UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Uso da taxonomia integrativa para delimitação da espécie *Adelophryne pachydactyla (*HOOGMOED et al., 1994) e considerações taxonômicas sobre o gênero *Adelophryne* (Anura: Eletherodactylidae).

RAMON COSTA DOMINATO

ILHÉUS – BAHIA

2017

RAMON COSTA DOMINATO

Uso da taxonomia integrativa para delimitação da espécie *Adelophryne pachydactyla (*HOOGMOED et al., 1994) e considerações taxonômicas sobre o gênero *Adelophryne* (Anura: Eletherodactylidae).

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Área de concentração: Zoologia

Orientadora: Dra. Janisete Gomes da Silva Miller

Co-orientador: Dr. Victor Goyannes Dill Orrico

ILHÉUS - BAHIA

2017

RAMON COSTA DOMINATO

Uso da taxonomia integrativa para delimitação da espécie *Adelophryne pachydactyla (*HOOGMOED et al., 1994) e considerações taxonômicas sobre o gênero *Adelophryne* (Anura: Eletherodactylidae).

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Dissertação aprovada em 14 de março de 2017 na cidade de Ilhéus - BA

_____

Prof ª. Dra. Janisete Gomes da Silva Miller
Universidade Estadual de Santa Cruz
(Orientadora)

_____

Dra. Carla Santana Cassini
Instituto Uiraçu

_____

Dr. Euvaldo Marciano Santos Silva Junior
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

À minha família pelo apoio incondicional que fez de mim a pessoa que sou hoje. Sem minha base, nada seria. Este trabalho é dedicado a vocês. À minha mãe, pelo apoio incondicional, paciência e suporte. Às minhas irmãs Carlla e Samira, por estarem sempre a meu lado. Meu Pai Geraldo, que mesmo não estando mais presente entre nós, estará feliz com esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e sustento, principalmente nos momentos difíceis.

À minha mãe Normeia pela paciência, suporte, incentivo. Obrigado pelo apoio incondicional e por sempre acreditar que eu seria capaz.

À Carlla e Samira, irmãs que são meu porto seguro, que sempre que preciso estão ali para ajudar, ouvir, mostrar que sou capaz e que devo seguir em frente.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, por conceder a infraestrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Zoologia pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida.

À orientadora Janisete, pelo apoio, por me colocar para cima sempre que estava me sentindo desamparado, pela sua disponibilidade e atenção sempre disposta em ajudar e principalmente por me acalmar nos momentos de angustia e ansiedade.

Ao Co-Orientador Victor, pelas broncas, puxões de orelhas, sempre disposto a ensinar principalmente durante as caronas. Você foi um divisor de águas em minha vida acadêmica e sempre mostrando que posso mais.

À melhor Turma do mestrado de Zoologia, vocês são os melhores. Serei eternamente grato pela oportunidade de ter conhecido cada um de vocês!

À minha amiga Aila, sempre disposta a ouvir e ajudar, e sempre foi uma ótima companheira de campo.

Ao Augusto pela doação dos indivíduos da serra do Mandin e Serra Azul que foram importantes para conclusão desse trabalho.

Ao fotógrafo oficial do trabalho, Arthur, sem sua ajuda estaria perdido.

Caio e Danilo, obrigado pelas dicas nos primeiros campos na Reserva Michelin.

Um agradecimento especial a minha Amiga Laís, companheira de laboratório, Passamos juntos por uma montanha-russa de emoções e com seu apoio foi tudo mais fácil.

A todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

Uso da taxonomia integrativa para delimitação da espécie *Adelophryne pachydactyla (HOOGMOED* et al., 1994) e considerações taxonômicas sobre o gênero *adelophryne* (Anura: Eletherodactylidae).

RESUMO

O gênero *Adelophryne* é composto atualmente por nove espécies, dentre as quais cinco ocorrem na Floresta Atlântica. As espécies do gênero compreendem animais de pequeno porte e ágeis que habitam a serapilheira. Estudos indicam que estes animais possuem uma divergência genética acentuada, além da ausência de caracteres morfológicos que auxiliem sua identificação. Na Floresta Atlântica da Bahia há pelo menos quatro espécies putativas do gênero, porém, não há dados moleculares sobre estas espécies. A determinação dos nomes ainda é confusa, uma vez que há incerteza na atribuição do nome *Adelophryne pachydactyla* à uma linhagem específica. Neste estudo, foram caracterizadas genética e morfologicamente as quatro populações conhecidas para a Floresta Atlântica da Bahia, além de buscar entender as relações entre estas e outras espécies do gênero. Foi utilizada uma abordagem integrativa por meio de dados moleculares e caracteres morfológicos. Foram encontrados altos valores de divergência genética intra e interespecífica, corroborando os resultados das análises filogenéticas (Máxima Parcimônia e Análise Bayesiana), além de uma caracterização morfológica das espécies. Os resultados do presente estudo possibilitaram uma melhor compreensão da relação entre as espécies que ocorrem na Floresta Atlântica, contribuindo com o aumento da informação taxonômica do gênero e permitindo a atribuição do nome *A. pachydactyla* à uma linhagem.

Palavras chaves: 16s; Espécie críptica; Floresta Atlântica.

Use of integrative taxonomy for delimitation of species *Adelophryne pachydactyla* (HOOGMOED et al., 1994) and taxonomic considerations on the genus *Adelophryne* (Anura: Eletherodactylidae).

ABSTRACT

The genus *Adelophryne* currently comprises nine species, among which five occur in the Atlantic Forest. The species within this genus comprise small and agile animals that inhabit the leaf litter. Studies indicate that these animals have a marked genetic divergence and the absence of morphological characters that support their identification. In the Atlantic Forest of Bahia there are at least four putative species of the genus, however, there are no molecular data for these species. The determination of the names is still confusing, since there is uncertainty in the attribution of the name *A. pachydactyla* to a specific lineage. In this study the four populations known for the Atlantic Forest of Bahia were characterized genetically and morphologically, in addition to seeking to understand the relationships of these with other species in the genus. An integrative approach was used combining molecular and morphological data. High values of intra and interspecific genetic divergence were found, corroborating the results from the phylogenetic analyses (Maximum Parsimony and Bayesian Analysis), besides a morphological characterization of the species. The results of the present study allowed a better understanding of the relationship among the specimens that occur in the Atlantic Forest, contributing to the increase on the taxonomic information on the genus and allowing the attribution of the name *A. pachydactyla* to a lineage.

Key Words: 16s; Cryptic species; Atlantic Florest.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL ---- 10

2 JUSTIFICATIVA ---- 14

3 OBJETIVO GERAL ---- 15

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ---- 15

4 INTRODUÇÃO ESPECÍFICA ---- 16

5 MATERIAIS E MÉTODOS ---- 18

5.1 ÁREA DE ESTUDO ---- 18

6 MORFOLOGIA ---- 19

7 DADOS MOLECULARES ---- 20

7.1 EXTRAÇÃO DO DNA ---- 20
7.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE VIA PCR ---- 20
7.3 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR ---- 21

8 RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA ---- 22

8.1 ALINHAMENTO E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS ---- 22
8.2 MÁXIMA PARCIMÔNIA ---- 22
8.3 ANÁLISE BAYESIANA ---- 22
8.4 GENBANK ---- 23
8.5 DISTÂNCIA GENÉTICA ---- 24

9 RESULTADOS ---- 25

9.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO ---- 25

10 CARACTERES MORFOLÓGICOS ---- 26

11 ANÁLISE FILOGENÉTICA ---- 29

11.1 MÁXIMA PARCIMÔNIA ---- 29
11.2 ANÁLISE BAYESIANA ---- 32

12 DISTÂNCIA GENÉTICA ---- 34

***13 ADELOPHRYNE PACHYDACTYLA* ---- 35**

14 DISCUSSÃO ---- 36

15 CONCLUSÃO ---- 39

16 REFERÊNCIAS ---- 40

17 APÊNDICE 1 – TODAS AS ÁRVORES GERADAS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA, PELO PROGRAMA TNT 1.1. ---- 46

1 INTRODUÇÃO GERAL

As florestas tropicais, incluindo a Floresta Atlântica, são ecossistemas ricos em diversidade de espécies, cujas áreas vêm sofrendo degradação ao longo dos anos (GENTRY, 2013). O bioma Floresta Atlântica encontra-se muito fragmentado, tendo perdido aproximadamente 90% da sua extensão original devido ao processo histórico de ocupação. Este bioma é considerado um “hotspot” e está entre os 25 biomas com maior diversidade de espécies no mundo, inclusive abrigando diversas espécies endêmicas (MYERS et al., 2000; GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003; TABARELLI et al., 2005; LAURANCE, 2009; RIBEIRO et al., 2009).

A Floresta Atlântica da Bahia abriga altos níveis de diversidade e endemismo. A porção sul deste bioma é conhecida como “Hiléia Baiana”, dada sua semelhança com a Floreta Amazônica tradicionalmente restrita às áreas costeiras. Em comparação com a região Sudeste, a Floresta Atlântica do Nordeste apresenta um grau de degradação ainda mais preocupante, estimando-se que restem apenas 0,3% da sua cobertura original, logo, sabe-se que altos níveis de fragmentação contribuem para a diminuição da diversidade em diferentes grupos animais, tais como mamíferos, aves, répteis e anfíbios (ANDRADE-LIMA,1966; THOMAS et al., 1998).

Nos últimos anos, muitos estudos tentam entender o surgimento da biodiversidade neste bioma. A hipótese de refúgio associado à expansão e contração de florestas e mudanças climáticas é a mais aceita (GRAZZIOTIN et al., 2006; THOME et al., 2010). Muitos inventários tentam estimar e quantificar a diversidade da Floresta Atlântica, entretanto, inventários inadequados podem não estabelecer a real diversidade do bioma, situação que pode ser associada à deficiência de informações sobre grupos biológicos (BRUNES et al., 2014).

Uma abordagem integrativa pode ser uma solução para entender a diversidade biológica, embora poucos estudos utilizem-na. Por exemplo, trabalhos com caracteres fenotípicos que não levam em consideração a plasticidade e/ou morfologia conservada, muitas vezes apresentam resultados diferentes quando comparados a estudos moleculares, e consequentemente um levantamento irreal sobre a diversidade/riqueza biológica. Cabe ressaltar que muitos pesquisadores também relatam dificuldades na delimitação de espécies usando apenas caracteres

morfológicos (VIEITES et al., 2009; THOME et al., 2010; GEHARA et al., 2013; VENCES et al., 2013).

A morfologia é uma ferramenta fundamental para a identificação, descrição e delimitação de espécies, visto que a maioria das descrições fazem uso desta metodologia. Entretanto, em alguns casos, um dos maiores desafios é a identificação de caracteres morfológicos que tenham informação suficiente para delimitar corretamente espécies. Assim, a abordagem integrativa pode ser considerada eficiente, identificando e solucionando até mesmo complexos de espécies crípticas (PADIAL, et al., 2010. (DUELLMAN, 1988; ZAMUDIO & SAVAGE, 2003; DAYRAT, 2005; LOUGHEED et al., 2006; SCHILCKS STEINER, et al., 2010).

BICKFORD et al. (2006) definiram espécies crípticas como duas ou mais espécies morfologicamente indistintas classificadas como uma mesma espécie nominal. Uma hipótese para as espécies crípticas é que os indivíduos podem estar passando por um processo de especiação que ainda não foi refletido nas suas características morfológicas. Em anfíbios, vários grupos são considerados complexos de espécies crípticas, e o uso de estudos integrativos e moleculares tem mostrado que a evolução morfológica deste grupo de animais pode ser considerada críptica (e.g FOUQUET et al., 2007; ELMER & CANNATELLA, 2008; LÖTTERS; SCHMITZ, 2009).

Dentre as diferentes metodologias em estudos integrativos, sequências de genes mitocondriais e nucleares são amplamente utilizadas (AVISE et al., 1987; RUBINOFF, 2006). As sequências de genes do DNAm tem possibilitado realizar inferências filogenéticas com o uso do gene 16S em anuros (HEDGES et al., 1993; GRAYBEAL, 1997; GOEBEL et al., 1999; AUSTIN et al., 2002). Estas sequências possibilitam determinar parentesco, identificar unidades taxonômicas e conhecer o histórico evolutivo e diversidade dos anuros Neotropicais. A região Neotropical é conhecida por possuir o maior número de espécies de anuros no mundo e a perda da diversidade biológica sem conhecimento da ciência tornou-se uma forma de pressionar os biólogos a registrar/documentar a diversidade do grupo (FOUQUET et al., 2007; BARNOSKY et al., 2011).

Entender a estrutura filogeográfica e a história evolutiva dos anuros da região Neotropical é um trabalho árduo e a utilização da taxonomia integrativa faz-se necessária, pois possibilita identificar diferenças entre indivíduos de uma população em uma biota regional, minimizando erros na intepretação da filogenia dos anuros

(SITES & MARSHALL, 2003; FOUQUET et al., 2007). Além disso, possibilita a construção de um conceito histórico sobre sua origem, mesmo em espécies com distribuição geográfica restrita, podendo revelar milhões de anos de evolução (PURVIS & HECTOR, 2000; FOUQUET et al., 2012).

Devido à dificuldade em entender a história evolutiva dos anfíbios da região Neotropical, vários agrupamentos não são resolvidos, como o grupo conhecido como Terraranas – Anfíbios que possuem desenvolvimento direto, eliminando a fase larval – cujas revisões recentes utilizando filogenia molecular têm mostrado modificações em diferentes níveis em sua classificação (PADIAL et al., 2014). A Família Eleutherodactylidae é incluída como parte dos Terraranas e subdividida em duas subfamílias, Eleutherodactylinae (LUTZ, 1954) com 202 espécies e Phyzelaphryninae (HEDGES et al., 2008) com dez espécies (FROST et al., 2017).

A Subfamília Phyzelaprhryninae é representada atualmente por dez espécies em dois gêneros: o monotípico *Phyzelaphryne* (HEYER, 1977) composto apenas por *Phyzelaphryne miriamae* (HEYER, 1977) e o gênero *Adelophryne* HOOGMOED & LESCURE (1984), com nove espécies. HOOGMOED & LESCURE (1984) descreveram duas espécies (*Adelophryne adiastola e Adelophryne gutturosa*) no norte da América do Sul. Posteriormente, HOOGMOED et al. (1994) descreveram três espécies, *Adelophryne baturitensis e Adelophryne maranguapensis,* espécies que se encontram isoladas no estado do Ceará, e *Adelophryne pachydactyla* no sul da Bahia; LOURENÇO-DE-MORAES et al. (2012) descreveram outra espécie para o sul da Bahia (*Adelophryne mucronatus*) e duas espécies para o sudeste do Brasil. SANTANA et al. (2012) descreveram uma espécie (*Adelophryne meridionalis*) para o estado de Minas Gerais e recentemente foi descrita por LOURENÇO-DE-MORAES et al. (2014) uma espécie para o Espírito Santo (*Adelophryne glandulata*). Das dez espécies que constituem a subfamília, nove ocorrem no Brasil.

O gênero *Adelophryne* tem distribuição descontínua no leste do Brasil, Guiana e na Bacia do Alto Amazonas. Compreende animais de pequeno porte, ágeis, habitantes da serapilheira. Poucos estudos foram publicados sobre este gênero e dentre as dificuldades para a realização destes estudos, pode ser citada a ausência de caracteres morfológicos diagnósticos para a delimitação correta das espécies do gênero (HEDGES et al., 2008; MACCULLOCH et al., 2008; SANTANA et al., 2012; LOURENÇO-DE-MORAES et al., 2012).

A Floresta Atlântica do sul da Bahia abriga pelo menos três linhagens putativas do gênero: *A. pachydactyla*, *A. mucronatus* e *Adelophryne sp.* (FOUQUET et al., 2012). Porém, não há dados moleculares/taxonômicos provenientes dos espécimes coletados na região que possam ser confiavelmente atribuídos à *A. pachydactyla*. Assim, atribuir com segurança o nome das espécies da Floresta Atlântica a alguma linhagem ainda é prematuro.

2 JUSTIFICATIVA

O gênero *Adelophryne* possui atualmente nove espécies descritas, das quais três ocorrem no Sul da Bahia. A região de Ilhéus é a localidade-tipo da espécie *Adelophryne pachydactyla*, mas esta população é praticamente desconhecida sob outros aspectos (e.g. comportamentais, históricos, moleculares) sendo conhecidos apenas os dados contidos na sua descrição original, feita com base em apenas um indivíduo.

Dentre as três espécies que ocorrem na região, duas foram descritas e uma está em processo de descrição por LOURENÇO-DE-MORAES et al. (dados não publicados), cujas descrições são baseadas em caracteres morfológicos até o momento.

Assim, é necessária uma revisão taxonômica dos indivíduos encontrados na região, utilizando taxonomia integrativa, a fim de atribuir com confiança o nome específico *A. pachydactyla* à uma linhagem e permitir o avanço do conhecimento taxonômico do grupo com a descrição (ou sinonímia) de outras espécies.

3 OBJETIVO GERAL

Delimitação fenotípica e molecular das espécies do gênero *Adelophryne* na região sul da Bahia e através dos dados integrados atribuir com segurança o nome *A. pachydactyla* à uma linhagem.

3.1 Objetivos específicos

- Delimitar as distâncias genéticas inter e intraespecíficas das espécies de *Adelophryne* da Bahia em relação às demais do gênero;
- Levantar e analisar características morfológicas externas que auxiliem a identificação de espécies;
- Determinar as relações filogenéticas entre as espécies;
- Integrar caracteres morfológicos e moleculares à filogenia;
- Atribuir o nome *A. pachydactyla* à uma linhagem.

4 INTRODUÇÃO ESPECÍFICA

O gênero *Adelophryne* pertence à Família Eleutherodactylidae, a qual atualmente é dividida em duas subfamílias, Eleutherodactylinae (LUTZ, 1954) com 202 espécies e Phyzelaphryninae (HEDGES et al., 2008) com 10 espécies (FROST et al., 2017). As espécies do gênero são conhecidas por serem animais de pequeno porte (< 19mm) e bastante ágeis que habitam a serapilheira. Sua distribuição é descontínua no leste do Brasil (Floresta Atlântica), onde esses animais possuem também uma morfologia conservada que dificulta sua separação em nível de espécie. Tal problema é apontado em vários estudos, o que demostra que as espécies são de difícil delimitação (HEDGES et al., 2008, SANTANA et al., 2012).

A delimitação/identificação correta de espécies tem um papel fundamental na taxonomia, entretanto, existem dificuldades na separação em nível de espécie, principalmente devido à falta de caracteres informativos. Para minimizar o problema, o uso da taxonomia integrativa foi proposta como uma abordagem eficiente, na qual diferentes metodologias aumentam a gama de informações para determinado grupo, o que muitas vezes não é alcançado por uma abordagem única. Vários são os parâmetros que podem ser utilizados na taxonomia integrativa, como caracteres fenotípicos e dados moleculares, os quais quando associados, permitem uma melhor identificação em nível de espécie (DAYRAT, 2005; FOUQUET et. al., 2012).

Os marcadores moleculares utilizados são em grande parte genes do DNA Mitocondrial (DNAm), pois a evolução destes genes ocorre em uma taxa suficientemente alta para gerar variação, e, como resultado, pode resolver problemas sobre a inferência filogenética em anuros, permitindo caracterizar espécies putativas com pequenas variações, espécies novas ou identificar complexos de espécies crípticas (BROWN et al., 1979; HEDGE et al., 1993; GRAYBEAL, 1997; AUSTIN et al., 2002; GOEBEL et al., 1999; SITE & MARSHALL, 2003; FOUQUET et al., 2007).

Nos últimos anos, estudos filogenéticos em anfíbios usando dados moleculares têm resultado em mudanças taxonômicas em diferentes níveis (DARST E CANNATELLA 2004; FROST et al., 2006; GUAYASAMIN et al., 2008). No caso do gênero *Adelophyne*, algumas espécies foram descritas recentemente com base nas características morfológicas: *A. patamona*, *A. gutturosa* e *A. meridionalis* (MACCULLOCH, et al., 2008; HOOGMOED et al., 1984; SANTANA et al., 2012),

porém, todos os estudos ressaltam a dificuldade em a) encontrar caracteres morfológicos que distinguam as espécies e b) delimitar as espécies do gênero, dada sua descrição simples. Entretanto, o estudo de FOUQUET et al. (2012) demonstra que há grande diversidade genética dentro do gênero, embora uma correspondência entre os dados moleculares e caracteres morfológicos ainda não tenha sido feita, o que é ressaltado pelos autores como uma das soluções para encontrar características que identifiquem as espécies do gênero. Este é um problema encontrado em vários táxons zoológicos.

Neste sentido, uma abordagem integrativa (DAYRAT, 2005) foi proposta como eficiente para delimitação de espécies. Como poucos dados da espécie *A. pachydactyla* são conhecidos (basicamente aqueles contidos na descrição original), é pertinente que estes sejam disponibilizados para a ciência a fim de prover evidência adicional das distinções específicas nas linhagens dentro do gênero. Assim o objetivo deste estudo é uma caracterização molecular e fenotípica das espécies do gênero *Adelophryne* da Floresta Atlântica da Bahia para atribuir com segurança o nome *A. pachydactyla* à uma linhagem.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

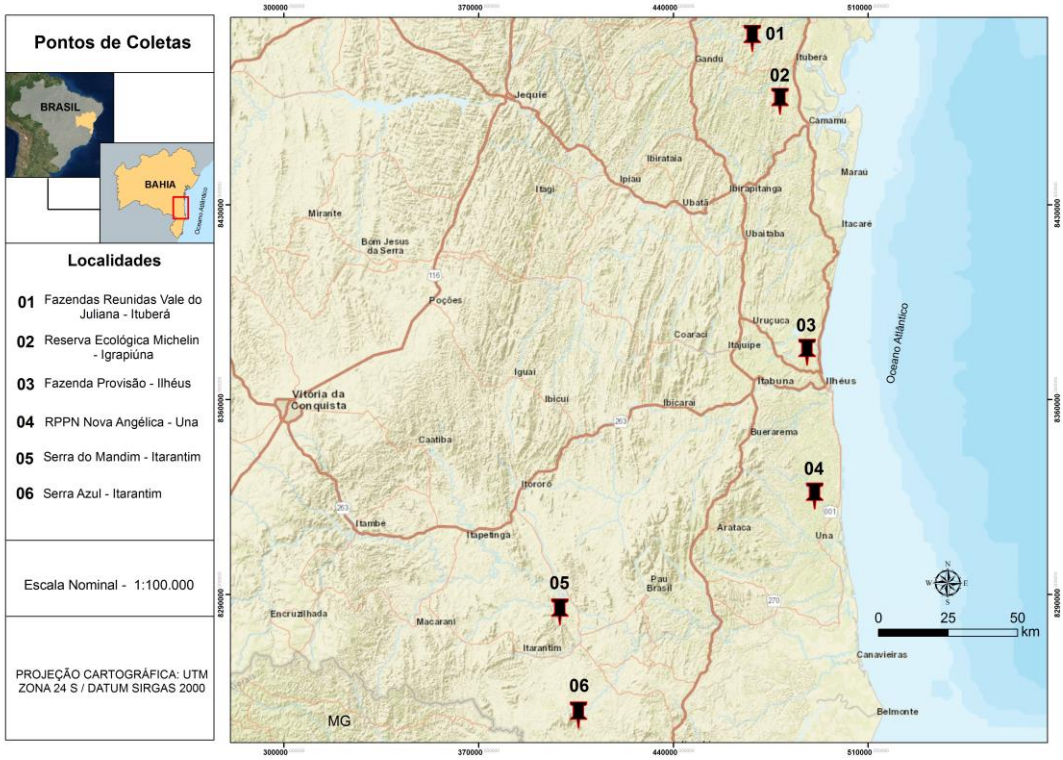
5.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em seis localidades na região sul do Estado da Bahia (Fig. 1) que foram definidas de acordo com levantamento prévio de áreas com ocorrência de espécies do gênero *Adelophryne*, e de acordo com a descrição original das espécies. Além disso, foram utilizados indivíduos depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (MZUESC).

Foram realizadas 17 idas a campo entre os meses de novembro e dezembro/2015 na Reserva Ecológica da Michelin e entre os meses de junho e agosto/2016, na região de Uruçuca onde é localizada a Fazenda Luzitânia, localidade-tipo da espécie *Adelophryne pachydactyla*.

A busca ativa foi a principal metodologia utilizada para captura dos indivíduos, e consiste em realizar uma busca a pé removendo o substrato (serapilheira) a fim de realizar o encontro visual. Os indivíduos coletados foram encaminhados para o laboratório de vertebrados onde foram retirados os tecidos e separados em morfotipos.

Figura 1 - Mapa das localidades onde foram realizadas as coletas das espécies do gênero *Adelophryne*.



6 MORFOLOGIA

Foram selecionados quatro caracteres da morfologia externa dos indivíduos para identificação e separação em morfotipos. Os caracteres foram escolhidos de acordo com a literatura sobre o gênero e descrições de espécies. As características foram comparadas entre os 132 indivíduos coletados nas seis localidades. Os caracteres utilizados no presente estudo foram:

1. Comprimento do IV dedo das mãos (Indivíduos possivelmente com duas ou três falanges);
2. Extremidades dos dedos (assimétricas ou pontiagudas);
3. Membrana timpânica (presente ou ausente);
4. Anel timpânico (completo ou incompleto):

Para o caráter “comprimento dos dedos”, a separação foi feita de acordo com a diferença de tamanho do IV dedo das mãos em comparação ao II dedo das mãos (e.g. Dedo IV mais curto que o dedo II, possivelmente duas falanges).

Após a separação dos morfotipos, foram selecionados 22 indivíduos para a análise molecular. Além disso, os indivíduos foram fotografados em decúbito dorsal, ventral e lateral para registro das características.

7 DADOS MOLECULARES

7.1 Extração do DNA

Após a identificação dos diferentes morfotipos dos espécimes, foi removida uma amostra da musculatura da coxa. Para cada exemplar, foi extraída uma pequena porção do músculo (aproximadamente 100mg). O DNA foi extraído utilizando o kit de extração DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20°C. Foi realizada a extração de DNA de pelo menos um morfotipo por localidade totalizando 22 indivíduos (Tabela 1).

7.2 Amplificação do gene via PCR

Para o presente trabalho foi escolhido o gene mitocondrial 16S, muito utilizado na literatura para estudo do gênero *Adelophryne* (e.g HEDGES et al., 2008; FOUQUET et al., 2012). Os "primers" utilizados foram 16Sbr-H sequência CCGGTCTGAACTCAGATCACGT (PALUMBI et al., 1991) e o 16S 16SC-16L GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC (DARST & CANNATELLA, 2004) na concentração de 20ng/µL. A amplificação do fragmento de DNA foi feita através da técnica da PCR ("Polymerase Chain Reaction"), utilizando dois termocicladores modelo Mastercycler da EppendorfR e Veriti 96 Well ThermalCycler da Applied Biosystems com a seguinte configuração: 5 minutos para a desnaturação inicial a 94ºC, seguido por 40 ciclos de 30 segundos para desnaturação a 94ºC; 30 segundos para anelamento a 58ºC e 90 segundos para extensão a 72ºC. Ao final foi realizada uma etapa para extensão por 7 minutos a 72ºC.

Para as reações de PCR foram utilizados água MiliQ ultrapura, tampão 5X Go Taq Flexi Buffer (Promega), dNTP (Promega), MgCL2 25mM (Promega), Go Taq DNA Polimerase 5U/ µL (Promega) e os "primers" na concentração de 20ng/ µL, em cada reação foi utilizado 3 µL de DNA totalizando 25 µL para cada reação de PCR. Além de incluir a cada ciclo da PCR uma reação de controle negativo para verificar possíveis ocorrências de contaminação.

Após o processo da PCR, foi feita a verificação dos fragmentos de DNA amplificados através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a visualização das bandas, foi aplicada no gel uma solução composta por 2 µL da reação da PCR,

2 µL de tampão de carreamento 5x Green Go taq flexiBuffer (Promega) e 2 µL do corante de DNA gel green (Biotium). Os géis foram colocados em transiluminador com luz UV (~300nm) (Nippon Genetics Europe) e analisados. Os produtos da PCR que apresentaram bandas de DNA em boa qualidade foram purificados e enviados para sequenciamento.

7.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos fragmentos amplificados foi feita através do tratamento com enzimas exonuclease I de *Escherichia coli* (EXOI) e fosfatase alcalina de camarão (SAP). Para a purificação, foram utilizados 2,7 µL da mistura enzimática - 0,9 µL de EXOI, e 1,8 µL de SAP – preparada minutos antes da purificação e 15,0 µL do produto de PCR. Os tubos contendo as reações foram levados ao termociclador e incubados a 37 °C por 30 minutos e em seguida a 80°C por 15 minutos. Os produtos de PCR purificados foram estocados a -20°C. Após cada purificação, foram corridos géis de agarose 1% contendo 2 µL da purificação, 2 µL de tampão de carreamento 5x Green Go taq flexiBuffer (Promega) e 2 µL do corante de DNA gel Green (Biotium), para verificar a eficiência da reação de purificação.

As amostras foram enviadas para sequenciamento no Centro de Recurso Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) na Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus Jaboticabal. Para a identificação das amostras apresentadas nas árvores filogenéticas foram usadas as nomenclaturas: Amostras obtidas do GenBank: GB_Nome da Espécie_Número do Voucher (G. B. A.Pachydactyla_Voucher), as demais amostras foram separadas de acordo com o número de coleta dos indivíduos e sua localidade (e.g. Ind_X_Localidade).

As sequências obtidas neste estudo foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank ® através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - ALTSCHUL et al., 1997) para confirmação da identidade taxonômica.

8 RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

8.1 Alinhamento e edição das sequências

As sequências obtidas de cada indivíduo foram editadas e analisadas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), versão 7.0.9.0. As sequências *forward* e *reverse* foram unidas em uma única sequência consenso e exportadas posteriormente em arquivo de texto no formado FASTA.

As sequências foram alinhadas, juntamente com o grupo externo no software MEGA 7.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando o algoritmo CLUSTALW com configurações *default*, além de eventuais correções manuais. Nesse mesmo software, foram realizadas análises preliminares em busca por sequências contaminadas e outros eventuais problemas. As matrizes foram então convertidas em formato TNT e FASTA com auxílio do software MESQUITE 2.75 (MADDISON & MADDISON, 2010).

8.2 Máxima Parcimônia

As análises de Máxima Parcimônia foram realizadas no software TNT 1.1 (GOLOBOFF et al., 2000), a partir da matriz do gene 16S. A obtenção da árvore mais parcimoniosa foi feita utilizando a opção “New Technology Search” e nível inicial de 100. Posteriormente foi gerado um consenso estrito entre as árvores, ou seja, um conjugado das árvores mais parcimoniosas. Após a análise da árvore de consenso (conjugado das árvores mais parcimoniosas, apresentada no Apêndice 1) as árvores foram salvas para então serem reamostradas (*resampling*) usando Jackknife (FARRIS et al., 1996), que é um algoritmo de remoção independente de caracteres, com o valor padrão (36), replicando a busca em 1000 árvores. Para determinar o suporte das árvores foi feita a análise em Jackknife utilizando os mesmos parâmetros da opção “New Technology Search”.

8.3 Análise Bayesiana

Para selecionar o melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos, as análises foram conduzidas utilizando o JModelTest 2.17 (GUINDON & GASCUEL, 2003; POSADA, 2008), configurações *default*, o modelo selecionado para o gene

16S foi o Tamura 2 parâmetros + I + gamma (TIM2+I+G), o modelo evolutivo resultante foi empregado para realizar a análise Bayesiana com o programa MrBayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012) usando a cadeia de Marcov Monte Carlo (MCMC) com quatro cadeias simultâneas para 10 milhões de gerações, e salvas a cada 1.000 gerações. O *burn-in* foi realizado a cada 250 gerações e o suporte dos ramos foram estimados através de probabilidade posterior.

8.4 GenBank

O grupo externo escolhido foi o gênero *Phyzelaphryne* e foram usadas três sequências obtidas no GenBank: *Phyzelaphryne miriamae* Voucher MTR12700, *Phyzelaprhyne* sp1A Voucher MTR192 e *Phyzelaprhryne* sp1B Voucher AndesA. As sequências do gênero *Adelophryne* depositadas no GenBank que utilizaram o gene 16s em seus estudos também foram incluídas nas análises (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações sobre as amostras obtidas do GenBank incluindo o voucher, localidade, estado ou país, usadas nas análises filogenéticas.

Gênero	Espécie	Voucher	Localidade	País / Estado
Phyzelaphryne	sp. 1b	AndesA	Seda Zafire	Colômbia
Phyzelaphryne	sp. 1a	MTR19206	Terra Vermelha	Amazonas
Phyzelaphryne	*miriamae*	MTRA12700	Purus	Amazonas
Adelophryne	*adiastola*	AJC2463	Com. Puerto Vaupes	Colômbia
Adelophryne	*gutturosa*	PK1168	Muri Muri creek	Guiana
Adelophryne	*gutturosa*	ROM44051	Meamu River	Guiana
Adelophryne	*patamona*	ROM43034	Mount Wokomung	Guiana
Adelophryne	*patamona*	ROM43035	Mount Wokomung	Guiana
Adelophryne	sp. 7	MTR13808	Serra do Navio	Amapá
Adelophryne	*maranguapensis*	CFBHT14103	Maranguape	Ceará
Adelophryne	*maranguapensis*	CFBT14119	Maranguape	Ceará
Adelophryne	*baturitensis*	CFBHT11105		Ceará
Adelophryne	*baturitensis*	CFBHT11339	Ubajara	Ceará
Adelophryne	sp. 2	PEU80	Wenceslau Guimarães	Bahia
Adelophryne	sp. 1	CFBHT11716	Caruaru	Pernambuco
Adelophryne	sp. 5	MTR17521	Marliéria	Minas Gerais
Adelophryne	sp. 5	CFBHE234	Mariana	Minas Gerais
Adelophryne	sp. 5	CFBHE235	Mariana	Minas Gerais
Adelophryne	sp. 4	MTR13750	Trancoso	Bahia
Adelophryne	sp. 6	MTR15919	Camacan	Bahia
Adelophryne	sp. 6	CFBH23672	Una	Bahia
Adelophryne	*pachydactyla*	MTR5988	Jussari	Bahia
Adelophryne	*pachydactyla*	MTR16244	Arataca	Bahia

8.5 Distância Genética

A distância genética foi determinada a partir dos resultados obtidos nas análises filogenéticas para cada clado, no qual a separação das espécies foi feita seguindo o percentual de distância genética sugerido por VENCES et al. (2005) para o gene 16S em anfíbios e calculada usando o software Mega 7.0.

9 RESULTADOS

9.1 Coleta do material biológico

Foram coletados 132 indivíduos do gênero *Adelophryne* distribuídos nas seis localidades do sul da Bahia e incluindo as amostras doadas, totalizando 106 amostras de tecidos do gênero (Tabela 2).

Tabela 2- Detalhes das localidades das espécies, número de indivíduos e amostras de tecidos.

Localidade	Número de Indivíduos	Amostras de Tecido
Fazenda Reunida Vale do Juliana	4	4
Fazenda Provisão - Ilhéus	1	1
Reserva Michelin – Uruçuca	24	24
Serra Azul - Itarantim	63	37
Serra do Mandim – Itarantim	24	24
RPPN Nova Angélica – Una	16	16
Total	**132**	**106**

Nas coletas realizadas na localidade-tipo da espécie *A. pachydactyla*, não foram encontrados indivíduos do gênero. A identificação e comparação dos indivíduos candidatos de *A. pachydactyla* foi feita utilizando fotografias do holótipo da espécie enviada pelo Museu de Zoologia Emilio Goeldi (MPEG), além de ser amostrado um indivíduo na Fazenda Provisão, Ilhéus – BA, localidade que fica aproximadamente a 30 km a leste da localidade-tipo, e 18 indivíduos na Reserva Particular do Patrimônio Natural Nova Angélica, que fica localizada a aproximadamente 50 Km a sudeste da localidade-tipo da espécie.

10 CARACTERES MORFOLÓGICOS

Os indivíduos foram separados previamente em quatro morfotipos diferentes de acordo com os caracteres morfológicos. Dentre os 132 indivíduos coletados, 22 foram selecionados para as análises molecular e também para testar a confiabilidade dos caracteres morfológicos para o gênero. Embora tenha sido detectado um pequeno número de diferenças morfológicas, elas foram bastante representativas em alguns casos.

Espécimes sp_1 - Os espécimes sp_1 apresentam o dedo IV das mãos menores que o dedo II, possivelmente esses indivíduos possuem duas falanges no dedo IV, além de possuírem membranas e anéis timpânicos completos;

Espécimes sp_2 - Os sp_2 possuem duas falanges, ou seja, o IV dedo das mãos menor que o dedo II, ausência de membrana timpânica e anel timpânico.

Espécimes sp_3 e sp_4 – Estes indivíduos não apresentam características morfológicas que os diferenciem, entretanto, ambos foram separados de acordo com sua localidade e com base nos resultados apresentados nas análises filogenéticas (Figs. 2 e 3). Tabela 3 apresenta aos indivíduos utilizados de acordo com seu morfotipo e localidade.

Tabela 3- Listas dos espécimes utilizados para análise filogenética, com separação por morfotipo e localidade.

Morfotipo	Coleção	Nº Tombo	Testemunho	Gene	Município	Estado	País
sp1_Una	MZUESC	-	IND_17	16 S	Una	BA	BR
sp3_Michelin	MZUESC	-	IND_09	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp3_Una	MZUESC	-	IND_43	16 S	Una	BA	BR
sp1_Michelin	MZUESC	-	IND_31	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp1_Juliana	MZUESC	-	IND_08	16 S	Ituberaba	BA	BR
sp2_Michelin	MZUESC	-	IND_22	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp3_Michelin	MZUESC	-	IND_36	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp2_Juliana	MZUESC	-	IND_06	16 S	Ituberaba	BA	BR
sp2_Juliana	MZUESC	-	IND_07	16 S	Ituberaba	BA	BR
sp2_Michelin	MZUESC	-	IND_24	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp2_Michelin	MZUESC	-	IND_23	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp3_Una	MZUESC	-	IND_42	16 S	Una	BA	BR
sp2_Michelin	MZUESC	-	IND_14	16 S	Igrapiuna	BA	BR
sp3_Una	MZUESC	-	IND_52	16 S	Una	BA	BR
sp3_Una	MZUESC	-	IND_47	16 S	Una	BA	BR
sp1_Mandim	MZUESC	15094	IND_293	16 S	Itarantim	BA	BR
sp4_Mandim	MZUESC	15862	IND_503	16 S	Itarantim	BA	BR
sp3_Mandim	MZUESC	15092	IND_291	16 S	Itarantim	BA	BR
sp4_Azul	MZUESC	15480	IND_337	16 S	Itarantim	BA	BR
sp4_Azul	MZUESC	15661	IND_422	16 S	Itarantim	BA	BR
sp3_Una	MZUESC	-	IND_50	16 S	Una	BA	BR
sp4_Ilhéus	MZUESC	14456	IND_137	16 S	Ilhéus	BA	BR

Figura 2 - Vista dorsal e ventral dos espécimes. A imagem A, apresenta o holótipo da espécie *Adelophryne pachydactyla*, as demais representam as espécies candidatas do gênero B - sp_1; C - sp _2; D - sp_3; C- sp_4.

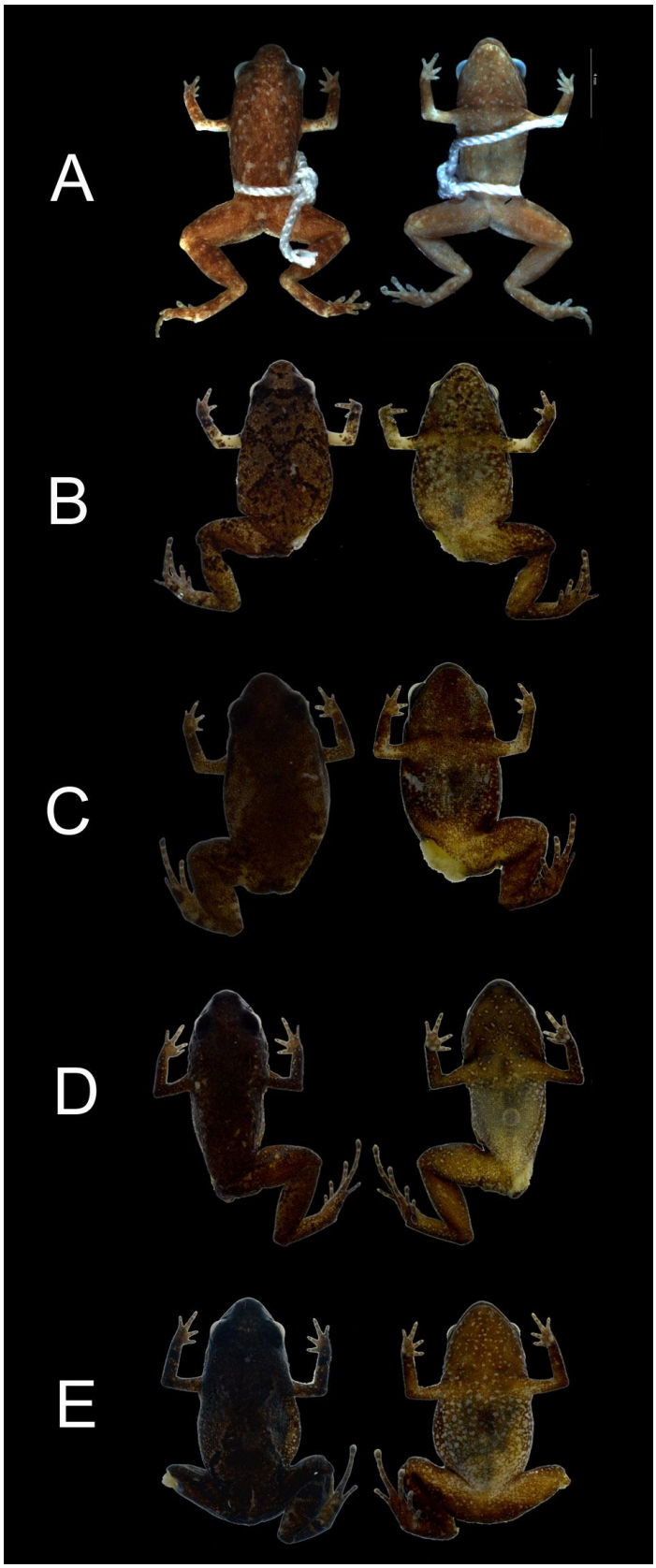
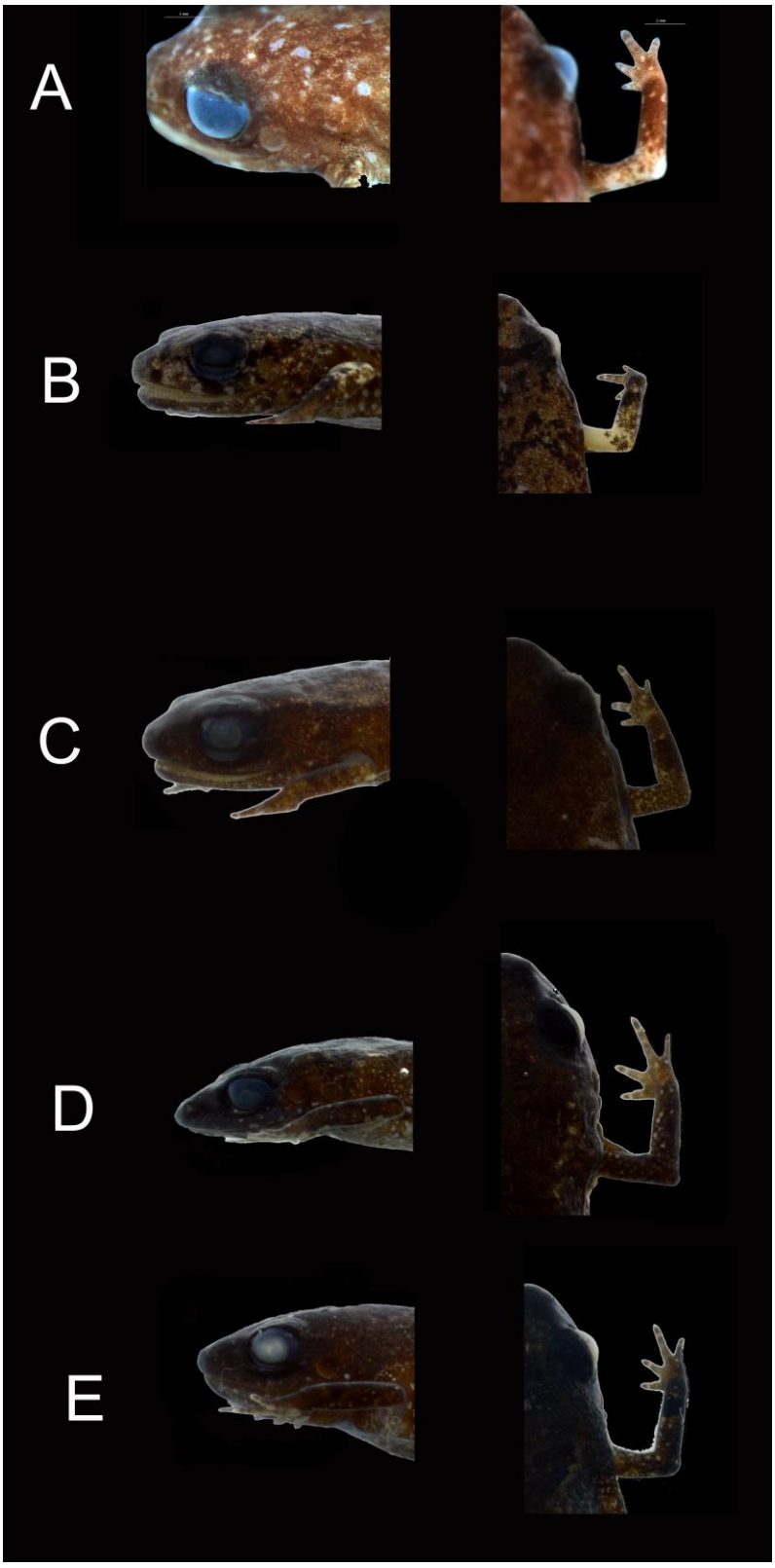


Figura 3 - Detalhe para as características morfológicas usadas para determinação das espécies candidatas, Membrana Timpânica e Dedos das Mãos: A. Holótipo de - *Adelophryne pachydactyla*, demais espécies candidatas. B. - sp_1; C. - sp_2; D. - sp_3; C. - sp_4.



11 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Dos 22 espécimes sequenciados, foram eliminadas duas sequências completas (*forward* + *reverse*) referentes aos indivíduos sp_2 (IND_23 e IND_24), devido à baixa qualidade das mesmas. Para o espécime IND_22_sp2_Michelin foi utilizado somente o sequenciamento “reverse” e nos espécimes, IND_137_sp4_Ilhéus e IND_503_sp4_Mandin foram utilizados somente o "forward", devido à baixa qualidade no sequenciamento complementar destes espécimes. A Tabela 1 apresenta todos os indivíduos enviados para o sequenciamento. Foi construída uma matriz conjunta, entre os espécimes da Floreta Atlântica da Bahia e das sequências obtidas no GenBank para então serem conduzidas duas análises filogenéticas, Máxima Parcimônia (MP) e Análise Bayesiana (BY).

11.1 Máxima Parcimônia

A Análise de Máxima Parcimônia (MP) foi realizada usando o método de busca “New technology Search”, obtendo o melhor score de 1185, com retenção de duas árvores mais parcimoniosas. Posteriormente foi gerado um consenso estrito, seguido de reamostragem (*resampling*) com suportes de Jackknife, resultando em uma única árvore mais parcimoniosa.

A árvore de consenso estrito gerada através do método de MP está apresentada na Figura 4. Nesta análise foram recuperadas dois grandes clados que apresentam separação de acordo com a distribuição geográfica das espécies, denominados o clado Amazônico (AM) que corresponde às espécies *A. adiastola*, *A. patamona e Adelophryne* sp_7_V_MTRR13808 (sp_SNV) todas sequências obtidas do GenBank, e o clado para a Floresta Atlântica com altos valores de suporte em seus ramos, denominados Clado I Jackknife = 97 e Clado II Jackknife = 99.

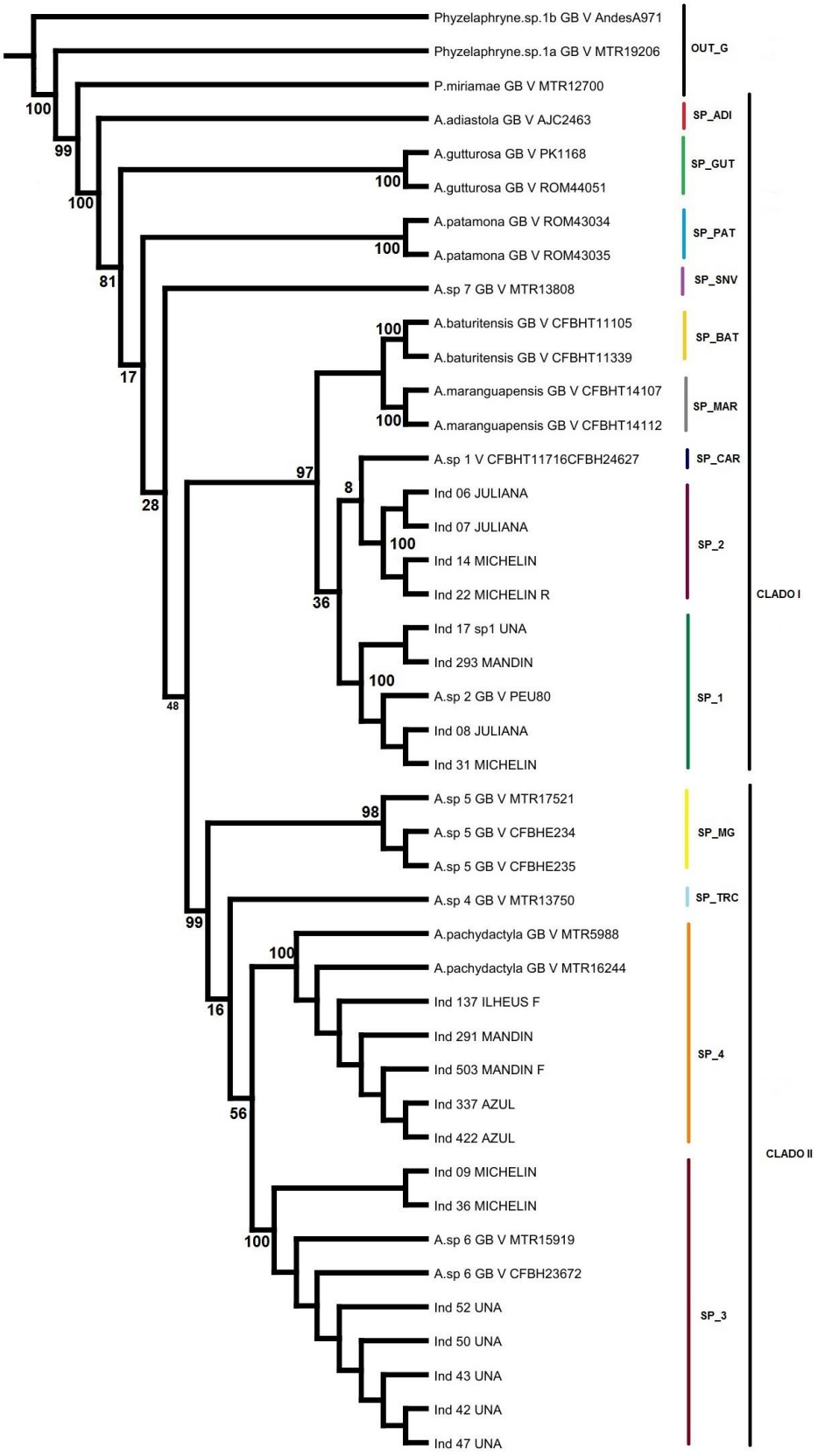
O clado II foi dividido em quatro grupos com bom suporte de Jackknife: sp_BAT (=100), sp_MAR (=100), sp_1 (=100) e sp_2 (=100). O clado sp_BAT, compreendeu somente a espécie *A. baturiteenses* e o clado sp_MAR a espécie *A. maranguapensis,* ambas correspondem as populações do estado do Ceará. Para a Floresta Atlântica da Bahia, foram recuperados dois grupos, o clado denominado sp_1 que foi composto somente por indivíduos da espécie sp_1, além de agrupar um

exemplar obtido no GenBank (*Adelophryne* sp_V. PEU80) cujos exemplares foram coletados nas regiões de Una, Igrapiúna, Wenceslau Guimarães e Serra do Mandin. O clado sp_2 agrupou indivíduos da espécie sp_2 com os exemplares restritos à região de Igrapiúna. O terminal sp_CAR (sp_1_V_CFHT11716) apresentou um baixo valor de suporte (=8), e foi recuperado como grupo irmão do clado sp_2, além de sua ocorrência ser para a região Guaibim-PE.

O clado II apresentou três grupos com bom suporte por jackknife: sp_MG (=98), sp_3 (=100) e sp_4 (=100). O clado sp_MG agrupou somente indivíduos coletados no estado de Minas Gerais, cujas sequências foram obtidas do GenBank. O clado sp_3 agrupou os indivíduos denominados *Adelophryne* sp_3 além de recuperar dois exemplares cujas sequências foram obtidas do GenBank (*Adelophryne* sp_6 Voucher: MTR15919 e CFBH23672) os exemplares deste clado foram coletados na região de Igrapiúna, Una e Camacan.

O clado sp_4 agrupou os indivíduos denominados *Adelophryne* sp_4, além de incluir neste grupo os indivíduos identificados como *A. pachydactyla* (Voucher: MTR15919 e MTR16244) à qual correspondem os exemplares coletados nas regiões de Serra Azul, Serra do Mandin, Ilhéus, Arataca e Jussari. O terminal sp_TRC (sp_4_V_MTR13750) possui baixo suporte nas análises filogenéticas (=16), recuperado como grupo irmão do clado sp_4 e os indivíduos foram coletados na região de Trancoso.

Figura 4 - Reconstrução filogenética baseada na análise de Máxima parcimônia com valores de suporte "Jackknife" são indicados junto aos nós.



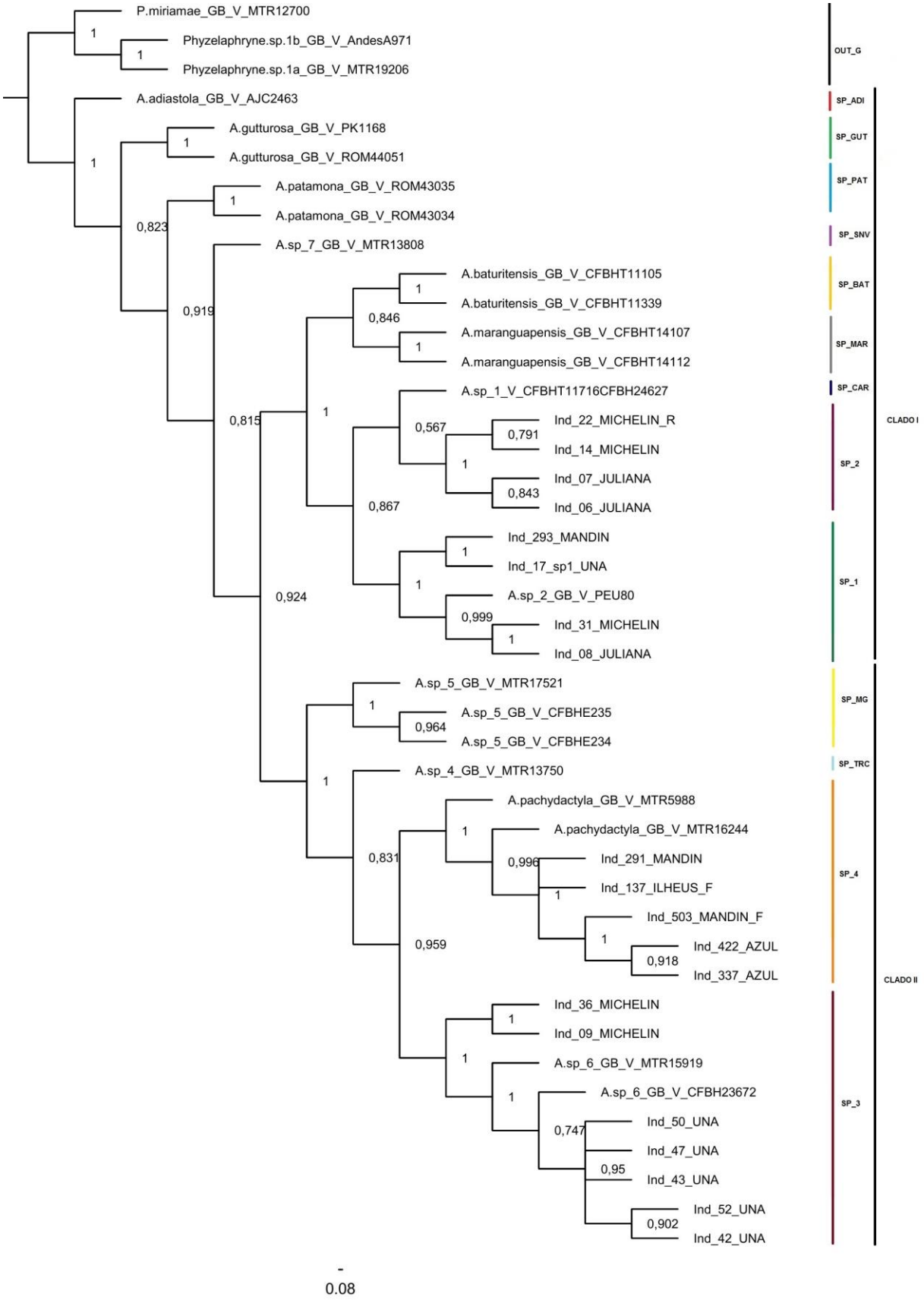
11.2 ANÁLISE BAYESIANA

A árvore gerada utilizando o método de análise Bayesiana (BY) está apresentada na Figura 5 e os valores de probabilidade posterior estão apresentados nos nós. A árvore Bayesiana apresentou topologia similar à árvore gerada pela análise de MP. Dois grandes clados foram recuperados, AM, para a floresta Amazônia e dois Clados para a Floresta Atlântica (Clado I e Clado II), o clado AM recuperado como grupo irmão dos clados da Floresta Atlântica.

O clado I foi composto por quatro grupos com bom suporte. O grupo sp_MAR apresentou o valor de probabilidade posterior igual a 1, composto somente por amostras da espécie *A. maranguapensis.* O valor de probabilidade posterior do grupo sp_BAT foi igual a 1, correspondendo à espécie *A. baturitensis*. Os grupos sp_1 e sp_2 apresentaram o valor de probabilidade posterior igual a 1. O clado sp_CAR apresentou um valor de probabilidade posterior baixo, igual a 0,56. Este clado foi recuperado como grupo irmão de sp_2.

O clado II apresentou três grupos com bom suporte, o clado sp_MG como grupo irmão de todos os clados do sul da Bahia com probabilidade posterior igual a 1. O clado sp_TRC não apresentou um bom valor de probabilidade posterior (0,83), entretanto foi recuperado como grupo irmão do clado sp_4 e sp_3.

Figura 5 - Reconstrução filogenética baseada na análise Bayesiana com valores de probabilidade posterior indicados junto aos nós.



12 DISTÂNCIA GENÉTICA

As distâncias genéticas são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – P-Distância interespecífica entre as populações do Gênero *Adelophryne*.

outgroup													
sp_ADI	0,203												
sp_GUT	0,202	0,129											
sp_PAT	0,212	0,133	0,116										
sp_SNV	0,253	0,185	0,189	0,157									
sp_BAT	0,236	0,209	0,221	0,185	0,221								
sp_MAR	0,274	0,241	0,233	0,189	0,225	0,157							
sp_CAR	0,252	0,209	0,217	0,189	0,217	0,137	0,145						
sp_2	0,253	0,200	0,208	0,176	0,224	0,118	0,152	0,091					
sp_1	0,240	0,214	0,198	0,190	0,248	0,165	0,198	0,163	0,136				
sp_MG	0,275	0,206	0,205	0,173	0,177	0,238	0,209	0,181	0,208	0,237			
sp_4	0,247	0,188	0,182	0,159	0,189	0,235	0,201	0,234	0,212	0,228	0,160		
sp_TRC	0,254	0,205	0,185	0,173	0,165	0,205	0,225	0,185	0,174	0,202	0,146	0,139	
sp_3	0,244	0,189	0,205	0,160	0,173	0,198	0,203	0,181	0,181	0,226	0,150	0,137	0,121

Os espécimes identificados como sp_1 possuem distância interespecífica de 13,6% em comparação aos espécimes sp_2. A presença da membrana timpânica é uma diagnose para os indivíduos sp_1 e o IV dedo da mão com duas falanges é uma característica compartilhada entre os dois espécimes (Fig. 3). A distribuição geográfica dos espécimes sp_1 é ampla, ocorrendo nas regiões de Una, Wenceslau Guimarães, serra do Mandin e Igrapiúna (Reserva Michelin e RPPN Nova Angélica) onde ocorre em simpatria com os espécimes sp_2, os quais são restritos à região de Igrapiúna.

Os espécimes sp_3 e sp_4 possuem uma distância interespecífica de 15%, podendo ser considerados linhagens distintas, entretanto não existe diferenciação morfológica, dificultando a separação baseada somente em caracteres morfológicos. Porém, há uma distância geográfica acentuada entre eles, os espécimes identificados como sp_3 ocorrem na região de Igrapiúna, Una, Serra Bonita, além das análises recuperaram dois indivíduos do GenBank (sp_6_CFBH23672 de Una e sp.6_MTR15919 de Camacan). Os espécimes sp_4 ocorrem na região de Itamaratin e Ilhéus, além das análises terem recuperado dois indivíduos do GenBank identificados como *Adelophryne pachydactyla* (Voucher: MRT5988 da Serra das lontras e MTR 16244, Serra do Teimoso) que ocorrem em Arataca e Jussari respectivamente, uma região geográfica diferente daquela dos espécimes sp_3.

13 Adelophryne pachydactyla

Duas sequências obtidas no GenBank são identificadas como *A. pachydactyla* (Voucher: MRT5988 da Serra das lontras e MTR 16244, Serra do Teimoso, ambas no estado da Bahia). Entretanto, os resultados apresentados no presente estudo não sustentam a identificação dos espécimes como *A. pachydactyla*, pois estes espécimes foram recuperados nas análises (MP e BY) no Clado dos indivíduos identificados como sp_4 que não possuem características morfológicas compartilhadas com a espécie *A. pachydactyla* de acordo com sua descrição original.

Os espécimes sp_4 possuem como característica três falanges no quarto dedo, e sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo nas regiões de Una, Wenceslau Guimarães, Serra do Mandin e Igrapiúna (Reserva Michelin e RPPN Nova Angélica) o que difere da distribuição da espécie *A. pachydactyla*.

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que os espécimes sp_1 apresentam características morfológicas que os associam à espécie *A. pachydactyla*, de acordo com a descrição feita por HOOGMOED et al. (1994) que são: comprimento rostro-clocal de 11,1mm; quarto dedo das mãos reduzido – 2 falanges (Dedo da mão II maior que o dedo IV); pontas dos dedos sem discos ou com as pontas assimétricas e pontiagudas.

Além disso, nos resultados apresentados nas análises filogenéticas (Fig. 4 e 5), os indivíduos *Adelophryne* sp_2_V_PEU80 de sequências obtidas do GenBank foram agrupados com espécimes sp_1 com alto suporte (BY=99 MP=100). Assim, de acordo com as características apresentadas nas análises filogenéticas (Figs. 4 e 5) e morfológicas iguais àquelas relatadas na descrição da espécie (Fig. 3), consideramos aqui a linhagem denominada sp_1 como a espécie *A. pachydactyla*.

14 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo utilizando dados moleculares integrados com morfologia para caracterizar e delimitar espécies no gênero *Adelophryne*, além de auxiliar a delimitação correta da espécie *Adelopryne pachydactyla*.As árvores geradas em ambas análises filogenéticas (MP e BY) apresentaram topologia semelhante com dois grandes grupos com bom suporte para a Floresta Atlântica. Os caracteres morfológicos e dados moleculares indicam que há pelo menos quatro linhagens para a Floresta Atlântica da Bahia.

O presente estudo apresenta informações adicionais àquelas publicadas por FOUQUET et al. (2012), principalmente pela integração de dados morfológicos e moleculares possibilitando uma melhor denominação das espécies para o gênero. FOUQUET et al. (2012) separaram as espécies do gênero para Floresta Atlântica entre Norte e Sul, o que não foi recuperado na presente análise. Além disso, os autores não deixaram claro como cada linhagem foi identificada e a atribuição dos nomes aos terminais, afirmando que a ausência dos caracteres morfológicos interferiu diretamente nos resultados apresentados, confirmando que a denominação de algumas linhagens foi prematura. Nossos resultados mostram que o uso dos dados integrados aumentou a confiabilidade do parentesco entre as linhagens da Floresta Atlântica, além de confirmar que as espécies da Floresta Amazônica são um grupo irmão da Floresta Atlântica conforme apresentado por FOUQUET et al. (2012).

Nas análises de MP e BY, os espécimes identificados como sp_CAR (voucher CFBH 11716 – Caruaru-PE) agruparam-se no clado I, entretanto esse agrupamento não possui um bom suporte, além de ser recuperado como grupo irmão do clado sp_2 (distância genética 9,1%) resultado que pode ser considerado prematuro devido à ausência de alguns dados para os espécimes, assim para entender melhor os resultados aqui apresentados serão necessárias novas análises (FOUQUET et al. 2012).

Os dois grupos da Floresta Atlântica da Bahia possuem suporte elevado nas análises filogenéticas, mostrando que as diferenças morfológicas são baixas porém bastante significativas na delimitação das espécies. Os espécimes sp_2 foram identificados por não apresentarem membrana e anel timpânico, duas falanges, no

IV dedo das mãos (Fig. 3), característica compartilhada com o clado sp_1 e ocorrem na região de Igrapiúna.

Os clados II da Floresta Atlântica possuem poucas diferenças morfológicas, entretanto, os dados moleculares apresentam alta diferenciação o que possibilita a separação das linhagens. Os espécimes sp_MG e sp_TRC, cujas sequências foram obtidas do GenBank, apresentaram distância genética acima de 10%, o que indicaria serem linhagens distintas com base nos resultados apresentados nas análises filogenéticas (BY e MP). Entretanto, para delimitação destas linhagens será necessário um maior esforço amostral, pois não foi possível a comparação destes indivíduos morfologicamente.

Os espécimes sp_3 e sp_4 possuem poucas diferenças morfológicas, entretanto devido à distância genética de 15% apresentada e os resultados das análises filogenéticas poderiam ser considerados como linhagens distintas, uma vez que o valor mínimo de distância genética para que sejam consideradas como espécies distintas para anfíbios em estudos com o gene 16s seria de 5% (VENCE et al., 2005).

O clado sp_3, incluindo dois indivíduos do GenBank (sp_6_CFBH23672 e sp_6_MTR15919), pode ser considerado como da linhagem de *A. mucronatus*, devido a algumas características morfológicas como: comprimento rostro-cloacal de 13 mm em média, tímpano visível, dedo I das mãos mais curto que o dedo II, e dedo IV dedo com três falanges de acordo com LOURENÇO-DE-MORAES et al. (2012).

Os espécimes sp_3 ocorrem em sua maioria na região de Una que é a localidade-tipo das espécies. O presente estudo indicou uma ampliação na distribuição geográfica desta linhagem que foi registrada na região de Igrapiúna (Reserva Michelin) e Serra Azul. Uma característica morfológica de *A. mucronatus* é a presença de um “flap” anal, com o material em mãos não fomos capazes de verificar tal característica, situação que possivelmente ocorreu devido à retirada do tecido (remoção de uma das pernas) que pode ter danificado a estrutura.

O clado sp_4 agrupou dois indivíduos do GenBank identificados como *A. pachydactyla* (Voucher: MRT5988 e MTR 16244) provenientes da Serra das Lontras e Serra do Teimoso respectivamente, ambas no estado da Bahia (FOUQUET et al., 2012). No entanto, os autores não deixam claro a metodologia empregada para identificação de cada espécime a nível específico. No presente estudo não recuperamos os resultados apresentados por Fouquet et al. (2012). De acordo com

as características morfológicas e moleculares aqui levantadas, o clado sp_1 é a linhagem que correspondente à espécie *A. pachydactyla*, além disso, a linhagem sp_1 apresenta uma distância genética significativa de 22,4% em comparação à espécie *A. pachydactyla* definida por FOUQUET et al. (2012).

As características morfológicas dos espécimes sp_4 é possuírem três falanges no quarto dedo das mãos, o que é diferente da descrição da espécie, pois de acordo HOOGMOED et al. (1994) indivíduos de *A. pachydactyla* possuem na verdade duas falanges no quarto dedo das mãos. Assim, dentro do limite utilizado em 5% pela P-Distância e as diferenças morfológicas, atribuímos aqui que são duas espécies diferentes daquelas determinadas por FOUQUET et al. (2012).

Encontrar caracteres diagnósticos para o gênero *Adelophryne* é a maior dificuldade em estudos taxonômicos no grupo (e.g. MACCULLOCH et al., 2008; HOOGMOED et al., 1984 e SANTANA et al., 2012) e o uso da taxonomia integrativa, como proposto em diferentes trabalhos (e.g. DAYRAT, 2005; WILL et al., 2005; PADIAL e DE LA RIVA, 2009, 2010), mostrou-se eficaz na separação e confirmação das espécies para o gênero, além de possibilitar a atribuição com segurança do nome *A. pachydactyla* à uma linhagem.

15 CONCLUSÃO

Os resultados revelam a importância de estudos integrativos para a correta delimitação de espécies. Os dados moleculares obtidos através do sequenciamento da região 16S apresentam informações filogenéticas suficientes entender a filogenia do gênero. Estes dados em conjunto com os registros na literatura (FOUQUET et al., 2012) e características morfológicas possibilitaram a delimitação de algumas linhagens dentro do gênero *Adelophryne*.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível a delimitação da espécie *A. pachydactyla* ao clado sp_1 devido às características apresentadas estarem de acordo com a diagnose da espécie (HOOGMOED et al., 1994) além deste novo registro expandir a sua distribuição geográfica para as regiões de Una, Serra do Mandin e Igrapiúna.

Estudos moleculares adicionais incluindo um número maior de indivíduos e de genes analisados aliados a estudos morfológicos, morfométricos e comportamentais (e.g. canto) com uma abordagem integrativa serão interessantes uma vez que o número de espécies, riqueza, e diversidade dentro do gênero ainda são subestimados.

16 REFERÊNCIAS

ANDRADE-LIMA, D.; ROCHA, M. G. Observações preliminares sobre a Mata do Buraquinho, João Pessoa, Paraíba. **Anais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1** (1): 47-61.1971.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v25, p. 3389-3402, 1997.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALE, R. M.; BERMINGHAMF, E.; LAMP, T.; NEIGELL, E. J.; REEBL, A. C.; SAUNDERSL, N. C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489–522, 1987.

AUSTIN, J. D.; LOUGHEED, S. C.; TANNER, A. A.; CHEK, A. A.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T.. A molecular perspective on the evolutionary af nities of an enigmatic neotropical frog,. **Society**, p. 335–346, 2002.

BARNOSKY, A.D., MATZKE, N., TOMIYA, S., WOGAN, G.O., SWARTZ, B.,QUENTAL, T.B., MARSHALL, C., MCGUIRE, J.L., LINDSEY, E.L., MAGUIRE, K.C., MERSEY, B., FERRER, E.A., Has the earth's sixth mass extinction already arrived, **Nature**, v. 471, n 7336, p 51–57, 2011.

BECKER, C. G. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1775–1777, 2007.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, 1979.

BRUNES, T.O; ALEANDRINO, J. D, ZINA J. HADDAD C.F.B; SIQUEIRA. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). **Royal Swedish Academy of Sciences**, 43, 6, November 2014, pp 586–604, 2014.

CAREY, C.; HEYER, W.R.; WILKINSON,J.; ALFORD, R.A.; ARNTZEN, J.W.; HALLIDAY, T.; HUNGERFORD, L.; LIPS, K.R.; MIDDLETON, E.M.; ORCHARD, S.A.; RAND, A.S. Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. **Conservation Biology,** 15 (4): 903–913. 2001.

DARST, C. R.; CANNATELLA, D. C. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 462–475, 2004.

DAYRAT, B., Towards integrative taxonomy. **Biol. J. Linn. Soc**.v 85, p 407–415, 2005.

DUELLMAN, W. E. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American Tropics. **Ann. MO Bot. Gard**. 75: 79-104, 1988.

ELMER, K.R.; DÁVILA, J.A.; LOUGHEED, S.C. Crypitic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaflitter frog, Eleutherodactylus ockendeni. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 247- 260. 2007.

ELMER, K. R.; CANNATELLA, D. C. diversity within Pristimantis " ockendeni " (Anura : Strabomantidae) in Ecuador. **Zootaxa**, v. 1784, p. 11–38, 2008.

FARIS, J. S.; ALBERT, V. A.; KÄLLERSJÖ, M; LIPSCOMB, D. & KLUGE, A. G. – Parsimony Jackknifing outperforms Neighbor-Joining. **Cladistics**. V.12. N.2. P. 99—124. 1996.

FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.D.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the Scinax ruber and Rhinella margaritifera species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 43: 567-582. 2007.

FOUQUET, A., D. LOEBMANN, S. CASTROVIEJO-FISHER, J. M. PADIAL, V. G. D. ORRICO, M. L. LYRA, I. J. ROBERTO, P. J. R. KOK, C. F. B. HADDAD & M. T. RODRIGUES., 2012. From Amazonia to the Atlantic Forest: molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. **Mol. Phylogenetics And Evolution**, v 65, p 547-561, 2012.

FROST, D.R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C.F.B., DE SA, R.O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S.C., RAXWORTHY, C.J., CAMPBELL, J.A., BLOTTO, B.L., MOLER, P., DREWES, R.C., NUSSBAUM, R.A., LYNCH, J.D., GREEN, D.M.,WHEELER, W.C., The amphibian tree of life. **Bull. Am. Mus. Natl. Hist**. v 297, p 8–370, 2006.

FROST, DARREL R. 2017. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0, ultimo acesso em 15 de Fevereiro 2017. Electronic Database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. **American Museum of Natural History**, New York, USA. 2017.

GALINDO-LEAL, CÂMARA, I. G., The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. **Center for Applied Biodiversity Science and Island Press,** p.3-11, Washington, USA, 2003.

GENTRY, A.H. Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. **Oikos**, 63: 19-28. 1992.

GEHARA, M., CANEDO, C., HADDAD, C.F.B. & VENCES, M. From widespread to microendemic, molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia, Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. **Conservation Genetics**, 14, 973–982, 2013.

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

GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S. & NIXON, K. C. - TNT (Tree analysis using New Technology) ver. 1.1 Tucumán, Argentina. 2000.

GRAZZIOTIN F. G, MONZEL M, ECHEVERRIGARAY S, BONATTO S. L. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Mol Ecol**, 15(13), 3969-3982, 2006.

GRAYBEAL, A. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. **Zoological Journal of the Linnean Society,** p. 297–338, 1997.

GUAYASAMIN, J.M., CASTROVIEJO-FISHER, S., TRUEB, L., AYARZAGUENA, J., RADA, M., VILA, C., Phylogenetic systematics of Glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon Allophryne ruthveni. **Zootaxa**, v 2100, p 1–97. 2009.

GUINDON, S. & O. GASCUEL. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. – **Systematic Biology,** V: 52: P: 696–704, 2003.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser**., v. 41, p. 95-98, 1999.

HEBERT P. D. N., CYWINSKA A., BALL S. L. E WAARD J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **The Royal Society**, Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321, 2003.

HEDGES, S. B.; NUSSBAUM, R. A.; MAXSON, L. R. Caecilian phylogeny and biogeography inferred from mitochondrial dna sequences of the 12s rRNA and 16s rRNA genes (amphibia : gymnophiona). **Herpetological Monograph**, p. 64–76, 1993.

HEDGES, S. B., W. E. DUELLMAN & M. P. HEINICKE., New World directdeveloping frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. – **Zootaxa**, v. 1737, p 1–182, 2008.

HEDGES, SB, WE DUELLMAN E MP HEINICKE. New world direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phy- logeny, classification, biogeography, and conservation. **Zootaxa** 1737: 1-182. 2008.

HEYER, W. R. Taxonomic notes on frogs from the Madeira and Purus rivers, Brasil. **Papeis Avulsos de Zoologia**. São Paulo 31: 141–162. 1977.

HOOGMOED, M. S., AND J. LESCURE. A new genus and two new species of minute leptodactylid frogs from northern South America, with comments upon Phyzelaphryne (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Zoologische Mededelingen. Leiden** 58: 85–115. 1984.

HOOGMOED, M. S., D. M. BORGES, AND P. CASCON. Three new species of the genus Adelophryne(Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. **Zoologische Mededelingen. Leiden** 68: 271–300. 1994.

LAURANCE, W. F., Conserving the hottest of the hotspots. **Biol.Conserv**, v. 142, n. 1137, 2009.

LOUGHEED, S.C.; AUSTIN, J.D.; BOGART, J.P.; BOAG, P.T.; CHEK, A.A. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. **BMC Evolutionary Biology**, 6:23-38. 2006.

LOURENÇO-DE-MORAES, R., SOLÉ, M. & TOLEDO, L.F., A new species of Adelophryne Hoogmoed & Lescure 1984 (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v 3946, p 348-360, 2012.

LOURENÇO-DE-MORAES, R., FERREIRA, R.F., FOUQUET, A., & BASTOS, R. P. A new diminutive frog species of Adelophryne (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v 344, p 59– 68, 2014.

LÖTTERS, S.; SCHMITZ, A. Another Case Of Cryptic Diversity In Poison Frogs (Dendrobatidae : Ameerega) — Description Of A New Species From Bolivia. **Zootaxa**, v. ISSN 1175-, n. March, p. 20–30, 2009.

LUTZ, B. Anfibios anuros do Distrito Federal/The frogs of the Federal District of Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **Rio de Janeiro** 52: 155–197. 1954.

MACCULLOCH, R.D., LATHROP, A., KOK, P.J.R., MINTER, L.R., KHAN, S.Z., BARRIO-AMORÓS, C.L., A new species of Adelophryne (Anura: Eleutherodactylidae) from Guyana, with additional data on A. gutturosa. **Zootaxa**. V 1884, p 36–50, 2008.

MADDISON, W. P. & MADDISON, D. R.- Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>. 2011.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. **Evolution**, v:49, P: 718–726, 1995.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER,C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

PADIAL, J.M; MIRALLES A.; LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, p. 16, 2010.

PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. **Zootaxa**, v.3825, p. 001-132, 2014.

PALUMBI S. R.; MARTIN A; ROMANO S.; MCMILLAN W. O.; STICE L.; GRABOWSKI G. THE Simple Fool's Guide to PCR, Version 2. **University of Hawaii Zoology Departmen**t, Honolulu, 1991.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. – **Molecular Biology and Evolution,** V: 25: P: 1253–1256, 2008.

PURVIS, A., HECTOR, A., Getting the measure of biodiversity. **Nature,** 405 (6783),212–219, 2000.

QUEIROZ, K. DE. Different species problems and their resolution. **BioEssays**, p. 1263–1269, 2005.

RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F.J. & HIROTA, M.M., The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for Conservation. **Biological Conservation**, v 142, p 1141–1153, 2009.

RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. V. D. MARK, D. AYRES, A. DARLING, S. HOHNA, B. LARGET, L. LIU, M. A. SUCHARD & J. P. HUELSENBECK. MrBayes 3.2: eficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. – **Systematic Biology**, V: 61, P: 539–542, 2012.

ROE, A. D.; SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 325–345, 2007.

RUBINOFF, D. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. **Conservation Biology,** v. 20, n. 4, p. 1026–1033, 2006.

SANTANA, D., J., FONSECA, E., M., NEVES, M., O., & CARVALHO, R., M., H., A new species of Adelophryne (Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil, **SALAMANDRA** , v. 48, n. 4, P. 187-192, 2012.

SCHLICK-STEINER, B. C. ; STEINER, F.M; SEIFERT, B; STAUFFER C; CHRISTIAN, E; CROZIER R. H. Integrative Taxonomy : A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. **Annu. Rev. Entomol**. 55:421–38, 2010.

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

STUART, S. N., J. S. CHANSON, N. A. COX, B. E. YOUNG, A. S. L. RODRIGUES, D. L. FISCHMAN, AND R. W. WALLER. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science,** v: 306, p: 1783–1786, 2004.

TABARELLI, Marcelo; PINTO, Luiz Paulo; SILVA, José Maria C.; HIROTA, Márcia M.; BEDÊ, Lúcio C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. Belo Horizonte, v. 1, n. 1, 2005.

TAMURA, K.; STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, & KUMAR S. - MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, n.30. P. 2725—2729. 2013.

THOMAS W. W; CARVALHO A. M. V; AMORIM A. M. A. J; ALBE, GARRISON LÁEZ AL. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservat**ion 7: 311–322. 1998.

THOMÉ, M. T.C; ZAMUDIO, K. R; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–1031, 2010.

VENCES, M.; THOMAS, M.; van der MEIJDEN, A.; CHIARI, Y. & VIEITES, D. R. – Comparative performace of the 16s rRNA gene in DNA barcoding of amphibian. **Frontiers in Zoology**. N.2, V.5, 2005.

VENCES M, GUAYASAMIN JM, MIRALLES A, DE LA RIVA I. To name or not to name: Criteria to promote economy of change in Linnaean classification schemes. **Zootaxa**, v. 3636, n. 2, p. 201–244, 2013.

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

WIENS, JOHN, J AND PENKROT, A. T. Delimiting Species Using DNA and Morphological Variation and Discordant Species Limits in Spiny Lizards (*Sceloporus*). **Syst. Biol**, v. 51, n. 1, p. 69–91, 2002.

17 APÊNDICE 1 – Todas as árvores geradas na análise filogenética, pelo programa TNT 1.1.

Figura 6 - Árvore mais parcimoniosa um.

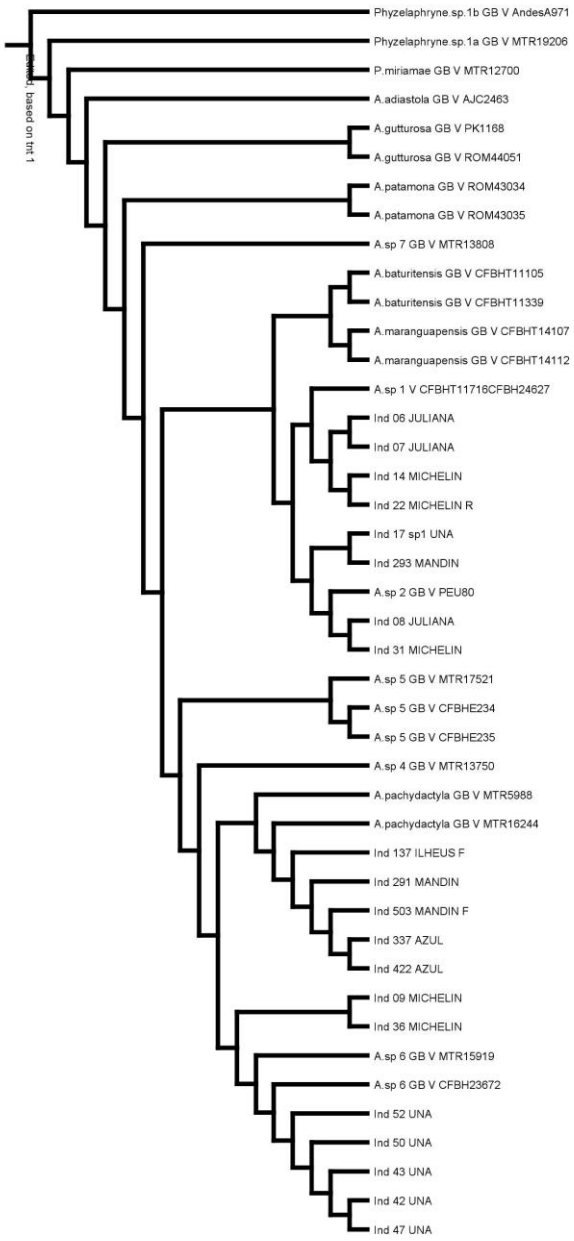


Figura 7 - Árvore mais parcimoniosa dois**.**

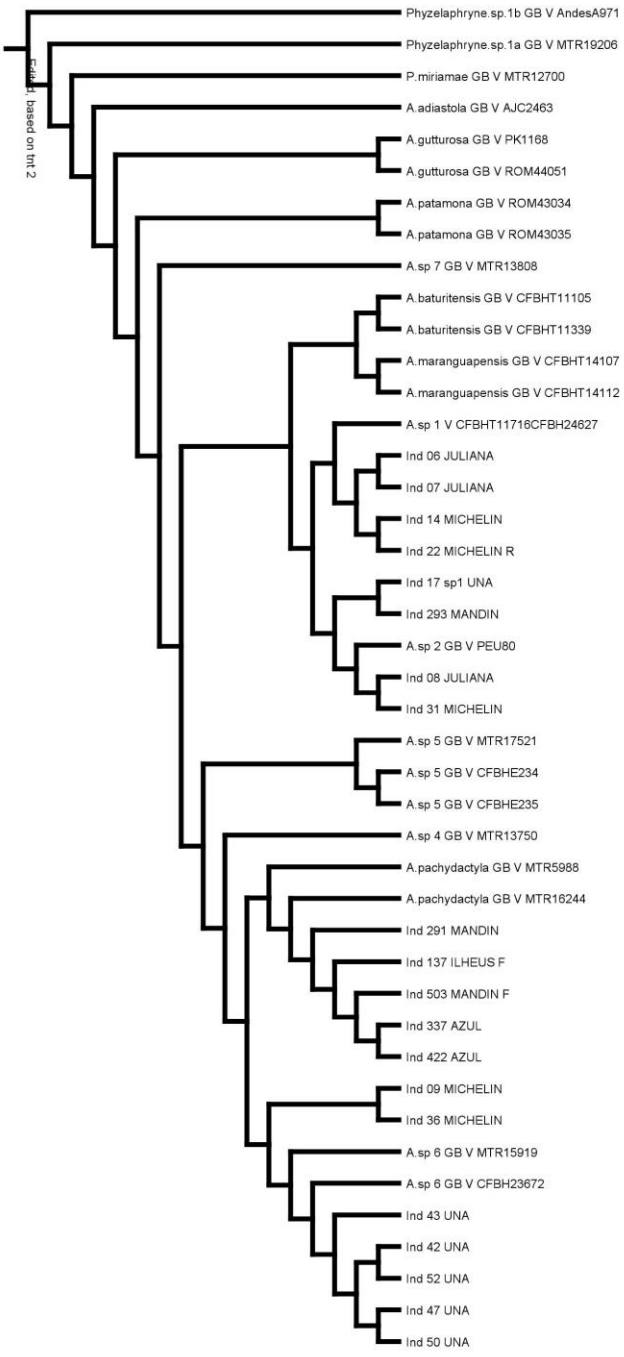
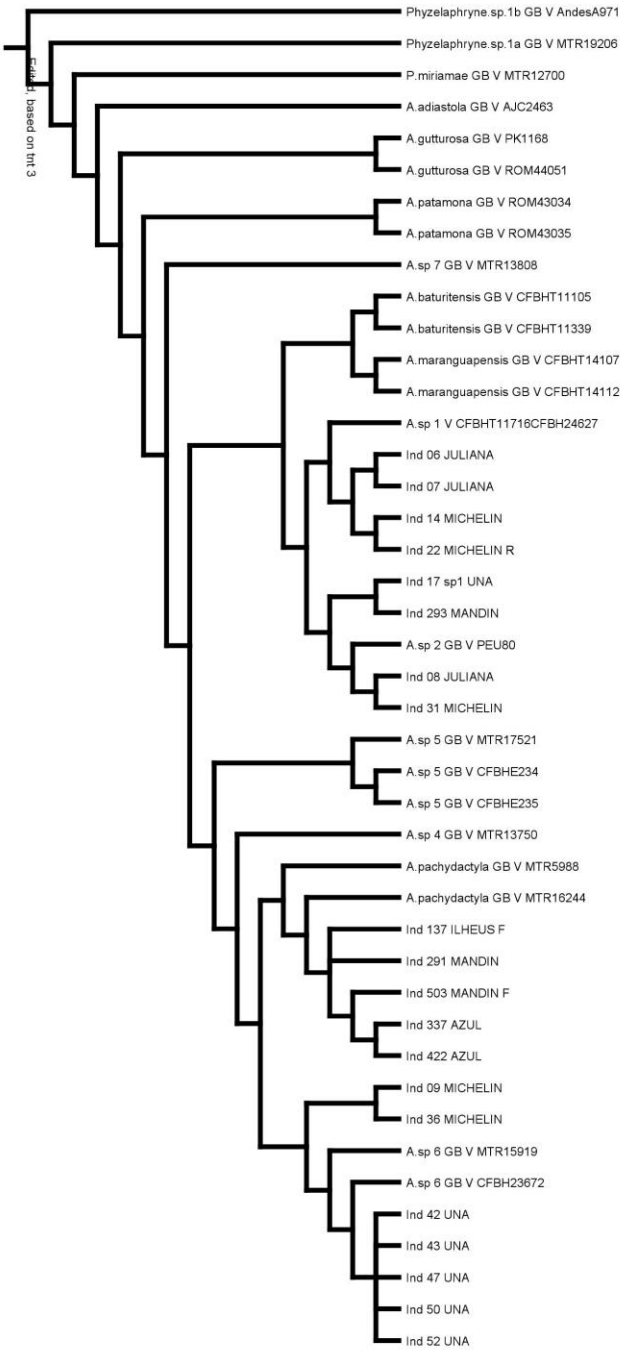



Figura 8 – Consenso estrito entre as duas árvores mais parcimoniosas.