

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografia de *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937)

Paulo Victor Scherrer de Araújo

Vitória, ES

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografia de *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937)

Paulo Victor Scherrer de Araújo

Orientadora: Leonora Pires Costa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal

Vitória, ES
Agosto, 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha esposa, Rebecca Pereira Cruz, por todo amor, carinho e apoio emocional durante esse processo. Você foi muito mais do que esposa, foi também assistente de laboratório, parceira de campo e revisora. Dedico essa conquista a você.

A meus pais, meu irmão e minha cunhada por toda motivação e apoio. Vocês são meus principais professores e dedico não só essa, mas todas as conquistas a tudo que investiram em mim.

A minha orientadora Leonora Pires Costa por mais uma vez ter aceitado orientar um projeto com animais de pele lisa. Sua ajuda foi fundamental para minha formação como biólogo e agora, como mestre em biologia animal. Obrigado por todo apoio e pela confiança depositada em mim.

Um agradecimento especial a Eduardo Loyola Muhl, meu grande parceiro desde os tempos de graduação, sempre disposto a ajudar, ser ajudado e virar madrugadas trabalhando. Precisamos dormir mais.

J. F. R. Tonini, C. S. Lima, J. Justino e E. L. Muhl pelos ensinamentos das técnicas laboratoriais. Agradeço também a todos os colegas do Núcleo de Genética aplicada à Conservação da Biodiversidade, UFES, por me socorrerem em diversos momentos durante esses anos de convivência. Eu nunca conseguiria gerar uma sequência de DNA sem a ajuda de vocês.

Aos companheiros LaMabianos (Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia – UFES) por todos os momentos de debate, discussão e descontração que tornam o dia-a-dia de trabalho muito mais agradável. Trabalhar ao lado de vocês é uma honra e esse trabalho contou com a contribuição de cada um de vocês.

Konrad Radzikowski pelo companherismo nos campos e toda parceria durante o período que estive no Brasil. Danke Schön!

A. Lima, A. Garda, R. Ávila, M. Napoli, M. Trefaut, D. Santana e C. Haddad, demais curadores e técnicos em curadoria pela doação de alíquotas de tecidos para a realização das análises moleculares. A. Fouquet, D. Massemin e R. Ernst por toda ajuda em relação aos Pipidae.

Aos professores do PPGBAN por todos os ensinamentos e trocas de ideias. Vocês são todos grande inspiração na minha vida profissional.

Aos professores componentes da banca pela disponibilidade de avaliar e contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelos recursos aplicados ao Núcleo de Genética Aplicado à Conservação da Biodiversidade. À FAPES e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Por fim, a todos os demais envolvidos de alguma forma na minha vida profissional e acadêmica. Muito obrigado aos meus queridos alunos, aos funcionários da UFES e aos meus colegas do PPGBAN.

Resumo

Pipa carvalhoi (Anura: Pipidae) é um anfíbio aquático primitivo que se distribui ao longo das drenagens costeiras do leste do Brasil. Sua distribuição é marcada por uma disjunção superior a 500 km onde não existem registros da ocorrência do animal. Suas várias adaptações ao hábito de vida subaquático, que incluem a retenção de linha lateral, ausência de língua e alimentação por sucção sugerem baixa capacidade de dispersão por terra e consequentemente, alta estruturação genética entre suas populações. O objetivo do presente estudo foi, então, compreender os padrões de diversificação genética de *Pipa carvalhoi* ao longo de sua distribuição geográfica e a influência de seu hábito de vida nos processos históricos que moldaram sua diversidade. Foram sequenciados os marcadores mitocondriais 12S, 16S e NADH desidrogenase (ND2) assim como os marcadores nucleares Seventh in Absentia (SIA) e Tyrosinase (TYR) para 79 amostras de tecidos de *P. carvalhoi*, provenientes de grande parte de sua distribuição geográfica, além de outras duas espécies do gênero. Foi revelada uma forte estruturação genética associada a divisão das principais regiões hidrográficas. Sua diversificação data do Paleogeno e parece estar associada ao surgimento das principais drenagens costeiras do Brasil. A alta estruturação genética, a ausência de indícios recentes de fluxo gênico e a divergência profunda revelam diversidade críptica ao longo da distribuição de *Pipa carvalhoi*.

Palavras-chaves: Filogenética; Biogeografia; Anura; Mata Atlântica; Pipidae.

SUMÁRIO

Introdução	5
Objetivos	8
Objetivo Geral	8
Objetivos Específicos	9
Materiais e Métodos	9
Amostras Populacionais	9
Métodos Moleculares e Filogenéticos	10
Resultados	12
Discussão	17
Conclusões	29
Referências Bibliográficas	31
TABELAS	40
FIGURAS	45
APÊNDICES	56

1. Introdução

Estudos de genética molecular apontam que a diversidade de espécies reconhecidas está subestimada em grande parte dos animais e plantas (Oliver et al. 2013). Em anfíbios, essa subestimação é evidente, uma vez que nos últimos 20 anos, aproximadamente 3000 espécies foram descritas (Köhler et al. 2005; Glaw & Köhler, 1998; Köhler et al. 2005; AmphibiaWeb, 2016). Dessa forma, observa-se um aumento de mais de 35% no número absoluto de espécies, sendo este decorrente de dois fatores: i: acesso a regiões tropicais anteriormente não exploradas, aumentando o número de espécies endêmicas) e ii: abordagens teóricas associadas de novas metodologias, como a filogeografia e a bioacústica, que aliadas à taxonomia clássica, revelam a diversidade de espécies crípticas (Köhler et al. 2005; Fouquet et al. 2007).

Das 7528 espécies de anfíbios reconhecidas atualmente, 88% pertencem à Ordem Anura (AmphibiaWeb, 2016), distribuídas, principalmente, na região Neotropical (Köhler et al. 2005), na qual o Brasil possui o maior índice de riqueza de anuros em âmbito global, sendo 982 espécies registradas até o momento no total. Dessas, mais de 500 (Haddad et al. 2013) ocorrem na Mata Atlântica (MA), um dos biomas mais ameaçados do mundo em decorrência da ocupação humana. Dos seus mais de 1.300.000 km² de mata originais, a MA está hoje reduzida a menos de 8% de sua extensão, representada por pequenos fragmentos dispersos ao longo da costa brasileira e em Missiones, Argentina (Galindo-Leal & Câmara, 2005). Sua relevância ecológica, atrelada à ameaça de destruição que vem sofrendo, evidenciam a importância de se estudar os processos causadores dessa diversidade.

Estudos filogeográficos têm sido desenvolvidos, com a utilização de diferentes organismos como modelo, como anfíbios e mamíferos, na busca por padrões que buscam investigar a diversidade de espécies e os processos históricos ligados à

especiação neste bioma (e.g. Carnaval, 2002; Pellegrino et al., 2005; Grazziotin et al., 2006; Carnaval et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2009; Costa & Leite, 2012). Observa-se diferentes propostas para explicar a origem da alta diversidade de espécies encontrada na MA, como as hipótese dos refúgios pleistocênicos (Haffer, 1969; Carnaval et al. 2009), a hipótese de isolamento por rios (Wallace, 1952; Sick, 1967), hipótese dos gradientes ecológicos (Endler, 1982), hipótese paleogeográfica (Chapman, 1917; Bates, 2001) e, mais recentemente, hipótese da Mata Atlântida (Leite et al., 2016).

Apesar dos muitos esforços empregados na busca por um padrão geral que compreendesse toda a diversidade registrada na MA, os estudos indicam que espécies diferentes, mesmo aquelas com distribuição geográfica similar, podem ter sido influenciadas por processos históricos distintos (Batalha-Filho & Miyaki, 2011; Tonini et al. 2013). Sendo assim, para compreender corretamente o padrão filogeográfico de uma espécie, além dos aspectos ambientais associados, deve ser levado em conta também sua história natural, já que vários fatores como filopatria, capacidade de dispersão, competição com espécies próximas e presença de parasitas e patógenos podem influenciar diretamente na estruturação geográfica das populações (Martins & Domingues, 2011; Tonini et al. 2013). Em seus estudos sobre anfíbios amazônicos, Fouquet et al. 2007 menciona que espécies de anuros que são associadas a áreas abertas, como *Leptodactylus fuscus*, *Adenomera hylaedactyla* e *Scinax ruber*, bem como as que estão associadas a rios e grandes pântanos, como *Lithobates palmipes*, *Pipa pipa*, *Sphaenorhynchus lacteus*, *Hypsiboas ranipes* e *Dendropsophus nanus*, tendem a apresentar menor estruturação filogeográfica.

Os Pipidae são anuros primitivos altamente adaptados à vida aquática, que se distribuem ao longo da África subsaariana (gêneros *Xenopus*, *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus*) e América do Sul e Central (gênero *Pipa*). Adaptações para o hábito subaquático incluem retenção de linha lateral no adulto, ausência de língua,

alimentação por sucção, ausência de tímpano, ausência de cordas vocais e membranas interdigitais (Trueb & Cannatella, 1986; Tobias et al. 2011). Suas espécies habitam corpos d'água permanentes e temporários, bem como riachos lênticos e remanso de córregos, onde camuflam-se na lama e em folhas depositadas no substrato (Carvalho, 1937; Trueb & Cannatella, 1986). *Xenopus* corresponde ao gênero mais estudado da família, sendo também o mais diverso, com 29 espécies atualmente reconhecidas. Sabe-se que esses organismos apresentam uma alta capacidade de migração entre habitats, tanto entre rios diferentes, no período seco, quanto entre poços, no período úmido (Rödel, 2000).

Diferentes estudos apontam que, em espécies aquáticas, a estruturação genética pode ocorrer devido à separação geográfica entre bacias hidrográficas (Lovejoy & de Araujo 2000; Turner et al. 2004; Hubert et al. 2007; Sistrom et al. 2009; Cooke et al. 2009; Pearse et al. 2006). Em *Xenopus*, porém, observa-se que determinadas espécies possuem ampla distribuição, com alta conexão entre populações de diferentes bacias hidrográficas, sugerindo que a divisão entre bacias não deve ter sido o fator primordial na diversificação desse gênero (Evans et al. 2004; 2015; Furman et al. 2015). A separação das espécies *Xenopus* ocorreu em períodos anteriores ao Pleistoceno, com os processos de especiação relacionados a eventos aloploidia independentes, em que duas espécies se hibridizam e o zigoto é estabilizado pela duplicação cromossômica (Kobel, 1996; Evans et al. 2004; 2015).

Pipa é o gênero endêmico da região Neotropical, composto por sete espécies, seis das quais ocorrem ao longo e acima das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (*P. arrabali*, *P. aspera*, *P. myersi*, *P. parva*, *P. pipa* e *P. snethlageae*) e uma espécie (*P. carvalhoi*) com ocorrência na costa leste do Brasil, abrangendo os biomas da MA e Caatinga, com limite sul em Vitória, Espírito Santo (Silva et al. 2010; Santana et al. 2014). Dentre as características que distinguem o gênero *Pipa* dos demais Pipidae

africanos está o formato das pontas dos dedos e sua reprodução, em que os ovos são carregados nas costas da fêmea durante o desenvolvimento (Trueb & Cannatella, 1986; Azrabe, 1999; Canedo, 2006). *P. carvalhoi* pode ocupar ambientes relativamente impactados, sendo frequentemente encontrado em meios antropizados, incluindo lagos artificiais (Silva et al. 2010; Santana et al. 2014). Possui distribuição disjunta no leste do Brasil, com um primeiro agrupamento de populações no Nordeste (Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe), e um segundo ao longo do Sul da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (Silva et al. 2010; Santana et al. 2014).

Trabalhos sobre filogeografia de anfíbios na MA já levaram em conta espécies com diferentes modos de vida, como arborícolas (Carnaval et al., 2009; Tonini et al. 2013), terrestres (Thomé et al. 2010; Fouquet et al. 2012) e semi-fossoriais (Tonini et al., 2013). Porém, segundo Tonini et al. 2013, a diferença no modo de vida das espécies pode acarretar respostas diferenciadas aos eventos biogeográficos e paleoclimáticos comuns à área de distribuição.

Para *Pipa carvalhoi* há um desconhecimento das relações filogeográficas, dos processos históricos relacionados à sua distribuição e da influência de seu hábito de vida nos padrões de segregação das populações. Por tratar-se da única espécie subaquática dentro da diversidade de anuros que abarca sua distribuição, questiona-se se *P. carvalhoi* pode revelar padrões filogeográficos completamente distintos àqueles conhecidos para outras espécies de hábitos distintos. Dessa forma, objetivamos i: investigar a distribuição da diversidade genética de *P. carvalhoi* ao longo de sua distribuição geográfica; ii: compreender se há segregação entre as populações associadas à diferentes bacias hidrográficas.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo Geral:

Compreender os padrões de diversificação genética de *Pipa carvalhoi* ao longo de sua distribuição geográfica.

2.2. Objetivos Específicos:

- i. Mapear a diversidade genética e relação filogenética entre as diferentes populações de *P. carvalhoi*;
- ii. Avaliar e datar os processos históricos ligados a diversificação genética de *P. carvalhoi*;
- iii. Estudar a ligação entre *P. carvalhoi* e as espécies amazônicas de *Pipa*, além de reconstruir potenciais rotas de colonização da Mata Atlântica por esta espécie.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras Populacionais

Para as análises genéticas foram utilizados tecidos muscular e hepático, conservados em etanol 95%.. Parte do material foi obtido por doação das coleções “Célio Fernando Batista Haddad” (CFBH) da Universidade Federal de São Paulo (UNESP), Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CHBEZ), Coleção de Anfíbios e Répteis da Universidade Rural do Cariri (URCA-G), Coleção de Anfíbios da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônica (CHINPA), por amostras cedidas pelos pesquisadores Dr. Miguel Trefaut Rodrigues da Universidade de São Paulo (USP) e Dr. Diego José Santana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O restante das amostras foram coletadas durante este estudo nos municípios de Santa Teresa (ES), Santa Maria de Jetibá (ES), Colatina (ES), e em Poté (MG) (Figura 1). A captura dos

espécimes foi realizada por meio de busca ativa em corpos d'água, tanto temporários quanto permanentes, com auxílio de um puçá de pesca de malha fina. Os exemplares coletados foram eutanasiados em etanol 20% para retirada de tecido hepático, fixados em formalina 10% por 48 horas e transferidos para conservação em etanol 70%.

Foram obtidos um total de 79 amostras de tecido hepático ou muscular, sendo destas, 55 amostras de *Pipa carvalhoi* distribuídas ao longo de toda a distribuição geográfica conhecida para a espécie (Figura 1), além de 21 amostras de *P. pipa* e 2 amostras de *P. arrabali*. Adicionalmente, foram utilizadas sete amostras de outras espécies da família Pipidae, disponíveis no Genbank nas análises do marcador molecular 12S (Apêndice 1). A lista de amostras e suas respectivas localidades estão representadas na Tabela 1.

3.2 Métodos Moleculares e Filogeográficos

As amostras de tecido foram submetidas ao protocolo de extração com sal descrito por Bruford et al. (1992) e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para checagem do sucesso da extração de DNA.

Os marcadores mitocondriais NADH dehydrogenase 2 (ND2), 16S, 12S, e os nucleares Seventh in Absentia (SIA) e Tyrosinase (TYR) foram amplificados através da clonagem in vitro pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em um termociclador. Os *primers* utilizados e os perfis de PCR encontram-se na Tabela 2.

Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados com o kit BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems). As sequências foram obtidas por meio do sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) no Núcleo de Genética Aplicada à Biodiversidade da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES.

As sequências foram alinhadas pelo método MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) e, posteriormente, conferidas manualmente. O melhor modelo mutacional foi calculado para cada marcador molecular utilizado pelo software JModelTest (Posada, 2008). A partir das sequências alinhadas foram geradas árvores de afinidade filogenética pelos algoritmos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se, respectivamente, os softwares MEGA 6 (Tamura et al., 2013) e BEAST v1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Para cada algoritmo, 6 cladogramas foram gerados: um para cada marcador molecular individual e os demais para os cinco marcadores concatenados. Os valores para suporte dos clados da MV foi gerado por meio de 1000 replicações de *bootstrap*. Para a IB foi utilizado o algoritmo de integração de Monte Carlo via cadeias de Markov, percorrendo 10 milhões de gerações, com árvores amostradas a cada 1000 gerações, descartando-se as 1000 primeiras como *burn-in*. Como grupo externo utilizado para as análises filogenéticas foram alocados os táxons *Pseudopaludicola* sp., *Pipa pipa* e *P. arrabali*.

As distâncias genéticas foram geradas pelo software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P). Dados de dinâmica populacional foram estimados por meio de testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997), diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h). Foi testada a correlação entre distância genética e distância geográfica através do teste de Mantel pelo software Past 3.11 (Hammer et al. 2001). Para avaliar a conexão entre os haplótipos foram geradas redes de haplótipos pelo software PopArt (Bandelt et al., 1999).

O relógio molecular foi calculado de forma a estimar, em escala temporal, a separação das linhagens de *P. carvalhoi* e também da separação de *P. carvalhoi* das demais espécies de *Pipa*. Os tempos de divergência foram calculados a partir de duas diferentes matrizes de dados. A primeira matriz contava com seis espécies de Pipidae, incluindo três espécies de *Pipa* (*P. carvalhoi*, *P. parva* e *P. pipa*) e três espécies africanas

(*Hymenochirus* sp., *Silurana tropicalis* e *Xenopus borealis*). Tal matriz foi utilizada para calcular, a partir do marcador 12S, a origem do gênero *Pipa* e da separação entre as linhagens das três principais linhagens do gênero. A segunda matriz contou com os cinco marcadores concatenados, utilizando amostras de *P. carvalhoi* dos três clados recuperados pelas análises filogenéticas, além de *P. pipa* e *P. arrabali*. Em ambas as análises foi utilizado relógio molecular relaxado log-normal. O ponto de calibração foi, na primeira análise, baseado na hipótese de que a separação entre *Pipa* e os outros gêneros de Pipidae foi desencadeada pela quebra da supercontinente Gondwana, onde América do Sul e África eram terras contínuas, separando esses continentes. Diante disso, calibramos a base do gênero *Pipa* com uma distribuição normal a priori tendo média de 102 Ma e desvio padrão de 7 Ma.

O número de haplótipos (H) e de sítios polimórficos (S), testes de neutralidade (D de Tajima (1989); F_s de Fu (1997)) e índice de divergência genética (F_{st}) foram estimados por meio do software DnaSP v.5 (Librado e Rozas, 2009). A correlação entre distâncias genéticas e geográficas foi verificado por meio do Teste de Mantel implementado pelo software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

4. Resultados

Foram obtidas sequências de DNA mitocondrial de *Pipa carvalhoi* de 41 amostras para o marcador 12S, 50 amostras para o marcador 16S, 40 amostras para o marcador ND2, além de sequências de DNA nuclear de 54 amostras para o marcador SIA e 21 amostras para o marcador TYR. Foram obtidas, ainda, 18 sequências de *P. pipa* e duas de *P. arrabali* para cada um dos 5 marcadores genéticos, com exceção de ND2, em que não foi possível o sequenciamento de *P. arrabali* e somente 6 sequências de *P. pipa* foram obtidas com sucesso. No alinhamento, incluindo as três espécies de *Pipa*, as matrizes de dados apresentaram 329 pares de bases (pb) para 12S, 370 pb para 16S,

867 pb, para ND2, 376 pb para SIA e 300 pb para TYR. Os marcadores nucleares foram os mais conservados. Dentre eles, SIA apresentou apenas 4% de sítios variáveis (15 sítios) e TYR apresentou 11,3% de sítios variáveis (34 sítios). Quanto aos marcadores mitocondriais, uma maior porcentagem de sítios polimórficos foi recuperado, sendo eles de 29,5% para 16S (109 sítios), 45,5% para 12S (143 sítios) e 66,6% para ND2 (577 sítios).

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de bases significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O melhor modelo evolutivo selecionado para os conjuntos de dados foi HKY para SIA, HKY +G para 16S, HKY +I para 12S e TYR e GTR +G para ND2.

Pipa carvalhoi foi recuperado monofilético em todas as topologias com alto suporte, independente do algoritmo utilizado. O monofiletismo de *P. carvalhoi* foi recuperado também nas análises concatenadas com todos os marcadores. *P. pipa* e *P. arrabali* foram sempre mais próximas entre si quando comparadas a *P. carvalhoi* nas análises filogenéticas. Nas árvores de IB e MV para as matrizes de 12S, 16S e concatenadas, foi recuperado o monofiletismo das três espécies (Apêndice 2 a 5, 12 e 13). Para as matrizes de TYR e SIA, porém, *P. arrabali* e *P. pipa* formaram uma grande politomia, tanto na IB quanto na MV (Apêndice 8 a 11). A matriz de dados de ND2 não apresentou amostras de *P. arrabali*, portanto, nas árvores de IB e MV para este gene só foi recuperado o monofiletismo de *P. carvalhoi* e *P. pipa* (Apêndice 6 e 7). A matriz de 12S recuperou a espécie *P. parva* como grupo mais basal dentro do gênero *Pipa* (Figura 2).

Na árvore de espécies, assim como dentre as árvores de genes, para os marcadores mitocondriais (12S, 16S e ND2), *P. carvalhoi* está estruturado em três clados, nomeados aqui como Atlântico Sudeste, Atlântico Leste e Atlântico Nordeste (Figura 3), em referência às bacias hidrográficas nas quais estão concentrados a maior parte dos indivíduos agrupados. As amostras de Pernambuco, na região da Bacia do São Francisco

e de Minas Gerais, nas regiões das Bacias Atlântico Leste e Atlântico Sudeste, ficaram espalhadas pelos três clados. Os clados foram também separados com alto suporte nas árvores de genes concatenadas. Os marcadores nucleares (SIA e TYR), porém, recuperaram *P. carvalhoi* como uma grande politomia, sem evidenciar a divisão interna de grupos com alto suporte. Somente a árvore de IB da matriz de dados de SIA separou o clado Atlântico Nordeste das demais localidades de *P. carvalhoi* (Apêndice 8).

O clado Atlântico Sudeste reuniu amostras de todas as localidades do Espírito Santo, hidrograficamente localizadas na bacia Atlântico Sudeste, e as amostras de Poté, Minas Gerais, localizadas na bacia Atlântico Leste, porém, próximas à divisa com a bacia Atlântico Sudeste. Esse clado foi monofilético em todas as filogenias de genes mitocondriais e, também, de genes concatenados. As amostras do Espírito Santo sempre formaram subclado separado das amostras de Minas Gerais com alto suporte estatístico na IB e MV (Apêndice 2 a 7, 12 e 13).

O clado Atlântico Leste agrupou amostras de todas as localidades no estado da Bahia, localizados na bacia Atlântico Leste, as amostras de Ferros, Minas Gerais, localizada na bacia Atlântico Sudeste e Buíque, além das amostras de Pernambuco, localizada na bacia do São Francisco. Nas filogenias de ND2, as amostras de Pernambuco foram agrupadas em um clado à distinção dos demais, na base de *P. carvalhoi*, sem qualquer relação de monofiletismo com os representantes da bacia Atlântico Leste (Apêndice 6 e 7).

O clado Atlântico Nordeste agrupou as amostras do Ceará e Rio Grande do Norte, localizadas na bacia Atlântico Nordeste, além de amostras de Araçuaí, Minas Gerais, cidade localizada na bacia Atlântico Leste, na região do Vale do Jequitinhonha. Esse clado foi recuperado tanto nas filogenias de genes mitocondriais e concatenados, quando na IB para o marcador nuclear SIA. As amostras de Minas Gerais e Rio Grande do Norte

formaram um subclado separado das amostras do Ceará nas árvores de matriz de dados mitocondriais e concatenados.

As redes de haplótipos dos marcadores mitocondriais também recuperaram os três clados de *P. carvalhoi* (Figura 4, 5 e 6). As localidades de Minas Gerais estiveram representadas pelos três agrupamentos, sendo Araçuaí sempre mais próxima das amostras da Bacia Atlântico Nordeste, enquanto as amostras de Ferros sempre mais próximas das amostras da Bacia Atlântico Leste e a de Poté mais próxima das amostras da Bacia Atlântico Sudeste. Para a rede de haplótipos de SIA foram encontrados apenas dois haplótipos, um somente com as amostras do clado Atlântico Nordeste, e outro com as amostras dos clados Atlântico Leste e Atlântico Sudeste. Todos os indivíduos amostrados compartilham o mesmo haplótipo de TYR.

O clado com maior número de haplótipos foi sempre o Atlântico Leste (12 de 12S, 5 de 16S), onde poucas localidades diferentes compartilharam haplótipos únicos. No clado Atlântico Sudeste, a localidade de Poté, Minas Gerais, sempre segregou-se como haplótipo distinto das amostras das localidades do Espírito Santo, que, por sua vez, formou um haplótipo único de 12S e dois haplótipos diferentes de 16S. O clado Atlântico Nordeste formou três haplótipos tanto de 12S quanto de 16S, representados pelas duas localidades do Ceará, e um terceiro haplótipo reunindo amostras do Rio Grande do Norte e de Araçuaí, Minas Gerais. A rede de ND2 recuperou haplótipos únicos apenas dentro de mesmas localidades, porém, a maioria das amostras formaram haplótipos únicos.

Pipa carvalhoi apresentou alta divergência entre clados para os marcadores mitocondriais e seus haplótipos mais próximos estão separados por números de passos mutacionais semelhantes aos que separaram *P. arrabali* de *P. pipa* (Tabela 3). Os haplótipos de *P. carvalhoi* foram sempre separados dos haplótipos das espécies amazônicas por um alto número de passos mutacionais. *P. carvalhoi* apresentou sempre alta divergência genética em relação às espécies amazônicas *P. pipa* e *P. arrabali* (17% ±

3% no 12S; $16\% \pm 3\%$ no 16S; $54\% \pm 5\%$ no ND2; $3\% \pm 1\%$ no SIA; $10\% \pm 4\%$ no TYR). A divergência entre *P. pipa* e *P. arrabali*, porém, foi baixa para todos os marcadores ($6\% \pm 2\%$ no 12S; $3\% \pm 1\%$ no 16S; $>1\%$ em SIA e TYR). Considerando as divergências intraespecíficas, *P. carvalhoi* (5% no 12S; 3% no 16S; 19% no ND2) apresentou sempre valores maiores que *P. pipa* ($1,5\%$ no 12S; 2% no 16S; 5% no ND2) (Tabela 3). *Pipa. arrabali*, por apresentar apenas duas amostras, apresentou divergência sempre menor que 1% .

A divergência genética identificada entre os clados de *P. carvalhoi* foi alta para os marcadores mitocondriais, sempre maior ou igual a divergência entre *P. pipa* e *P. arrabali*. Para os marcadores nucleares, a divergência foi sempre menor que 1% , assim como a divergência entre as espécies amazônicas. O padrão de proximidade genética entre os diferentes clados, entretanto, variou entre os marcadores. Para 12S, o clado Atl.SE foi mais distante de seu clado vizinho Atl.E ($8\% \pm 2\%$) do que quando comparado ao clado Atl.NE ($7\% \pm 2\%$), e a menor divergência genética foi apresentada entre Atl.NE e Atl.E ($6\% \pm 1\%$). Já para os marcadores 16S e ND2, Atl.NE e Atl.E apresentaram a maior distância genética entre clados ($5\% \pm 1\%$ no 16S e $26\% \pm 3\%$ no ND2), enquanto as distâncias entre os clados Atl.NE e Atl.SE foi a mesma que entre Atl.SE e Atl.E ($4\% \pm 1\%$ no 16S e $23\% \pm 2\%$ no ND2). Em nenhuma das análises os clados Atl.NE e Atl.SE, que são mais distantes geograficamente, apresentaram a maior distância genética. As amostras de Pernambuco, que nas análises de ND2 formaram um clado bastante distinto dos demais, apresentaram uma alta divergência em relação aos clados predefinidos por este trabalho ($41\% \pm 4\%$ em relação a Atl.E e Atl.SE, e $46\% \pm 4\%$ em relação ao clado Atl.NE). Quanto às divergências internas de cada clado, Atl.E apresentou a maior divergência em 12S (2%), Atl.NE teve a maior divergência em 16S (2%) e Atl.SE foi o mais divergente em ND2 (6%) (Tabela 3). O teste de Mantel não recuperou relação entre distância genética e distância geográfica ($p=0,74$).

O relógio molecular calculado a partir das matrizes concatenadas datou o surgimento de *Pipa carvalhoi* durante o período Paleogeno entre 75,5 – 33,4 milhões de anos atrás e a divergência das linhagens de *P. pipa* e *P. arrabali* bem mais recente, no Mioceno, entre 16,5 – 4 milhões de anos atrás. Os três clados identificados para *P. carvalhoi* divergiram também durante o Mioceno, sendo que a primeira divisão que levou ao clado Atlântico Leste foi estimada entre 23,5 – 6,8 milhões de anos atrás, enquanto a segunda divisão, entre os clados Atlântico Sudeste e Atlântico Nordeste foi estimada entre 20,2 – 6,2 milhões de anos atrás. O relógio molecular calculado a partir da matriz de 12S datou o surgimento de *P. parva* entre 87,6 – 33,9 milhões de anos atrás e a divisão entre *P. carvalhoi* e *P. pipa* entre 77,2 – 24,8 milhões de anos atrás (Figura 7 e 8).

Grande parte dos valores encontrados nos testes de neutralidade não foram significativos (Tabela 4). Valores significativos indicando expansão populacional foram encontrados apenas para o clado Atlântico Sudeste, segundo o marcador 12S, tanto pelo teste D de Tajima quanto pelo F_s de Fu. Os valores de F_{st} indicaram diferenciação genética muito significativa ($F_{st} > 0,25$; Wright 1978, Hartl e Clark 1997) entre os clados de *Pipa carvalhoi* (Tabela 3). Os valores de diferenciação genética entre os clados de *P. carvalhoi* foram sempre próximos ou maiores do que os valores de diferenciação entre *P. pipa* e *P. arrabali*. De acordo com o marcador 12S, os maiores valores de F_{st} ocorreram entre os clados Atlântico Sudeste e Atlântico Nordeste (0,85), entre o Atlântico Leste e Atlântico Nordeste (0,93) segundo o marcador 16S e os identificados para o Atlântico Leste e Atlântico Sudeste pelo marcador ND2 (0,78).

5. Discussão

A relação evolutiva entre as três espécies de *Pipa* utilizadas no trabalho sustentam a proximidade não apenas geográfica mas também genética entre *P. pipa* e *P. arrabali*.

Os dados corroboram com a hipótese filogenética de Trueb e Cannatella (1986) que diz que *P. carvalhoi* teria surgido de um evento de vicariância que resultou em sua separação com o ancestral comum à linhagem que deu origem, posteriormente, a *P. arrabali* e *P. pipa*. Dados osteológicos descritos em Trueb e Cannatella (1986) e Cannatella e Trueb (1988), além da falta de estágio larval no desenvolvimento, também suportam a monofilia do grupo *P. arrabali* e *P. pipa*, juntamente com as espécies *P. aspera* e *P. snethlageae*, não incluídas nas análises do presente trabalho. A falta de modificações dérmicas bucais e o corpo pouco achatado, característica presente em *P. pipa* e *P. snethlageae*, traz grande semelhança externa entre *P. carvalhoi* e *P. Arrabali*, Porém, tal característica foi parafilética em todas as análises evolutivas realizadas pelo presente trabalho.

Nesse estudo, a distância genética entre *P. pipa* e *P. arrabali* nunca ultrapassou significativamente as divergências entre os clados internos a *P. carvalhoi*, e as amostras das duas espécies exibiram haplótipo único nas análises de DNA nuclear, que possui taxas evolutivas lentas em relação aos marcadores mitocondriais (Avice, 2000).

As análises de 12S, que incluíram *P. parva*, recuperaram a espécie como basal dentro do gênero, corroborando a hipótese filogenética de Trueb e Cannatella (1986) e Cannatella e Trueb (1988), que posiciona *P. parva*, juntamente com *P. myersi* como grupo basal dentro da evolução do gênero pela presença de 5 sinapomorfias compartilhadas com *Hymenochirus*, grupo-irmão de *Pipa*. O posicionamento do grupo *Pipa parva* como primitivo na evolução do gênero foi considerado possível de estar errada pelo próprio trabalho de Trueb e Cannatella (1986), devido à presença de características convergentes entre o grupo e *P. arrabali*, *P. snethlageae* e *P. pipa*. Os dados gerados pelo presente estudo suportam o posicionamento de *P. parva* como grupo basal dentro do gênero, assim como representado nas análises de Trueb e Cannatella (1986) e Cannatella e Trueb (1988).

Estudos sobre a sistemática e a relação de parentesco das espécies de *Pipa* são escassos e antigos. O primeiro estudo comparativo sobre o grupo foi feito por Noble (1925), onde o autor separa *Pipa* em dois gêneros com base no nível de achatamento dorso-ventral do corpo e presença de modificações dérmicas bucais: *Pipa*, que corresponderia às atuais *P. pipa* e *P. snethlageae*, e *Protopipa*, um gênero que agrupou as espécies *P. aspera* e *P. parva*, espécie pouco estudada até então. *Pipa carvalhoi* foi posteriormente descrita como *Protopipa carvalhoi* por Miranda-Ribeiro (1937a), nome utilizado também por Carvalho (1937). No mesmo ano, porém, Miranda-Ribeiro (1937b) descreveu o gênero *Hemipipa* para a inclusão de *P. carvalhoi*, baseado na presença de estágio larval. *Hemipipa carvalhoi* foi utilizado por uma série de autores nos anos que sucederam sua descrição (Carvalho, 1939; Myers & Carvalhoi, 1945; Paterson, 1955; Weigoldt, 1976). Dunn (1948) propôs a inclusão de todas as espécies em um único gênero *Pipa*, forma que foi suportada pelas análises filogenéticas posteriores (Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988; Trueb & Massemin, 2001).

Dunn (1948) caracterizou como difícil de organizar filogeneticamente as cinco espécies de *Pipa* descritas até o dado momento, mas descreveu *P. carvalhoi* como mais primitiva e *P. pipa* como mais especializada na maioria dos caracteres analisados, exceto pela especialização das pontas dos dedos, onde *P. parva* apresentava a forma mais primitiva. Trabalhos posteriores (Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988; Trueb & Massemin, 2001) suportam o grupo *P. parva* e *P. myersi* como basais ao gênero, e *P. arrabali*, *P. aspera*, *P. pipa* e *P. snethlageae* como grupo mais especializado dentro da filogenia (Figura 9).

O presente trabalho representa o primeiro estudo molecular utilizando mais de duas espécies de *Pipa* e, ainda, o primeiro estudo a visitar a relação de parentesco entre as espécies do gênero desde o trabalho de Trueb e Massemin (2001). Apesar de não incluírem amostras das espécies *P. aspera*, *P. myersi* e *P. snethlageae* na matriz de

dados analisada, o parentesco evolutivo das mesmas com, respectivamente, *P. arrabali*, *P. parva* e *P. pipa* tem alto suporte (Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988; Trueb & Massemin, 2001). Esse resultado corrobora a homologia do desenvolvimento direto dentro do gênero e posiciona essa característica como derivada dentro de sua história evolutiva, sendo presente apenas em *P. arrabali*, *P. aspera*, *P. pipa* e *P. snethlageae*. Características como presença de dentes maxilares são, porém, convergências entre *P. parva*, *P. pipa* e *P. snethlageae* e representam homoplasias da característica derivada (Trueb & Cannatella, 1986).

Não existem evidências plausíveis para o reconhecimento de *Hemipipa* e *Protopipa* como gêneros separados de *Pipa*. Os níveis de divergência encontrados entre as espécies são altos em relação aos encontrados em outras espécies de Anuros (Vences et al. 2005a; Vences et al. 2005b), porém, os altos níveis de divergência e o alto número de passos mutacionais na separação entre os haplogrupos de cada espécie podem ser fruto da separação muito antiga sofrida pelas principais linhagens dentro do gênero e o isolamento gerado pela separação das principais bacias hidrográficas que abrigam as espécies.

As relações filogenéticas entre as espécies de *Pipa*, bem como a divisão de haplótipos corroboram a hipótese biogeográfica de Trueb e Cannatella (1986) que sugere que o ancestral do gênero era, após a separação dos continentes Africano e Sul Americano, espalhado por toda América do Sul. Esse ancestral sofreu, subsequentemente, uma vicariância que o dividiu em duas espécies. A primeira delas restrita à região ao Noroeste da América do Sul, dando origem a *P. parva* e *P. myersi*, hoje restritas às regiões da bacia do rio Maracaibo, na Venezuela e no noroeste da Colômbia, respectivamente. A outra que ocupava a região hidrográfica dos rios Orinoco e Amazonas e ainda áreas do Sudeste e Nordeste do Brasil. Em seguida, um novo evento vicariante resultou em uma espécie isolada na costa leste do Brasil, que deu origem à *P.*

carvalhoi e a linhagem que deu origem a *P. arrabali*, *P. aspera*, *P. snethlageae* e *P. pipa* teria se diversificado nas regiões Amazônicas e do rio Orinoco.

A divisão do supercontinente Gondwana parece ter tipo papel crucial na origem da diversidade atual de Pipidae. Estes (1975) propôs que a quebra da Gondwana foi o evento responsável pela divisão entre *Pipa* e os gêneros africanos *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus*. Tal hipótese foi utilizada como ponto de calibração das análises de relógio molecular no presente estudo, já que não existem indícios da presença de fósseis de *Pipa* na África e nem de fósseis de *Hymenochirus* ou *Pseudhymenochirus* na América do Sul. A ideia de que anfíbios podem se dispersar sobre uma barreira marinha já foi utilizada como base para explicação sobre a distribuição de diversas espécies, principalmente relacionados a eventos de colonização de ilhas oceânicas (Evans et al. 2003; Vences et al. 2003), porém, é muito menos frequente do que a dispersão por meio de ambientes terrestres (Bewick et al. 2012).

Estes (1975a,b) descreveu "*Xenopus*" *romeri* do Paleoceno tardio na Bacia de Itaboraí. A presença de um fóssil de *Xenopus* na América do Sul tornaria pouco provável a hipótese de diversificação de *Xenopus* durante o Paleoceno/Eoceno. Este fóssil foi reanalisado posteriormente por Cannatella e Trueb (1988) e Báez e Harrison (2005) que posicionaram "*Xenopus*" *romeri* anterior ao surgimento do gênero *Xenopus*. A família Pipidae, favorecida pelo hábito de vida aquático, é uma das mais numerosas em termos de registros fósseis dentre todos os anfíbios. Em sua grande maioria os registros datam do Cretáceo e Terciário e estão localizados por várias regiões da África e América do Sul. Tais registros dão suporte às hipóteses biogeográficas de diversificação da família. A presença de *Singidella* e *Pachycentrata*, grupo-irmão dos atuais *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus*, somente na África dá suporte à hipótese de divisão da linhagem Pipinae (*Hymenochirus*, *Pseudhymenochirus* e *Pipa*) pela quebra do supercontinente Gondwana. Não existe, porém, nenhum registro fóssil de espécies de *Pipa*, nem mesmo

de espécies próximas a este táxon, para ser utilizado como ponto de calibração para as análises de relógio molecular.

A datação mostrou que a separação entre as principais linhagens de *Pipa* aconteceu pouco depois da quebra da Gondwana, ainda durante as primeiras fases do Período Terciário, cerca de 61 Ma para o primeiro evento de vicariância, que separou o grupo *P. parva* das demais espécies e 53 Ma para o segundo evento vicariante, isolando a linhagem de *P. carvalhoi* na costa leste. O Paleoceno e Eoceno parecem ter sido importantes também na formação da diversidade atual das linhagens Africanas de Pipidae. Evans et al. (2004) estimaram que todos os *Xenopus* atuais originaram-se entre 50.5 e 81.3 Ma.

Diferente das espécies de *Pipa*, determinados *Xenopus* possuem distribuição muito ampla e com alta conexão entre populações de diferentes bacias hidrográficas, sugerindo que esse não deve ter sido o fator primordial na diversificação desse gênero (Evans et al. 2004; 2015; Furman et al. 2015). O histórico de especiação desse gênero africano, porém, parece estar relacionado a diversos processos de aloploidia independentes, com a presença de espécies tetraploides, octoploides e até dodecaploides (Kobel, 1996; Evans et al. 2004; 2015). Em *Pipa*, as bacias hidrográficas parecem ter atuado no isolamento das principais linhagens e, ainda, pontualmente na divisão de espécies-irmãs, como entre *P. parva* e *P. myersi*, em que *P. parva* está restrita a áreas da bacia do Rio Maracaibo, onde *P. myersi* não ocorre. As espécies das regiões do Orinoco e Amazônica possuem ampla distribuição geográfica, incluindo diversos pontos de simpatria, onde os níveis de divisão interna de redes hidrográficas não parecem ter tido papel importante nos eventos de especiação.

As análises intraespecíficas recuperaram, em *P. carvalhoi*, três clados distintos, nomeados aqui de acordo com as bacias hidrográficas a qual fazem parte a maioria de

suas amostras. A composição de cada clado foi similar em todas as análises filogenéticas, independente do marcador utilizado.

O clado Atlântico Nordeste é composto por amostras dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, juntamente com as amostras de Araçuaí, Minas Gerais. O clado Atlântico Leste é composto pelas amostras situadas na Bahia, Pernambuco e, adicionalmente, as amostras de Ferros, Minas Gerais. O clado Atlântico Sudeste foi composto pelas amostras de todo o Espírito Santo, além de Poté, Minas Gerais.

As medidas de distância genética recuperaram, para genes mitocondriais, alta divergência entre clados e baixa divergência interna aos clados. As distâncias, em geral, são superiores ao padrão de distâncias intraespecíficas presentes na literatura. Vences (2005a,b), revela que a variação intrapopulacional em 16S varia de 0 a 3%, enquanto entre diferentes populações da mesma espécie a variação é de 0 a 5,1% e entre espécies diferentes, entre 1 e 16,5%, com valores mais baixos entre espécies de distribuição alopátrica. Sugere-se (Vences 2005a,b) que valores em torno de 5% para 16S sejam utilizados como limiar para a definição de espécies em Anfíbios, enquanto Fouquet et al. (2007) sugere o valor mínimo de 3% entre espécies diferentes para o mesmo marcador. Os valores de divergência recuperados no presente estudo para o marcador 16S entre os clados de *P. carvalhoi* foram de 4% $\pm$ 1% entre os clados Atl.NE e Atl.SE e entre Atl.SE e Atl.E, e de 5% $\pm$ 1% entre os clados Atl.NE e Atl.E. Em adição, foram recuperados valores baixos de divergência dentro dos clados, sendo 0% para Atl.E e 1% para Atl.SE. A divergência entre as espécies *P. pipa* e *P. arrabali* para o gene 16S foi também de 5% $\pm$ 1%.

Para ND2, tem sido considerado o limiar de 10% para a divergência entre espécies de anuros (Crawford, 2003). A distância recuperada entre os clados de *P. carvalhoi* foi de 22% a 29%, muito acima do limiar utilizado para outras espécies de anuros. Não foi possível amplificar nenhuma sequência de ND2 para *P. arrabali*, mas a distância entre *P.*

pipa e *P. carvalhoi* foi, em média, 54%. As divergências dentro dos clados foi, porém, de 2% para os clados Atl.E e Atl.NE, e de 6% para o clado Atl.SE.

Não existe limite de divergência interespecífica determinado para o gene 12S, porém, Nogueira et al. (2016) recuperou valores de 4% a 10% entre espécies do grupo *Scinax catharinae* e entre 7% e 17% entre espécies do grupo *Scinax ruber*. Os valores de divergência entre os clados de *P. carvalhoi* variaram entre 6% e 8% no presente estudo, enquanto entre as espécies *P. pipa* e *P. arrabali* a distância foi de 6%. As divergências dentro dos clados foi sempre menor de 2% para o mesmo marcador.

Uma alta estruturação genética foi identificada para todos os clados de *P. carvalhoi*. Os valores de divergência genética entre os clados foram sempre iguais, ou maiores, do que os valores de divergência entre *P. pipa* e *P. arrabali*. A separação de *P. pipa* e *P. arrabali* é suportada também por diversos caracteres morfológicos e osteológicos (Noble, 1925; Dunn, 1948; Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988) e cada uma dessas espécies possuem ainda, uma espécie-irmã mais próxima que não foi incluída no presente estudo (*P. aspera* para *P. arrabali* e *P. snethlageae* para *P. pipa*). Os valores altos de F_{st} sugerem ausência de fluxo gênico entre os diferentes clados.

Além de altos valores de distância genética, o relógio molecular recuperou tempo de divergência entre os clados de *P. carvalhoi* mais antigo que a separação de *P. arrabali* com *P. pipa*. A separação entre os clados de *P. carvalhoi* ocorreu durante o Mioceno, há cerca de 14,4 Ma, com intervalo de 95% de confiança entre 6,8 e 23,5 Ma. A separação entre *P. pipa* e *P. arrabali* foi também durante o Mioceno, por volta de 9,5 Ma, com intervalo de 95% de confiança entre 4,0 e 16,5 Ma.

Grande parte dos pesquisadores sistematistas concordam hoje que o melhor futuro possível para a tomada de decisões taxonômicas é a abordagem integrativa. Devido à sua complexidade, a diversidade de espécies precisa ser analisada por meio de múltiplas

perspectivas, já que a evolução das diferentes características acontece em taxas diferentes e podem variar entre os diferentes grupos de seres vivos (Padial et al. 2010). Aspectos morfológicos, ecológicos e comportamentais devem ser analisados, juntamente com os dados moleculares, para que seja definido com maior precisão se *Pipa carvalhoi* corresponde a um complexo de diferentes espécies.

A relação de parentesco entre os três clados internos a *P. carvalhoi* variou entre os diferentes marcadores. As árvores de 16S e ND2 separaram os clados como Atl.SE e Atl.NE como um grupo monofilético separado do clado Atl.E, embora para o último marcador a IB tenha tido suporte moderado (91%). Em SIA, porém, foi recuperada a monofilia dos clados Atl.SE e Atl.E com moderado suporte filogenético (94%). Para as árvores de TYR e 12S foi recuperada uma tricotomia entre os três clados. As análises concatenadas corroboram a monofilia dos clados Atl.SE e Atl.NE, que possuem a maior distância genética entre si. Tal relação se torna possível se assumirmos que, após a segregação dos indivíduos da bacia Atlântico Leste, os demais indivíduos das bacias Atlântico Nordeste e Sudeste mantiveram contato por vias interioranas, mantendo, assim, o fluxo gênico. O fato de Minas Gerais apresentar amostras pertencentes a ambos os clados, Nordeste e Sudeste, sugere que pode ter sido esse o ponto de contato entre eles.

As amostras de Pernambuco estão localizadas na bacia do São Francisco. Apesar de serem as únicas amostras localizadas nessa bacia, tais amostras só formaram um clado em separado dos demais representantes das demais bacias hidrográficas nas análises de ND2, onde se configuram como o grupo mais basal da espécie. Para outros marcadores, incluindo a análise concatenada, as amostras da bacia do São Francisco foram sempre internas ao clado Atlântico Leste, sendo monofiléticas apenas em 12S. Os níveis de divergência par a par e a posição filogenética das amostras de tal localidade sugerem fluxo gênico recente. Porém, existe uma disjunção entre a localidade de Pernambuco e as demais localidades da Bahia de pelo menos 500 km, onde nunca foi

registrada a presença da espécie (Santana et al. 2014). A coleta de novos espécimes e inclusão de novas sequências provenientes de Pernambuco, Paraíba, Ceará e Sergipe, estado onde a ocorrência de *P. carvalhoi* foi recém registrada, ajudarão a definir com melhor precisão a relação filogenética da região em relação às outras localidades e a investigar uma quebra filogenética entre os dois clados. Vale pontuar que a disjunção na distribuição geográfica de *P. carvalhoi* era de 1500 km quando registrada por Myers e Carvalho (1945). Com o registro de novas localidades (Santana et al. 2014) a disjunção conhecida hoje não ultrapassa os 500 km. Portanto, essa faixa onde a ocorrência da espécie não é registrada por ser resultado do menor esforço de coleta local, ou ainda de eventos de extinção local e recente.

P. carvalhoi já foi estudada sobre diferentes aspectos estruturais e comportamentais. Estudos osteológicos foram extremamente importantes para a descrição de toda a diversidade do gênero (Paterson, 1955; Trueb & Cannatella, 1986; Cannatella & Trueb, 1988; Trueb & Massemin, 2001), assim como aspectos morfológicos de todas as espécies (Noble, 1925; Dunn, 1948), aspectos histológicos do dorso de fêmeas foram investigados por Fernandes et al. (2011), características bioacústicas e reprodutivas foram realizadas por Heuwinkel e Bunten (1996) e a composição da dieta estudada por Canedo et al. (2006). Em nenhum dos trabalhos citados, porém, o foco foi a investigação da variação geográfica ou as divergências intraespecíficas. Dunn (1948) cita as localidades conhecidas para *P. carvalhoi* estavam divididas em dois grupos: um grupo entre Pernambuco e Ceará, ocorrendo em altitudes de 590 a 1000 metros e um outro grupo em terras baixas, representado por outro grupo formado por, até então, uma única localidade a 1500 km de distância do primeiro grupo, no Espírito Santo. O presente estudo representa, então, a primeira tentativa de organização intraespecífica das linhagens de *P. carvalhoi*.

Apesar de muitas novas localidades terem sido descobertas para *P. carvalhoi* após os estudos morfológicos de Dunn (1948), a distribuição geográfica da espécie continua a apresentar uma disjunção entre as amostras do Nordeste e do Sudeste. A disjunção corresponde hoje a uma faixa de aproximadamente 500 km entre a localidade de Poço Redondo, em Sergipe e Jequié, na Bahia que são, respectivamente, a localidade mais ao sul conhecida para o primeiro grupo e aquela mais ao norte conhecida para o segundo grupo (Santana et al. 2014). Apesar do padrão de disjunção existente geograficamente para a espécie, os haplótipos de *P. carvalhoi* não apresentaram padrão de parentesco evolutivo semelhante ao observado em sua distribuição geográfica em nenhuma das análises realizadas.

Grande parte das espécies de anfíbios estão altamente ligadas a ambientes úmidos e corpos d'água devido principalmente à presença de larva aquática, chamada de girino, e também da alta suscetibilidade à desidratação (Duellman e Trueb, 1994). *Pipa*, porém, é o único gênero Neotropical a apresentar adultos adaptados à vida subaquática, e se utilizar de tais ambientes aquáticos para todas as suas funções biológicas, tais como alimentação, reprodução, desenvolvimento e forrageamento, de forma que era esperado uma associação muito maior com o padrão de dispersão apresentado por peixes de água doce, onde a diversidade está associada principalmente aos processos físicos relacionados ao surgimento e diferenciação das bacias hidrográficas (Costa & Bockmann, 1994; Armbruster, 1998; Quevedo & Reis, 2002), do que de outras espécies de anfíbios, explicados por padrões ligados à fauna terrestre como a Hipótese dos Refúgios (Haffer, 1969; Carnaval et al. 2009; Menezes et al. 2016).

A relação evolutiva recuperada para as amostras costeiras, entretanto, pode ser explicada pela divisão das bacias hidrográficas. Amostras das diferentes bacias hidrográficas formaram clados separados nas análises filogenéticas, haplótipos separados

e apresentaram alta estruturação genética entre elas. Associado a isso, amostras de uma mesma bacia apresentaram sempre alta proximidade filogenética e haplotípica, além de baixa divergência genética entre elas. Nossos dados contavam com amostras de apenas uma localidade da bacia do São Francisco, porém, tais amostras só formaram um clado único em ND2. Nas demais análises, as amostras da bacia do São Francisco estiveram inclusas ao clado Atlântico Leste.

A separação entre as bacias hidrográficas não explica, porém, todas as relações filogenéticas encontradas para *P. carvalhoi*, falhando em explicar principalmente o padrão encontrado para as amostras de Minas Gerais, localizadas mais ao interior do continente. Amostras de Araçuaí, Minas Gerais, área localizada na Bacia Atlântico Leste, representam o mesmo haplótipo ou um haplótipo muito próximo a amostras do Rio Grande do Norte e Ceará, localizados na Bacia Atlântico Nordeste, apesar de estarem separados por mais de 1000 km. Amostras de Ferros, Minas Gerais, apesar de estarem localizadas na Bacia Atlântico Sudeste, foram sempre mais próximas filogeneticamente às amostras da Bacia Atlântico Leste, localizadas principalmente na Bahia. Amostras de Poté, Minas Gerais, localizadas na Bacia Atlântico Leste, foram sempre mais próximas filogeneticamente às amostras do Espírito Santo, localizadas na Bacia Atlântico Sudeste. Porém, é conhecida a habilidade de *P. carvalhoi* e de outras espécies de Pipidae de movimentação, inclusive para migração, e forrageamento fora da água (Myers & Carvalho, 1945; Dunn, 1948; Tinsley et al. 1996; Lobos & Jaksic, 2005), principalmente após chuvas torrenciais, explicando a presença de indivíduos dessas espécies em lagos isolados. É possível que a proximidade maior entre rios e afluentes de diferentes bacias hidrográficas nas regiões do interior do sudeste do Brasil tenha favorecido eventos migratórios por meio terrestre durante as estações chuvosas, resultando em um padrão de distribuição local que independe da divisão de bacias hidrográficas. Costa (2001)

defende a origem mista de bacias hidrográficas e propõe que cabeceiras de rios são áreas onde ocorrem complexas trocas de fauna entre áreas adjacentes.

É conhecido também que as transgressões oceânicas podem ter moldado a diversificação de espécies durante o Quaternário. Durante períodos de glaciação, o nível do mar chegou a ficar em média 100 metros abaixo do nível atual, expondo a plataforma continental (Ribeiro, 2006; Leite et al. 2016). O aumento do curso dos rios, combinados a uma série de movimentos verticais de blocos continentais gerados pela diminuição dos níveis dos mares favoreceu novas conexões entre rios de diferentes regiões hidrográficas durante o Pleistoceno (Ribeiro, 2006).

O baixo número de amostras interioranas em nossos dados não permite uma conclusão precisa sobre uma maior influência de processos migratórios ou vicariantes nos padrões de parentesco encontrados para as amostras de Minas Gerais. Porém, independente do processo que tenha influenciado o padrão encontrado, o mesmo foi gerado por eventos recentes, provavelmente do final do Terciário e começo do Quaternário, devido ao nível de semelhança genética encontrado entre amostras dessas populações e aquelas provenientes da costa leste do país.

6. Conclusões

Pipa surgiu a partir da segregação entre América do Sul e África pela quebra do supercontinente Gondwana no Cretáceo. O Paleoceno e Eoceno foram de grande importância para a diversificação do gênero, assim como foi para os gêneros africanos *Xenopus* e *Silurana*. A diversificação inicial de *Pipa* foi influenciada por dois eventos de vicariância dividindo as espécies por regiões hidrográficas. As espécies *P. parva* e *P. myersi* formam o primeiro grupo a se separar, ficando restritas à região da Bacia do rio Maracaibo. Posteriormente um segundo evento vicariante separou *P. carvalhoi* nas bacias

da costa Leste brasileira e a linhagem que deu origem às espécies *P. pipa*, *P. arrabali*, *P. aspera* e *P. snethlageae* nas regiões Amazônica e do Orinoco.

Pipa carvalhoi apresenta alta estruturação filogenética, com três clados compostos por indivíduos associados a diferentes regiões hidrográficas (Atlântico Leste, Atlântico Nordeste e Atlântico Sudeste). A segregação entre as diferentes regiões hidrográficas mostra-se como uma barreira ao fluxo gênico e parece ter sido responsável pela estruturação genética da espécie, principalmente das populações costeiras. Para as populações de Minas Gerais, mais ao interior, a hidrografia não explica o padrão filogenético, indicando que outros fatores podem ter atuado na estruturação genética das populações. A relação filogenética entre os três clados variou entre os diferentes marcadores moleculares. A análise concatenada sugere que os clados Atlântico Nordeste e Atlântico Sudeste sejam monofiléticos, apesar de serem os clados mais distantes geograficamente. Para que isso seja possível, a faixa do interior, onde existem representantes de todos os três clados pode ter servido como zona de contato entre as populações distantes.

As amostras da bacia do São Francisco foram internas ao clado Atlântico Leste, com exceção das análises de ND2, onde esse grupo formou um clado separado e basal em relação aos outros grupos da espécie. Apesar da proximidade genética, *P. carvalhoi* apresenta uma disjunção na distribuição geográfica de cerca de 500 km entre as populações da bacia Atlântico Leste e da bacia do São Francisco, onde não existem registros de ocorrência para a espécie que pode ser devido à subamostragem regional ou mesmo eventos de extinção recentes no local.

As distâncias genéticas, valores de F_{st} e o tempo de divergência estimado pelo relógio molecular mostram que a separação encontrada entre os clados internos a *P. carvalhoi* supera os valores assumidos como limiares para a divisão de espécies em anfíbios. Os valores são, ainda, sempre maiores ou iguais àqueles que separam *P.*

arrabali e *P. pipa*, espécies largamente sustentadas por caracteres moleculares, morfológicos e comportamentais.

Pipa carvalhoi é, em suma, uma linhagem de origem muito antiga que teve sua diversificação influenciada pelo surgimento das principais drenagens costeiras do Brasil. Tais eventos não servem, porém, para explicar toda a diversidade da espécie. A alta estruturação genética, a ausência de indícios recentes de fluxo gênico e a divergência profunda revelam a possibilidade de diversidade críptica ao longo da distribuição de *Pipa carvalhoi*.

Referências Bibliográficas:

Armbruster, J.W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes of the Rhinelepis group (Loricariidae: Hypostominae). **Copeia** 3, 620-636, 1998.

Arzabe, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia** 16(3), 851-864, 1999.

Avise, J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. **Harvard University Press**, Cambridge, MA. 447 p, 2000.

Báez, A.M. & Harrison, T. A new pipine frog from an Eocene crater lake in north-central Tanzania. **Palaeontology** 48, 723–737, 2005.

Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** 16, 37-48, 1999.

- Batalha-Filho, H. & Miyaki, C.Y. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia Especial B**, 31–34, 2011.
- Bates, J.M. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Vieira I, D'Incão M.A, Silva J.M.C, Oren, D. (eds) **Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia**. Belém. Museu Paraense Emílio Goeldi 119-138, 2001.
- Bewick, A.J, Chain, F.J.J, Heled, J., Evans, B.J. The pipid root. **Systematic Biology** 61(6): 913-916, 2012.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., Burke, T. Single-locus and DNA fingerprinting In: Hoelzel AR (ed) **Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach**. Oxford. IRL Press 225–269, 1992.
- Cannatella, D. C. & Trueb, L. Evolution of pipoid frogs: Intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). **Zoological Journal of the Linnean Society** 94, 1–38, 1988.
- Canedo, C., Garcia, J.P., Fernandes, R., Pombal, J.P. Diet of *Pipa carvalhoi* (Amphibia, Pipidae) is not influenced by female parental care. **Herpetological Review** 37(1), 44-45, 2006
- Carnaval, A.C., Moritz, C., Hickerson, M., Haddad, C. & Rodrigues, M. Stability predicts diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science** 323: 785-789, 2009.
- Carnaval, A.C.O.Q. Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern Brazil – a preliminary study. **Integrative and Comparative Biology** 42: 913-921, 2002.
- Carvalho, A.L. Notas ecológicas e zoogeográficas sobre vertebrados no Nordeste Brasileiro. **Revista O Campo**, 12-13, 1937.
- Carvalho, A.L. Notas sobre *Hemipipa carvalhoi* Mir.-Rib. (Batrachia Anura: Pipidae). 1ª parte. **Boletim Biológico** (Nova Série) 4(3), 394- 414, 1939.
- Cooke, G.M., Chao, N.L., Beheregaray, L.B. Phylogeography of a flooded forest specialist fish from central Amazonia based on intron DNA: the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*. **Freshw. Biol.** 54, 1216- 1232, 2009.

Costa, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography** 30: 71-86, 2003.

Costa, L.P., Leite, Y.R. Historical fragmentation shaping vertebrate diversification in the Atlantic forest biodiversity hotspot. Bones, clones, and biomes: the history and geography of recent neotropical mammals. Edited by: Patterson BD, Costa LP. 2012, Chicago: University of Chicago Press

Costa, W.J.E.M. & Bockmann, F.A. A new genus and species of Sarcoglanidinae (Siluriformes: Trichomycteridae) from southeastern Brazil, with a re-examination of subfamilial phylogeny. **Journal of Natural History** 28, 715-730, 1994.

Crawford, A.J., Bermingham, E., Polania, C. The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: a comparative phylogeographic analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. **Molecular Ecology** 16: 4789-4807, 2007.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." **BMC Evolutionary Biology** 7: 214, 2007.

Duellman, W.E. & TRUEB, L. Biology of Amphibians. Baltimore, **The Johns Hopkins University Press** 670p, 1994.

Dunn, E.R. American frogs of the family Pipidae. **American Museum Novitates** 1348, 1-13, 1948.

Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res** 32: 1792-1797, 2004.

Endler, J.A. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. **American Zoologist** 22: 441-452, 1982.

Estes, R. Xenopus from the Paleocene of Brazil and its zoogeographic importance. **Nature** 254, 48-40, 1975a.

Estes, R. Fossil Xenopus from the Paleocene of South America and zoogeography of pipid frogs. **Herpetologica** 31, 263-278, 1975b.

Evans, B.J., Brown, R.M., McGuire, J.A., Supriatna, J., Andayani, N., Diesmos, A., Melnick, D.J., Cannatella, D.C. Phylogenetics of fanged frogs: testing biogeographical hypotheses at the interface of the Asian and Australian faunal zones. **Systematic Biology** 52, 1-29, 2003.

Evans, B.J., Kelley, D.B., Tinsley, R.C., Melnick, D.J., Cannatella, D.C. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 33, 197–213, 2004.

Evans, B.J., Carter, T.F., Greenbaum, E., Gvoždík, V., Kelley, D.B., McLaughlin, P.J., Pauwels, O.S., Portik, D.M., Stanley, E.L., Tinsley, R.C., Tobias, M.L., Blackburn, D.C. Genetics, morphology, advertisement calls, and historical records distinguish six new polyploid species of African clawed frog (*Xenopus*, Pipidae) from west and Central Africa. **PLoS One** 10, 2015.

Excoffier, L., Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour** 10, 564–567, 2010.

Fernandes, T.L., Antoniazzi, M.M., Sasso-Cerri, E., Egami, M.I., Lima, C., Rodrigues, M.T., Jared, C. 2011. Carrying progeny on the back: Reproduction in the Brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. **South Am J Herpetol** 6, 161–176, 2011.

Fitzpatrick, S.W., Brasileiro, C.A., Haddad C.F.B. & Zamudio K.R. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology** 18(13): 2877-2896, 2009.

Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmell, N.J. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. **PLoS ONE** 2(10), 2007.

Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira, M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. & Rodrigues, M.T. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 62, 823–838, 2012.

Fu, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147, 915–925, 1997.

Furman, B.L.S., Bewick, A.J., Harrison, T.L., Greenbaum, E., Gvoždík, V. et al. Pan-African phylogeography of a model organism, the African clawed frog *Xenopus laevis*. **Mol Ecol** 24, 909-925, 2015.

Galindo-Leal, C. e Câmara, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Capítulo 1. In: Galindo-Leal, C. e Câmara, I.G. (Eds). Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 3-11 pp, 2005.

Glaw, F., Köhler, J. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. **Herpetological Review** 29, 11–12, 1998.

Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & S.L. Bonatto. Phylogeography of the Bothrops jararaca Complex (Serpentes:Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology** 15: 3969-3982, 2006.

Haddad, C.F.B., Toledo, L.F., Prado, C.P.A., Loebmann, D., Gasparini, J.L., Sazima, I. **Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica**. Anolis Books Editora, 1ª Edição, 544p, 2013.

Haffer, J. Speciation in Amazonian birds. **Science** 165, 131–131, 1969.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4, 1, 2001.

Hartl, D.L., Clark, A.G. Principles of populations genetics, 3th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer. 542p., 1997.

Heuwinkel, H. & Bunten, G. Hydroacoustical investigations on the frog *Pipa carvalhoi*. *Bioacoustics* 6(4), 317, 1996.

Hubert, N., Torrico, J.P., Bonhomme, F., Renno, J.F. Species polyphyly and mtDNA introgression among three *Serrasalmus* sister-species. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 46, 375–381, 2007.

Kobel, H.R. Reproductive capacity of experimental *Xenopus gilli* x *X. l. laevis* hybrids. In: Tinsley, R.C., Kobel, H.R. (Eds.), *The Biology of Xenopus*, Oxford: Clarendon Press. 73-80, 1996.

Köhler, J., Vieites, D.R., Bonett, R.M., Garcia, F.H., Glaw, F., Steinke, D., Vences, M. New amphibians and global conservation: A boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. **Bioscience** 55, 693–696, 2005.

Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Loss, A.C., Rocha, R.G., Batalha-Filho, H., Bastos, A.C., Quaresma, V.S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M., Pardini, R. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 113, 1008–1013, 2016.

Librado, P., Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25, 1451–1452, 2009.

Lobos, G. & Jaksic, F.M. The ongoing invasion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) in Chile: causes of concern. **Biodivers. Conserv.** 14, 429–439, 2005

Lovejoy, N.R. & Araujo, M.L.G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology** 9, 259–268, 2000.

Martins, F.M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society** 104 (3): 499–509, 2011.

Menezes, L., Canedo, C., Batalha-Filho, H., Garda, A.A., Gehara, M., Napoli, M.F. Multilocus Phylogeography of the Treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) Reveals a Plio-Pleistocene Diversification in the Atlantic Forest. **PLoS ONE** 11 (6), 2016.

Miranda-Ribeiro, A. Sobre uma collecção de vertebrados do nordeste brasileiro. Primeira parte: peixes e batrachios. **Revista O Campo**, 54–56, 1937a.

Miranda-Ribeiro, A. Ainda os batrachios do nordeste. **Revista O Campo** 26, 1937b.

Myers, G.S. & Carvalho, A.L. Notes on some new or little known Brazilian amphibians, with an examination of the history of the Plata salamander, *Ensatina platensis*. Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Nova Série Zoologia 35, 1–24, 1945.

Noble, G. K. A new genus of Surinam Toads (Pipidae). American Museum Novitates 164, 1–3, 1925.

Nogueira, L., Solé, M., Siqueira, S., Affonso, P.R.A.M., Strüssmann, C., Sampaio, I. Genetic analysis reveals candidate species in the *Scinax catharinae* clade (Amphibia: Anura) from Central Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 39(1), 49-53, 2016.

Oliver, L.A., Rittmeyer, E.N., Kraus, F., Richards, S.J., Austin, C.A. Phylogeny and phylogeography of *Mantophryne* (Anura: Microhylidae) reveals cryptic diversity in New Guinea. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 67, 600–607, 2013.

Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. The integrative future of taxonomy. **Front. Zool.** 7, 16, 2010.

Paterson, N. The skull of the toad, *Hemipipa carvalhoi* Mir.-Rib. with remarks on other Pipidae. **Proc. Zool. Soc.** 125, 223-252, 1955.

Pearse, D.E., Arndt, A.D., Valenzuela, N., Miller, B.A., Vitor Cantarelli, J.W., Sites, J.R. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). **Molecular Ecology** 15, 985-1006, 2006.

Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. & Sites, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river system in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society** 85, 13–26, 2005.

Posada, D. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution** 25: 1253-1256, 2008.

Quevedo, R. & Reis, R.E. *Pogonopoma obscurum*: a new species of loricariid catfish (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil, with comments on the genus *Pogonopoma*. **Copeia** 2002 (2), 402-410, 2002.

Ribeiro, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology** 4(2), 225-246, 2006.

Rödel, M.O. Herpetofauna of West Africa, Vol. I. Amphibians of the West African Savanna. – Edition Chimaira, Frankfurt, Germany, 2000.

Santana, D.O., Franco, S.C., Rocha, S.M., Freitas, E.B., De-Carvalho, C.B., Faria, R.G. First record of *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937) (Anura: Pipidae) in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Check List** 10(2): 407-408, 2014

Silva, E.T., Fernandes, V.D., Santana, D.J., Feio, R.N. Amphibia, Anura, Pipidae, *Pipa carvalhoi* (Miranda-Ribeiro, 1937): Distribution extension and geographic distribution map in the southeast of Brazil. **Check List** (UNESP) 6(3): 451-453, 2010.

Sistrom, M.J., Chao, N.L., Beheregaray, L.B. Population history of the Amazonian one-lined pencilfish based on intron DNA data. **J Zool** 4, 287–298, 2009.

Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123, 585-595, 1989.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725-2729, 2013.

Tinsley, R. C., Loumont, C., Kobel, H. R. Geographical distribution and ecology; pp 35-59. In: TINSLEY, R. C. & KOBEL, H. R. (eds.): The biology of *Xenopus*; Oxford (Oxford Univ. Press), 440 pp. 1996

Tobias, M.L., Evans, B.J., Kelley, D.B. Evolution of advertisement call in African clawed frogs. **Behaviour** 148, 519–549, 2011.

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

Tonini, J., Costa, L.P. & Carnaval, A. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. **Journal Of Zoological Systematics & Evolutionary Research** 51(2): 114-121, 2013.

- Trueb, L. & Cannatella, D.C. Systematics, morphology, and phylogeny of the genus *Pipa* (Anura: Pipidae). **Herpetologica** 42(4):412–449, 1986.
- Trueb, L. & Massemin, D. The osteology and relationships of *Pipa aspera* (Amphibia: Anura: Pipidae), with notes on its natural history in French Guiana. **Amphib-Reptilia** 22, 33-54, 2001.
- Turner, T.F., McPhee, M.V., Campbel, P., Winemiller, K.O. Phylogeography and interespecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. **J. of Fish Bio.** 64, 186-201, 2004.
- Vences, M., Vieites, D.R., Glaw, F., Brinkmann, H., Kosuch, J., Vieth, M., Meyer, A. Multiple overseas dispersal in amphibians. **Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences** 270, 2435-2442, 2003.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M., Vieites, D.R., Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B, Biological Sciences** 360, 1859– 1868, 2005a.
- Vences, M., Thomas, M., der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers Zool.** 2, 5. 2005b.
- Wallace, A.R. On the monkeys of the Amazon. **Proceedings Zoologist Society London** 20: 107-110, 1852.
- Weigoldt, P. Beobachtungen zur Biologie und Ethologie von *Pipa* (Hemipipa) *carvalhoi* Mir. Rib. 1937 (Anura, Pipidae). **Z. Tierpsychol.** 40, 80-99, 1976.
- Wright, S. Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, 465 pp, 1978.
- Xia, X., Xie, Z. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. **J Hered** 92, 371–373, 2001.

TABELAS

Tabela 1. Lista de espécimes de *Pipa* analisados com número de tombo da amostra e localidade de coleta. Amostras com asterisco (*) correspondem apenas ao número do coletor.

AMOSTRA	Espécie	Localidade	Identificação de Localidade
AAGARDA1174	<i>Pipa carvalhoi</i>	Serra Caiada/RN	1
AAGARDA1175	<i>Pipa carvalhoi</i>	Serra Caiada/RN	1
AAGARDA1176	<i>Pipa carvalhoi</i>	Serra Caiada/RN	1
AAGARDA2690	<i>Pipa carvalhoi</i>	Crato/CE	2
AAGARDA2691	<i>Pipa carvalhoi</i>	Crato/CE	2
AAGARDA2692	<i>Pipa carvalhoi</i>	Crato/CE	2
AAGARDA2695	<i>Pipa carvalhoi</i>	Crato/CE	2
AAGARDA2696	<i>Pipa carvalhoi</i>	Crato/CE	2
AAGARDA5	<i>Pipa carvalhoi</i>	Araçuaí/MG	12
AAGARDA4	<i>Pipa carvalhoi</i>	Araçuaí/MG	12
AAGARDA7994	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
AAGARDA7997	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
AAGARDA7999	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
AAGARDA8001	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
AAGARDA8003	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
VC52	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
VC53	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buíque/PE	4
URCA-G1098	<i>Pipa carvalhoi</i>	Mauriti/CE	3
URCA-G1099	<i>Pipa carvalhoi</i>	Mauriti/CE	3
URCA-G1119	<i>Pipa carvalhoi</i>	Mauriti/CE	3
URCA-G1122	<i>Pipa carvalhoi</i>	Mauriti/CE	3
UFBA-T665	<i>Pipa carvalhoi</i>	Ilhéus/BA	7
MTR5933	<i>Pipa carvalhoi</i>	Jussari/BA	9
MTR5934	<i>Pipa carvalhoi</i>	Jussari/BA	9
MTR12367	<i>Pipa carvalhoi</i>	Linhares/BA	15

MTR15988	<i>Pipa carvalhoi</i>	Camacan/BA	10
MTR16082	<i>Pipa carvalhoi</i>	Camacan/BA	10
DS35	<i>Pipa carvalhoi</i>	Ferros/MG	14
DS36	<i>Pipa carvalhoi</i>	Ferros/MG	14
DS42	<i>Pipa carvalhoi</i>	Ferros/MG	14
DS43	<i>Pipa carvalhoi</i>	Ferros/MG	14
PVS108	<i>Pipa carvalhoi</i>	Santa Maria de Jetibá/ES	18
PVS109	<i>Pipa carvalhoi</i>	Santa Maria de Jetibá/ES	18
PVS110	<i>Pipa carvalhoi</i>	Santa Teresa/ES	17
PVS111	<i>Pipa carvalhoi</i>	Santa Teresa/ES	17
PVS112	<i>Pipa carvalhoi</i>	Santa Teresa/ES	17
PVS113	<i>Pipa carvalhoi</i>	Colatina/ES	16
PVS114	<i>Pipa carvalhoi</i>	Colatina/ES	16
PVS115	<i>Pipa carvalhoi</i>	Colatina/ES	16
PVS116	<i>Pipa carvalhoi</i>	Colatina/ES	16
PVS56	<i>Pipa carvalhoi</i>	Poté/MG	13
PVS57	<i>Pipa carvalhoi</i>	Poté/MG	13
CH2225	<i>Pipa carvalhoi</i>	Porto Seguro/BA	11
CH2297	<i>Pipa carvalhoi</i>	Porto Seguro/BA	11
CH3973	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buararema/BA	8
CH3974	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buararema/BA	8
CH3975	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buararema/BA	8
CH3976	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buararema/BA	8
CH3977	<i>Pipa carvalhoi</i>	Buararema/BA	8
CH4248	<i>Pipa carvalhoi</i>	Una/Ilhéus/BA	7
CH12862	<i>Pipa carvalhoi</i>	Jequié/BA	5
CH16157	<i>Pipa carvalhoi</i>	Uruçuca/BA	6
CH16158	<i>Pipa carvalhoi</i>	Uruçuca/BA	6
CH16159	<i>Pipa carvalhoi</i>	Uruçuca/BA	6

CH16160	<i>Pipa carvalhoi</i>	Uruçuca/BA	6
CH16161	<i>Pipa carvalhoi</i>	Uruçuca/BA	6
MTR13267	<i>Pipa pipa</i>	Maruim/AM	-
MTR13268	<i>Pipa pipa</i>	Maruim/AM	-
MTR13269	<i>Pipa pipa</i>	Maruim/AM	-
MTR13287	<i>Pipa pipa</i>	Maruim/AM	-
MTR13288	<i>Pipa pipa</i>	Maruim/AM	-
HT310	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT324	<i>Pipa arrabali</i>	Juruá/AM	-
HT903	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT907	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT908	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT940	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT989	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1002	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT309	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1017	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1035	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1036	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1037	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT1042	<i>Pipa pipa</i>	Caracaraí/RR	-
HT3213	<i>Pipa arrabali</i>	Prainha/PA	-
HT3258	<i>Pipa pipa</i>	Purupuru/BA	-
HT4278	<i>Pipa pipa</i>	Morrinho/PA	-
HT4279	<i>Pipa pipa</i>	Morrinho/PA	-

Tabela 2. Lista dos marcadores moleculares utilizados no presente estudo, o par de *primers* e perfis utilizados para amplificar as sequências de cada um deles.

Marcador	12S	16S	ND2	SIA	TYR
Primer forward	N12F	N16F	ND2ELEUF	SIA1 (T3) F	TYR-F40 F
Primer reverse	N12R	N16R	ND2ALAR	SIA2 (T7) R	TYR-SPA R
Referência	Salducci et al. 2005	Salducci et al. 2005	Carnaval e Bates, 2007	Bonacum et al. 2001	Vences et al. 2003
Perfil (temperatura, tempo)					
Desnaturação inicial	92°C, 2'	92°C, 2'	94°C, 30"	94°C, 30"	94°C, 30"
Nº de Ciclos	5 + 30	5 + 30	35	35	35
Desnaturação	92°C, 15"	92°C, 15"	94°C, 30"	94°C, 30"	94°C, 30"
Anelamento	48°C, 45" + 50°C, 45"	46°C, 45" + 50°C, 45"	56°C, 30"	56°C, 60"	54°C, 60"
Extensão	72°C, 1'30" + 72°C, 1"	72°C, 1'30" + 72°C, 1"	72°C, 45"	72°C, 60"	72°C, 60"
Extensão final	72°C, 7'	72°C, 7'	72°C, 10'	72°C, 6'	72°C, 6'

Tabela 3. Distâncias genéticas média e desvio padrão (entre colchetes) e valores de F_{st} (cinza) entre os clados de *P. carvalhoi* e outras espécies de *Pipa* encontrados nas análises filogenéticas para os marcadores mitocondriais. Na diagonal, em negrito, encontram-se os valores de distância genética interna para cada clado.

Gene	Espécie/Clado	Atl.E	Atl.SE	Atl.NE	P. pipa	P. arrabali
12 S	Atl.E	0.02 [0.00]	0.73	0.77	0.85	0.89
	Atl.SE	0.08 [0.02]	0.01 [0.00]	0.85	0.88	0.93
	Atl.NE	0.06 [0.01]	0.07 [0.02]	0.00 [0.00]	0.92	0.96
	<i>P. pipa</i>	0.18 [0.03]	0.17 [0.03]	0.17 [0.03]	0.01 [0.00]	0.78
	<i>P. arrabali</i>	0.17 [0.03]	0.18 [0.04]	0.17 [0.03]	0.06 [0.02]	0.02 [0.00]
16 S	Atl.E	0.00 [0.00]	0.88	0.93	0.90	0.99
	Atl.SE	0.04 [0.01]	0.01 [0.00]	0.86	0.88	0.96
	Atl.NE	0.05 [0.01]	0.04 [0.01]	0.00 [0.00]	0.91	0.98
	<i>P. pipa</i>	0.14 [0.02]	0.13 [0.02]	0.17 [0.02]	0.02 [0.00]	0.79
	<i>P. arrabali</i>	0.16 [0.02]	0.14 [0.02]	0.18 [0.03]	0.05 [0.01]	0.00 [0.00]
ND2	Atl.E	0.02 [0.00]	0,78	0,72	0,78	-
	Atl.SE	0.26 [0.02]	0.06 [0.01]	0,77	0,83	-
	Atl.NE	0.29 [0.03]	0.22 [0.02]	0.02 [0.00]	0,89	-
	<i>P. pipa</i>	0.54 [0.05]	0.54 [0.05]	0.52 [0.05]	0.05 [0.01]	-
	<i>P. arrabali</i>	-	-	-	-	-

Tabela 4. Índices amostrais e valores dos testes de neutralidade para cada clado/espécie dos marcadores mitocondriais. n = número de amostras; H = número de haplótipos; S = Número de sítios polimórficos. Valores significativos foram destacados em negrito.

Gene	Espécie/Clado	n	H	S	D de Tajima	FS de fu
12S	P. carvalhoi	41	17	44	1,23	1,06
	Atl. E	19	13	25	1,04	0,62
	Atl. SE	7	2	14	-1,65	-1,89
	Atl. NE	14	3	4	1,88	1,54
	P. pipa	18	4	11	2,25	1,92
	P. arrabali	2	2	2	N.A	N.A
16S	P. carvalhoi	50	11	31	1,09	1,71
	Atl. E	26	7	12	-1,74	-2,34
	Atl. SE	12	5	11	-0,14	0,87
	Atl. NE	12	3	3	1,97	1,49
	P. pipa	18	3	18	2,33	2,05
	P. arrabali	2	2	1	N.A	N.A
ND2	P. carvalhoi	33	26	352	-0,38	-0,35
	Atl. E	10	8	50	-1,44	-1,71
	Atl. SE	6	6	98	0,15	0,01
	Atl. NE	15	10	63	-1,44	-2,23
	P. pipa	6	6	84	-0,62	-0,63
	P. arrabali	-	-	-	-	-

FIGURAS

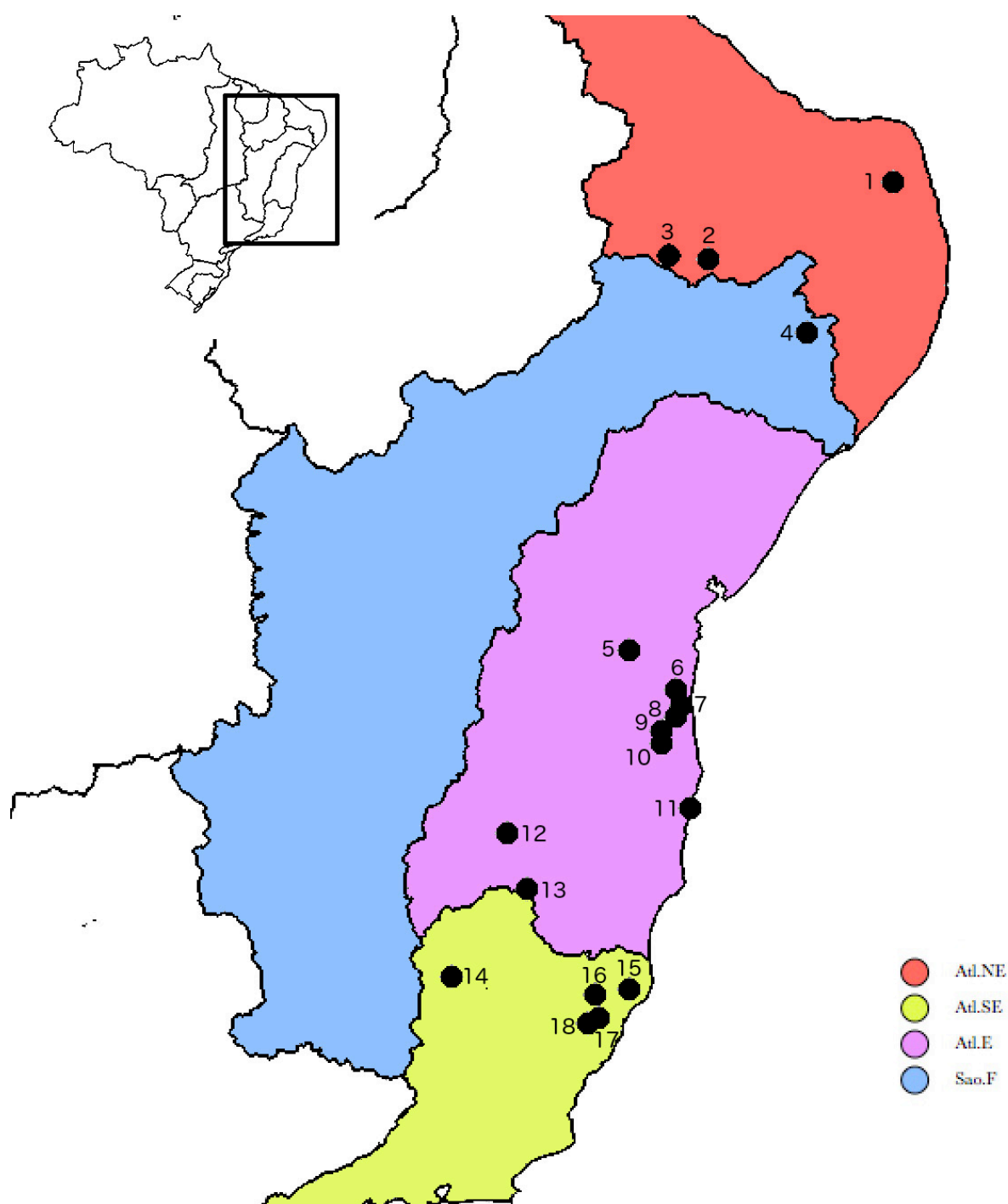


Figura 1. Mapa mostrando a distribuição das amostras de *P. carvalhoi* utilizadas nas análises moleculares dentro das bacias hidrográficas segundo a Agência Nacional de Águas (ANA). Numeração das localidades de acordo com a identificação da Tabela 1. 1 – 3: Bacia Atlântico Nordeste (Vermelho); 4: Bacia do São Francisco (Azul); 5 – 13: Bacia Atlântico Leste (Roxo); 14 – 17: Bacia Atlântico Sudeste (Verde).

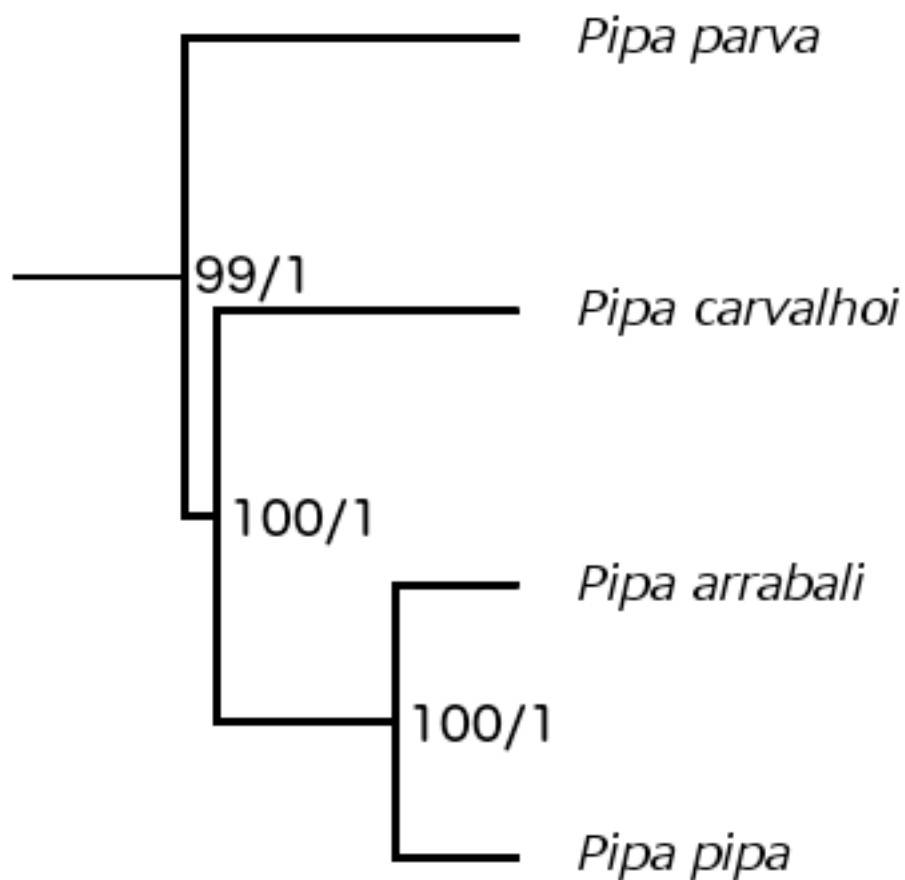


Figura 2. Árvore Filogenética de genes concatenados para as espécies de *Pipa*. Valores ao lado dos ramos representam, respectivamente, o valor de *bootstrap* da Máxima Verossimilhança (ML) e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana (IB).

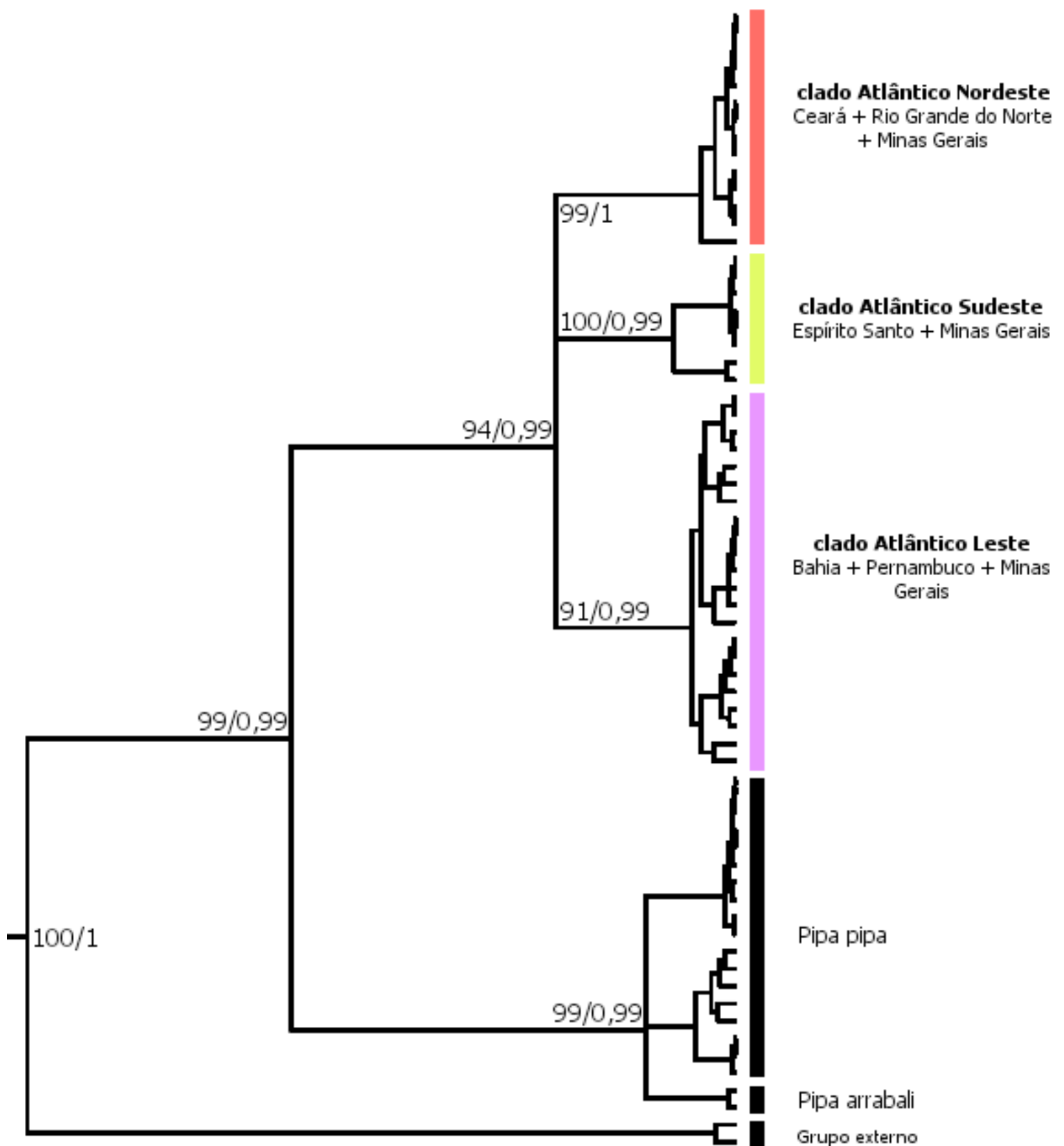


Figura 3. Árvore Filogenética de genes concatenados para os clados de *Pipa carvalhoi*. Valores ao lado dos ramos representam, respectivamente, o valor de *bootstrap* da Máxima Verossimilhança (ML) e probabilidade posterior da Inferência Bayesiana (IB).

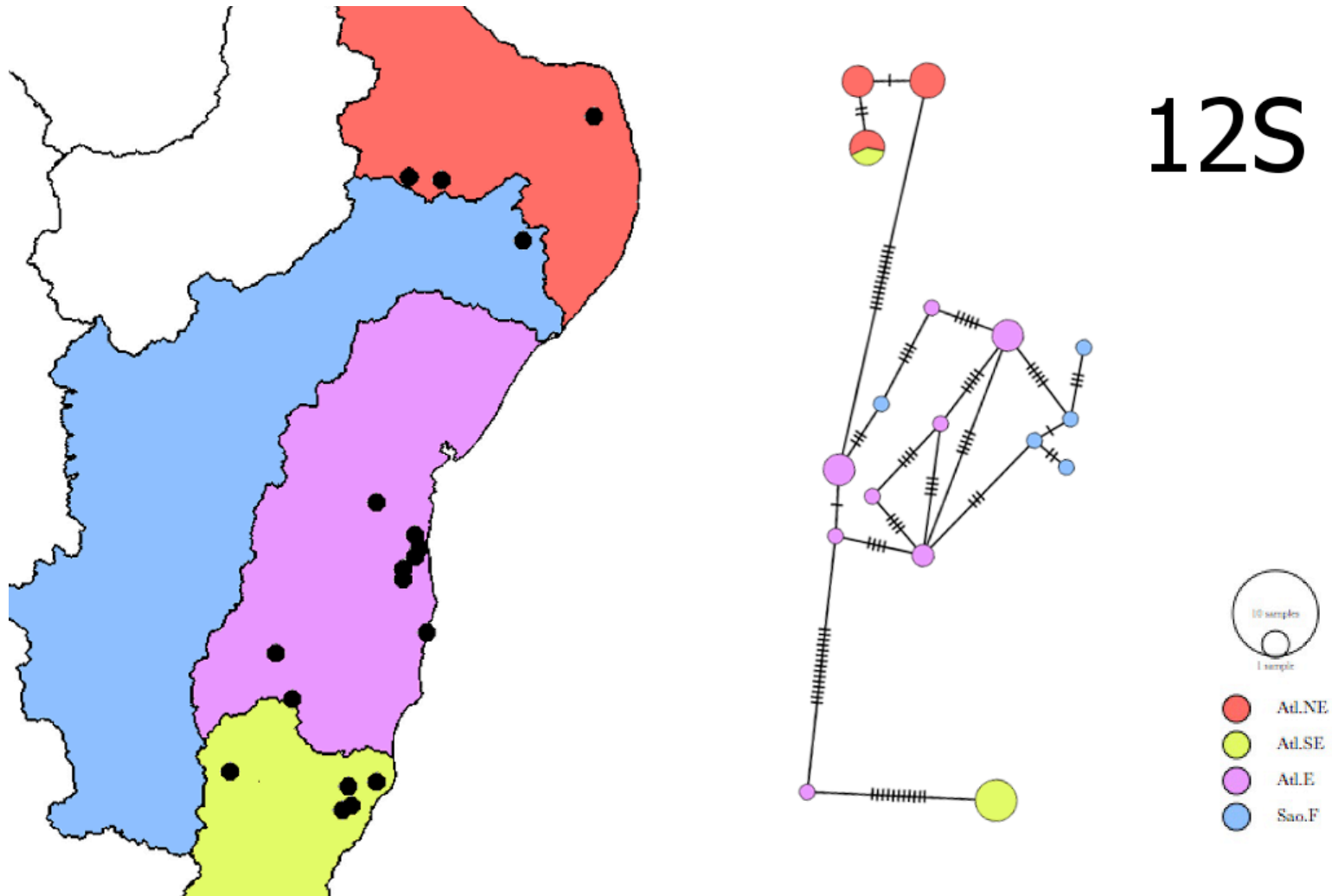


Figura 4. Rede de haplótipos do gene 12S. O tamanho dos círculos é diretamente proporcional ao número de amostras que o haplótipo representa. O número de passos mutacionais está representado por traços nas linhas que ligam os haplótipos vizinhos.

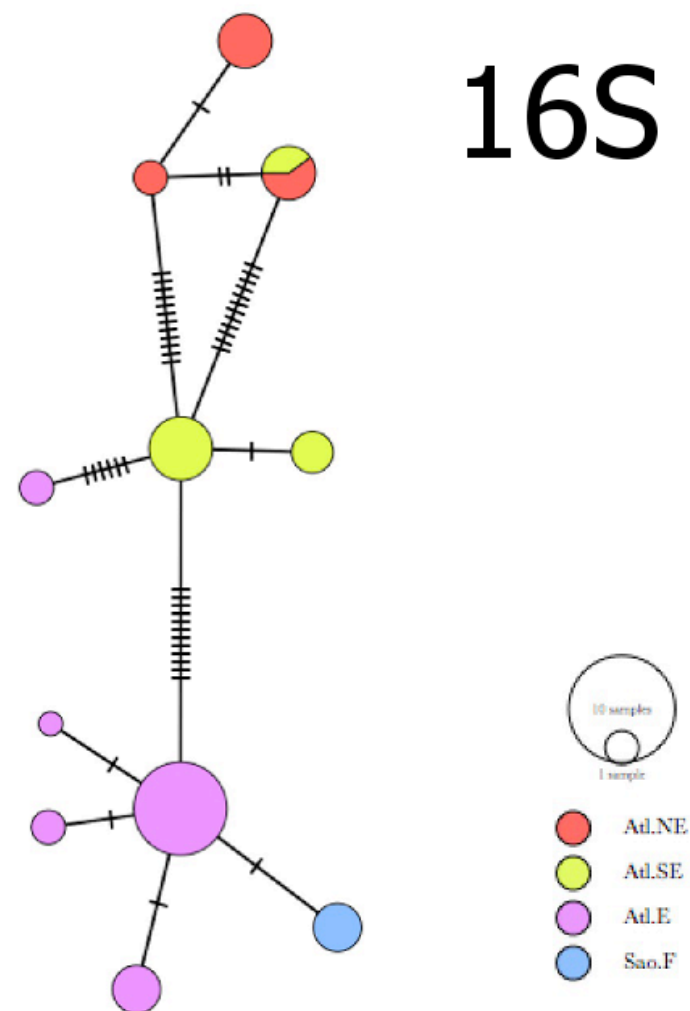
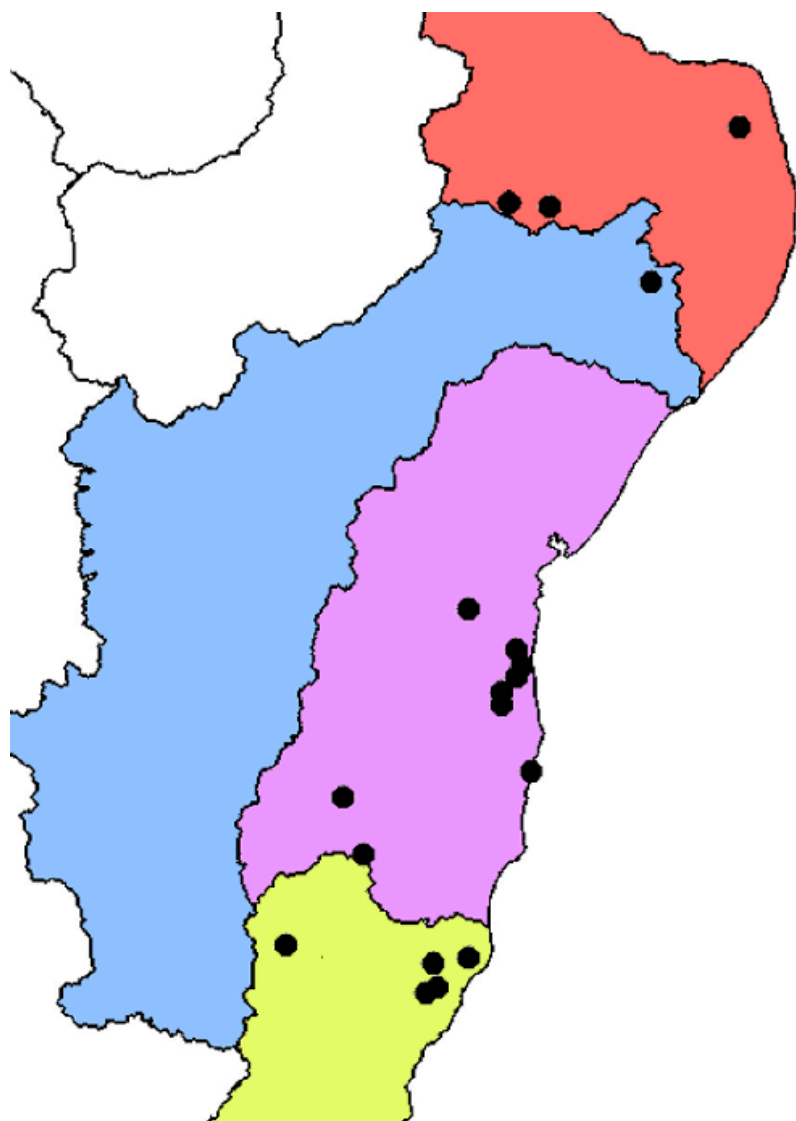


Figura 5. Rede de haplótipos do gene 16S. O tamanho dos círculos é diretamente proporcional ao número de amostras que o haplótipo representa. O número de passos mutacionais está representado por traços nas linhas que ligam os haplótipos vizinhos.

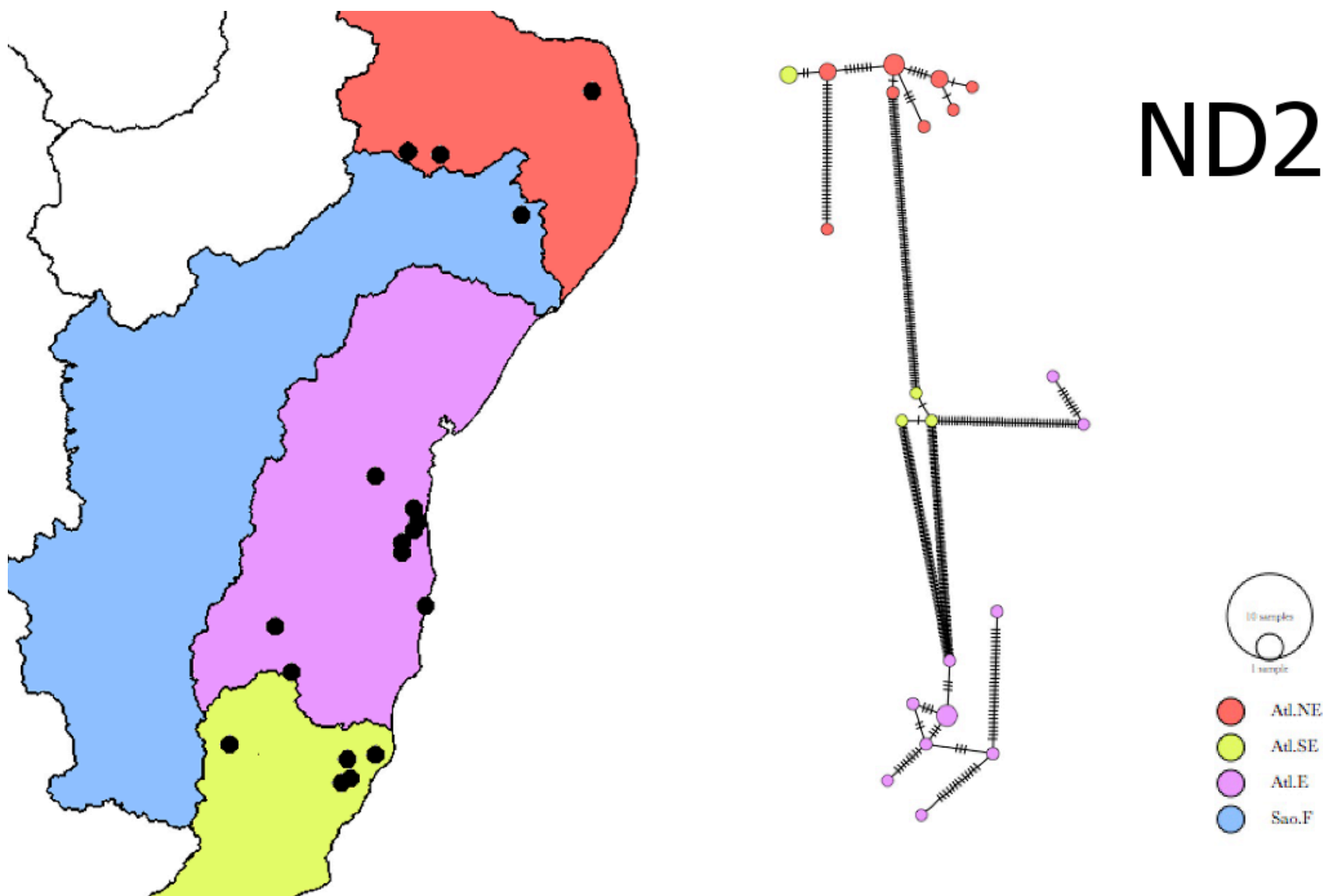


Figura 6. Rede de haplótipos do gene ND2. O tamanho dos círculos é diretamente proporcional ao número de amostras que o haplótipo representa. O número de passos mutacionais está representado por traços nas linhas que ligam os haplótipos vizinhos.

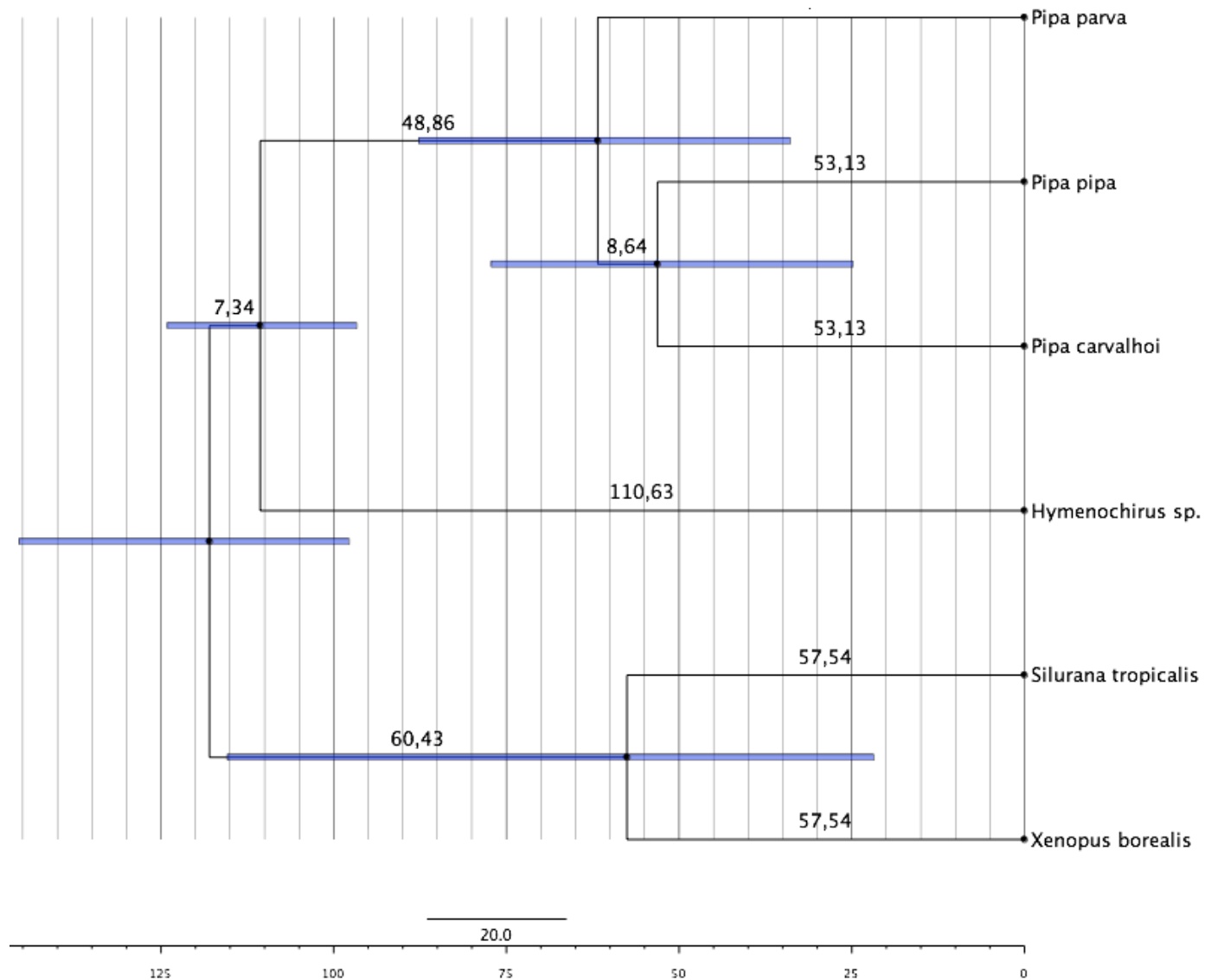


Figura 7. Árvore com datação por Relógio Molecular baseados nas sequências de 12S. Os representam o tempo para cada ramo em milhões de anos. As barras azuis representam intervalo de confiança de 95%.

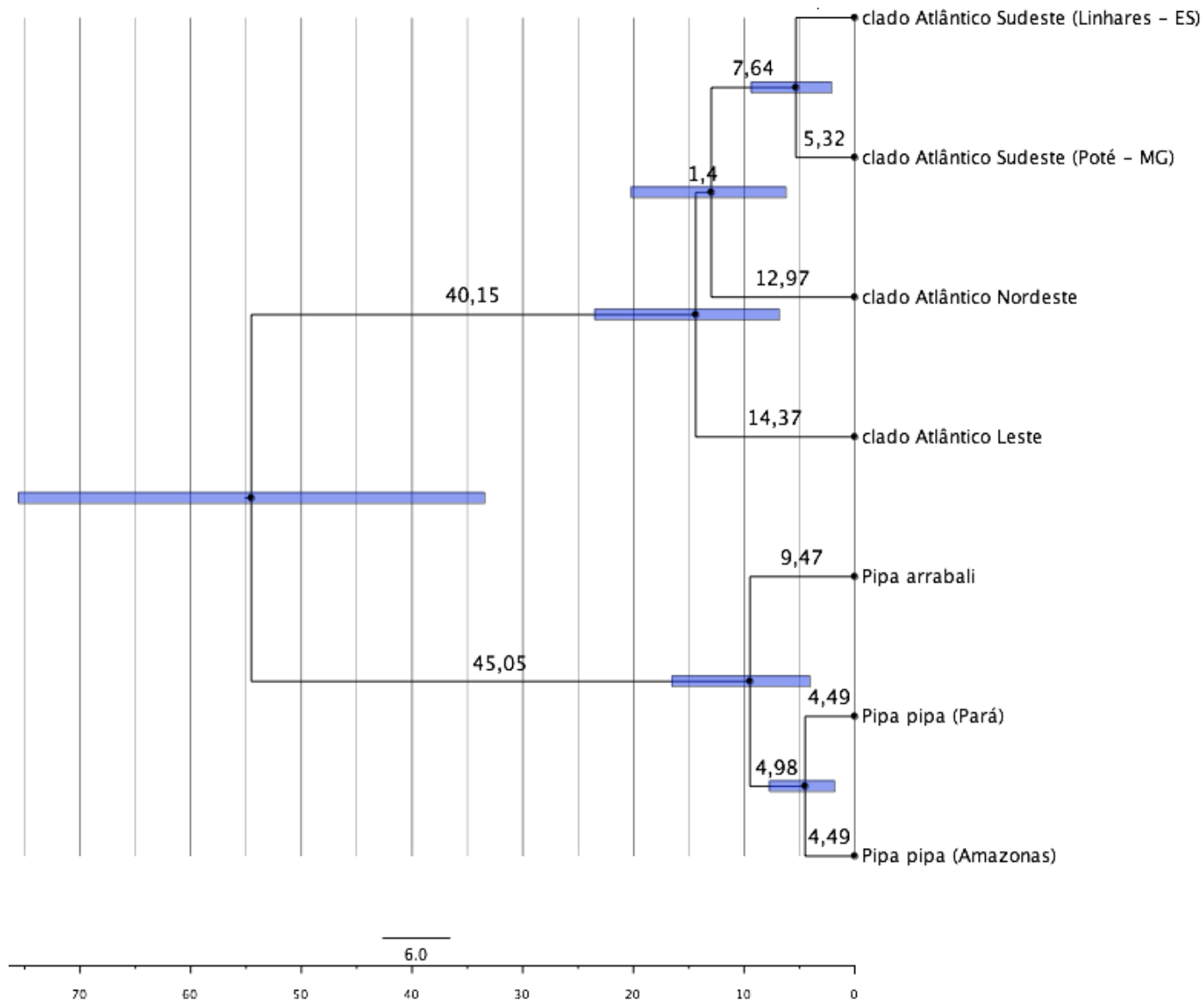


Figura 8. Árvore com datação por Relógio Molecular baseados na matriz concatenada. Os representam o tempo para cada ramo em milhões de anos. As barras azuis representam intervalo de confiança de 95%.

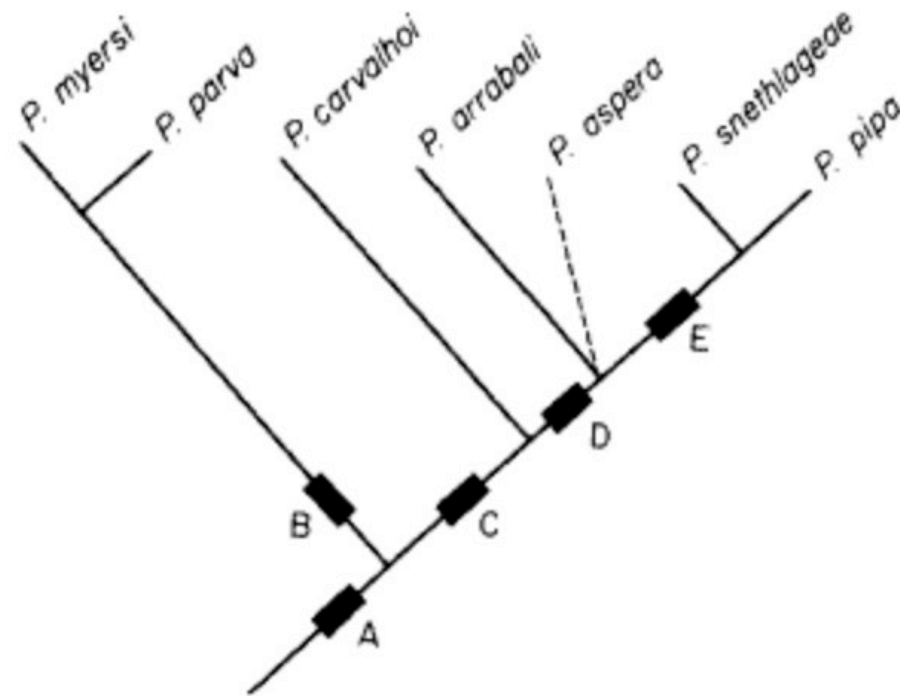


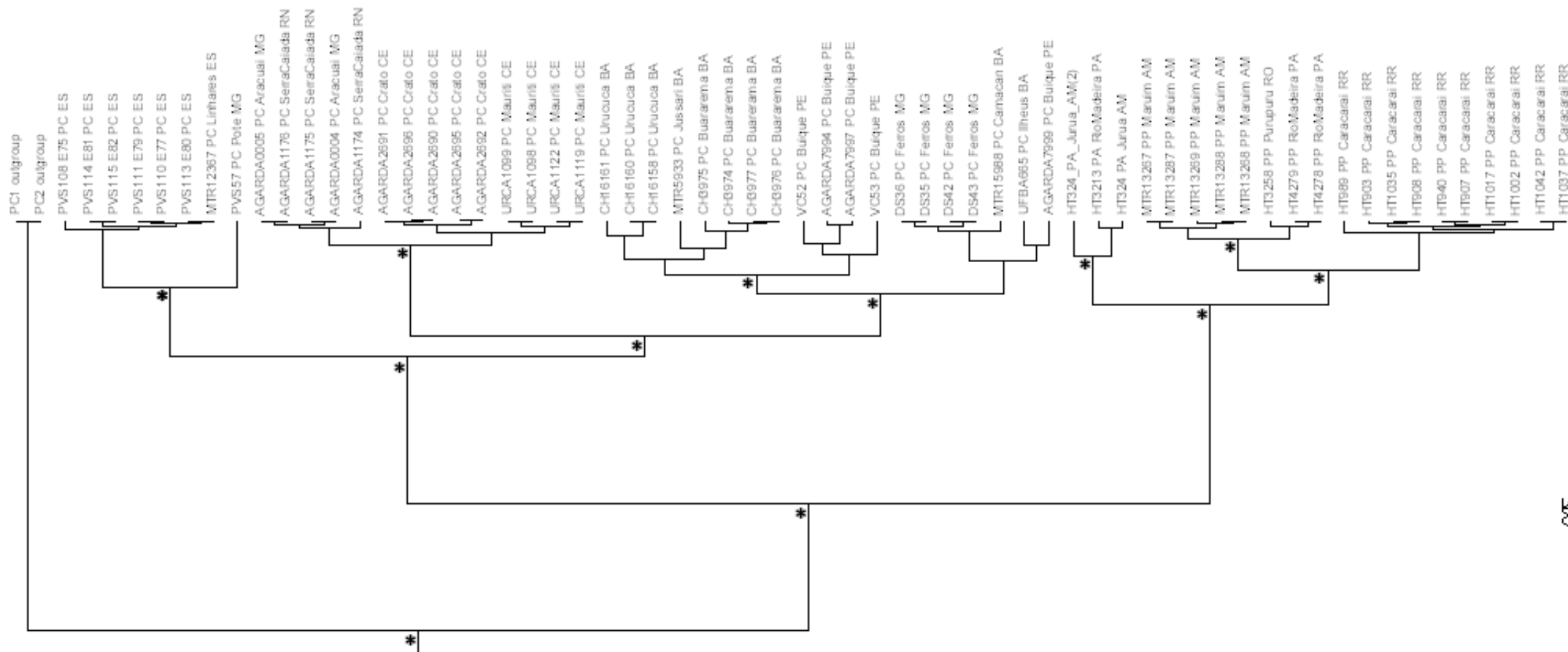
Figura 9. Relação de parentesco entre espécies de *Pipa* proposta por Trueb & Cannatella, 1986.

APÊNDICES

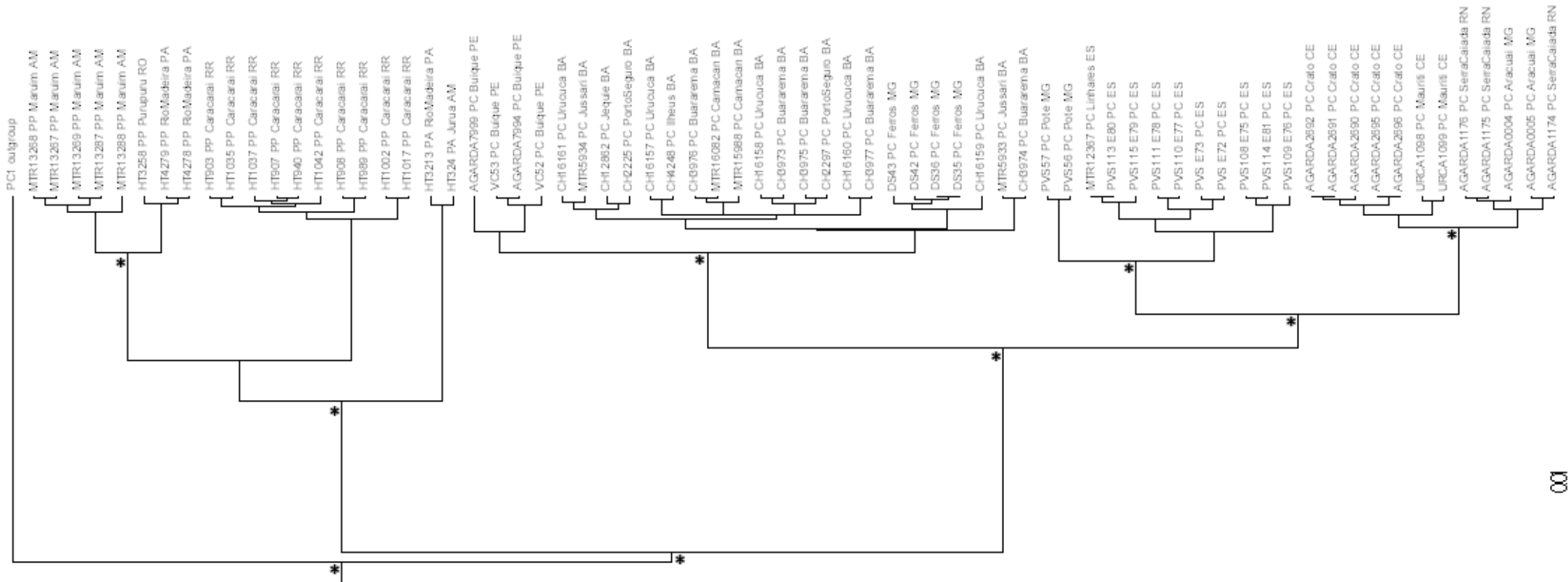
APÊNDICE 1: Lista sequências de 12S obtidas no GenBank para as análises de relógio molecular. As siglas correspondem aos números de acesso do GenBank.

Espécie	Acesso Genbank
<i>Pseudhymenochirus merlini</i>	NC_015618.1
<i>Hymenochirus boettgeri</i>	NC_015615.1
<i>Silurana tropicalis</i>	NC_006839.1
<i>Xenopus borealis</i>	NC_018776.1
<i>Pipa pipa</i>	GQ244477.1
<i>Pipa carvalhoi</i>	NC_015617.1
<i>Pipa parva</i>	AY581622.1

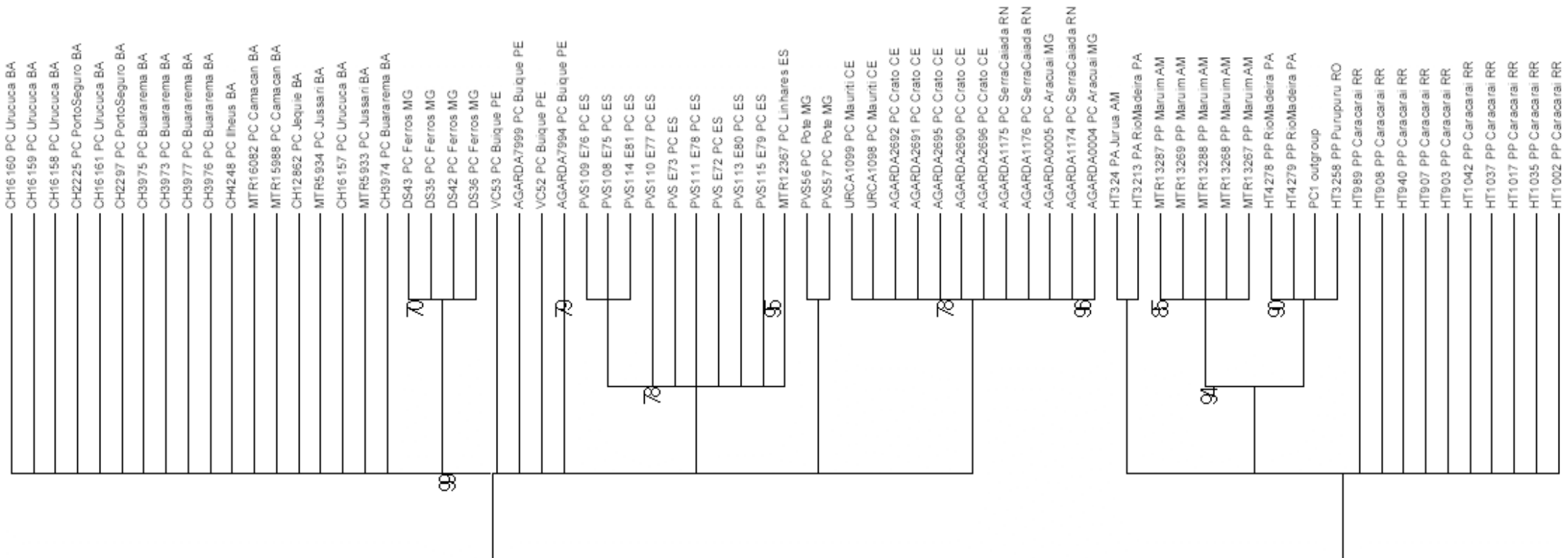
APÊNDICE 2: Árvore de Inferência Bayesiana (IB) de 12S. Os nós marcados com asterisco (*) possuem probabilidade posterior maior que 0,95.



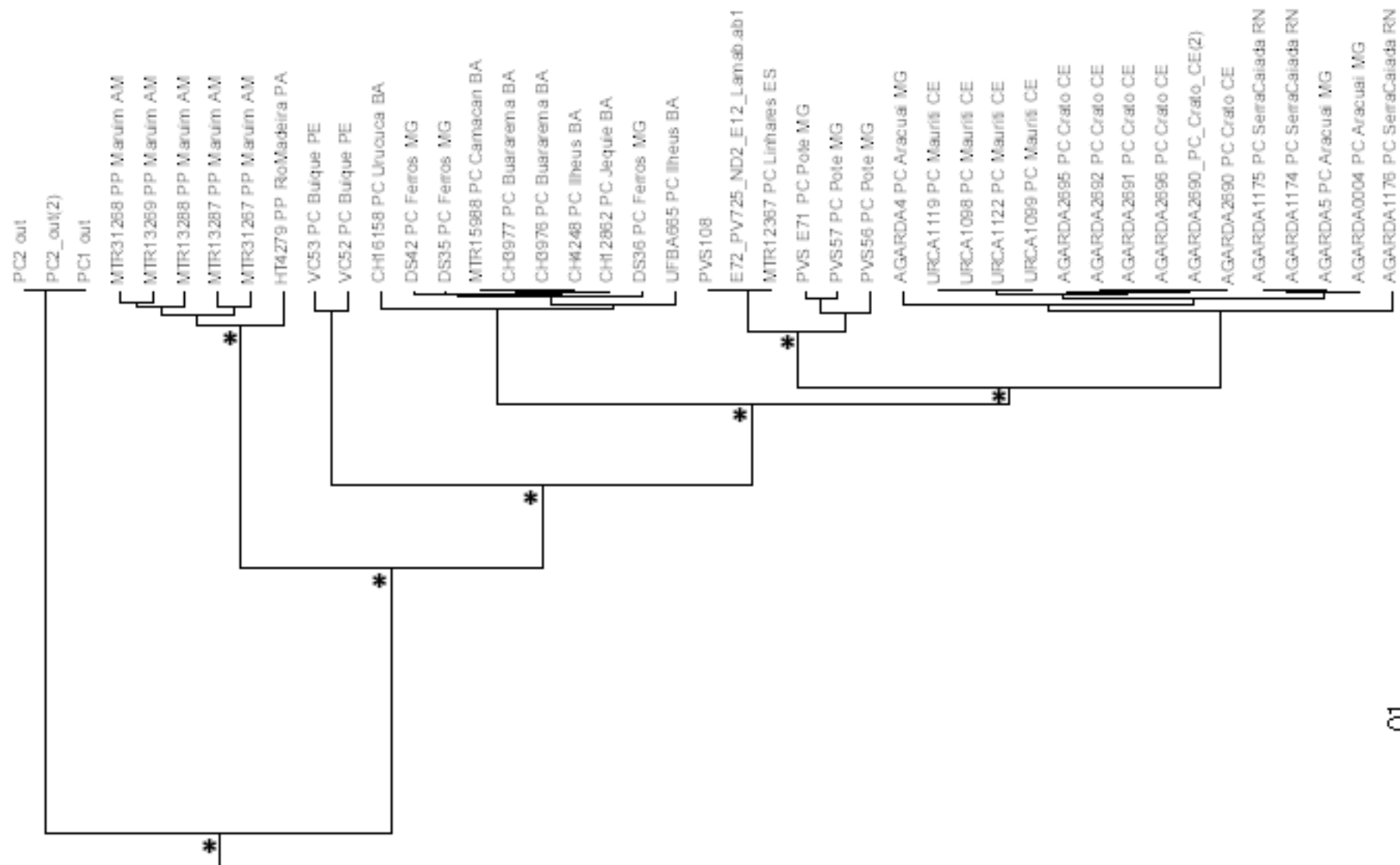
APÊNDICE 4: Árvore de Inferência Bayesiana (IB) de 16S. Os nós marcados com asterisco (*) possuem probabilidade posterior maior que 0,95.



APÊNDICE 5: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) de 16S. Os valores dos nós correspondem ao *bootstrap*.

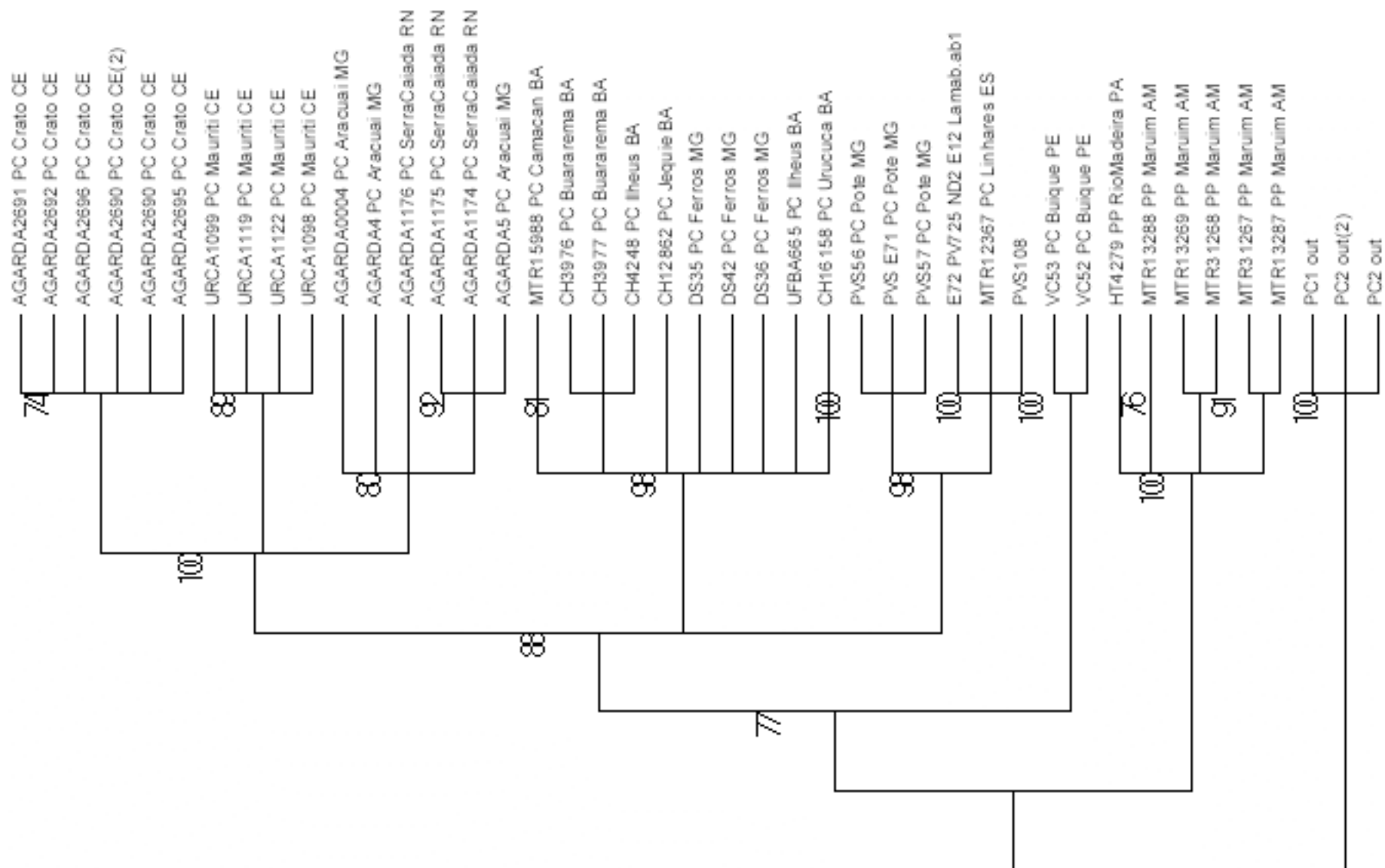


APÊNDICE 6: Árvore de Inferência Bayesiana (IB) de ND2. Os nós marcados com asterísco (*) possuem probabilidade posterior maior que 0,95.



01

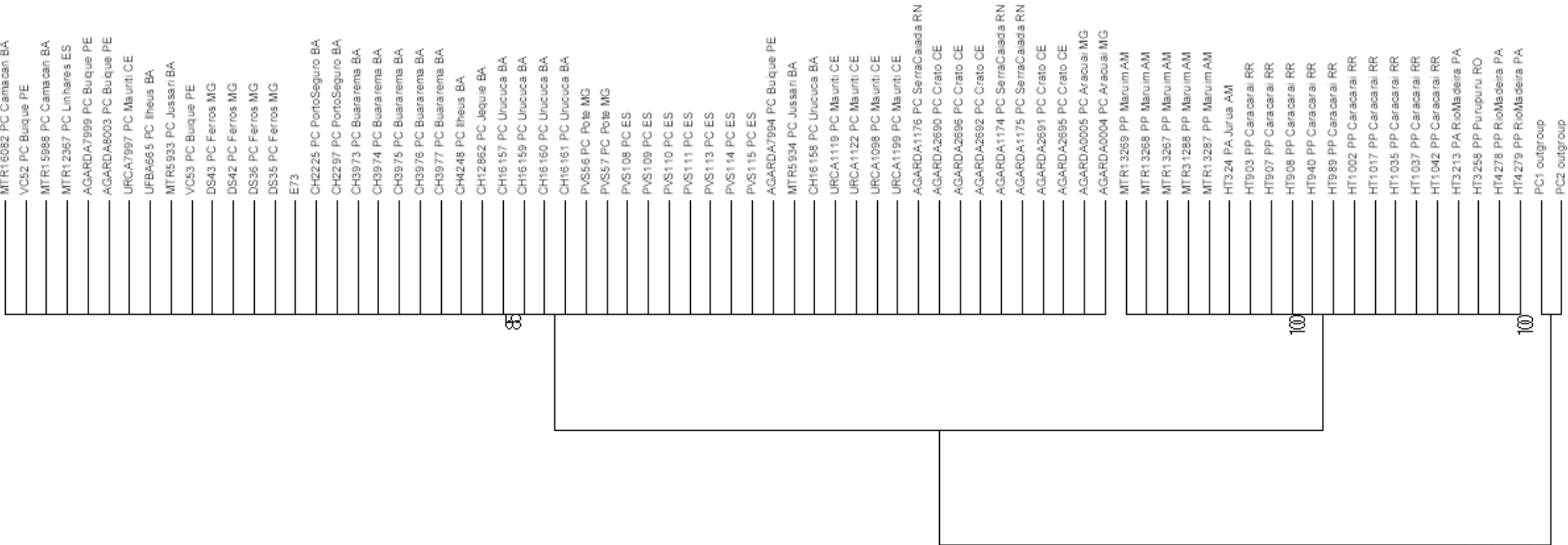
APÊNDICE 7: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) de ND2. Os valores dos nós correspondem ao *bootstrap*.



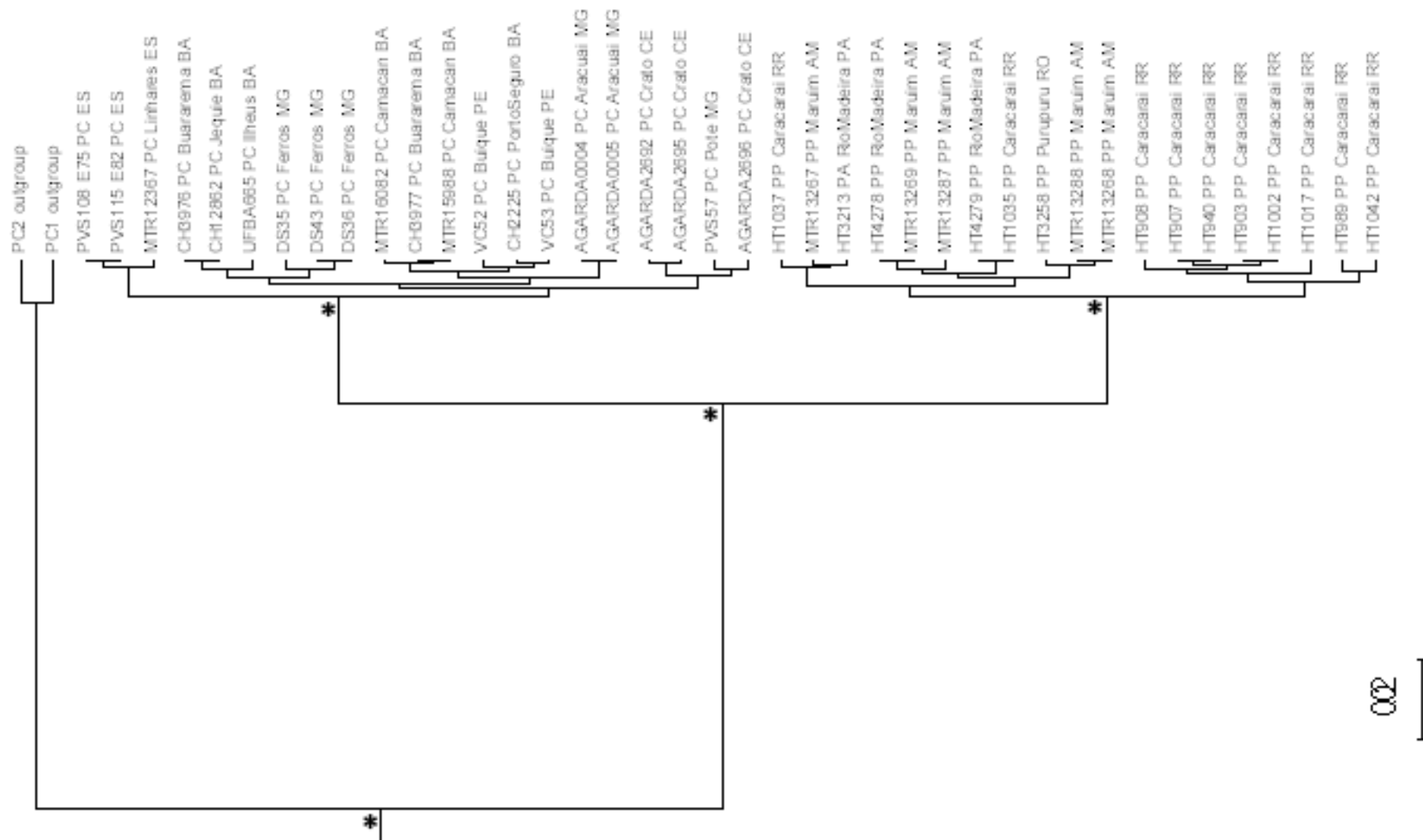
APÊNDICE 8: Árvore de Inferência Bayesiana (IB) de SIA. Os nós marcados com asterisco (*) possuem probabilidade posterior maior que 0,95.



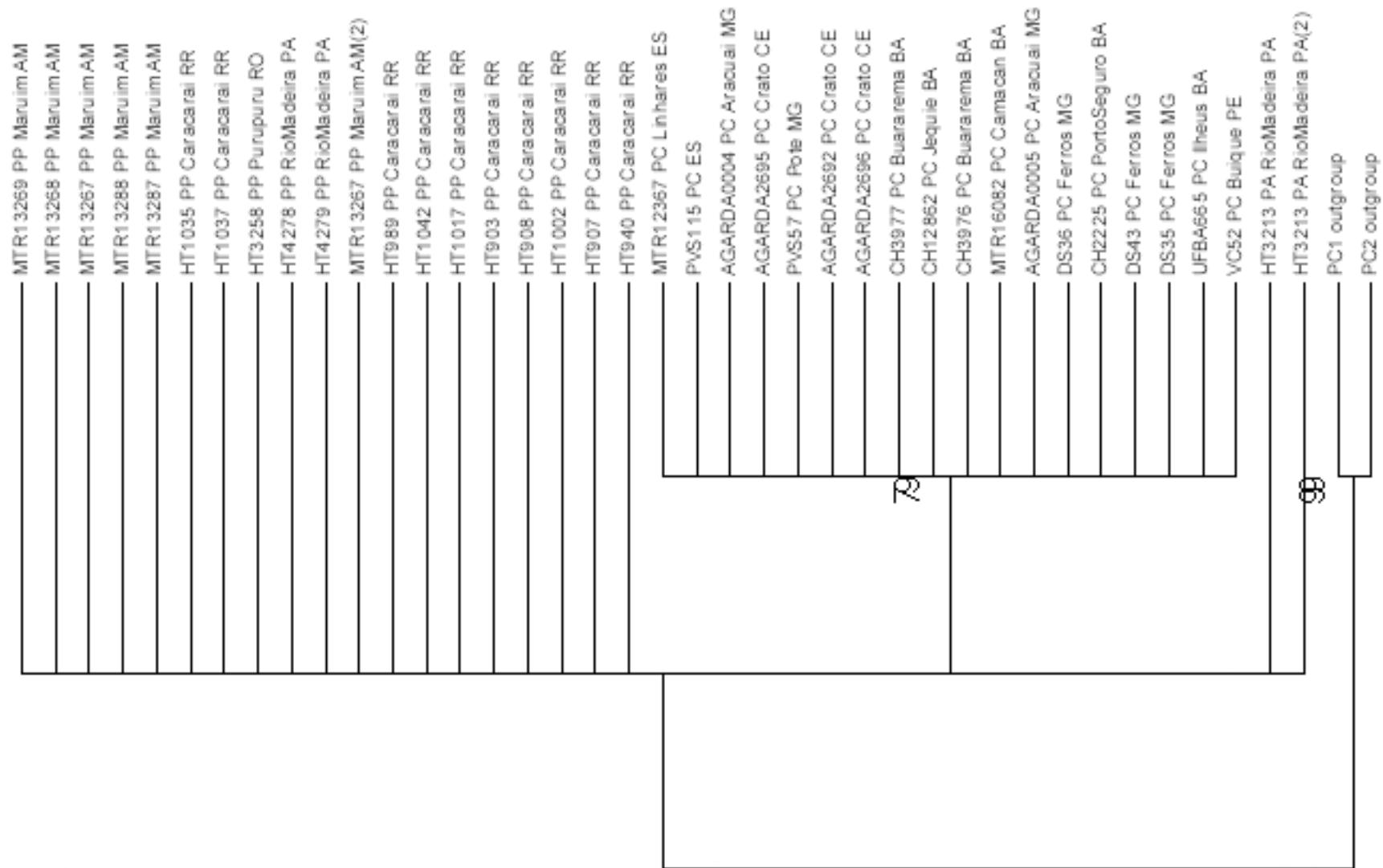
APÊNDICE 9: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) de SIA. Os valores dos nós correspondem ao *bootstrap*.



APÊNDICE 10: Árvore de Inferência Bayesiana (IB) de TYR. Os nós marcados com asterísco (*) possuem probabilidade posterior maior que 0,95.



APÊNDICE 11: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) de TYR. Os valores dos nós correspondem ao *bootstrap*.



APÊNDICE 13: Árvore de Máxima Verossimilhança (MV) dos dados concatenados. Os valores dos nós correspondem ao *bootstrap*.

