consider historical river rearrangements and the current permeability between river courses, we recognize that the region is dynamic and that such events may have facilitated dispersal and vicariance in a more complex way than previously thought. This makes the DIVA hypothesis a plausible interpretation of biogeographic history. It is important to highlight that, as with the MrBayes phylogenetic analysis, some nodes in the inferred time-calibrated tree were poorly supported. This is especially notable considering the most

recent cladogenetic events and the positioning of *Allobates* aff. *tinae* 4. If we consider that the actual positioning of this taxon is the one inferred in the previous tree, another biogeographic history would be more plausible. However, this alternative biogeographic hypothesis would not be drastically different, with *A.* aff. *tinae* 4 instead diversifying by a dispersal event from the current range of *A. tinae* (BAYAREA+J), or *A.* aff. *tinae* 3 (DIVA). In any case, we emphasize that these more uncertain results regarding phylogenetic positioning of recent taxa and their consequent biogeographical history must be interpreted with caution.

4 DISCUSSION

We found pronounced genetic structure, high genetic distance and low levels of haplotype sharing between major internal clades of the *Allobates tinae* complex, even considering geographically close sampling localities and without the influence of evident physical barriers. Such evidence corroborates a diversification pattern observed for another anuran in the Purus-Madeira interfluvium, the slender-legged treefrog *Osteocephalus taurinus* (Ortiz et al., 2018). Despite being large, arboreal, and having greater dispersal capacity than the small and terrestrial members of *A. tinae* complex, *O. taurinus* also presents two distinct intraspecific lineages highly associated with the main forest types within the Purus-Madeira interfluvium, Dense Ombrophilous Forest in the northeastern and Open Ombrophilous Forest in the southwestern (Ortiz et al., 2018). In contrast, phylogeographic inferences of a congeneric and morphologically similar species (*Allobates sumtuosus*) inhabiting an Amazonian region known to be more stable over geological time (Guiana Shield), demonstrated a much less pronounced genetic structure over a similar geographic scale (Fernandes et al., 2021). These contrasting evidences

demonstrate that not only the ecomorphological traits of some anuran species (such as their small size, low vagility, territoriality and high philopatry) may contribute to their diversification and cryptic speciation (Avice, 2004; Fernandes et al., 2021; Ortiz et al., 2018; Vences & Wake, 2007; Zeisset & Beebee, 2008), but also idiosyncrasies inherent to the studied lineages and their relationship with environments over historical and ecological times.

Cryptic diversification is widely known for many Amazonian vertebrate groups (Funk et al., 2011; MarquesSouza et al., 2020; Schultz et al., 2017). Due to limited sampling and unresolved taxonomy, the data is unknown or underestimated (Grant et al., 2017; Réjaud et al., 2020; Santos et al., 2009). Our genetic evidence suggests that *Allobates tinae* complex is in fact composed of multiple cryptic species, as evidenced by the genetic distances among the major internal clades (greater than 3%), which is a reference value for the mitochondrial 16S marker in delimiting closely related species (Vences et al., 2005). This evidence corroborates the results of Lima et al. (2020) by contradicting the initial idea that *A. tinae* is a widely distributed species (Melo-Sampaio et al., 2018). Furthermore, only two of the seven major clades have been named as *A. caldwella* and *A. tinae*, which represent one third of their current diversity that is relevant for biogeographic and conservationist perspectives.

Large Amazonian rivers are historically recognized as relevant biogeographical barriers for individuals and species typically from non-flooded forests by reducing or impeding their dispersal across its banks (Ribas et al., 2012). The influence of these riverine barriers on the dispersal of other vertebrate groups remains less understood (Ortiz et al., 2018; Peixoto et al., 2020; Pirani et al., 2020; Réjaud et al., 2020; Ruokolainen et al., 2019).

Considering the *Allobates tinae* complex, which occurs in the Inambari and Rondônia areas of endemism (bordered by the Madeira River), there is mixed evidence for riverine barriers structuring genetic patterns. While the lower Madeira River does not seem to limit the occurrence of *A. aff. tinae* 1, the species from the upper Madeira River (*A. tinae* and *A. aff. tinae* 2) seem to have their current distributions limited by this river. Such a pattern is unexpected, because the Amazonian rivers headwaters are known to favour gene flow among populations, thus preventing speciation diversification (Weir et al., 2015). On the other hand, the Purus, a meandering river, is not generally considered an important barrier to the dispersal of vertebrates such as birds (Ribas et al., 2012). However, our results suggest that it may limit the distribution of species specialized in terra firme forests within the *A. tinae* complex, such as *A. tinae*, *A. aff. tinae* 4, and *A. caldwellaie*. This pattern of mixed evidence can be attributed to the fact that part of the diversification of the *A. tinae* complex took place before the full establishment of these large rivers, while another part occurred after their establishment (Hoorn et al., 2010). This results indicates a permeable effect of large rivers as barriers to this species complex and reinforce the influence of dispersal events followed by speciation. However, it is noteworthy that large river channels, as well as associated riparian forests (Moraes et al., 2016; Naka & Brumfield, 2018), may have contributed as secondary barriers during the *A. tinae* complex diversification by limiting dispersal events and, consequently, generating and maintaining lineage diversity.

The divergence between *A. caldwellaie* and *A. tinae* in the absence of current physical barriers might be explained by the massive environmental changes and historical events that took place in this region, such as the changing of rivers, glaciers, marine incursions, and the formation of Pebas Lake (Hoorn et al., 2022). In general, the geographic

distribution of major clades of the *A. tinae* complex in the Purus-Madeira interfluvium does not fully match to all suggested ecoregions for this region (Ximenes et al., 2021). Therefore, the spatial organization of these clades must have occurred before the emergence of the currently observed ecological heterogeneity, especially considering that the non-flooded forests have been suggested to be recent in this region (Ribas et al., 2018). Complex patterns of lineage and species distribution observed in Southwestern Amazonia are common in heterogeneous regions where varying forest covers and landscape components can influence gene flow among populations (Oliveira & Scheffers, 2019; Ortiz et al., 2018). Consequently, in alignment with observed genetic differentiation patterns, ecological processes such as environmental heterogeneity and habitat selection have likely played a role in driving the diversification and speciation of the *A. tinae* complex on a finer scale, as seen in previous studies with different taxa (McCartney-Melstad & Shaffer, 2015; Shafer & Wolf, 2013).

Some historical biogeographic events in Brazilian Southwestern Amazonia seem to be relevant for the dispersal events and current geographic distributions within the *Allobates tinae* complex. The most recent common ancestor of the *A. tinae* complex would have originated from a southern dispersal from the Guiana Shield, and such a dispersal was likely facilitated by the increased permeability between these regions before the establishment of the Amazon River (Hoorn et al., 2010). This same dispersal route was observed considering the diversification of *Amazophrynella*, another Amazonian genus typical from non-flooded forests, but in the opposite direction (Moraes et al., 2022). Despite this initial diversification, the ancestor of the *A. tinae* complex would have remained geographically constrained to a small area since the entire western region of the Amazonian biome was covered by unsuitable habitats: a huge lacustrine environment

(Pebas system) and its associated floodplain forests (MéndezCamacho et al., 2021; Réjaud et al., 2020). Following the continuous influx of Andean sediment along the Miocene, this lacustrine environment was drained towards the East, originating the proto-Amazon River (Hoorn et al., 2010). Concomitantly, the *A. tinae* complex dispersed and diversified to the south and later to the west, following the continuous development of non-flooded forests in this region (Hoorn et al., 2010). Brazilian Southwestern Amazonia has also been historically subject to various hydrographic captures led by neotectonic events, and evidence indicates that the large rivers in the region have considerably modified their courses until the Pleistocene/Holocene (Rossetti et al., 2019). This intense landscape dynamism certainly influenced the evolutionary history of the *A. tinae* complex, both by promoting speciation events or preventing them (Musher et al., 2022), and even the evidenced dispersal/speciation may in fact be the result of drainage captures. Therefore, such a diversification history of the *A. tinae* complex supports that both the historical high landscape dynamism of the Brazilian Southwestern Amazonia (Hoorn et al., 2010) and its historical and current environmental complexity (Ortiz et al., 2018; Peixoto et al., 2023) played fundamental roles in generating and maintaining its megadiverse biota.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Universal grant no. 401120/2016-3 to APL) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM; #653/2009). We thank Santo Antônio Energia S.A. for financial and logistical support during the fieldwork

on the upper Madeira River; Centro de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica (CENBAM) for assistance with fieldwork at the Purus-Madeira interfluvium. Gabriela F. Maia is grateful to the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for a doctoral scholarship (CAPES; #88882.347457/2019-01). Miquéias Ferrão thanks the Harvard Museum of Comparative Zoology, the David Rockefeller Center for Latin American Studies of Harvard University, GEF Terrestre, RANICMBio and CAPES (#88887.927982/2023-00) for fellowships. Leandro J.C.L. Moraes was funded by scholarships from CAPES (#88887.630472/2021-00) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; #2022/01213-7). Brazilian CNPq and FAPESP provided productivity fellowships to Igor L. Kaefer (#3100078/2022-9) and Albertina P. Lima (Edital #013/2022), respectively.

REFERENCES

- Adamack, A. T., & Gruber, B. (2014). PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, *5*, 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
- Antonelli, A., Ariza, M., Albert, J., Andermann, T., Azevedo, J., Bacon, C., Faurby, S., Guedes, T., Hoorn, C., Lohmann, L., Matos-Maraví, P., Ritter, C., Sanmartín, I., Silvestro, D., Tejedor, M., ter, H., Tuomisto, H., Werneck, F., Zizka, A., & Edwards, S. (2018). Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. *PeerJ*, *6*, e5644. <https://doi.org/10.7717/peerj.5644>
- Avise, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. Sinauer.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, *21*, 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M., Rambaut, A., & Drummond, A. (2014). BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, *10*, e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Cracraft, J. (1985). Historical biogeography and patterns of differentiation within the south American avifauna: Areas of endemism. *American Ornithologists Union Ornithology Monographs*, *36*, 49–84. <https://doi.org/10.2307/40168278>
- Dambros, C. S., Morais, J. W., Azevedo, R. A., & Gotelli, N. J. (2017). Isolation by distance, not rivers, control the distribution of termite species in the Amazonian rain forest. *Ecography*, *40*, 1242–1250. <https://doi.org/10.1111/ecog.02663>
- Dias-Terceiro, R. G., Kaefer, I. L., de Fraga, R., de Araújo, M. C., Simões, P. I., & Lima, A. P. (2015). A matter of scale: Historical and environmental factors structure anuran assemblages from the upper Madeira River, Amazonia. *Biotropica*, *47*, 259–266. <https://doi.org/10.1111/btp.12197>

Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed Phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, *4*, e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Fernandes, A. M. (2013). Fine-scale endemism of Amazonian birds in a threatened landscape. *Biodiversity and Conservation*, *22*, 2683–2694. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0546-9>

Fernandes, A. M., Cohn-Haft, M., Hrbek, T., & Farias, I. P. (2014). Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. *Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology*, *22*, 361–371. <https://doi.org/10.1007/BF03544273>

Fernandes, I. Y., Moraes, L. J. C. L., Menin, M., Farias, I. P., Lima, A. P., & Kaefer, I. L. (2021). Unlinking the speciation steps: Geographical factors drive changes in sexual signals of an Amazonian nurse-frog through body size variation. *Evolutionary Biology*, *48*, 81–93. <https://doi.org/10.1007/s11692-020-09525-7>

Ferrão, M., Colatreli, O., Fraga, R., Kaefer, I. L., Moravec, J., & Lima, A. P. (2016). High species richness of *Scinax* Treefrogs (Hylidae) in a threatened Amazonian landscape revealed by an integrative approach. *PLoS One*, *11*, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165679>

Ferrão, M., Fraga, R. d., Moravec, J., Kaefer, I. L., & Lima, A. P. (2018). A new species of Amazonian snouted treefrog (Hylidae: *Scinax*) with description of a novel species-habitat association for an aquatic breeding frog. *PeerJ*, *6*, e4321. <https://doi.org/10.7717/peerj.4321>

Ferrão, M., Hanken, J., & Lima, A. P. (2022). A new nurse frog of the *Allobates tapajos* species complex (Anura: Aromobatidae) from the upper Madeira River, Brazilian Amazonia. *PeerJ*, *10*, e13751. <https://doi.org/10.7717/peerj.13751>

Ferreira, A. S., Jehle, R., Stow, A. J., & Lima, A. P. (2018). Soil and forest structure predicts large-scale patterns of occurrence and local abundance of a widespread Amazonian frog. *PeerJ*, *6*, e5424. <https://doi.org/10.7717/peerj.5424>

Ferreira, A. S., Lima, A. P., Jehle, R., Ferrão, M., & Stow, A. (2020). The influence of environmental variation on the genetic structure of a poison frog distributed across continuous amazonian rainforest. *Journal of Heredity*, *111*, 457–470. <https://doi.org/10.1093/jhered/esaa034>

Fouquet, A., Courtois, E. A., Baudain, D., Lima, J. D., Souza, S. M., Noonan, B. P., & Rodrigues, M. T. (2015). The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Tropical Ecology*, *31*, 361–373. <https://doi.org/10.1017/S0266467415000206>

Frost, D. R. (2024). *Amphibian species of the world: An online reference*. Version 6.2 (Retrieved May 10, 2024). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, *62*, 707–724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>

Funk, W. C., Caminer, M., & Ron, S. R. (2011). High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*, 1806–1814. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1653>

Gehring, P. S., Pabijan, M., Randrianirina, J. E., Glaw, F., & Vences, M. (2012). The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *64*, 618–632. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.018>

Godinho, M. B. D. C., & Da Silva, F. R. (2018). The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. *Scientific Reports*, 8, 3427.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21879-9>

Grant, T., Frost, D., Caldwell, J., Gagliardo, R., Haddad, C., Kok, P., Means, D., Noonan, B., Schargel, W., & Wheeler, W. (2006). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *American Museum of Natural History*, 299, 1–262. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)299\[1:PSODFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)299[1:PSODFA]2.0.CO;2)

Grant, T., Rada, M., Anganoy-Criollo, M., Batista, A., Dias, P. H., Jeckel, A. M., Machado, D., & Rueda-Almonacid, J. (2017). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives revisited (Anura: Dendrobatoidea). *South American Journal of Herpetology*, 12, S1–S90. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00017.1>

Hoorn, C., Bogotá-A, G. R., Romero-Baez, M., Lammertsma, E. I., Flantua, S. G. A., Dantas, E. L., Dino, R., do, D., & Chemale, F., Jr. (2017). The Amazon at sea: Onset and stages of the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in the drainage basin. *Global and Planetary Change*, 153, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2017.02.005>

Hoorn, C., Boschman, L. M., Kukla, T., Sciumbata, M., & Val, P. (2022). The Miocene wetland of western Amazonia and its role in Neotropical biogeography. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1–11, 25–35. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab098>

Hoorn, C., Wesselingh, F. P., ter, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C., Figueiredo, J., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T., & Antonelli, A. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330, 927–931. <https://doi.org/10.1126/science.1194585>

IBGE. (2012). *Manual técnico da vegetação brasileira: Sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, técnicas e manejo de coleções botânicas, procedimentos para mapeamentos*. IBGE—Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Kaefer, I. L., Tsuji-Nishikido, B. M., Mota, E. P., Farias, I. P., & Lima, A. P. (2013). The early stages of speciation in Amazonian forest frogs: Phenotypic conservatism despite strong genetic structure. *Evolutionary Biology*, *40*, 228–245. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9205-4>

Kapli, T., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2016). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, *33*, 1630–1638. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Landis, M. J., Matzke, N. J., Moore, B. R., & Huelsenbeck, J. P. (2013). Bayesian analysis of biogeography when the number of areas is large. *Systematic Biology*, *62*, 789–804. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt040>

Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, *34*, 772–773.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>

Lima, A. P., Ferrão, M., & Lacerda da Silva, D. (2020). Not as widespread as thought: Integrative taxonomy reveals cryptic diversity in the Amazonian nurse frog *Allobates tinae* Melo-Sampaio, Oliveira and Prates, 2018 and description of a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *58*, 1173–1194. <https://doi.org/10.1111/jzs.12406>

Lougheed, S. C., Gascon, C., Jones, D. A., Bogart, J. P., & Boag, P. T. (1999). Ridges and rivers: A test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, *266*, 1829–1835. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0853>

Lyra, M. L., Haddad, C. F. B., & de Azeredo-Espin, A. M. L. (2017). Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: Polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, *17*, 966–980. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12648>

Maia, G. F., Lima, A. P., & Kaefer, I. L. (2017). 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*, *121*, 95–108. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blw017>

Marques-Souza, S., Machado Pellegrino, K. C., Oliveira Brunes, T., Carnaval, A. C., Pacheco Damasceno, R., Lima de Oliveira Borges, M., & Rodrigues, M. T. (2020). Hidden in the DNA: How multiple historical processes and natural history traits shaped patterns of cryptic diversity in an Amazon leaf-litter lizard *Loxopholis osvaldoi* (Squamata: Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography*, *47*, 501–515. <https://doi.org/10.1111/jbi.13748>

Matzke, N. J. (2013). Probabilistic historical biogeography: New models for founder-event speciation, imperfect detection, and fossils allow improved accuracy and model-testing. *Frontiers of Biogeography*, 5(4), 242–248. <https://doi.org/10.21425/F5FBG19694>

McCartney-Melstad, E., & Shaffer, H. B. (2015). Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. *Molecular Ecology*, 24, 5084–5109. <https://doi.org/10.1111/mec.13391>

Melo-Sampaio, P. R., Oliveira, R. M. D., & Prates, I. (2018). A new nurse frog from Brazil (Aromobatidae: *Allobates*), with data on the distribution and phenotypic variation of western Amazonian species. *South American Journal of Herpetology*, 13, 131–149. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00098.1>

Méndez-Camacho, K., Leon-Alvarado, O., & Miranda-Esquivel, D. R. (2021). Biogeographic evidence supports the old Amazon hypothesis for the formation of the Amazon fluvial system. *PeerJ*, 9, e12533. <https://doi.org/10.7717/peerj.12533>

Menger, J., Magnusson, W. E., Anderson, M. J., Schlegel, M., Pe, G., & Henle, K. (2017). Environmental characteristics drive variation in Amazonian understory bird assemblages. *PLoS One*, 1–20, e0171540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171540>

Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., Lees, D., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T., & Vogler, A. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, 58, 298–311. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp027>

Moraes, L. J. C. L., & Lima, A. P. (2021). A new nurse frog (*Allobates*, Aromobatidae) with a cricket-like advertisement call from eastern Amazonia. *Herpetologica*, 77, 146–163. <https://doi.org/10.1655/herpetologica-d-20-00010.1>

Moraes, L. J. C. L., Werneck, F. P., Réjaud, A., Rodrigues, M. T., Prates, I., Glaw, F., Kok, P. J. R., Ron, S. R., Chaparro, J. C., OsornoMuñoz, M., Dal Vechio, F., Recoder,

R. S., Marques-Souza, S., Rojas, R. R., Demay, L., Hrbek, T., & Fouquet, A. (2022). Diversification of tiny toads (Bufonidae: *Amazophrynella*) sheds light on ancient landscape dynamism in Amazonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, *136*, 75–91. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blac006>.

Moraes, L. J. C. L., Pavan, D., Barros, M. C., & Ribas, C. C. (2016). The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography*, *2113–2124*, 2113–2124. <https://doi.org/10.1111/jbi.12756>

Moraes, L. J. C. L., Pavan, D., & Lima, A. P. (2019). A new nurse frog of *Allobates masniger-nidicola* complex (Anura, Aromobatidae) from the east bank of Tapajós River, eastern Amazonia. *Zootaxa*, *4648*, 401–434. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4648.3.1>

Musher, L. J., Giakoumis, M., Albert, J., del-Rio, G., Rego, M., Thom, G., Aleixo, A., Ribas, C., Brumfield, R., Smith, B., & Cracraft, J. (2022). River network rearrangements promote speciation in lowland Amazonian birds. *Science Advances*, *1–15*, eabn1099. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1099>

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, *403*, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>

Naka, L. N., & Brumfield, R. T. (2018). The dual role of Amazonian rivers in the generation and maintenance of avian diversity. *Science Advances*, *4*, eaar8575. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8575>

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Oliveira, B. F., & Scheffers, B. R. (2019). Vertical stratification influences global patterns of biodiversity. *Ecography*, *42*, 249. <https://doi.org/10.1111/ecog.03636>

Ortiz, D. A., Lima, A. P., & Werneck, F. P. (2018). Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. *Evolutionary Ecology*, *32*, 359–378. <https://doi.org/10.1007/s10682-018-9939-2>

Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In D. M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (pp. 205–247). Sinauer & Associates Inc.

Paz, A., Ibáñez, R., Lips, K. R., & Crawford, A. J. (2015). Testing the role of ecology and life history in structuring genetic variation across a landscape: A trait-based phylogeographic approach. *Molecular Ecology*, *24*, 3723–3737. <https://doi.org/10.1111/mec.13275>

Peixoto, G. M., de Fraga, R., Araújo, M. C., Kaefer, I. L., & Lima, A. P. (2020). Hierarchical effects of historical and environmental factors on lizard assemblages in the upper Madeira River, Brazilian Amazonia. *PLoS One*, *15*, e0233881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233881>

Peixoto, G. M., de Fraga, R., Magnusson, W. E., Leitão, P. H., Kaefer, I. L., & Lima, A. P. (2023). Disentangling the effects of environmental and geographic distances on lizard assemblages in Amazonian forests. *Journal of Biogeography*, *00*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/jbi.14591>

Pirani, R. M., Peloso, P. L. V., Prado, J. R., Polo, É. M., Knowles, L. L., Ron, S. R., Rodrigues, M., Sturaro, M., & Werneck, F. (2020). Diversification history of clown tree frogs in Neotropical rainforests (Anura, Hylidae, *Dendropsophus leucophyllatus* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *150*, 106877. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106877>

Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: Assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, *21*(2), 609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>

R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*, 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

Ree, R. H., & Smith, S. A. (2008). Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and Cladogenesis. *Systematic Biology*, *57*, 4–14. <https://doi.org/10.1080/10635150701883881>

Reid, N. M., & Carstens, B. C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: A Bayesian implementation of the general mixed yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, *12*, 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-196>

Réjaud, A., Rodrigues, M. T., Crawford, A. J., Castroviejo-Fisher, S., Jaramillo, A. F., Chaparro, J. C., Glaw, F., Gagliardi-Urrutia, G., Moravec, J., de, I., Perez, P., Lima, A., Werneck, F., Hrbek, T., Ron, S., Ernst, R., Kok, P., Driskell, A., Chave, J., & Fouquet, A. (2020). Historical biogeography identifies a possible role of Miocene wetlands in the diversification of the Amazonian rocket frogs (Aromobatidae: *Allobates*). *Journal of Biogeography*, *47*, 2472–2482. <https://doi.org/10.1111/jbi.13937>

Ribas, C. C., Aleixo, A., Gubili, C., d'Horta, F. M., Brumfield, R. T., & Cracraft, J. (2018). Biogeography and diversification of *Rhegmatorhina* (Aves: Thamnophilidae): Implications for the evolution of Amazonian landscapes during the quaternary. *Journal of Biogeography*, *45*, 917–928. <https://doi.org/10.1111/jbi.13169>

Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y., & Cracraft, J. (2011). A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past

three million years. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, Series B*, 279, 681–689.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1120>

Rojas, D., Lima, A. P., Momigliano, P., Simões, P. I., Dudaniec, R. Y., de Avila-Pires, T. C. S., & Stow, A. (2020). The evolution of polymorphism in the warning coloration of the Amazonian poison frog *Adelphobates galactonotus*. *Heredity*, 124, 439–456.

<https://doi.org/10.1038/s41437-019-0281-4>

Rojas, R. R., Fouquet, A., Ron, S. R., Hernández-Ruz, E. J., MeloSampaio, P. R., Chaparro, J. C., Vogt, R., Carvalho, V., Pinheiro, L., Avila, R., Farias, I., Gordo, M., & Hrbek, T. (2018). A panAmazonian species delimitation: High species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). *PeerJ*, 6, e4941.

<https://doi.org/10.7717/peerj.4941>

Ronquist, F. (1997). Dispersal–Vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, 46, 195–203.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/46.1.195>

Ronquist, F., Teslenko, M., van, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., & Huelsenbeck, J. (2012). MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Rossetti, D. d. F., Gribel, R., Cohen, M. C. L., Valeriano, M. d. M., Tatumi, S. H., & Yee, M. (2019). The role of late PleistoceneHolocene tectono-sedimentary history on the origin of patches of savanna vegetation in the middle Madeira River, southwest of the Amazonian lowlands. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 526, 136–156. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.04.017>

Rossetti, D. F., Cohen, M. C. L., Bertani, T. C., Hayakawa, E. H., Paz, J. D. S., Castro, D. F., & Friaes, Y. (2014). Late quaternary fluvial terrace evolution in the main southern Amazonian tributary. *Catena*, 116, 19–37. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.11.021>

021

- Roure, B., Baurain, D., & Philippe, H. (2013). Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 197–214. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss208>
- Ruokolainen, K., Moulatlet, G. M., Zuquim, G., Hoorn, C., & Tuomisto, H. (2019). Geologically recent rearrangements in central amazonian river network and their importance for the riverine barrier hypothesis. *Frontiers of Biogeography*, *11*, e45046. <https://doi.org/10.21425/F5FBG45046>
- Santos, J. C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R., & Cannatella, D. C. (2009). Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS Biology*, *7*, 448–461. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000056>
- Schultz, E. D., Burney, C. W., Brumfield, R. T., Polo, E. M., Cracraft, J., & Ribas, C. C. (2017). Systematics and biogeography of the *Automolus infuscatus* complex (Aves; Furnariidae): Cryptic diversity reveals western Amazonia as the origin of a transcontinental radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *107*, 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.023>
- Shafer, A. B. A., & Wolf, J. B. W. (2013). Widespread evidence for incipient ecological speciation: A meta-analysis of isolation-by-ecology. *Ecology Letters*, *16*, 940–950. <https://doi.org/10.1111/ele.12120>
- Simões, P. I., Lima, A. P., & Farias, I. P. (2010). The description of a cryptic species related to the pan-Amazonian frog *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Anura: Aromobatidae). *Zootaxa*, *28*, 1–28. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2406.1.1>
- Souza, J. R. D., Ferrão, M., Kaefer, I. L., Cunha-Machado, A. S., Melo-Sampaio, P. R., Hanken, J., & Lima, A. P. (2023). A new pale-ventered nurse frog (Aromobatidae: *Allobates*) from southwestern Brazilian Amazonia. *Vertebrate Zoology*, *73*, 647–675. <https://doi.org/10.3897/vz.73.e103534>.

Vacher, J., Chave, J., Ficetola, F. G., Sommeria-Klein, G., Tao, S., Thébaud, C., Blanc, M., Camacho, A., Cassimiro, J., Colston, T., Dewynter, M., Ernst, R., Gaucher, P., Gomes, J., Jairam, R., Kok, P., Lima, J., Martinez, Q., Marty, C., ... Fouquet, A. (2020). Largescale DNA-based survey of frogs in Amazonia suggests a vast underestimation of species richness and endemism. *Journal of Biogeography*, *47*, 1781–1791. <https://doi.org/10.1111/jbi.13847>

Vences, M., Thomas, M., Meijden, A. V. D., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, *12*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-5>

Vences, M., & Wake, D. B. (2007). Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian Biology, Systematics*, *7*, 2613–2670.

Wallace, A. R. (1852). On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, *14*, 107–110.

Wang, J., & Tan, Y. (2013). Efficient Euclidean distance transform algorithm of binary images in arbitrary dimensions. *Pattern Recognition*, *46*(1), 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2012.07.030>

Weir, J. T., Faccio, M. S., Pulido-Santacruz, P., Barrera-Guzmán, A. O., & Aleixo, A. (2015). Hybridization in headwater regions, and the role of rivers as drivers of speciation in Amazonian birds. *Evolution*, *69*, 1823–1834. <https://doi.org/10.1111/evo.12696>

Wiens, J. J., & Morrill, M. C. (2011). Missing data in phylogenetic analysis: Reconciling results from simulations and empirical data. *Systematic Biology*, *60*, 719–731. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr025>

Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics*, *15*, 323–354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>

Ximenes, A. C., Amaral, S., Monteiro, A. M. V., Almeida, R. M., & Valeriano, D. M. (2021). Mapping the terrestrial ecoregions of the Purus-Madeira interfluvium in the

Amazon Forest using machine learning techniques. *Forest Ecology and Management*, 488, 118960. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.118960>

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practices. *Nature Reviews Genetics*, 13, 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

Zeisset, I., & Beebee, T. J. C. (2008). Amphibian phylogeography: A model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101, 109–119. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.30>

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

Table and figure legends

Table 1. Sampling localities of the *Allobates tinae* complex in Brazilian Southwestern Amazonia, with their geographical coordinates.

Fig. 1 Geographic distribution of sampling localities of the *Allobates tinae* complex, with its internal major clades represented by different colors. Purple star shows the type locality of *Allobates tinae* and yellow star shows the type locality of *Allobates caldwellae*. Map created in QGIS 3.3 "s-Hertogenbosch" (<http://qgis.osgeo.org>). State abbreviations: AM = Amazonas, AC = Acre, MT = Mato Grosso, RO = Rondônia.

Fig. 2 Phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex reconstructed through Bayesian inference from four mitochondrial DNA genes (12S, 16S, COI, Cytb). Nodal support values are shown at branches. This tree is an internal clade of a more comprehensive tree of the genus *Allobates*, presented in Supporting Information (Figure S1). The colored bars on the right represent the results of the species delimitation analyses (ASAP, mPTP and bGMYC) and their consensus (CONS).

Fig. 3 Haplotype network with 59 sequences of 16S mitochondrial DNA gene for the *Allobates tinae* complex. The size of each circle indicates the relative haplotype frequency, and their distinct color indicates the geographical origin of individuals according to the map depicted in Fig. 1.

Fig. 4 Bayesian time-calibrated phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex and the results of the BioGeoBears analysis (A). Nodal support values are shown at branches (asterisks: posterior probability = 1.0), and blue horizontal bars on nodes correspond to their 95% HPD. Black dots on nodes represent calibration points. Colored terminals correspond to those identified as distinct species according to our delimitation analyses (Fig. 2), also representing their geographical distribution for the BioGeoBears analysis. In (B), the hypothetical evolutionary history of dispersals and speciations indicated by the BAYAREA+J model in the BioGeoBears, following the major landscape changes in Brazilian Southwestern Amazonia.

Fig. S1 Phylogenetic tree of the genus *Allobates* reconstructed through Bayesian inference from four mitochondrial DNA genes (12S, 16S, COI, Cytb). Nodal support values are shown at branches. The target clade, *Allobates tinae* complex, is highlighted

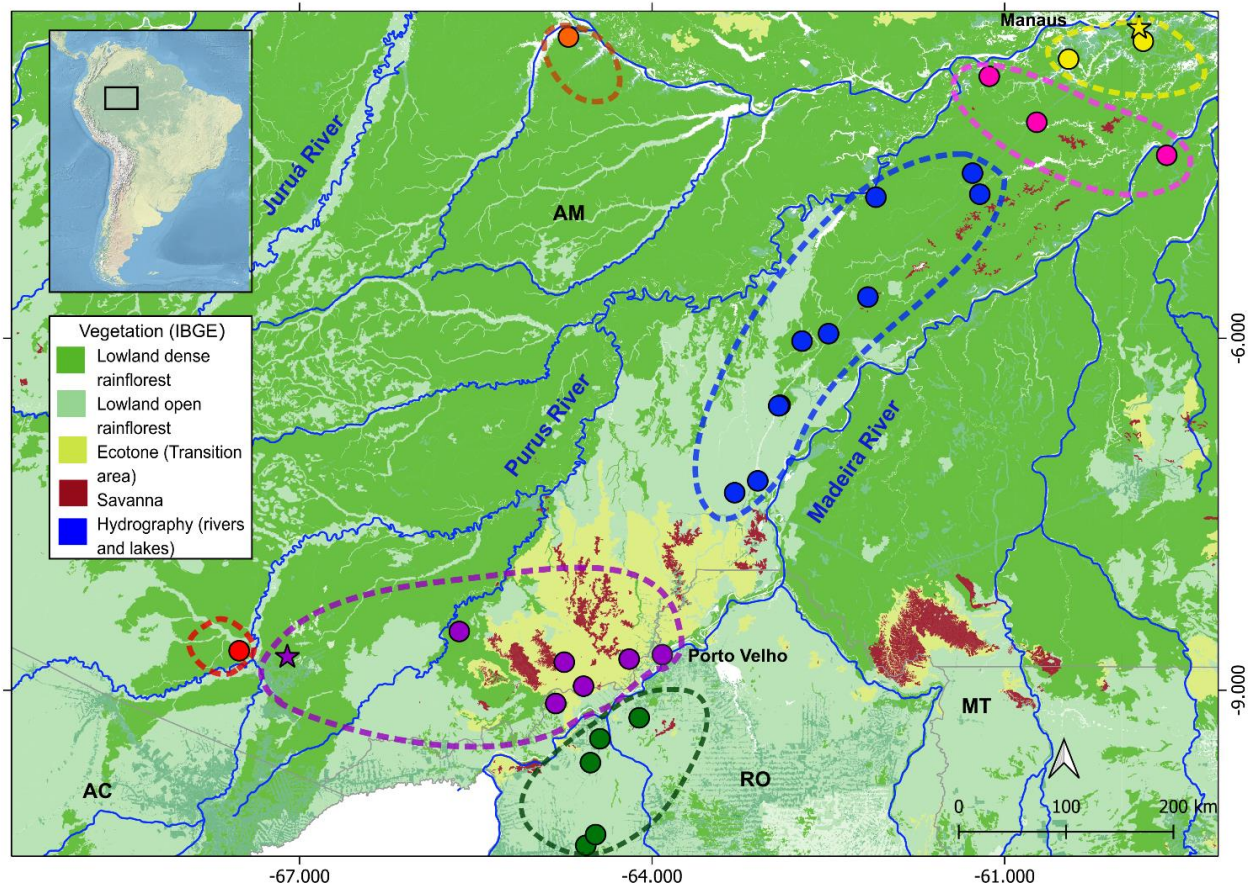
by colors representing the results of the consensus of the species delimitation analyses (ASAP, mPTP and bGMYC).

Fig. S2 Bayesian time-calibrated phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex and the results of the BioGeoBears analysis (A). Nodal support values are shown at branches (asterisks: posterior probability = 1.0), and blue horizontal bars on nodes correspond to their 95% HPD. Black dots on nodes represent calibration points. Colored terminals correspond to those identified as distinct species according to our delimitation analyses (Fig. 2 in the main text), also representing their geographical distribution for the BioGeoBears analysis. In (B), the hypothetical evolutionary history of vicariance and dispersals followed by speciations indicated by the DIVA model in the BioGeoBears, following the major landscape changes in Brazilian Southwestern Amazonia.

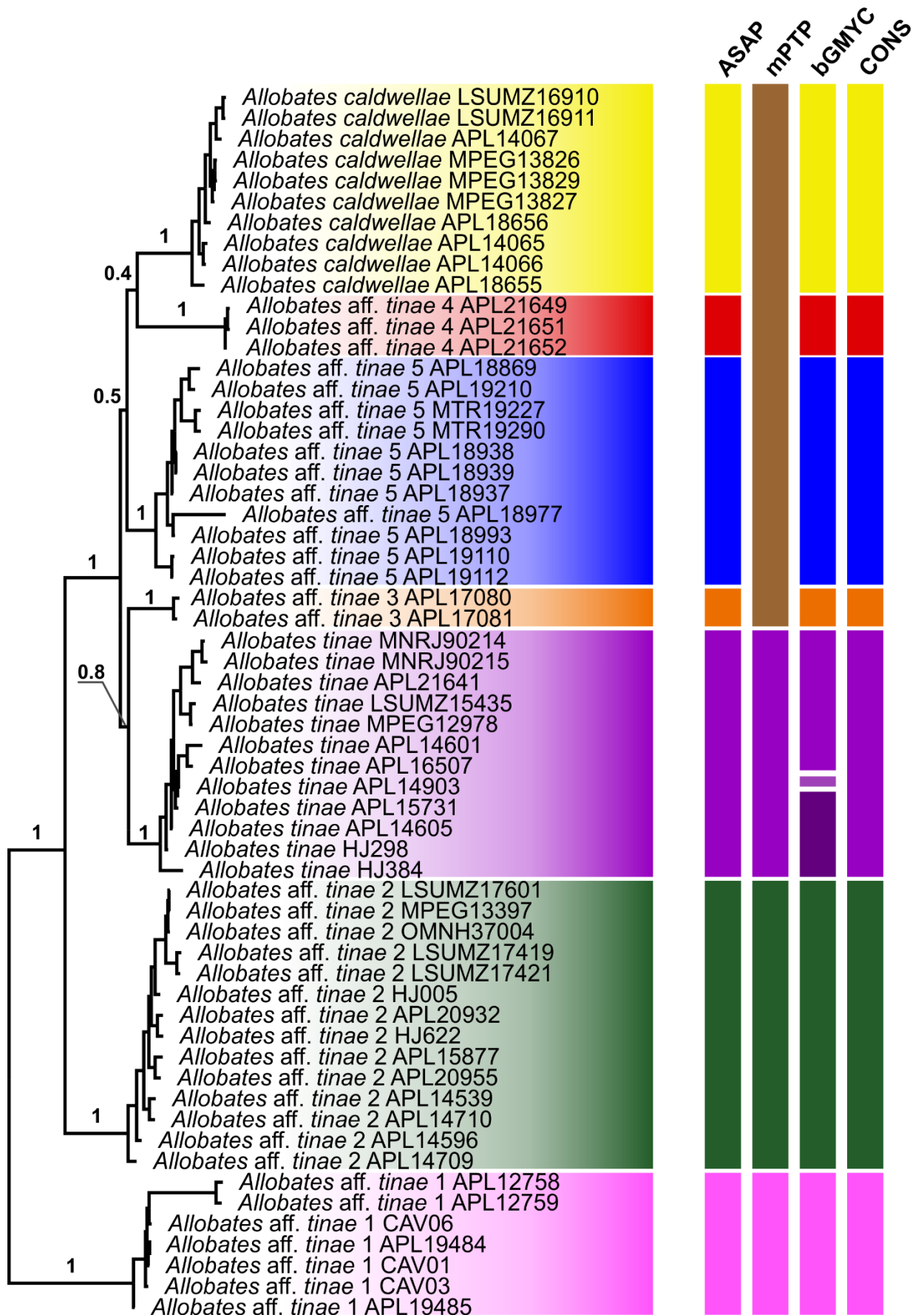
Table 1. Sampling localities of the *Allobates tinae* complex in southwestern Amazonia, with their geographical coordinates.

Site ID	Acronym	Geographic Coordinates
RAPELD M1 (AM)	M01	3°21'12.161"S, 59°51'20.272"W
RAPELD M3 (AM)	M03	4°09'28.526"S, 60°43'32.597"W
RAPELD M5 (AM)	M05	4°36'34.720"S, 61°15'00.318"W
RAPELD M8 (AM)	M08	5°38'51.373"S, 62°09'45.172"W
RAPELD M9 (AM)	M09	5°56'23.763"S, 62°30'57.864"W
RAPELD M10 (AM)	M10	6°34'30.116"S, 62°55'17.497"W
RAPELD M11 (AM)	M11	7°12'10.625"S, 63°07'30.617"W
Borba (AM)	BOR	4°26'21.998"S, 59°37'10.099"W
Autazes (AM)	AUT	3°28'02.701"S, 59°49'09.160"W
Castanho (AM)	CAS	3°37'10.400"S, 60°27'18.400"W
Vila Rica do Caviana (AM)	CAV	3°45'59.000"S, 61°07'46.801"W
RAPELD Morrinhos (RO)	MOR	9°01'12.390"S, 64°15'15.280"W
RAPELD Teotônio (RO)	TEO	8°50'52.375"S, 64°04'06.492"W
RAPELD Ilha do Búfalo (RO)	BUF	9°08'37.500"S, 64°30'57.802"W
RAPELD Jirau Direito (RO)	JID	9°20'00.840"S, 64°44'25.500"W
RAPELD Jirau Esquerdo (RO)	JIE	9°20'05.039"S, 64°44'15.299"W
RAPELD Jaci Direito (RO)	JAD	9°21'56.002"S, 64°32'34.001"W
RAPELD Jaci Novo (RO)	JAN	9°24'45"S, 64°26'33"W
Rio Ituxi (AM)	ITX	8°28'45.800"S, 65°42'59.600"W
T1 Camicuã/ Purus-Esquerdo (AM)	PUR	8°43'37.3"S, 67°25'27.6"W
Guajará-Mirim (AM)	GUA	10°19'17.200"S, 64°33'47.900"W
Boca do Acre (AM)	BOC	8°45'35.280"S, 67°18'32.040"W
Tefé (AM)	TEF	3°25'52.000"S, 64°42'38.999"W

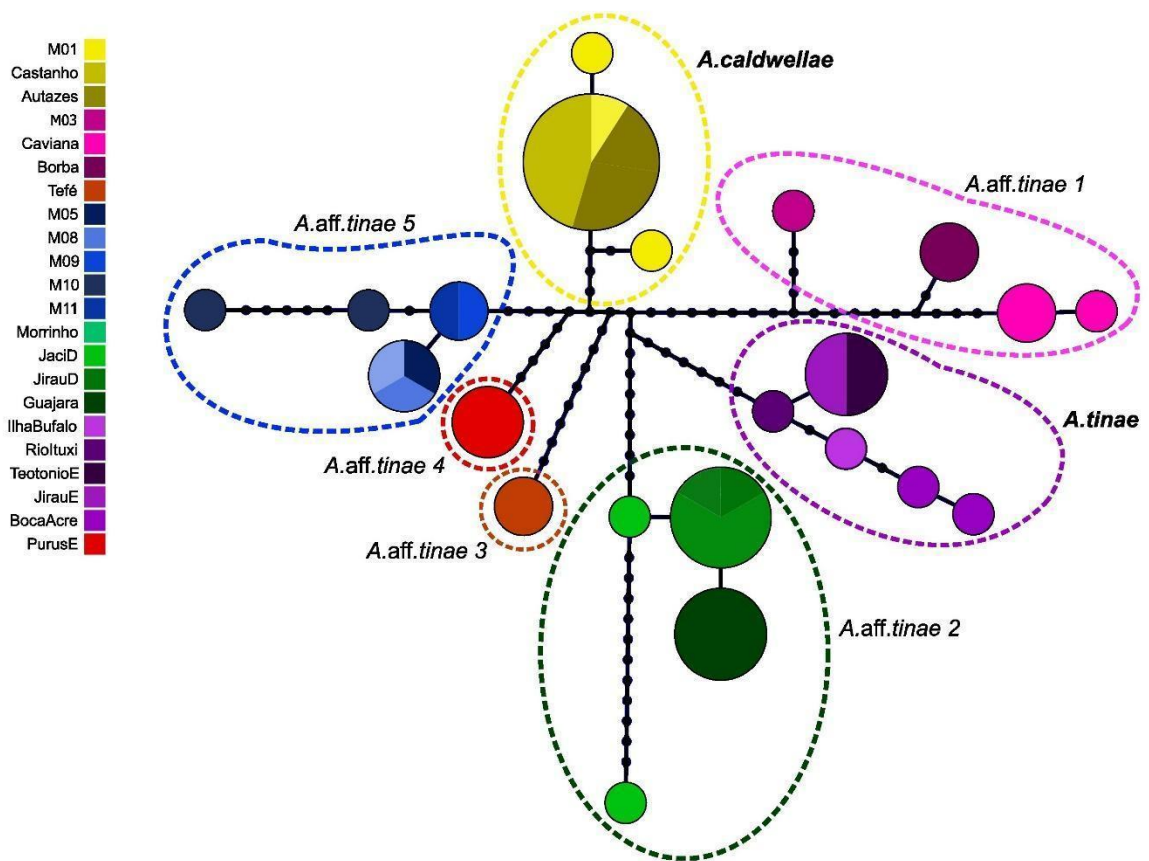
Brazilian states: Amazonas (AM); Rondônia (RO)



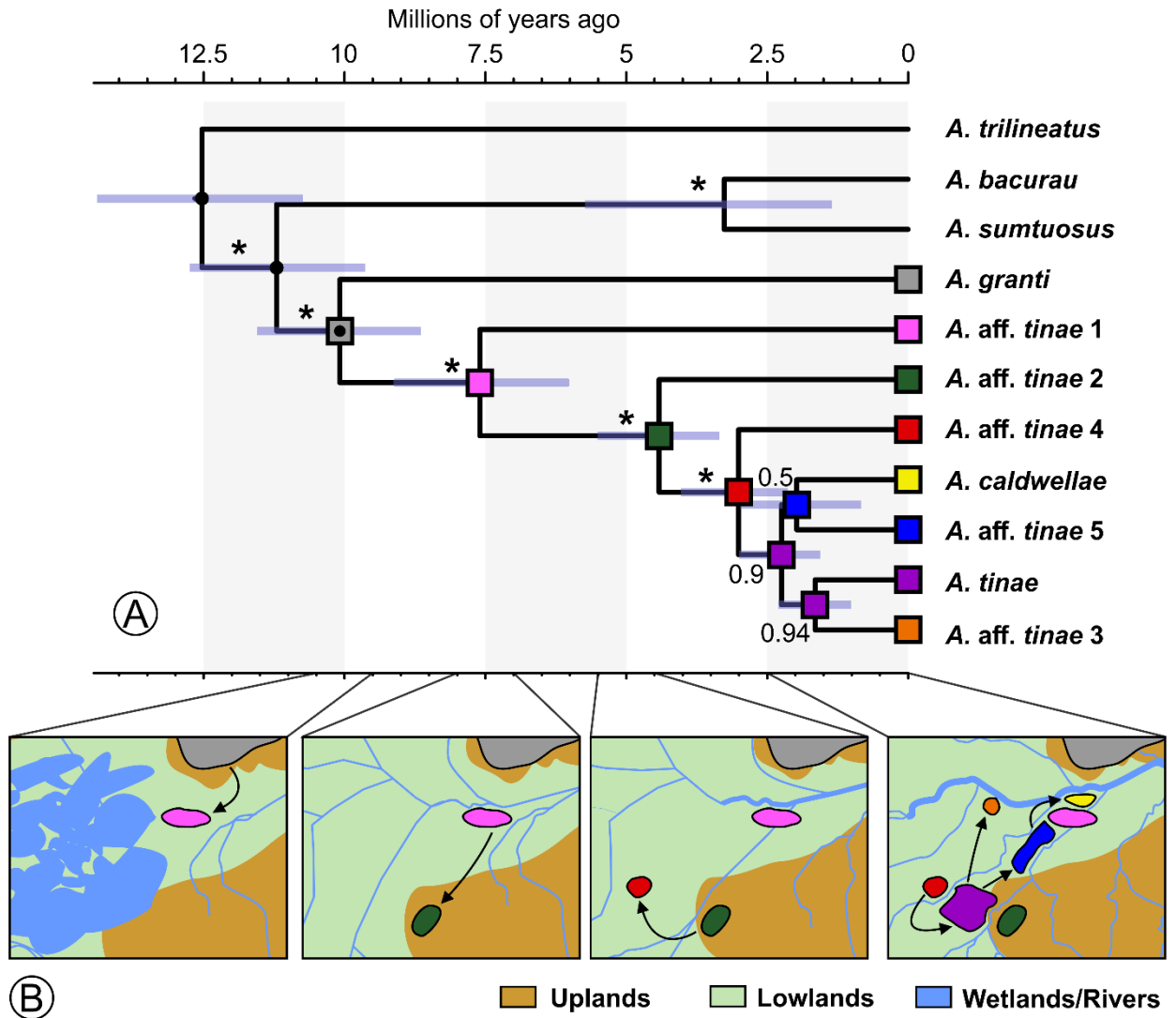
Geographic distribution of sampling localities of the *Allobates tinae* complex, with its internal major clades represented by different colors. Purple star shows the type locality of *Allobates tinae* and yellow star shows the type locality of *Allobates caldwellae*. Map created in QGIS 3.3 "s-Hertogenbosch" (<http://qgis.osgeo.org>). State abbreviations: AM = Amazonas, AC = Acre, MT = Mato Grosso, RO = Rondônia.



Phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex reconstructed through Bayesian inference from four mitochondrial DNA genes (12S, 16S, COI, Cytb). Nodal support values are shown at branches. This tree is an internal clade of a more comprehensive tree of the genus *Allobates*, presented in Supporting Information (Figure S1). The colored bars on the right represent the results of the species delimitation analyses (ASAP, mPTP and bGMYC) and their consensus (CONS).



Haplotype network with 50 sequences of 16S mitochondrial DNA gene for the *Allobates tinae* complex. The size of each circle indicates the relative haplotype frequency, and their distinct color indicates the geographical origin of individuals according to the map depicted in Fig. 1.



Bayesian time-calibrated phylogenetic tree of the *Allobates tinae* complex and the results of the BioGeoBears analysis (A). Nodal support values are shown at branches (asterisks: posterior probability = 1.0), and blue horizontal bars on nodes correspond to their 95% HPD. Black dots on nodes represent calibration points. Colored terminals correspond to those identified as distinct species according to our delimitation analyses (Fig. 2), also representing their geographical distribution for the BioGeoBears analysis. In (B), the hypothetical evolutionary history of dispersals and speciations indicated by the BAYAREA+J model in the BioGeoBears analysis, following the major landscape changes in Brazilian Southwestern Amazonia.

Capítulo 2

Linhas invisíveis: nichos ecológicos e fatores ocultos moldando a distribuição do complexo *Allobates tinae*.

Formatado conforme as normas da revista Acta Amazonica.

Gabriela Farias Maia¹, Josué Anderson R. Azevedo², Igor L. Kaefer^{1,3}, Albertina P. Lima¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia – INPA-V8 – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, Cep: 69067-375, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

³Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Rodrigo Otávio, 6200, 69077-000 Manaus, AM, Brazil

Resumo

Compreender os padrões de distribuição e os fatores que moldam a diversidade de espécies na Amazônia é fundamental para a conservação eficaz de sua biodiversidade. Este estudo investigou a sobreposição de nicho e a distribuição potencial de linhagens do complexo de rãs-cuidadoras *Allobates tinae*. O objetivo foi avaliar o grau de diferenciação ecológica entre as linhagens e identificar os fatores ambientais e históricos que influenciam suas distribuições. Foram utilizadas análises de componentes principais, cálculos de sobreposição de nicho com a métrica D de Schoener e modelagem de nicho ecológico por meio da abordagem de conjuntos de modelos utilizando o algoritmo de máxima entropia. Os resultados revelaram padrões distintos de sobreposição ambiental entre as linhagens, com destaque para a alta similaridade entre *Allobates tinae* e *Allobates aff. tinae 2*, separadas geograficamente pelo rio Madeira. Em contraste, outras linhagens apresentaram baixa sobreposição, refletindo alta especialização ecológica. Os modelos mostraram desempenho robusto, com elevada acurácia preditiva, e identificaram áreas de alta adequabilidade ambiental ainda não amostradas. Altitude, precipitação e balanço hídrico foram as variáveis ambientais mais influentes. A separação geográfica entre linhagens com nichos semelhantes sugere a atuação combinada de processos históricos, como o isolamento promovido por grandes rios amazônicos, e fatores ecológicos contemporâneos. Os resultados reforçam a importância de integrar dados ecológicos e espaciais para aprimorar a delimitação de espécies e contribuir com ações de conservação em regiões de alta diversidade biológica e crescente pressão ambiental.

Introdução

A Amazônia é amplamente reconhecida como um dos principais centros globais de biodiversidade, abrigando uma rica diversidade de flora e fauna com altos níveis de endemismo (Myers *et al.* 2000; Antonelli *et al.* 2018; Guayasamin *et al.* 2024). Essa diversidade é resultado de uma longa história evolutiva e de processos ecológicos complexos, moldados por fatores como a elevação dos Andes, mudanças climáticas e a formação de grandes rios amazônicos, que atuaram como barreiras biogeográficas e promoveram a diversificação das espécies (Thom *et al.* 2020; Fordham 2020; Hoorn *et al.* 2022; Musher *et al.* 2022). Apesar dessa riqueza biológica, muitos aspectos relacionados à origem e manutenção dessa biodiversidade permanecem pouco compreendidos, especialmente em grupos taxonômicos com alta diversidade críptica, como os anfíbios anuros (Fouquet *et al.* 2007; Motta *et al.* 2018; Penhacek *et al.* 2024). Neste contexto, compreender os fatores ecológicos e históricos que influenciam a distribuição espacial das espécies é fundamental para elucidar os processos de diversificação (Wiens and Graham 2005; Peterson *et al.* 2011; Ribas *et al.* 2022).

A teoria biogeográfica propõe que os grandes rios amazônicos atuam como barreiras naturais significativas à dispersão de organismos terrestres, promovendo o isolamento geográfico e favorecendo a especiação alopátrica — processos históricos bem documentados na região (Ribas *et al.* 2012; Moraes *et al.* 2016). Além disso, fatores ecológicos, como clima e heterogeneidade ambiental, desempenham um papel essencial na distribuição das espécies, ao moldar seus nichos ecológicos (Wiens and Graham 2005; Warren *et al.* 2008). Para anfíbios amazônicos, variáveis ambientais como precipitação sazonal, balanço hídrico, umidade dos

microambientes, elevação e características da vegetação são particularmente relevantes devido à sua sensibilidade fisiológica às condições microclimáticas locais (Duellman and Trueb 1994; Moreno *et al.* 2023). A precipitação sazonal e o balanço hídrico influenciam diretamente a disponibilidade de água nos microambientes ocupados pelos anfíbios, e são essenciais para manter a umidade corporal e prevenir a dessecação, dado que esses organismos possuem baixa resistência à perda de água. Além disso, um ambiente com vegetação densa e fechada protege contra a radiação solar direta e mantém um alto nível de umidade relativa, criando condições favoráveis para a sobrevivência desses animais (Moreno *et al.* 2024). Por outro lado, habitats com vegetação aberta ou degradada colocam os anfíbios em maior risco de dessecação devido à redução da sombra e da umidade ambiental (Pottier *et al.* 2025).

Nesse cenário, a modelagem de nicho ecológico tem se consolidado como uma ferramenta poderosa para investigar os fatores ambientais determinantes da distribuição potencial das espécies (Regos *et al.* 2019). Essa abordagem permite não apenas identificar áreas adequadas para ocorrência das espécies com base em seus requerimentos e tolerâncias ambientais conhecidas, mas também testar hipóteses sobre o papel relativo dos fatores ecológicos na delimitação espacial das linhagens estudadas (Soberón and Peterson 2005; Peterson *et al.* 2011). Modelos preditivos podem também revelar áreas potenciais ainda não amostradas que merecem atenção especial em futuros esforços de pesquisa e conservação (Raxworthy *et al.* 2003). Por outro lado, a estimativa do volume do nicho ambiental efetivamente ocupado por cada linhagem também permite testar hipóteses de delimitação de espécies (Raxworthy *et al.* 2007). A partir dessas estimativas, é possível avaliar a sobreposição de nichos e estimar se os organismos apresentam conservatismo ou plasticidade nos nichos ambientais (Warren *et al.* 2008; Broennimann *et al.* 2012),

além de fornecer pistas sobre os fatores que influenciam a distribuição e diversidade dos organismos.

Entre os diferentes grupos de organismos, os anfíbios se destacam por sua sensibilidade às condições ambientais, como temperatura, umidade e disponibilidade hídrica, tornando-os excelentes bioindicadores das mudanças nos ecossistemas, devido à sua sensibilidade ambiental e à estreita relação com condições ecológicas locais (Duellman and Trueb 1994; Juarez *et al.* 2024, Pottier *et al.* 2025). No entanto, apesar de sua importância ecológica, a identificação de sua real diversidade ainda representa um desafio, uma vez que a alta diversidade críptica frequentemente subestima o número real de espécies. Nesse sentido, a riqueza de espécies de anuros na Amazônia pode estar altamente subestimada devido à presença de linhagens geneticamente distintas que não são reconhecidas com base apenas em características morfológicas (Funk *et al.* 2012; Rojas *et al.* 2018; Moura and Jetz 2021). Espécies crípticas são aquelas fenotípicamente muito semelhantes entre si, mas geneticamente distintas, frequentemente passando despercebidas em estudos baseados unicamente em caracteres morfológicos tradicionais (Bickford *et al.* 2007). Essa diversidade oculta pode dificultar o entendimento dos processos evolutivos e ecológicos envolvidos na sua diversificação (Fouquet *et al.* 2007; Funk *et al.* 2012; Struck *et al.* 2018). Para resolver esse problema, abordagens integrativas, combinando métodos moleculares, ecológicos e biogeográficos, têm se mostrado essenciais para revelar padrões ocultos de diversidade (Vacher *et al.* 2020; Fouquet *et al.* 2022; Maia *et al.* 2025).

O gênero *Allobates* (Anura: Aromobatidae) se destaca como um excelente modelo para investigar os processos de diversificação na Amazônia, especialmente devido à sua alta diversidade críptica. Estudos recentes revelaram que muitas espécies

deste gênero, antes consideradas amplamente distribuídas, são na verdade, complexos de múltiplas linhagens geneticamente distintas com distribuições geográficas restritas (Simões *et al.* 2018; Réjaud *et al.* 2020; Ferrão *et al.* 2022; Jaramillo-Martinez *et al.* 2025). O complexo *Allobates tinae* representa um exemplo notável dessa diversidade críptica em anuros amazônicos (Lima *et al.* 2020). Estudos filogenéticos recentes identificaram pelo menos sete linhagens geneticamente distintas dentro desse complexo, das quais apenas duas foram formalmente descritas (Maia *et al.* 2025). Essas linhagens apresentam distribuições geográficas alopátricas, o que indica que processos históricos e/ou ecológicos possivelmente atuaram em conjunto para moldar os padrões espaciais atualmente observados.

Considerando o conhecimento ainda limitado sobre os fatores ambientais que influenciam a distribuição e diversidade dos organismos, este estudo visa investigar como os fatores ecológicos moldam a distribuição potencial das linhagens do complexo *Allobates tinae* na Amazônia, utilizando a modelagem de nicho ecológico. Buscamos avaliar quais variáveis ambientais são mais importantes para determinar a adequabilidade ambiental das linhagens estudadas, caracterizando as distribuições potenciais previstas para cada espécie descrita ou candidata dentro do complexo. Adicionalmente, pretendemos quantificar o grau de diferenciação ecológica entre as linhagens por meio da análise quantitativa da sobreposição dos nichos ambientais. Por fim, buscamos identificar áreas de alta adequabilidade ambiental ainda não amostradas, as quais possam representar lacunas significativas no conhecimento atual sobre a distribuição real dessas linhagens, sendo potencialmente relevantes para sua conservação.

Materiais e métodos

Área de estudo

O estudo foi conduzido no sudoeste da Amazônia brasileira, abrangendo principalmente os interflúvios formados pelos rios Purus, Madeira e Juruá (Fig. 1). O interflúvio Purus-Madeira cobre uma extensa área de aproximadamente 300.000 km², com cerca de 260 km de largura e 1.500 km de comprimento (RADAMBRASIL, 1978). A região apresenta elevada heterogeneidade ambiental, com variações na precipitação sazonal e uma média anual entre 2100 mm e 2800 mm (Fick and Hijmans 2017). A topografia é predominantemente plana, com altitudes variando de 27 m no norte a 80 m no sul (Fearnside *et al.* 2009). Os solos são em grande parte gleissolos e plintossolos, caracterizados por baixa drenagem e composição predominante de silte e argila (Cintra *et al.* 2013; Schietti *et al.* 2016; Ximenes *et al.* 2021). A vegetação da área apresenta diferenças ao longo da paisagem: no norte, predominam florestas tropicais de terra firme com dossel emergente, enquanto no sul são mais comuns as florestas abertas (Emilio 2007).

Distribuição Geográfica

As linhagens investigadas (*sensu* Maia *et al.* 2025) apresentam distribuições geográficas restritas e adjacentes, ocupando diferentes regiões dentro dos interflúvios mencionados anteriormente (Figura 1). *Allobates tinae* Melo-Sampaio *et al.* 2018 ocorre principalmente no interflúvio dos rios Madeira e Purus; *Allobates caldwella* Lima *et al.* 2020 está restrita a porção norte do interflúvio Purus-Madeira, com registros próximos a Careiro da Várzea, estrada de Manaquiri e ao longo da Estrada de Autazes; *Allobates* aff. *tinae* 2 é encontrada exclusivamente na margem direita do Rio

Madeira; enquanto que *Allobates* aff. *tinae* 5 possui registros limitados a porção sul do interflúvio Purus-Madeira. A linhagem *A.* aff. *tinae* 1, por sua vez, está localizada em regiões específicas do interflúvio Purus-Madeira, sobretudo associada a florestas ombrófilas fechadas. Por fim, *A.* aff. *tinae* 3 e *A.* aff. *tinae* 4 possuem distribuições restritas a áreas específicas dentro e fora do interflúvio, mas com poucos registros conhecidos até o momento (Maia *et al.* 2025). Para todas as linhagens analisadas, foram utilizados registros georreferenciados de indivíduos obtidos em campo por A.P. Lima e colaboradores, complementados por dados provenientes de coleções científicas e literatura disponível.

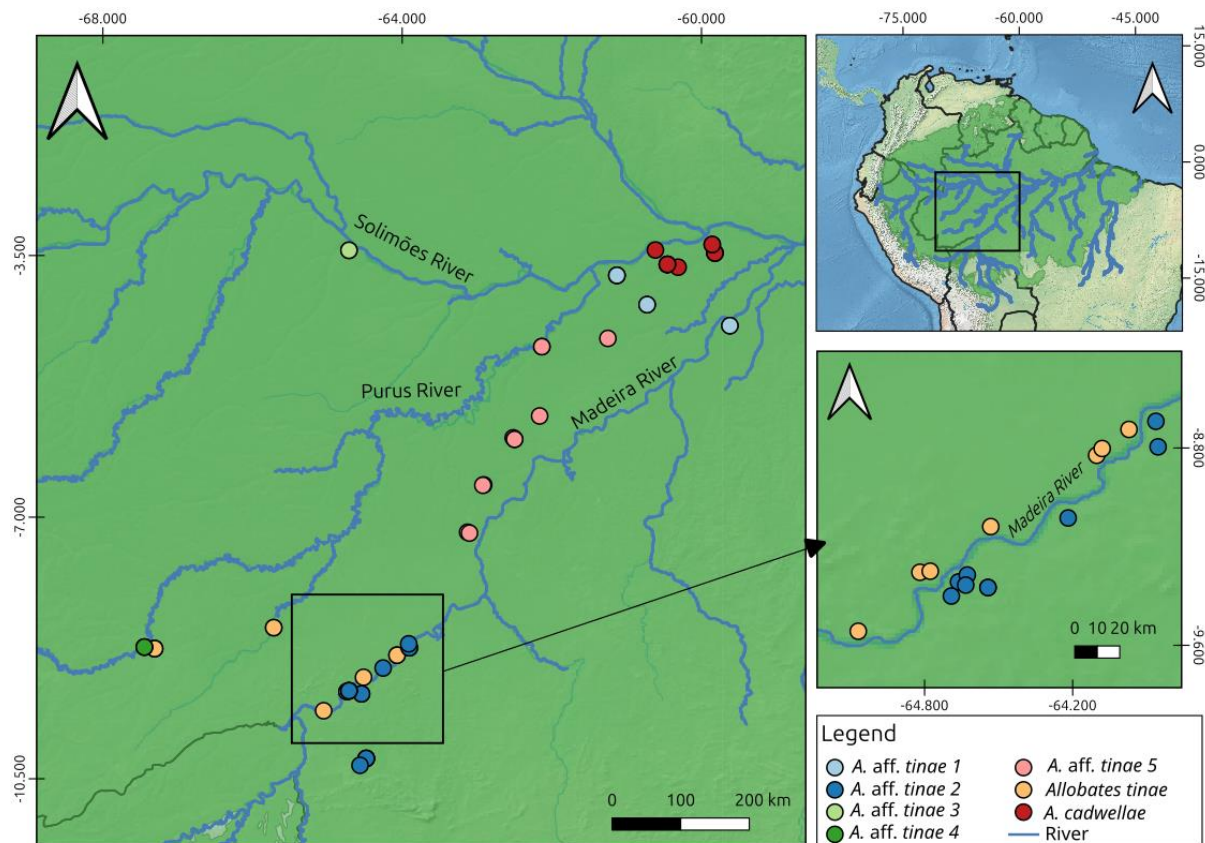


Figura 1. Distribuição geográfica das linhagens do complexo *Allobates tinae* no sudoeste da Amazônia brasileira. O mapa destaca os interflúvios formados pelos rios Purus, Madeira e Juruá, com as localizações conhecidas das linhagens representadas por diferentes cores.

Variáveis ambientais

Para avaliar o grau de sobreposição dos nichos ambientais e modelar a distribuição das linhagens, utilizamos dados de variáveis ambientais provenientes de bases de dados disponíveis online. Para caracterizar os padrões de temperatura e precipitação na área de distribuição das linhagens, utilizamos 19 variáveis bioclimáticas da base CHELSA V.2.1, com resolução espacial de 1 x1 km (Karger *et al.* 2016). Além disso, adquirimos as variáveis do CHELSA-BIOCLIM+ (Brun *et al.* 2022a; Brun *et al.* 2022b), que fornecem preditores climáticos adicionais mais próximos das condições ambientais experimentadas pelas linhagens, tais como umidade relativa próxima à superfície, déficit de pressão de vapor, evapotranspiração potencial, índice de umidade climática e potencial hídrico (Delprá-Cachulo *et al.* 2024; Giacometti *et al.* 2025). Esses preditores adicionais capturam condições microclimáticas cruciais para anfíbios, dada a sua sensibilidade a variações de umidade e temperatura no microhabitat (Wells 2007). Em razão da similaridade entre os preditores do conjunto Bioclim+, realizamos uma análise de componentes principais (PCA) para reduzir a dimensionalidade e minimizar a colinearidade, utilizando apenas o primeiro componente principal, o qual denominamos balanço hídrico.

Obtivemos também dados de sensoriamento remoto transformados em valores de NDVI (Normalized Difference Vegetation Index, ou Índice de Vegetação por Diferença Normalizada), derivados de imagens do satélite Sentinel-2, disponibilizadas pela base de dados do Copernicus, com resolução espacial de 10 metros. Utilizamos o valor médio de NDVI considerando amostragens a partir do intervalo entre os anos 1999 e 2020. O NDVI é um índice amplamente utilizado para quantificar a estrutura

da vegetação, podendo variar entre os valores de -1 até 1 sendo valores negativos associados a uma menor estrutura vegetacional, com plantas com menor vigor e sobre estresse hídrico, ou pouco saudáveis, enquanto que valores maiores do índice se traduzem em uma vegetação mais complexa e com mais vigor, saudável, com maior área foliar, menor estresse hídrico no ambiente, por exemplo (Pettorelli 2013). Tal parâmetro sofre uma influência direta da disponibilidade da umidade e do microclima local, que são aspectos fundamentais para a ecologia dos anfíbios.

Dados de elevação do terreno foram obtidos via SRTM (Shuttle Radar Topography Mission) (Farr and Kobrick 2000) disponíveis na base de dados do WorldClim. Embora a elevação seja frequentemente considerada um preditor indireto – uma vez que seus efeitos são mediados por variáveis correlacionadas, como radiação solar, temperatura média anual, precipitação e topografia (Elith *et al.* 2009; Guisan *et al.* 2017), optamos por incluí-la neste estudo, visto que, para espécies com distribuição muito restrita, a elevação pode oferecer uma medida precisa que capta nuances ambientais não totalmente refletidas pelas variáveis bioclimáticas. Ademais, considerando que a área de estudo está delimitada a uma bacia/interflúvio, onde as condições ambientais são relativamente homogêneas e a projeção dos modelos se restringe a essa região, as limitações associadas ao uso da elevação como preditor indireto são minimizadas (Figueiredo *et al.* 2015).

Todas as variáveis foram mantidas na resolução original de aproximadamente 1 km × 1 km – e aplicamos um procedimento de reamostragem de todos os rasters para padronizar a resolução espacial e alinhar perfeitamente as células de todas as camadas. Em seguida, foi gerado um Mínimo Polígono Convexo (MCP) em volta dos âmbitos geográficos de todas as linhagens do complexo *Allobates tinae*, ao qual se aplicou um

buffer de 5° para definir a área de estudo destinada à calibração e projeção dos modelos. Para reduzir a multicolinearidade entre os preditores, realizamos uma análise sequencial do *Variance Inflation Factor* (VIF) (Naimi *et al.* 2014), onde removemos uma a uma as variáveis com maior VIF, privilegiando a seleção de variáveis mais relevantes para anfíbios (por exemplo, optando por manter variáveis como balanço hídrico ao invés de temperatura média anual) e que apresentavam variação relevante para todas as espécies, até que restassem apenas variáveis com VIF menor que cinco. As variáveis selecionadas e a sua relevância para a distribuição e ecologia das espécies estão descritas na Tabela 1.

Por fim, os registros de ocorrência foram submetidos a um processo de “*spatial thinning*” (spThin v3.6; Aiello-Lammens *et al.* 2015), garantindo uma distância mínima de 15 km entre os pontos. Esse procedimento visa reduzir o viés amostral decorrente do agrupamento de registros em áreas com maior esforço de amostragem, bem como diminuir a autocorrelação espacial.

Tabela 1. Variáveis ambientais selecionadas com base na análise de VIF (valores menores que cinco) e em critérios biológicos, de forma a minimizar a colinearidade ao mesmo tempo que capturar os principais gradientes ambientais relevantes para os anfíbios.

Variável	Sigla	Descrição
Balanço Hídrico	Balanço hídrico	Integra informações de precipitação e evapotranspiração para fornecer uma medida direta da disponibilidade líquida de água, essencial para a fisiologia de anfíbios.
Precipitação do Mês Mais Úmido	Bio 13	Quantifica a quantidade total de chuva no mês com maior precipitação, refletindo a disponibilidade de água e a umidade máxima.

Precipitação do Trimestre Mais Quente	Bio 18	Captura a quantidade total de chuva durante o período mais quente, crucial para a manutenção do balanço hídrico nos momentos de maior estresse térmico.
Amplitude Diurna	Bio 2	Representa a diferença média entre as temperaturas máxima e mínima diárias, influenciando as condições microclimáticas locais.
Sazonalidade da Temperatura	Bio 4	Reflete a variação da temperatura ao longo do ano, impactando os ciclos biológicos e a distribuição das linhagens.
Elevação	Elevação	Permite inferir efeitos topográficos indiretos, como variações em radiação e temperatura, que podem influenciar os microclimas locais.
Índice de Vegetação por Diferença Normalizada	NDVI	Reflete a densidade e a cobertura da vegetação, associadas à qualidade do habitat e à modulação do microclima, fatores que afetam a disponibilidade de umidade.

Sobreposição de nicho

Implementamos o cálculo da sobreposição de nicho como descrito em Broennimann *et al.* 2012 e di Cola *et al.* 2017, em ambiente R. Para quantificar a sobreposição de nicho ambiental entre as linhagens, utilizamos a métrica de Schoener (D), que varia de 0 (nenhuma sobreposição) a 1 (sobreposição completa) (Schoener 1968). Para isso, um espaço ambiental é construído via componentes principais (método PCAenv) que considera todo o gradiente climático da área de estudo (Broennimann *et al.* 2012), a partir das variáveis selecionadas (ver tópico anterior). Primeiramente, plotamos a distribuição das linhagens nos dois primeiros PCs (espaço ambiental) para visualizar a sobreposição das linhagens ao longo dos gradientes ambientais. Prosseguindo com o workflow de Broennimann *et al.* 2012), as densidades de ocorrência das linhagens são estimadas nesse espaço por meio de funções de kernel (corrigidas pela disponibilidade ambiental), reduzindo vieses decorrentes de diferentes

esforços de amostragem (di Cola *et al.* 2017). Dessa forma, a sobreposição do nicho (DDD) reflete efetivamente o quanto as linhagens dividem condições ambientais semelhantes. Para linhagens com menos de cinco ocorrências, adicionamos um buffer de 0.1 graus para extrair os valores ambientais correspondentes.

Para verificar se o grau de sobreposição observado é estatisticamente significativo, aplicamos os testes de equivalência e de similaridade (Warren *et al.* 2008). O teste de equivalência (*niche equivalency*) randomiza as ocorrências de pares de linhagens das duas espécies (mas preserva o total de pontos em cada grupo), avaliando se ambas poderiam ser “troçadas” sem alterar a sobreposição; se o p-valor for alto ($p > 0,05$), não se rejeita a hipótese de nichos equivalentes, sugerindo que as diferenças podem ser explicadas pelo acaso. Já o teste de similaridade (*niche similarity*) investiga se o nicho de uma linhagem em certa área é mais semelhante ao nicho de outra linhagem do que se esperaria por acaso, deslocando-se aleatoriamente a distribuição ou o espaço ambiental; p-valor elevado ($p > 0,05$) indica maior similaridade do que o esperado ao acaso, ao passo que $p < 0,05$ sinaliza que tais nichos divergem além do aleatório.

Modelagem de distribuição de linhagens

Considerando que todas as linhagens de *Allobates tinae* possuem um número muito limitado de ocorrências conhecidas, adotamos a estratégia de “*ensemble of small models*” (Breiner *et al.* 2015). Dessa forma geramos modelos para todas as combinações de duas variáveis por vez e depois calculamos o modelo final a partir de uma média ponderada. Como algoritmo de distribuição das linhagens, utilizamos o MaxEnt v3.4.3 (Phillips *et al.* 2006; Hijmans *et al.* 2017) em conjunto com o pacote ENMeval v2.0.3 (Muscarella *et al.* 2014) na linguagem R. Para definir o fundo

amostral (*background*), selecionamos 10.000 pontos aleatórios no espaço de estudo, exceto 5 km em torno de cada ocorrência. Para cada combinação de duas variáveis (das sete selecionadas), empregamos parâmetros simples do MaxEnt (funções “L” e “LQ”, com regularização entre 1 e 5) visando evitar sobreajuste e complexidade dos modelos, considerando as poucas ocorrências por linhagem. Modelos bivariados com todas as combinações de parâmetros foram testados em cada rodada e o modelo com o menor AICc foi selecionado. Para os modelos bivariados, a métrica de desempenho (AUC – Área Sob a Curva) foi calculada em esquema de validação com particionamento em cinco blocos (*rankdomkfold*), garantindo que cada partição tivesse registros suficientes.

Para a produção do modelo final (*ensemble*), utilizamos a métrica Somers’ D (Somers 1962) para calcular a média ponderada da projeção espacial de todos os melhores modelos bivariados. Da mesma forma, calculamos a importância das variáveis a partir dos valores médios (ponderados) de importância em todos os modelos binários. Utilizamos a função *evaluate* do pacote *sdm* para obter as métricas de desempenho do modelo final (AUC, TSS, Boyce, Sørensen). Finalmente, geramos mapas binários de distribuição das linhagens aplicando o limiar de máxima sensibilidade + especificidade (Max sp+se) aos valores contínuos de probabilidade de ocorrência.

RESULTADOS

Apenas quatro das sete linhagens de *Allobates* possuíam registros em cinco ou mais localidades distintas e com variabilidade ambiental adequada para a modelagem de distribuição (considerando a resolução dos *grids* disponíveis). Entretanto, todas as linhagens puderam ter a sobreposição de nicho mensurada par a par. A análise de componentes principais (PCA) revelou diferenças ambientais claras entre as linhagens do complexo *Allobates tinae*. Os dois primeiros componentes principais explicaram em conjunto cerca de 67% da variação ambiental total, sendo o PC1 responsável por 50,24% e o PC2 por 16,75%. PC1 está intimamente relacionado a gradientes ambientais como altitude, balanço hídrico e isotermalidade, enquanto PC2 reflete principalmente mudanças relacionadas à precipitação sazonal (Bio_13 e Bio_18) e ao índice de vegetação (NDVI) (Fig. 2).

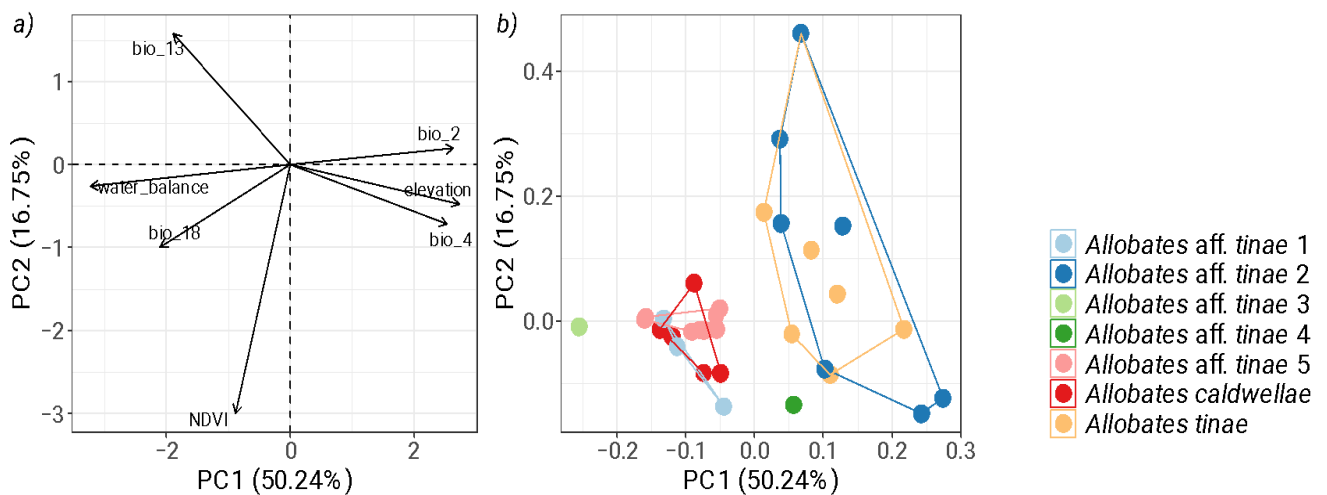


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos valores ambientais extraídos para as ocorrências das linhagens de *Allobates*. (a) Biplot dos escores da PCA ilustrando a direção e a magnitude dos gradientes ambientais na área de estudo – as setas indicam a contribuição das variáveis: Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI), Precipitação do Mês Mais Úmido (bio_13), Precipitação do Trimestre Mais Quente (bio_18), Variação Diurna Média da

Temperatura (bio_2), Sazonalidade da Temperatura (bio_4), Balanço Hídrico (water_balance) e Elevação. (b) Dentro do espaço ambiental definido pelos PCs, cada ponto representa uma localidade por linhagem (definido a partir da precisão do grid de ~1 por 1 km), e os mínimos polígonos convexos (MCP) delimitam a variação ambiental experimentada por cada linhagem. Veja que há bastante sobreposição de nicho ambiental entre algumas linhagens e que a principal diferenciação entre elas se dá no PC1, principalmente ao longo de gradientes de altitude, balanço hídrico e isotermalidade.

A visualização da ordenação das linhagens definido pelos dois primeiros componentes principais revelou que as linhagens *Allobates tinae* e *Allobates aff. tinae 2* possuem um alto grau de sobreposição ambiental (Fig. 2), sugerindo que as duas ocupam nichos ambientais semelhantes. Da mesma forma, foi observada sobreposição moderada entre as linhagens *Allobates aff. tinae 1* e *Allobates caldwellae*. Apesar destas semelhanças ambientais, estas não coexistem geograficamente, sugerindo que outros fatores além dos ambientais atuais podem ter limitado as suas distribuições. As demais linhagens analisadas (*A. aff. tinae 3*, *A. aff. tinae 4* e *A. aff. tinae 5*) apresentaram pouca ou nenhuma sobreposição ambiental com outras linhagens do complexo. A métrica D de Schoener e dos resultados dos testes de equivalência e de similaridade, confirmaram uma alta sobreposição de nicho entre *A. aff. tinae 2* e *Allobates tinae* ($D = 0,730$), sobreposição moderada entre *A. aff. tinae 1* e *A. caldwellae* ($D = 0,290$; $p = 0,030$ no teste de equivalência) e os demais pares apresentaram valores baixos ou nulos de sobreposição (D próximo ou igual a zero), indicando clara diferenciação ecológica entre essas linhagens (Tabela 2).

Tabela 2 – Sobreposição de nicho ambiental entre todos os pares de linhagens do complexo *Allobates tinae*. A sobreposição de nicho ambiental calculada a partir do método PCA-env com base na métrica D de Schoener (0 = sem sobreposição; 1 sobreposição total). O teste de equivalência de nicho avalia se as linhagens ocupam nichos indistinguíveis, enquanto o teste de similaridade de nicho verifica se os nichos são mais semelhantes do que o esperado ao acaso. Os valores de P indicam a significância estatística dos testes, baseados em 1000 permutações aleatórias dos dados ambientais.

Par de linhagens	Sobreposição (D)	Equivalência (P-value)	Similaridade (P-value)
<i>A. aff. tinae 2</i> vs <i>A. tinae</i>	0.730	0.020	0.069
<i>A. aff. tinae 1</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.290	0.030	0.406
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.089	0.198	0.911
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. aff. tinae 1</i>	0.070	0.158	1.000
<i>A. aff. tinae 4</i> vs <i>A. tinae</i>	0.000	0.376	1.000

<i>A. aff. tinae 1</i> vs <i>A. tinae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 2</i> vs <i>A. aff. tinae 1</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 2</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 3</i> vs <i>A. aff. tinae 1</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 3</i> vs <i>A. aff. tinae 2</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 3</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 3</i> vs <i>A. tinae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 4</i> vs <i>A. aff. tinae 1</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 4</i> vs <i>A. aff. tinae 2</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 4</i> vs <i>A. aff. tinae 3</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 4</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. aff. tinae 2</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. aff. tinae 3</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. aff. tinae 4</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. aff. tinae 5</i> vs <i>A. tinae</i>	0.000	1.000	1.000
<i>A. tinae</i> vs <i>A. caldwellae</i>	0.000	1.000	1.000

Os modelos de distribuição de espécies, ajustados utilizando a abordagem "Ensemble of Small Models" (ESMs) e o algoritmo MaxEnt, apresentaram desempenho satisfatório, com valores consistentemente elevados de AUC ($\geq 0,95$) e TSS ($\geq 0,90$), sugerindo alta capacidade de discriminação entre presenças e ausências para todas as quatro linhagens com registros suficientes para modelagem. As métricas Boyce e Sørensen corroboraram essa boa performance, demonstrando alinhamento entre as predições probabilísticas e o padrão binário de ocorrência. No conjunto, *A. aff. tinae 2* obteve os maiores valores (AUC = 0,987; TSS = 0,957), enquanto *A. aff. tinae 5* apresentou um índice de Boyce menor (0,422), mas ainda se manteve em níveis aceitáveis nas demais métricas (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho dos modelos distribuição (ensemble of small models) por linhagem.

AUC = Área Sob a Curva; TSS = True Skill Statistic; Max SE + SP = Limiar maximizando (sensibilidade + especificidade); Boyce = Índice de Boyce; Sørensen = Índice de Similaridade de Sørensen.

Espécie	AUC	TSS	Max SE + SP	Boyce	Sørensen
<i>A. caldwellae</i>	0.977	0.957	0.600	0.401	0.868
<i>A. tinae</i>	0.978	0.904	0.543	0.958	0.856
<i>A. aff. tinae 2</i>	0.987	0.957	0.597	0.983	0.864
<i>A. aff. tinae 5</i>	0.950	0.922	0.649	0.422	0.668

Importância relativa das variáveis ambientais

As variáveis ambientais contribuíram de maneira diferenciada para a modelagem da distribuição potencial das linhagens do complexo *Allobates tinae* (Fig. 3), refletindo adaptações ecológicas específicas a distintos contextos ambientais. Para *Allobates caldwellae*, a altitude (~35%) e o balanço hídrico (~30%) foram os preditores mais relevantes, destacando a influência conjunta da topografia e da disponibilidade de água na definição da adequabilidade ambiental para a espécie. Já para *Allobates tinae*, as variáveis mais influentes foram o balanço hídrico sazonal (~25%) e a precipitação no trimestre mais quente (Bio_18; ~20%), indicando que essa espécie está especialmente associada a ambientes com elevada variabilidade hídrica ao longo do ano.

Para a distribuição potencial de *Allobates aff. tinae 2*, a variável de maior importância foi a precipitação no trimestre mais quente (Bio_18), contribuindo com aproximadamente 30% para o modelo, seguida pelo balanço hídrico (~25%) e pela altitude (~20%). Esse padrão indica que a ocorrência dessa linhagem está fortemente condicionada por uma combinação de fatores relacionados à sazonalidade da precipitação e às características topográficas locais. Já para *Allobates aff. tinae 5*, as

variáveis mais influentes na modelagem da distribuição foram a altitude (~25%), a sazonalidade da temperatura (Bio_4; ~20%) e o balanço hídrico (~15%). Esse conjunto de preditores destaca a dependência dessa linhagem por microclimas específicos associados a áreas elevadas, onde as variações térmicas e hídricas ao longo do ano influenciam diretamente as condições de habitat.

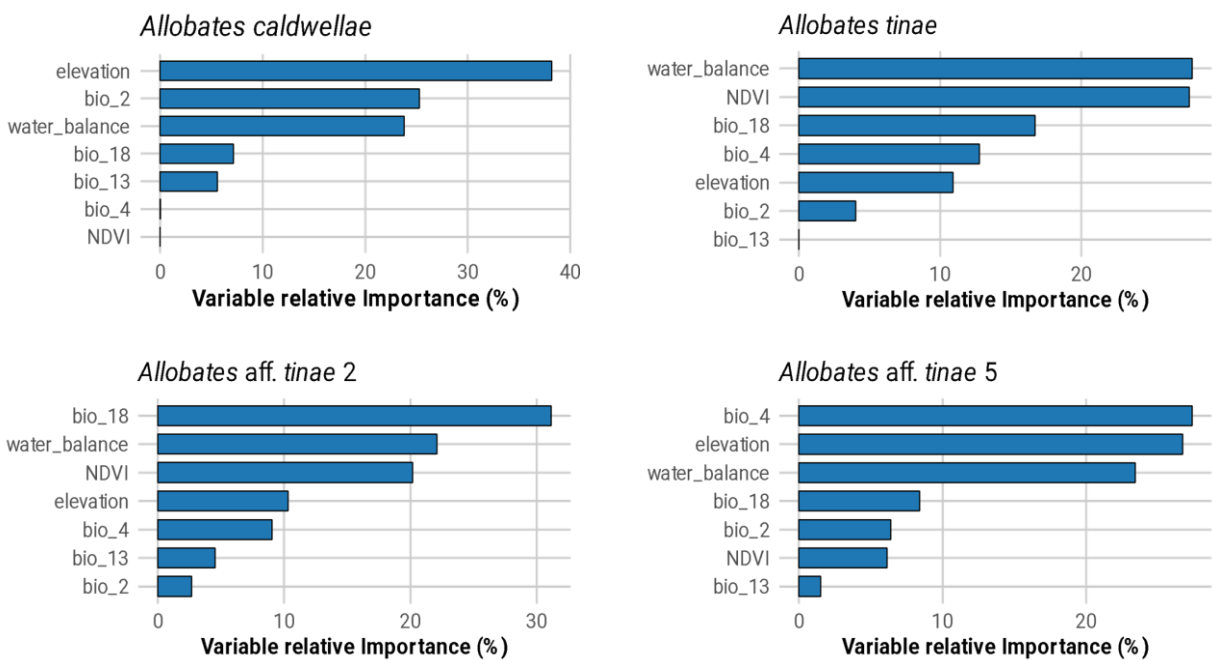


Figura 3. Importância das variáveis ambientais utilizadas na modelagem de nicho para linhagens do complexo *Allobates tinae*. Os modelos foram ajustados utilizando *ensemble of small models* do Maxent e as estimativas de importância das variáveis foram obtidas a partir da média ponderada (AUC) das contribuições das variáveis em cada rodada. Os gráficos de barras mostram a contribuição relativa de cada variável preditora nos modelos gerados, refletindo seu impacto na distribuição potencial das linhagens modeladas.

Distribuição potencial das linhagens

Os mapas preditivos das distribuições potenciais revelaram padrões espaciais distintos para cada linhagem analisada (Figura 4). A linhagem *Allobates tinae* ocorre principalmente na porção sul do interflúvio Purus–Madeira, ocupando áreas próximas

às margens esquerdas do rio Madeira e à direita do rio Purus. Os modelos preditivos revelaram que essa espécie apresenta ampla distribuição potencial (i.e., áreas de alta adequabilidade ambiental) nessas regiões, especialmente associada a áreas com alta disponibilidade hídrica e elevada NDVI. A espécie recentemente descrita, *Allobates caldwellae*, está restrita à porção norte do interflúvio Purus-Madeira (IPM Norte), região caracterizada por condições ambientais específicas relacionadas ao balanço hídrico e à baixa elevação. Apesar de apresentar sobreposição ambiental moderada com *A. aff. tinae* 1, não há coexistência geográfica entre essas duas linhagens, sugerindo que outros fatores históricos ou ecológicos possam estar limitando suas distribuições.

Os modelos preditivos indicaram áreas altamente adequadas em habitats específicos associados a condições ambientais particulares desta região. A linhagem *A. aff. tinae* 2 ocorre exclusivamente na margem direita do Rio Madeira e apresentou alta especialização relacionada à precipitação sazonal (Bio_18), balanço hídrico e NDVI. A distribuição potencial restrita às margens do lado direito do Rio Madeira sugere forte influência dessa barreira fluvial em sua delimitação espacial. Áreas adicionais de alta adequabilidade ambiental sem registros conhecidos foram identificadas, representando oportunidades importantes para novos esforços amostrais. *A. aff. tinae* 5 apresenta uma área potencial ampla aos longos das margens dos rios principais da região estudada, especialmente nas áreas centrais próximas ao longo do interflúvio Purus-Madeira. Os modelos revelaram áreas altamente adequadas restritas espacialmente, sem muita extrapolação, sugerindo forte dependência dessa linhagem a microclimas específicos relacionados à altitude e elevação.

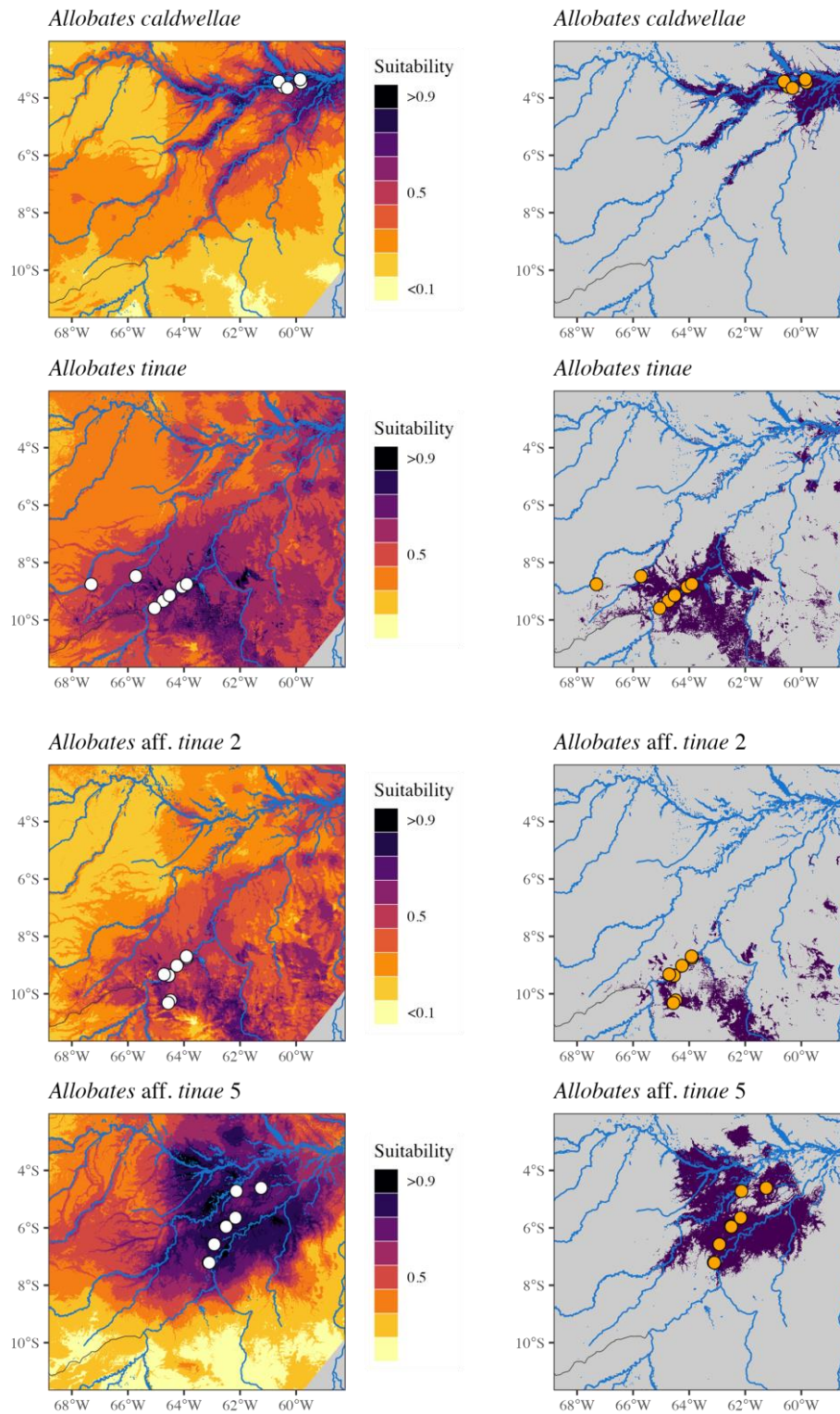


Figura 4. Mapas preditivos de adequabilidade ambiental para diferentes linhagens modeladas utilizando ensemble of small models (ESMs) com o MaxEnt. À esquerda, os mapas contínuos representam a adequabilidade ambiental prevista pelos modelos, variando de <0.1 (baixa, tons laranja e amarelados) a >0.9 (alta, tons roxos e preto). Os pontos indicam as localidades conhecidas das linhagens. À direita, os mapas binários mostram as áreas classificadas como adequadas pelo critério de Máxima Sensibilidade + Especificidade,

destacando regiões onde a linhagem é mais provável de ocorrer (em roxo). Os rios principais são representados em azul.

DISCUSSÃO

Nossos resultados revelam padrões importantes sobre a distribuição ecológica e biogeográfica das linhagens do complexo *Allobates tinae*, destacando o papel concomitante de fatores históricos e ecológicos na delimitação de seus nichos ambientais e na segregação espacial. A alta sobreposição ambiental observada entre *A. tinae* e *A. aff. tinae 2* ($D = 0,730$) sugere que essas linhagens ocupam nichos ambientais semelhantes, caracterizados por gradientes relacionados ao balanço hídrico ambiental e precipitação sazonal. No entanto, sua separação geográfica pelo Rio Madeira reforça o papel dos grandes rios amazônicos como barreiras biogeográficas significativas, promovendo isolamento populacional e especiação alopátrica (Ribas *et al.* 2012; Hoorn *et al.* 2010). A ausência de coexistência espacial entre linhagens com nichos semelhantes também pode ser explicada por processos de exclusão competitiva ou particionamento de recursos, que limitam a ocupação de áreas sobrepostas (Burke *et al.* 2024).

A baixa sobreposição de nicho entre a maioria das linhagens e a clara diferenciação ecológica entre as linhagens do complexo, como *A. aff. tinae 5*, reflete uma alta especialização ambiental, especialmente em microclimas associados à altitude e à sazonalidade térmica. As variáveis ambientais mais relevantes para os modelos, como balanço hídrico, precipitação sazonal (Bio_18), elevação e NDVI, são reconhecidamente cruciais para anfíbios devido à sua sensibilidade fisiológica às condições microclimáticas locais (Karger *et al.* 2016). Essas especializações ecológicas podem ter contribuído para a separação geográfica das linhagens, mesmo em áreas com gradientes ambientais relativamente homogêneos.

Os modelos preditivos gerados utilizando a abordagem "*Ensemble of Small Models*" (ESMs) e o algoritmo MaxEnt apresentaram desempenho robusto ($AUC \geq 0,95$; $TSS \geq 0,90$), confirmando sua capacidade de discriminar áreas adequadas para as linhagens estudadas. Esses resultados podem destacar a eficácia de abordagens integrativas para modelagem de nicho ecológico em grupos com registros limitados. Entretanto reconhecemos que a alta restrição espacial das linhagens e a baixa quantidade de registros pode levar ao truncamento da estimativa dos nichos, podendo levar ao sobreajuste dos modelos (ex: predizendo uma distribuição que é muito preciso para os dados de treinamento, mas não reflete a distribuição real da linhagem) (Guisan *et al.* 2017). Porém, vale reforçar que além da abordagem de *Ensemble of small models*, que é *desenhada* para minimizar essas limitações (Breiner *et al.* 2015), restringimos a complexidade de cada modelo individual a partir dos parâmetros de regularização. Por fim, a validação em campo poderá confirmar as hipóteses sobre a distribuição potencial das linhagens aqui estudadas, assim como o uso de abordagens adicionais, como modelagem mecanística a partir de parâmetros de fisiologia termal e hídrica (Cassemiro *et al.* 2018; Kearney and Porter 2020; Rodríguez *et al.* 2019).

Os mapas preditivos revelaram áreas de alta adequabilidade ambiental ainda não amostradas, como margens do rio Madeira para *A. aff. tinae* 2 e regiões isoladas para *A. aff. tinae* 5. Essas regiões representam pontos para futuros esforços de coleta e podem ampliar de forma significativa o conhecimento sobre a distribuição real dessas linhagens, revelando padrões ocultos de diversidade genética e ecológica. Os padrões espaciais distintos observados entre essas linhagens, com microhabitats específicos e distribuição restrita, reforçam a importância das áreas de endemismo amazônicas na geração e manutenção da biodiversidade regional, onde fatores históricos (ex.: formação de rios) e ecológicos (ex.: gradientes de umidade e topografia) atuam sinergicamente

para gerar e manter a biodiversidade regional (Cracraft 1985; Silva *et al.* 2005, Guayasamin *et al.* 2024).

Nossos resultados indicam que barreiras históricas como rios amazônicos interagiram com gradientes ambientais contemporâneos para moldar as distribuições observadas em algumas linhagens do complexo *Allobates tinae*. A separação espacial entre linhagens ecologicamente semelhantes sugere que processos históricos desempenharam um papel dominante na delimitação das áreas de ocorrência, enquanto fatores ecológicos contribuíram para a especialização dentro dessas áreas, reforçando o papel complementar dos fatores históricos e ecológicos na diversificação da biota amazônica (Ribas *et al.* 2012; Moraes *et al.* 2016; Guayasamin *et al.* 2024). As linhagens do complexo *Allobates tinae* demonstraram diferentes níveis de especialização ecológica, sendo algumas altamente vulneráveis às mudanças climáticas e à degradação ambiental causada por atividades humanas. A identificação de áreas prioritárias para conservação, como regiões com conhecida interferência antrópica na vegetação ou margens fluviais específicas, é essencial para proteger essas linhagens em um cenário de rápida transformação ambiental (Penhacek *et al.* 2024).

Este estudo revelou padrões bem definidos de sobreposição de nicho e de distribuição potencial entre as linhagens do complexo *Allobates tinae*, ressaltando a influência combinada de fatores históricos e ecológicos no processo de diversificação do grupo na região sudoeste da Amazônia brasileira. As análises indicaram que variáveis ambientais como altitude, balanço hídrico e precipitação sazonal atuam como determinantes na delimitação dos nichos ecológicos ocupados por cada linhagem, refletindo adaptações específicas a diferentes condições microclimáticas e topográficas. Os modelos de distribuição preditiva demonstraram elevado desempenho, evidenciado por métricas consistentes de acurácia, e permitiram identificar áreas de alta

adequabilidade ambiental que ainda não foram amostradas, configurando-se como regiões estratégicas para investigações futuras. Ademais, os resultados sugerem fortemente que eventos históricos de isolamento geográfico, como promovidos por grandes rios amazônicos, interagiram com gradientes ecológicos contemporâneos, moldando as distribuições espaciais atuais das linhagens. Esses achados não apenas reforçam a importância dos rios como barreiras biogeográficas, mas também evidenciam a necessidade de abordagens integrativas para compreender a complexa interação entre história evolutiva e contexto ambiental na geração e manutenção da biodiversidade amazônica.

Ao integrar dados moleculares provenientes de estudos anteriores com análises ecológicas baseadas em modelagem preditiva espacialmente explícita, contribuimos de forma significativa para o esclarecimento dos mecanismos que geram, estruturam e mantêm a biodiversidade na região amazônica. Essa abordagem integrativa permitiu não apenas reconhecer padrões ocultos de diversidade dentro do complexo *Allobates tinae*, mas também compreender como fatores evolutivos, ecológicos e históricos interagem para moldar a distribuição das linhagens. Ao revelar a importância dos filtros ambientais atuais e das barreiras geográficas passadas na delimitação de nichos ecológicos e linhagens evolutivas, o estudo reforça o papel essencial de abordagens multidisciplinares na formulação de estratégias eficazes para a proteção da diversidade

Referências

- Aiello-Lammens, M.E.; Boria, R.A.; Radosavljevic, A.; Vilela, B.; Anderson, R.P. 2015. spThin: an R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography*, 38: 541–545. doi:10.1111/ecog.01132.
- Antonelli, A.; Zizka, A.; Carvalho, F.A.; Scharn, R.; Bacon, C.D.; Silvestro, D.; Condamine, F.L. 2018. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(23): 6034–6039.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3): 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Breiner, F.T.; Guisan, A.; Bergamini, A.; Nobis, M.P. 2015. Overcoming limitations of modelling rare species by using ensembles of small models. *Methods in Ecology and Evolution* 6(10): 1210–1218. doi:10.1111/2041-210X.12403.
- Broennimann, O.; Fitzpatrick, M.C.; Pearman, P.B.; Petitpierre, B.; Pellissier, L.; Yoccoz, N.G.; Thuiller, W.; Fortin, M.-J.; Randin, C.; Zimmermann, N.E.; Graham, C.H.; Guisan, A. 2012. Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography* 21(4): 481–497.
- Brun, P.; Zimmermann, N.E.; Hari, C.; Pellissier, L.; Karger, D.N. 2022a. Global climate-related predictors at kilometer resolution for the past and future. *Earth System Science Data*, 14: 5573–5603. doi:10.5194/essd-14-5573-2022.
- Brun, P.; Zimmermann, N.E.; Hari, C.; Pellissier, L.; Karger, D.N. 2022b. CHELSA-

BIOCLIM+ A novel set of global climate-related predictors at kilometre-resolution. EnviDat. doi:10.16904/envidat.332.

Burke, N.W.; O'Brien, C.P.; Fill, J.M. 2023. The competitive exclusion–tolerance rule explains habitat partitioning among co-occurring species of burying beetles. *Ecology*. doi:10.1002/ecy.4208.

Casemiro, F.A.S.; Gouveia, S.F.; Diniz-Filho, J.A.F. 2018. Distribuição de *Rhinella granulosa*: integrando envelopes bioclimáticos e respostas ecofisiológicas. *Revista da Biologia* 8(1): 38–44. doi:10.7594/revbio.08.07.

Delprá-Cachulo, J.M.; Peredo-Rivera, E.; Palacio-Núñez, J.; Toledo, L.F.; Olivera-Méndez, A.; Martínez-Montoya, J.F.; et al. 2024. Influence of environmental variables on the spatiotemporal distribution of anurans during the reproductive season in southeastern Brazil. *Acta Zoológica Mexicana* 40.

Duellman, W.E.; Trueb, L. 1994. Biology of amphibians. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 670p.

Elith, J.; Leathwick, J.R. 2009. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40(1): 677–697.

Emilio, T. 2007. Distribuição de palmeiras (Arecaceae) ao longo de gradientes ambientais no baixo interflúvio Purus-Madeira, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas. 102p.

Farr, T.G.; Kobrick, M. 2000. Shuttle radar topography mission produces a wealth of data. *Eos, Transactions, American Geophysical Union*, 81: 583–585. doi:10.1029/EO081i048p00583.

Fearnside, P.M.; Graça, P.M.L.A.; Keizer, E.W.H.; Maldonado, F.D.; Barbosa, R.I.; Nogueira, E.M. 2009. Modelagem de desmatamento e emissões de gases de efeito estufa na região sob influência da Rodovia Manaus-Porto Velho (BR-319). *Revista Brasileira de Meteorologia*, 24: 208–233.

Ferrão, M.; Hanken, J.; Lima, A.P. 2022. A new nurse frog of the *Allobates tapajos* species complex (Anura: Aromobatidae) from the upper Madeira River, Brazilian Amazonia. *PeerJ*, 10: e13751. doi:10.7717/peerj.13751.

Figueiredo, S.M.M.; Venticinque, E.M.; Figueiredo, E.O.; Ferreira, E.J.L. 2015. Predição da distribuição de espécies florestais usando variáveis topográficas e de índice de vegetação no leste do Acre, Brasil. *Acta Amazonica* 45(2): 167-174.

Fick, S.E.; Hijmans, R.J. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37: 4302–4315. doi:10.1002/joc.5086.

Fordham, G.; Shanee, S.; Peck, M. 2020. Effect of river size on Amazonian primate community structure: A biogeographic analysis using updated taxonomic assessments. *American Journal of Primatology* 82. doi:10.1002/ajp.23136.

Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C.; Blanc, M.; Gemmell, N.J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2(10): e1109. doi:10.1371/journal.pone.0001109.7.

Fouquet, A.; Peloso, P.; Jairam, R.; Lima, A.P.; Mônico, A.T.; Ernst, R.; Kok, P.J.R. 2022. Back from the deaf: Integrative taxonomy revalidates an earless and mute species, *Hylodes grandoculis* van Lidth de Jeude, 1904, and confirms a new species of *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870 (Anura: Strabomantidae) from the Eastern Guiana Shield. *Organisms Diversity & Evolution*, 22: 1065–1098. doi:10.1007/s13127-022-00564-w.

Funk, W.C.; McKay, J.K.; Hohenlohe, P.A.; Allendorf, F.W. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9): 489–496. doi:10.1016/j.tree.2012.05.012.

Giacometti, D.; Tattersall, G.J. 2025. Behavioural evidence of a humidistat: a temperature-compensating mechanism of hydroregulation. *bioRxiv*. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2025.01>.

Guayasamin, J.M.; Ribas, C.C.; Carnaval, A.C.; Carrillo, J.D.; Hoorn, C.; Lohmann, L.G.; et al. 2024. Evolution of Amazonian biodiversity: A review. *Acta Amazonica* 54: e54bc21360.

Guisan, A.; Thuiller, W.; Zimmermann, N.E. 2017. *Habitat suitability and distribution models: with applications in R*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hoorn, C.; Boschman, L.M.; Kukla, T.; Sciumbata, M.; Val, P. 2022. The Miocene wetland of western Amazonia and its role in Neotropical biogeography. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 199: 25–35. doi:10.1093/botlinnean/boab098.

Jaramillo-Martinez, A.F.; Vilà, C.; Guayasamin, J.M.; Gagliardi-Urrutia, G.; Rojas-Runjaic, F.J.M.; Simões, P.I.; Chaparro, J.C.; Aguilar-Manihuari, R.; Castroviejo-Fisher, S. 2025. Genetic and phenotypic evidence reveals a complex evolutionary history within the Amazonian *Allobates juami/insperatus* clade (Anura, Aromobatidae), with the description of a new species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2025(471): 1–83.

Juarez, B.H.; Quintanilla-Salinas, I.; Lacey, M.P.; O'Connell, L.A. 2024. Water availability and temperature as modifiers of evaporative water loss in tropical frogs. *Integrative and Comparative Biology*, 64: 354–365. doi:10.1093/icb/icae057.

Karger, D.N.; Conrad, O.; Böhner, J.; Kawohl, T.; Kreft, H.; Soria-Auza, R.W.; Zimmermann, N.E.; Linder, H.P.; Kessler, M. 2017. Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Scientific Data*, 4: 170122. doi:10.1038/sdata.2017.122.

Kearney, M. R., & Porter, W. P. (2020). NicheMapR – an R package for biophysical modelling: the ectotherm and Dynamic Energy Budget models. *Ecography*, 43(1), 85–96. <https://doi.org/10.1111/ecog.04680>.

Maia, G.F.; Ferrão, M.; Moraes, L.J.C.L.; Kaefer, I.L.; Lima, A.P. 2025. Cryptic diversity and historical biogeography of a nurse-frog species complex (*Allobates tinae*):

Insights on biotic diversification in Brazilian southwestern Amazonia. *Zoologica Scripta*, 54: 317–331. doi:10.1111/zsc.12711.

Moraes, L.J.C.L.; Pavan, D.; Barros, M.C.; Ribas, C.C. 2016. The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography*, 43: 2113–2124. doi:10.1111/jbi.12756.

Moreno, E.; Pequeno, P.; Santorelli Junior, S.; Ferrão, M.; Lima, A.; Magnusson, W. 2023. How environmental factors affect the abundance and distribution of two congeneric species of Amazonian frogs. *Biotropica* 56: 28–35.

Motta, J.; Menin, M.; Almeida, A.P.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2018. When the unknown lives next door: a study of central Amazonian anurofauna. *Zootaxa*, 4438(1): 79–104. doi:10.11646/zootaxa.4438.1.3.

Moura, M.R.; Jetz, W. 2021. Shortfalls and opportunities in terrestrial vertebrate species discovery. *Nature Ecology & Evolution* 5(5): 631–639.

Myers, N.; Mittermeier, R.; Mittermeier, C.; et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853–858.

Musher, L.J.; Ferreira, M.; Aleixo, A.; Berv, J.S.; Thom, G.; Brumfield, R.T.; Cracraft, J.; Ribas, C.C.; Smith, B.T. 2022. River network rearrangements promote speciation in lowland Amazonian birds. *Science Advances*, 8(15): eabn1099.

Naimi AI, Moodie EE, Auger N, Kaufman JS. 2014. Constructing inverse probability weights for continuous exposures: a comparison of methods. *Epidemiology*, 25(2): 292–299. doi:10.1097/EDE.0000000000000053.

Penhacek, M.; Souza, T.; Santos, J.; Guerra, V.; Castro-Souza, R.; Rodrigues, D. 2024. Amazonian amphibians: diversity, spatial distribution patterns, conservation and sampling deficits. *Biodiversity Data Journal* 12: e109785.

Peterson, A.T.; Soberón, J.; Pearson, R.G.; Anderson, R.P.; Martínez-Meyer, E.; Nakamura, M.; Araújo, M.B. 2011. Ecological niches and geographic distributions (MPB-49). Princeton University Press, Princeton, USA.

Pettorelli, N. 2013. *The Normalized Difference Vegetation Index*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Pottier, P.; Kearney, M.R.; Wu, N.C.; et al. 2025. Vulnerability of amphibians to global warming. *Nature*. doi:10.1038/s41586-025-08665-0.

RADAMBRASIL. 1978. Levantamento dos recursos naturais. Folha SB-20 – Purus, Vol. 17. DNPM/Projeto RADAMBRASIL, Rio de Janeiro, 546p.

Raxworthy, C.J.; Martinez-Meyer, E.; Horning, N.; Nussbaum, R.A.; Schneider, G.E.; Ortega-Huerta, M.A.; Peterson, A.T. 2003. Predicting distributions of known and unknown reptile species in Madagascar. *Nature*, 426(6968): 837–841. doi:10.1038/nature02205.

Raxworthy, C.J.; Ingram, C.M.; Rabibisoa, N.; Pearson, R.G. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*, 56(6): 907–923. doi:10.1080/10635150701775111.

Regos, A.; Gagne, L.; Alcaraz-Segura, D.; Honrado, J.; Domínguez, J. 2019. Efeitos de características de espécies e preditores ambientais no desempenho e transferibilidade de modelos de nicho ecológico. *Scientific Reports* 9.

Ribas, C.; Aleixo, A.; Nogueira, A.; Miyaki, C.; Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 681–689.

Ribas, C.C.; Fritz, S.C.; Baker, P.A. 2022. The challenges and potential of geogenomics for biogeography and conservation in Amazonia. *Journal of Biogeography*, 49: 1–15. doi:10.1111/jbi.14452.

Rodríguez, L.; García, J.J.; Carreño, F.; Martínez, B. 2019. Integration of physiological knowledge into hybrid species distribution modelling to improve forecast of distributional shifts of tropical corals. *Diversity and Distributions* 25(5): 715–728. doi:10.1111/ddi.12883.

Rojas, R.R.; Fouquet, A.; Ron, S.R.; Hernández-Ruz, E.J.; Melo-Sampaio, P.R.; Chaparro, J.C.; Vogt, R.C.; de Carvalho, V.T.; Pinheiro, L.C.; Avila, R.W.; Farias, I.P.; Gordo, M.; Hrbek, T. 2018. A Pan-Amazonian species delimitation: high species

diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). *PeerJ*, 6: e4941. doi:10.7717/peerj.4941.

Schietti, J.; Martins, D.; Emilio, T.; Souza, P.F.; Levis, C.; Baccaro, F.B.; Pinto, J.L.P.V.; Moulatlet, G.M.; Stark, S.C.; Sarmiento, K.; Araújo, R.N.O.; Costa, F.R.C.; Schöngart, J.; Quesada, C.A.; Saleska, S.R.; Tomasella, J.; Magnusson, W.E. 2016. Forest structure along a 600 km transect of natural disturbances and seasonality gradients in central-southern Amazonia. *Journal of Ecology*, 104: 1335–1346.

Simões, P.I.; Gagliardi-Urrutia, G.; Rojas-Runjaic, F.J.M.; Castroviejo-Fisher, S. 2018. A new species of nurse-frog (Aromobatidae, Allobates) from the Juami River basin, northwestern Brazilian Amazonia. *Zootaxa*, 4387(1): 109–133. doi:10.11646/zootaxa.4387.1.5.

Soberón, J.; Peterson, A. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2: 1–10. doi:10.17161/BI.V2I0.4.

Struck, T.H.; Feder, J.L.; Bendiksyby, M.; Birkeland, S.; Cerca, J.; Gusarov, V.I.; et al. 2018. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33: 153–163.

Thom, G.; Xue, A.T.; Sawakuchi, A.O.; Ribas, C.C.; Hickerson, M.J.; Aleixo, A.; Miyaki, C.Y. 2020. Quaternary climate changes as speciation drivers in the Amazon floodplains. *Science Advances*, 6: eaax4718. doi:10.1126/sciadv.aax4718.

Vacher, J.-P.; Chave, J.; Ficetola, F.; de Thoisy, B.; Lamanna, C.; Jansen, M.; et al. 2020. Large-scale DNA-based survey of frogs in Amazonia suggests a vast underestimation of species richness and endemism. *Journal of Biogeography*, 47: 1781–1791. doi:10.1111/jbi.13847.

Warren, D.L.; Glor, R.E.; Turelli, M. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* 62(11): 2868–2883.

Wells, K.D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago, USA, 1400p.

Wiens, J.J.; Graham, C.H. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 519–539. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431.

Ximenes, A.C.; Amaral, S.; Monteiro, A.M.V.; Almeida, R.M.; Valeriano, D.M. 2021. Mapping the terrestrial ecoregions of the Purus-Madeira interfluvium in the Amazon Forest using machine learning techniques. *Forest Ecology and Management*, 488: 118960. doi:10.1016/j.foreco.2021.118960.

Figuras Suplementares

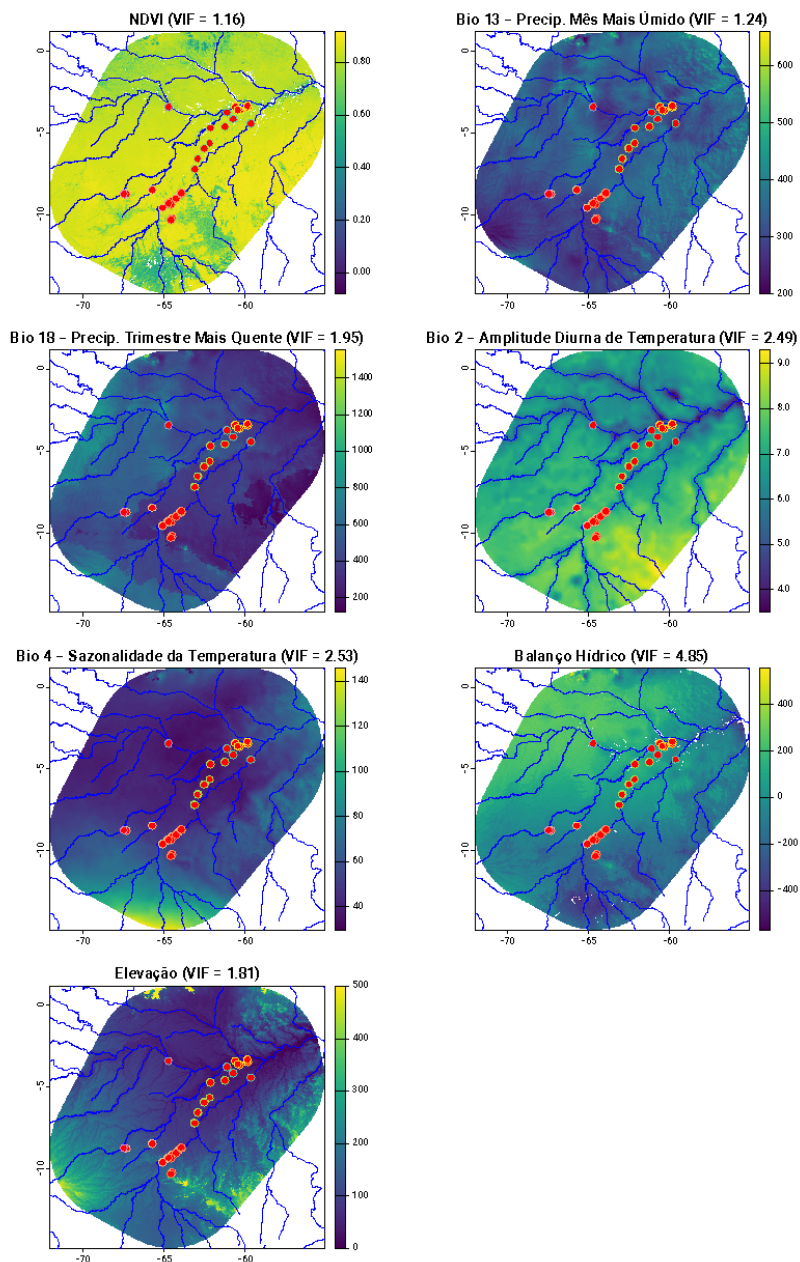


Figura suplementar. Variáveis ambientais selecionadas e recortadas de acordo com a extensão usada para treinar os modelos. Os respectivos VIFs são mostrados no título de cada figura.

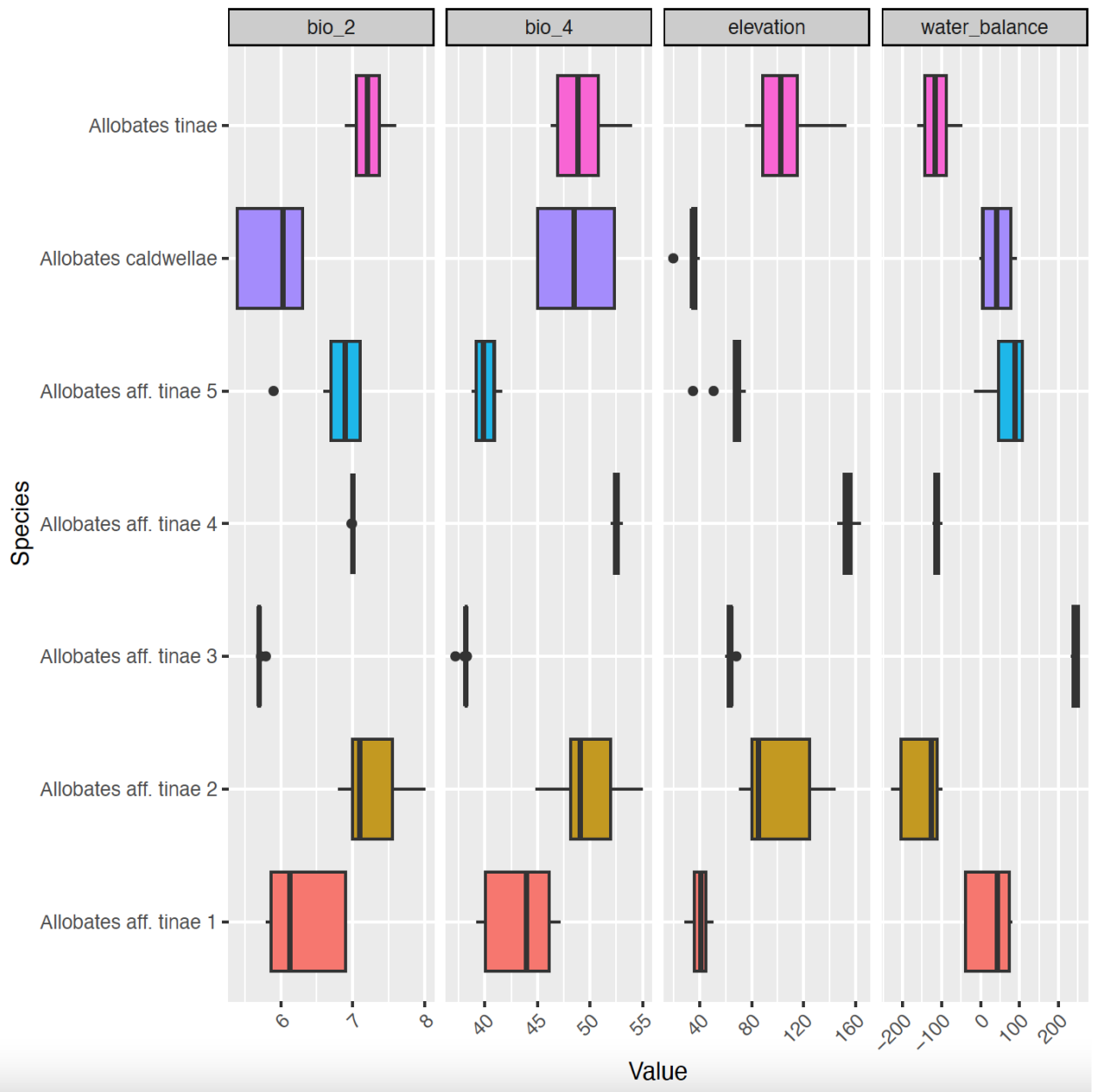


Figura suplementar a (continua abaixo). Valores das variáveis ambientais selecionadas para cada linhagem (valores extraídos por localidade)

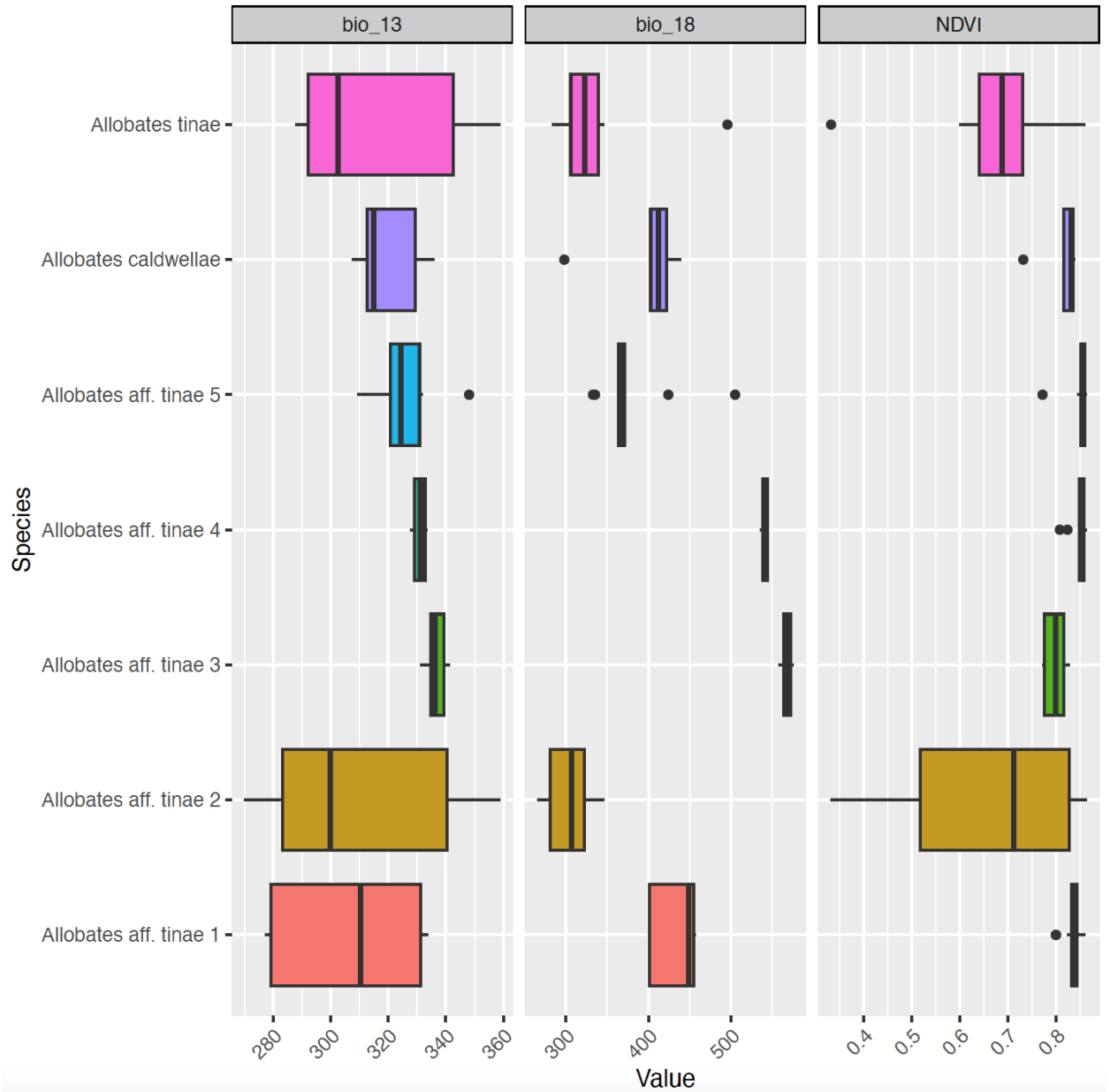


Figura suplementar b (continuação). Valores das variáveis ambientais selecionadas para cada linhagem (valores extraídos por localidade)

Conclusão Geral

Esta tese teve como objetivo investigar os processos históricos e ecológicos que moldaram a diversificação do complexo *Allobates tinae* na Amazônia brasileira, integrando abordagens filogenéticas, biogeográficas e modelagem de nicho ecológico. Os resultados obtidos revelaram padrões complexos de diversificação críptica, destacando a interação entre fatores históricos (barreiras fluviais e dinâmica paleogeográfica) e ecológicos (gradientes ambientais e especialização em microhabitats) na geração e manutenção da biodiversidade amazônica.

No primeiro capítulo, combinamos análises filogenéticas e biogeográficas para identificar sete linhagens geneticamente distintas dentro do complexo *Allobates tinae*, das quais apenas duas (*A. tinae* e *A. caldwellae*) haviam sido formalmente descritas. A distribuição não sobreposta dessas linhagens, separadas por grandes rios como o Madeira e o Purus, reforçou o papel das barreiras fluviais como agentes de isolamento geográfico e especiação alopátrica. As análises biogeográficas indicaram que a diversificação do grupo iniciou-se no Mioceno, com dispersões sucessivas a partir do Escudo das Guianas, seguidas de eventos de vicariância durante o Plioceno e Pleistoceno. Esses resultados corroboram estudos anteriores que destacam os grandes rios amazônicos como divisores biogeográficos críticos para organismos terrestres de baixa capacidade de dispersão.

No segundo capítulo, a modelagem de nicho ecológico revelou que variáveis como precipitação sazonal, balanço hídrico e elevação são determinantes fundamentais para a distribuição das linhagens estudadas. Apesar da alta sobreposição ambiental entre *A. tinae* e *A. aff. tinae* 2, a ausência de coexistência geográfica sugeriu

que barreiras históricas, como o rio Madeira, atuaram em conjunto com especializações ecológicas para limitar suas áreas de ocorrência. Além disso, os modelos identificaram áreas prioritárias ainda não amostradas, como margens do rio Madeira e áreas isoladas, que representam lacunas sugestivas para futuras pesquisas de campo e estratégias de conservação.

Em síntese, esta tese demonstra que a riqueza biológica é sustentada por mecanismos complexos e complementares, nos quais a dinâmica histórica da paisagem (formação de rios e capturas de drenagem) e a seleção por fatores ecológicos (vegetação, umidade e topografia) atuam como forças complementares. Ao combinar abordagens de filogeografia, biogeografia e modelagem de nicho, este estudo fornece um modelo para desvendar padrões de diversificação em grupos que contêm espécies crípticas, ajudando a revelar a diversidade camuflada e oferecendo dados para estratégias de conservação baseadas em evidências em uma região sob pressão antrópica crescente.

Referências Gerais

- Antonelli, A.; Zizka, A.; Carvalho, F.A.; Scharn, R.; Bacon, C.D.; Silvestro, D.; et al. 2018. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 6034–6039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713819115>.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3): 148–155. doi:10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Brun, P.; Zimmermann, N.E.; Hari, C.; Pellissier, L.; Karger, D.N. 2022. Global climate-related predictors at kilometer resolution for the past and future. *Earth System Science Data*, 14: 5573–5603. doi:10.5194/essd-14-5573-2022.
- Cracraft, J. 1985. Species selection, macroevolutionary analysis, and the “hierarchical theory” of evolution. *Systematic Zoology*, 34(2): 222–229. doi:10.2307/2413330.
- Dias, A.; Van Houdt, S.; Meschin, K.; Von Stackelberg, K.; Bago, M.-L.; Baldarelli, L.; et al. 2023. Using essential biodiversity variables to assess forest ecosystem integrity. *Frontiers in Forests and Global Change* 6: 1098901. doi: 10.3389/ffgc.2023.1098901.
- Ferrão, M.; de Souza, R.A.; Colatreli, O.P.; Hanken, J.; Lima, A.P. 2022. Hidden in the litter: cryptic diversity of the leaf-litter toad *Rhinella castaneotica–proboscidea* complex revealed through integrative taxonomy, with description of a new species from south-western Amazonia. *Systematics and Biodiversity* 20: 1–24. <https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2039317>.
- Franco-Mena, D.; Guayasamin, J.M.; Andrade-Brito, D.; Yáñez-Muñoz, M.H.; Rojas-Runjaic, F.J.M. 2023. Unveiling the evolutionary relationships and the high cryptic diversity in Andean rainfrogs (*Craugastoridae: Pristimantis myersi* group). *PeerJ* 11:

e14715. <https://doi.org/10.7717/peerj.14715>

Funk, W.C.; McKay, J.K.; Hohenlohe, P.A.; Allendorf, F.W. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9): 489–496. doi:10.1016/j.tree.2012.05.012.

Godinho, M.B.C.; Silva, F.R. 2018. The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. *Scientific Reports* 8: 3427. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21879-9>.

Guayasamin, J.M.; Ribas, C.C.; Carnaval, A.C.; Carrillo, J.D.; Hoorn, C.; Lohmann, L.G.; et al. 2024. Evolution of Amazonian biodiversity: A review. *Acta Amazonica* 54: e54bc21360.

Hoorn, C.; Boschman, L.M.; Kukla, T.; Sciumbata, M.; Val, P. 2022. The Miocene wetland of western Amazonia and its role in Neotropical biogeography. *Botanical Journal of the Linnean Society* 199: 25–35. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab098>.

Huang, Y.; Gan, X, Feng, Y.; Li, J.; Niu, S.; Zhou, B. 2024. A new framework for assessing ecosystem health with consideration of the sustainable supply of ecosystem services. *Landscape Ecology* 39:37. <https://doi.org/10.1007/s10980-024-01834-y>.

Jenkins, C.N.; Pimm, S.L.; Joppa, L.N. 2013. Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(28): E2602–E2610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302251110>.

Juarez, B.H.; Quintanilla-Salinas, I.; Lacey, M.P.; O'Connell, L.A. 2024. Water availability and temperature as modifiers of evaporative water loss in tropical frogs. *Integrative and Comparative Biology* 64: 354–365. <https://doi.org/10.1093/icb/icae057>

Lima, A.P.; Ferrão, M.; Silva, D.L. 2020. Not as widespread as thought: Integrative taxonomy reveals cryptic diversity in the Amazonian nurse frog *Allobates tinae* Melo-Sampaio, Oliveira and Prates, 2018 and description of a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 58: 1173–1194. <https://doi.org/10.1111/jzs.12406>

Menger, J.; Magnusson, W.E.; Anderson, M.J.; Schlegel, M.; Pe'er, G.; Henle, K. 2017. Environmental characteristics drive variation in Amazonian understory bird assemblages. *PLoS One* 12: e0171540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171540>.

Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; da Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858. doi:10.1038/35002501.

Réjaud, A.; Rodrigues, M.T.; Crawford, A.J.; Castroviejo-Fisher, S.; Jaramillo, A.; et al. 2020. Historical biogeography identifies a possible role of Miocene wetlands in the diversification of the Amazonian rocket frogs (*Aromobatidae: Allobates*). *Journal of Biogeography* 47: 2472–2482. <https://doi.org/10.1111/jbi.13937>

Ribas, C.C.; Sawakuchi, A.O.; de Almeida, R.P.; et al. 2025. The role of rivers in the origin and future of Amazonian biodiversity. *Nature Reviews Biodiversity* 1: 14–31. <https://doi.org/10.1038/s44358-024-00001-0>.

Rocha, D.G.; Sollmann, R. 2023. Habitat use patterns suggest that climate-driven vegetation changes will negatively impact mammal communities in the Amazon. *Animal Conservation* 26: 663–674. <https://doi.org/10.1111/acv.12853>.

Silva, J.M.C.; Rylands, A.B.; Fonseca, G.A.B. 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, 19(3): 689–694. doi:10.1111/j.1523-

1739.2005.00705.x.

Steur, G.; Ter Steege, H.; Verburg, R.W.; Sabatier, D.; Molino, J.F.; Bánki, O.S.; et al. 2022. Relationships between species richness and ecosystem services in Amazonian forests strongly influenced by biogeographical strata and forest types. *Scientific Reports* 12:5960. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09786-6>.

Vacher, J.P.; Chave, J.; Ficetola, F.G.; Sommeria-Klein, G.; Tao, S.; Thébaud, C.; et al. 2020. Large-scale DNA-based survey of frogs in Amazonia suggests a vast underestimation of species richness and endemism. *Journal of Biogeography* 47: 1781–1791. <https://doi.org/10.1111/jbi.13847>