

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

**Filogeografia dos anuros *Aparasphenodon brunoi* e  
*Physalaemus crombiei* na Região Central da Mata  
Atlântica**

**Caio Simão de Lima**

**Vitória - ES**  
**Fevereiro, 2012**

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

**Filogeografia dos anuros *Aparasphenodon brunoi* e  
*Physalaemus crombiei* na Região Central da Mata  
Atlântica**

**Caio Simão de Lima**

**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. Orientadora: Profa. Dra. Leonora Pires Costa**

**Vitória - ES  
Fevereiro, 2012**

**Dedico esse trabalho a minha família. Sempre presente.**

## **Agradecimentos**

Agradeço à Leonora Pires Costa por ter aceitado me orientar e ter contribuído tanto com o trabalho, sempre com um olhar diferente.

À Leonora Pires Costa e Yuri Leite pela maneira como administram o laboratório garantindo as condições para que trabalhos como este sejam desenvolvidos.

A João Tonini pela ajuda no meu treinamento nos métodos laboratoriais, pela colaboração e discussão a respeito de pontos do trabalho em todo o tempo do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa disponibilizada ao longo dos dois anos de pós-graduação.

A todos os integrantes do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia (LaMaB), por colaborações diversas, além de outros companheiros em outros laboratórios da UFES.

À Juliana Justino, pela ajuda e constante troca de idéias sobre otimização dos métodos laboratoriais empregados no trabalho.

A Célio Fernando Baptista Haddad, Miguel Trefaut e Valéria Fagundes, pelas amostras cedidas utilizadas neste estudo. Fundamentais para o trabalho.

## Lista de Tabelas – Anexo I

- Tabela 1.** Tabela referente aos dados de genética populacional para *A. brunoi* e *P. crombiei* para ambos os genes.....**pag. 57**
- Tabela 2.** Tabela referente aos índices de divergência genética para *A. brunoi* (ND2).....**pag. 57**
- Tabela 3.** Tabela referente aos índices de divergência genética para *A. brunoi* (COI).....**pag. 58**
- Tabela 4.** Tabela referente aos índices de divergência genética para ambos os genes em *P. crombiei*..... **pag. 59**
- Tabela 5.** Tabela referente aos dados do relógio molecular para *A. brunoi* e *P. crombiei*.....**pag. 59**
- Tabela 6.** Tabela referente às localidades de origem das amostras, suas coordenadas e dados secundários para *A. brunoi*.....**pag. 60**
- Tabela 7.** Tabela referente às localidades de origem das amostras, suas coordenadas e dados secundários para *P. crombiei*.....**pag. 61**

## Lista de Figuras – Anexo I

- Figura 1.** Filogenia obtida na análise bayesiana para gene ND2 em *A. brunoi*.....**pag. 63**
- Figura 2.** Filogenia obtida na análise bayesiana para gene COI em *A. brunoi*.....**pag. 64**
- Figura 3.** Filogenia obtida na análise bayesiana para gene ND2 em *P. crombiei*.....**pag. 65**
- Figura 4.** Filogenia obtida na análise bayesiana para gene COI em *P. crombiei*.....**pag. 66**
- Figura 5.** Mapas dos paleomodelos obtidos para *A. brunoi* e *P. crombiei*.....**pag. 67**
- Figura 6.** Mapas do paleomodelo de áreas estáveis obtido para *A. brunoi* .....**pag. 68**
- Figura 7.** Mapas do paleomodelo de áreas estáveis obtido para *P. crombiei*.....**pag. 69**
- Figura 8.** Rede de haplótipos para o gene ND2 em *A. brunoi*.....**pag. 70**
- Figura 9.** Rede de haplótipos para o gene COI em *A. brunoi*.....**pag. 71**
- Figura 10.** Rede de haplótipos para o gene ND2 em *P. crombiei*.....**pag. 72**

**Figura 11.** Rede de haplótipos para o gene COI em *P. crombiei*.....pag. 73

## **Anexo II**

Perfis de PCR realizados no trabalho.....pag. 75

Grupos externos e seus números do GenBank.....pag. 75

## Resumo

Trabalhos filogeográficos vêm sendo bem sucedidos em encontrar padrões e sugerir refúgios históricos ao combinar dados de diversidade e distribuição de linhagens genéticas a modelos de paleodistribuição das espécies. Neste estudo foram utilizados dois marcadores moleculares, ND2 e COI, para examinar a diferenciação genética e distribuição histórica de *Aparasphenodon brunoi* e *Physalaemus crombiei*, duas espécies de anuros endêmicos da Mata Atlântica, através de análises filogeográficas combinadas à construção de modelos de distribuição de espécies nas condições atuais e paleoclimáticas. Foi verificada divergência genética geograficamente estruturada nas duas espécies, com alguns limites coincidindo com divisões já verificadas para anfíbios e outros grupos animais na região central da Mata Atlântica. Os refúgios propostos nos modelos paleoclimáticos para ambas as espécies suportam a idéia da fragmentação de habitats durante o Quaternário. Os resultados obtidos apontam a região central do Espírito Santo como uma área historicamente instável, e sugere-se recente expansão populacional nessa área. As análises demonstram que espécies com distribuição geográfica atualmente semelhante, podem ter tido sua história evolutiva influenciada por processos históricos distintos.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>pag. 08</b>
<b>1.1 Padrões e processos geradores da diversidade na Mata Atlântica.....</b>	<b>pag. 08</b>
<b>1.2 Filogeografia x Herpetofauna na Mata Atlântica.....</b>	<b>pag. 09</b>
<b>1.3 Taxons Testados.....</b>	<b>pag. 10</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>pag. 12</b>
<b>2.1 Amostras Populacionais.....</b>	<b>pag. 12</b>
<b>2.2 Métodos Moleculares.....</b>	<b>pag. 12</b>
<b>2.3 Análises filogenéticas e biogeográficas.....</b>	<b>pag. 13</b>
<b>2.4 Modelos Paleoclimáticos.....</b>	<b>pag. 14</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>pag. 15</b>
<b>3.1 Padrões Haplotípicos para o gene ND2 em <i>Aparasphenodon brunoi</i>.....</b>	<b>pag. 16</b>
<b>3.2 Padrões Haplotípicos para o gene de COI em <i>Aparasphenodon brunoi</i>.....</b>	<b>pag. 17</b>
<b>3.3 Padrões Haplotípicos para o gene ND2 em <i>Physalaemus crombiei</i>.....</b>	<b>pag. 18</b>
<b>3.4 Padrões Haplotípicos para o gene COI em <i>Physalaemus crombiei</i>.....</b>	<b>pag. 19</b>
<b>3.5 Mapas das Áreas Historicamente Estáveis.....</b>	<b>pag. 20</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>pag. 20</b>
<b>4.1 Padrões encontrados em <i>Aparasphenodon brunoi</i> na região central da Mata Atlântica.....</b>	<b>pag. 20</b>
<b>4.2 Padrões encontrados em <i>Physalaemus crombiei</i> na região central da Mata Atlântica.....</b>	<b>pag. 25</b>
<b>4.3 Considerações históricas sobre a Mata Atlântica e coerência geográfica observada nos padrões filogeográficos encontrados para <i>Aparasphenodon brunoi</i> e <i>Physalaemus crombiei</i>.....</b>	<b>pag. 27</b>
<b>4.4 Tempo de divergência estimado com o relógio molecular entre os clados encontrados para <i>Aparasphenodon brunoi</i> e <i>Physalaemus crombiei</i>.....</b>	<b>pag. 35</b>
<b>4.5 Modelos paleoclimáticos e a distribuição histórica de <i>Aparasphenodon brunoi</i> e <i>Physalaemus crombiei</i> na região central da Mata Atlântica.....</b>	<b>pag. 37</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>pag. 46</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>pag. 47</b>



## 1. Introdução

### 1.1 Padrões e processos geradores da diversidade na Mata Atlântica

A Mata Atlântica brasileira é um dos ecossistemas de maior biodiversidade no mundo (Myers et al., 2000). Apesar disso, continua sofrendo grande impacto pelo desmatamento, restando atualmente cerca de 7% a 8% de sua área original (SOS Mata Atlântica & INPE, 1993; Galindo-Leal & Câmara, 2003). O *status* de ecossistema megadiverso deixa evidente a importância de se estudar os processos causadores dessa diversidade. No entanto, os padrões de endemismo e a filogeografia das espécies da Mata Atlântica, dentre estas a diversificada fauna de anuros, apresentam-se pobremente conhecidos em comparação a outras áreas (Avise & Johns, 1998). Pode-se dizer que são relativamente recentes estudos comparativos em toda a região neotropical, se comparados aos disponíveis para o hemisfério norte, que tem seus padrões e processos causadores da diversificação de suas espécies já bem investigados (Avise & Johns, 1998; Carnaval & Bates, 2007; Fouquet et al., 2007).

Estudos filogeográficos desenvolvidos na Mata Atlântica vêm sendo bem sucedidos em encontrar padrões de especiação e seus processos causadores nos diferentes grupos animais (Carnaval, 2002; Pellegrino et al., 2005; Graziotin et al., 2006; Carnaval et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2009), porém um padrão geral ainda é alvo de constante debate nessa área (Costa, 2003; Cabanne et al., 2007, Carnaval & Moritz, 2008; Thomé et al., 2010). A hipótese clássica, mais recorrente e bem conhecida é a da existência passada de Refúgios Pleistocênicos (Vanzolini & Williams, 1970; Heyer & Maxson, 1982; Resende et al., 2010; Martins, 2011), que assume a possibilidade de que oscilações climáticas, com épocas frias e secas (períodos glaciais) intercaladas a períodos quentes e chuvosos (interglaciais), ao longo do Pleistoceno causaram a retração das matas e sua posterior regressão. Portanto, durante os períodos glaciais as matas reduziam-se a ilhas, isolando populações de espécies, o que favorecia sua diferenciação. Já em épocas de clima favorável, as matas expandiam seu território e se conectavam novamente, o que permitia a expansão das populações das espécies antes isoladas.

Ainda que bem aceita como causadora da diversidade em várias regiões biogeográficas (Mayr & O'Hara, 1986; Avise & John, 1998; Carnaval et al., 2009; Martins, 2011), os Refúgios Pleistocênicos não parecem ter sido os únicos geradores da especiação na Mata Atlântica. Estudos paleopolinológicos (Behling & Negrelle 2001;

Behling, 2002a), geológicos (Dominguez et al., 1981; Mello et al., 1999) e filogeográficos (Zamudio & Greene, 1997; Pellegrino et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2009) vêm apontando para a ocorrência de oscilações climáticas e fragmentação das matas também durante o Plioceno e Holoceno, além de outros fatores históricos como variações nos níveis dos mares e eventos neotectônicos ao longo da história da Mata Atlântica. Adicionalmente, vários eventos de diversificação de vertebrados, datados pelo método molecular, apontam para épocas geológicas anteriores à formação de tais refúgios pleistocênicos (Costa, 2003; Leite, 2003; Pellegrino et al., 2005; Vallinoto et al., 2009; Costa & Leite, *in press*).

### **1.2 Filogeografia x Herpetofauna na Mata Atlântica**

O Brasil possui a maior riqueza de espécies de anfíbios do mundo. São 877 espécies (SBH, 2011), das quais, quase 400 ocorrem na mata Atlântica (Duellman, 1999). Ainda assim, poucos trabalhos têm buscado identificar os padrões de distribuição geográfica das espécies, bem como os fatores históricos determinantes para a ocorrência de tais padrões. Os anfíbios são animais sensíveis às características físico-químicas de seu ambiente e, especialmente em espécies florestais, sua ocorrência é bastante pontual, o que as torna mais sujeitas a flutuações populacionais, assim como reduz sua capacidade de dispersão, fazendo com que sua distribuição geográfica seja mais influenciada por fatores históricos do que ecológicos (Avise, 2000; Graham et al., 2006). Devido a essa baixa vagilidade, os anfíbios geralmente apresentam divergência genética marcada entre populações (Vázquez-Dominguez, 2007), o que pode indicar que espécies diferentes, ocupando uma mesma região, possam ser influenciadas por fatores históricos comuns e apresentem padrões filogeográficos semelhantes.

Trabalhos de filogeografia já identificaram marcada estruturação genética ao longo da distribuição de espécies de anuros (Fouquet et al., 2007; Carnaval et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2009), serpentes (Wüster et al., 2005; Graziotin et al., 2006) e lagartos (Pellegrino et al., 2005) na Mata Atlântica, quase sempre evidenciando eventos históricos ocorridos durante o Quaternário como causadores da distribuição observada entre as unidades filogeográficas. Além disso, tais estudos também têm se mostrado eficazes no auxílio a estudos sistemáticos, contribuindo para a redefinição de espécies crípticas. Ao combinar métodos de filogeografia e filogenética molecular para o estudo do grupo de espécies *Scinax ruber* e *Rhinella margaritifera*, Fouquet et al., (2007),

encontraram 6 linhagens diferentes em *S. ruber* e 11 linhagens distintas em *R. margaritifera*, todas essas com possível mérito de espécie.

Os estudos filogeográficos têm demonstrado importante contribuição na investigação da história evolutiva da herpetofauna da Mata Atlântica, identificando prováveis sítios de refúgios e rotas de migração (Carnaval, 2002; Pellegrino et al., 2005; Grazziotin et al., 2006; Carnaval et al., 2009, Fitzpatrick et al., 2009; Thomé et al., 2010). Carnaval & Moritz, (2008), investigaram, por meio de modelos paleoclimáticos, a distribuição da Mata Atlântica para o Quaternário tardio e encontraram indícios da existência histórica de refúgios de mata que se mantiveram estáveis ao longo das oscilações climáticas durante o Pleistoceno, com padrões de distribuição congruentes com dados palinológicos e com os centros de endemismo propostos na literatura para espécies de aves, mamíferos, bambus e plantas lenhosas. Ao investigar a filogeografia de três espécies de anfíbios da Mata Atlântica e comparar os resultados a modelos paleoclimáticos de estabilidade, Carnaval et al., (2009), encontraram forte estruturação entre as unidades filogeográficas intraespecíficas e verificaram padrões congruentes entre os refúgios obtidos no modelo e a estruturação observada, além de ramos mais longos nos filogramas para indivíduos provenientes de áreas preditas como estáveis, indicando seu endemismo genético. Ambos os trabalhos de modelagem paleoclimática supracitados verificaram refúgios na porção norte da Mata Atlântica, Bahia e Pernambuco, enquanto na porção sul foram detectadas áreas estáveis, geralmente menores, em partes do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

### **1.3 Taxons testados**

As espécies de anuros empregados neste trabalho foram *Aparasphenodon brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920 (Hylidae) e *Physalaemus crombiei* Heyer & Wolf, 1989 (Leiuperidae). Essas espécies, distantes filogeneticamente, possuem modos de vida diferentes, tais como local e estratégia de reprodução e local para forrageio, o que pode sugerir que esses táxons responderam de maneira diferente a eventos biogeográficos e paleoclimáticos. Portanto, pretende-se verificar, se acontecimentos históricos marcantes resultaram em padrões filogeográficos semelhantes para estes táxons. A filogeografia comparada representa uma importante ferramenta para se testar as respostas conjuntas de táxons aos fatores que modificaram o ambiente ocupado e, sobretudo quando comparada a modelos paleoclimáticos, provê informações valiosas sobre a distribuição

das espécies nos diferentes modelos de paleoclimas gerados (Hugall et al., 2002; Carnaval et al., 2009)

*Aparasphenodon brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920 possui como característica marcante, entre os anfíbios, uma hiperossificação no topo da cabeça, que é observada em todo o gênero. Tal estrutura incrustada no crânio dá a sua cabeça o formato de um capacete e protege o animal contra predadores enquanto está escondido em axilas de bromélias ou buracos em bambus (Trueb, 1970; Duellman & Trueb, 1994). A característica de usar a cabeça para selar as aberturas dos esconderijos, conhecida como *phargmosis*, é também uma adaptação que reduz perda de água por evaporação (Trueb, 1970; Andrade & Abe, 1997). O gênero *Aparasphenodon* é composto, atualmente, por quatro espécies. Três delas ocorrem na costa atlântica (Bahia até Santa Catarina, ver Frost, 2012) e uma espécie é conhecida para uma região na Venezuela (ver Trueb, 1970; Frost, 2012).

*Aparasphenodon brunoi* ocupa, predominantemente, áreas costeiras desde o litoral norte de São Paulo, passando pelos estados de Rio de Janeiro, Espírito Santo até a costa da Bahia (Argôlo, 2000; Frost, 2012). Curiosamente, *A. brunoi* é encontrada também a cerca de 290Km da costa, no Parque Estadual do Rio Doce (PERD) em Minas Gerais (Feio et al., 1998; Rievers, 2010), onde a espécie faz parte da lista de espécies ameaçadas do estado. Feio et al., (1998) comentam que *A. brunoi* ocorre num local restrito do PERD, o que possivelmente se deve à abundância de bromélias e bambus nesse local. É uma das maiores espécies bromelícolas, que utiliza as bromeliáceas para esconderijo diurno e local de forrageio, podendo atingir cerca de 80 mm de comprimento. As fêmeas depositam seus ovos principalmente em poças formadas em buracos no solo durante a estação chuvosa (Teixeira et al., 2002).

*Physalaemus crombiei* Heyer & Wolf, 1989 é uma espécie de porte pequeno, podendo chegar a pouco mais de 20 mm de comprimento (Haddad & Sazima, 2004). Ocupa o chão da mata e geralmente vive na serrapilheira, próxima a alagados e córregos (Prado & Pombal Jr., 2005; Pupin et al., 2010), ocupando preferencialmente o interior das matas (Peixoto & Pimenta, 2004). Espécies de *Physalaemus* reproduzem-se depositando seus ovos em ninhos de espuma (Haddad & Prado, 2005). Em *P. crombiei* os ovos são depositados no chão úmido da mata, próximo a poças formadas em épocas de chuva, o que indica menor dependência de ambientes aquáticos para reprodução (Haddad & Prado, 2005; Pupin et al., 2010). Essa espécie pertence ao complexo do grupo *signifer* (Nascimento et al., 2005), que agrupa espécies crípticas comumente

encontradas em simpatria e sintopia (Almeida et al., 2011). Até recentemente, *P. crombiei* era conhecida apenas para o município de Santa Teresa, Espírito Santo, sua localidade tipo (Rievers, 2010; Pupin et al., 2010). Porém, é atualmente registrada em áreas de montanha e baixada desde o sul do Espírito Santo até o extremo sul da Bahia (Peixoto & Pimenta, 2004; Tonini et al., 2011; Almeida et al., 2011; Frost, 2012), já tendo sido registrada em área de altitude em Minas Gerais (Rievers, 2010; São-Pedro & Feio, 2011).

Ambas as espécies carecem de dados a respeito de sua história evolutiva e de explicações para seus padrões de distribuição. Vale ressaltar a ocorrência de ambas em terras baixas do litoral, bem como em matas do interior da Mata Atlântica e em diferentes altitudes. Rievers, (2010), investigou a anurofauna da serrapilheira do PERD e chamou atenção para o criptismo entre *P. crombiei* e *P. obtectus* Bookermann, 1966. Na ocasião, assumiu ter encontrado *Physalaemus* sp. (cf. *crombiei*) com base em diferenças no canto (Santos et al., 2009) entre os dois morfotipos observados.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Amostras Populacionais**

Os tecidos muscular e hepático, conservados em etanol, utilizados nas análises genéticas ao longo do estudo foram obtidos junto a Coleção de Tecidos e DNA da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no Laboratório de Genética Animal (LGA) da UFES, na coleção “Célio Fernando Batista Haddad” (CFBH) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e amostras cedidas pelo Dr. Miguel Trefaut Rodrigues (MTR) da Universidade de São Paulo.

Para *Aparasphenodon brunoi* foram obtidas 26 amostras de 13 localidades no RJ, ES, MG e BA e para *Physalaemus crombiei* foram utilizadas 42 amostras de 8 localidades distribuídas pelo ES. Todas as amostras utilizadas neste estudo são provenientes de coleções idôneas vinculadas a universidades brasileiras, cujos pesquisadores responsáveis, assim como os depositantes de espécimes verificados, possuem experiência na identificação das espécies envolvidas, valendo-se, portanto ressaltar a confiabilidade na identificação das espécies alvo utilizadas nas análises. Os *vouchers* das amostras obtidas na UFES foram verificados pelo próprio autor em conjunto com especialistas.

### **2.2 Métodos Moleculares**

As amostras de tecido foram submetidas ao protocolo de extração de DNA total usando sal de Medrano et al., (1990). Foi obtido um fragmento de 949pb do gene ND2 de 25 indivíduos e outro de 651pb do gene COI para 22 indivíduos de *A. brunoi* enquanto que para *P. crombiei* amplificou-se um fragmento de 930pb de ND2 para 40 indivíduos e 687pb do gene COI de 42 indivíduos.

Os genes ND2 e COI foram amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com *primers* específicos em um termociclador (Perfis das PCRs e primers em anexo pag. 72). O produto amplificado foi purificado com a enzima ExoSap e em seguida realizou-se a quantificação do produto purificado no espectrofotômetro NanoDrop.

As sequências foram obtidas no sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems, Inc.) do Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade da UFES e alinhadas pelo Clustal W no software MEGA 5.0 (Kumar et al., 1994). Parte das sequências foram obtidas por meio de serviço terceirizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

### **2.3 Análises filogenéticas e biogeográficas**

O melhor modelo mutacional calculado para os dados obtidos foi estimado no programa JModelTest (Posada, 2008)Em seguida, as afinidades filogenéticas foram verificadas pelos métodos de Inferência Bayesiana (IB), utilizando BEAST v1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007) e por Máxima Verossimilhança (MV) no programa MEGA 5 (Kumar et al., 1994). Para IB foi utilizada a Corrente de Markov Monte Carlo para 10 milhões de gerações, com árvores amostradas a cada 1000 gerações, descartando-se as 1000 primeiras como *burn-in*. Os valores de suporte da MV foram obtidos por meio de 1000 replicações de *bootstrap*, com árvore inicial obtida por busca heurística com Intercâmbio do Vizinheiro Mais Próximo. Os grupos externos empregados para as análises foram selecionados com a ferramenta BLAST (Altschul et al., 1997) no MEGA 5.0, escolhendo-se as sequencias geneticamente mais próxima disponível no GenBank (GB) (espécies e números do GB no Anexo II, pag. 73).

De forma a estimar a profundidade temporal que separa as linhagens foi calculado o relógio molecular, (Drummond et al., 2006) para o gene ND2 (0,957% mutações por milhões de anos; Crawford, 2003). Apenas o gene ND2 possui taxa de diversificação conhecida para anuros neotropicais. A opção de modelo do relógio molecular utilizada foi *relaxed clock uncorrelated lognormal*, pois não há registro fóssil

ou geológico para as espécies incluídas neste trabalho. Os resultados das análises foram verificados no Tracer v1.5 (Drummond & Rambaut, 2007). Dados estatísticos de genética populacional foram estimados com base nas sequências obtidas (Tabela 1), a fim de se verificar características de cada população e indícios de expansão populacional. Foram eles: diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica (h), testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989), e F de Fu (Fu, 1997) calculados no programa DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009). Para se evidenciar as relações entre os haplótipos, foram geradas redes de haplótipos no programa Network v4.6.1.0 (Bandelt et al., 1999).

A análise conjunta dos resultados foi utilizada na verificação da estruturação genética, níveis de divergência intra-específica e indicativos da existência de unidades filogeográficas nas populações.

## **2.4 Modelos Paleoclimáticos**

Para gerar os modelos de distribuição das espécies nas condições atuais e paleoclimáticas, nós compilamos dados de localidades do nosso próprio trabalho de campo, bases de dados on-line, coleções científicas e trabalhos científicos. Como *A. brunoi* e *P. crombiei* distribuem-se na maior parte ao longo da costa, mas também ocupam áreas do interior, todo o domínio da floresta atlântica foi utilizado nas projeções dos modelos. A distribuição de *A. brunoi* vai da região próxima de Itabuna, Bahia (S - 14,8015, -39,0365 W) até Ubatuba, São Paulo (-23,4340 S, -45,0860 W), enquanto *P. crombiei* distribui-se desde o mesmo limite norte até Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo (-20.8333 S, -41.0666 W). Portanto, o plano de fundo usado para as espécies é a área do bioma Mata Atlântica entre os dois municípios conhecidos como limites de sua distribuição. Registros duplicados, ou registros a até 10 km um do outro, foram considerados apenas uma vez para minimizar a autocorrelação espacial (Anderson & Raza, 2010).

Os modelos de distribuição das espécies foram executados com o algoritmo de máxima entropia utilizando-se o programa Maxent 3.3.3h (Phillips et al., 2006;. <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/MaxEnt/>), e treinados com dados climáticos de 19 variáveis bioclimáticas disponíveis na base de dados Worldclim (Hijmans et al., 2005;. <http://biogeo.berkeley.edu/worldclim/worldclim.htm>). Os modelos foram treinados usando o plano de fundo escolhido, e projetados em camadas climáticas das condições atuais (1950-2000), com resolução espacial de 1km, incluindo a Mata Atlântica inteira. Foram feitas projeções para os cenários paleoclimáticos da Última

Interglacial (LIG, 120.000 a.a. anos atrás) e da Última Glacial Máxima (LGM, 21.000 a.a.), previstas no Community Climate System Model (CCSM) com resolução espacial de 5km<sup>2</sup> (Hijmans et al., 2005; <http://biogeo.berkeley.edu/worldclim/worldclim.htm>). Considerou-se a interseção dos mapas como indicativo de zonas climaticamente estáveis (Waltari et al., 2007, Carnaval & Moritz 2008).

Foram realizados ajustes específicos para o tempo presente a fim de maximizar o desempenho dos modelos de cada espécie. Para evitar sobreprevisões ou aplicação de variáveis errôneas e encontrar o melhor modelo para o nosso conjunto de dados para o Maxent, testamos diferentes *features classes* e *regularization multipliers*. O melhor conjunto de parâmetros foi obtido observando-se as médias dos valores de 10% *omission rates* e *minimum training presence* (MTP) (Pearson et al., 2007), e a área sob a curva (AUC) da Operação curva característica do receptor (ROC), selecionando os menores valores de diferenças das médias entre os treinos e os testes de AUCs (Thomé et al., 2010). Os valores de MTP foram utilizados como limiar (*threshold*) para a presença das espécies no ambiente. Em seguida, o melhor conjunto de parâmetros foi usado para as projeções do clima passado.

### 3. Resultados

As árvores encontradas pela análise bayesiana e de verossimilhança apresentaram topologia semelhante e indicaram estruturação genética com expansão recente para as duas espécies na região central da Mata Atlântica. Todos os clados evidenciados apresentaram “confiabilidade posterior” superior a 95% na análise bayesiana e *bootstrap* superior a 90% na de verossimilhança.

Devido à grande semelhança na topologia das árvores encontradas, apenas os filogramas da análise bayesiana são reportados no trabalho. As árvores concatenadas apresentaram topologia idêntica às obtidas para o gene ND2 e por isso não são demonstradas. O arranjo de haplótipo nas redes é congruentes com os clados formados nas análises filogenéticas, indicando estruturação genética marcada nas populações das espécies analisadas (Figuras 8, 9, 10, 11). Tais dados recebem suporte também pelo teste D de Tajima (Tabela 1), que indicou expansão populacional em *A. brunoi*, concordando com os ramos curtos observados para essa espécie nos filogramas (Figura 1). Os valores do Teste de Mantel (valores não demonstrados) não foram significativos para indicar isolamento por distância, embora se observe que os índices de divergência genética apresentam-se maiores entre os clados mais distantes



### 3.1 Padrões Haplótípicos para o gene ND2 em *Aparasphenodon brunoi*

Os resultados encontrados para *A. brunoi* revelaram 19 haplótipos únicos. A diversidade haplotípica foi de 0,973 ( $\pm 0,019$ ) e a diversidade nucleotídica encontrada foi 0,03529 ( $\pm 0,01333$ ). O teste de neutralidade D de Tajima indicou expansão populacional (-1,97433) significante ( $P < 0,05$ ), enquanto F de Fu não resultou em valores significativos. (Tabela 1).

Cinco clados puderam ser identificados ao longo da área amostrada (Figura 1). O clado N reuniu haplótipos da BA, Caraíva e Prado, e do extremo norte do ES. O clado C agrupou amostras de várias localidades do ES, com haplótipos desde Linhares, norte do ES, passando por Aracruz, Serra até Setiba, mais ao sul do ES, apresentando-se mais próximos no filograma. O clado C apresentou-se como grupo irmão do clado MG, que reuniu haplótipos do Parque Estadual do Rio Doce, em MG, mas também haplótipos provenientes de amostras de localidades no Espírito Santo: Pinheiros, extremo norte do ES e Reserva Biológica Vale do Rio Doce (ReBio CVRD), em Linhares. O clado S agregou amostras do município de Maricá, RJ, a uma amostra de Marataízes, sul do ES, enquanto o clado S1, foi formado por apenas um haplótipo diferenciado dos demais, também proveniente de Maricá, RJ.

Foi verificada divergência genética (Tabela 2) de 2,4% entre o clado norte (N) e o clado central (C). Entre o clado N e o clado de Minas gerais (MG) foi verificada divergência genética de 2,6%; entre os clados N e o clado sul (S) a divergência foi de 3,9% e entre os clados C e S esta foi de 3,5%. O clado MG divergiu geneticamente do clado C por 2,4% e do clado S em 3,7% (Tabela 2).

O clado S10550, formado por um haplótipo único (Ab\_CFBH10550), derivado de uma amostra da localidade de Maricá, RJ, diferenciou-se notadamente de todos os outros, apresentando divergência genética superior a 20% em relação aos demais clados. Testes posteriores, envolvendo a repetição das análises com e sem esse haplótipo, foram realizados com o intuito de verificar a possíveis ruídos fruto da influência da sequência Ab\_CFBH10550 nos resultados obtidos. Contudo, não houveram mudanças expressivas na topologia das árvores e nem nos índices de divergência quando esta amostra foi retirada. Por isso, a mesma foi incluída em todas as análises, com exceção da realizada para o relógio molecular.

Devido a sua alta divergência em relação a todos os demais haplótipos, Ab\_CFBH10550 foi utilizado como grupo externo nas datações do relógio molecular. Pelo fato de ser um haplótipo único e muito diferenciado entre os demais, quando

incluído nessa análise, este influenciava os resultados, gerando alterações discrepantes no tempo de divergência entre os clados. O tempo de separação entre os clados (Tabela 5) foi de 3,14 milhões de anos (m.a.) entre os clados S e C, 2,00 m.a entre C e N, e 1,84 m.a entre os clados C e MG.

O baixo número de sequências de uma mesma localidade presente em clados diferentes observado na rede de haplótipos demonstrou estruturação genética entre as populações amostradas na Região Central da Mata Atlântica (Figura 8). O haplótipo H\_15 apresentou-se diferenciado entre os demais, inclusive dentro de seu clado (S). O caso mais extremo foi em relação ao haplótipo único que forma o clado S10550, proveniente de Maricá (RJ). Os passos evolutivos encontrados não puderam ser contados, o que provavelmente se deve à sua alta divergência genética, superior a 20% em relação aos haplótipos que formam os demais clados. Assim, o método estatístico utilizado para a construção da rede não foi capaz de estabelecer uma conexão confiável entre este e os demais clados.

### **3.2 Padrões Haplotípicos para o gene de COI em *Aparasphenodon brunoi***

Foram encontrados 15 haplótipos únicos para o gene COI entre as populações de *A. brunoi* amostradas. A diversidade haplotípica foi de 0,952 ( $\pm 0,029$ ) e a diversidade nucleotídica foi 0,04628 ( $\pm 0,01856$ ). O teste neutralidade D de Tajima também apontou para expansão demográfica para esse marcador molecular, enquanto o F de Fu novamente não demonstrou valores significativos (Tabela 1).

Para o gene COI foram identificados sete clados com suporte nas análises empregadas (Figura 2). Os clados Ncoi, MGcoi, Ccoi, FL1870, FL10871, Scoi e S10550coi agruparam haplótipos de maneira semelhante à observada para ND2, o que gerou um filograma similar ao encontrado para ND2, sendo os haplótipos comentados acima as únicas diferenças marcantes.

O clado Ncoi apresentou 0,8% de divergência genética (Tabela 3) em relação ao clado Ccoi, 0,6% de divergência em relação ao clado MGcoi e 1,2% do clado Scoi. Para o Ccoi foi verificada divergência genética de 1,0% em relação a MGcoi e entre Ccoi e Scoi foi de 1,9%, enquanto em MGcoi e Scoi foi encontrado 1,8% de divergência genética. O clado S1coi foi formado pelo mesmo haplótipo único identificado no gene ND2 e também apresentou divergência superior a 20% em relação aos demais.

Dois haplótipos provenientes da Floresta Nacional dos Goytacazes, Linhares, ES, apresentaram altos índices de divergência genética para o gene COI (Tabela 3). O haplótipo Ab\_CFBH10870, foi atribuído ao clado C para o gene ND2, enquanto no gene COI este formou sozinho um clado diferenciado (FL10870), com índices de divergência superiores a 20% em relação aos demais. Tal fato também foi observado para o haplótipo Ab\_CFBH10871, da mesma localidade. Esta sequência não entrou nas análises de ND2, porém também apresentou altos índices de divergência, superiores a 20%, formando um clado (FL10871) separado (Tabela 2 e Figura 2). Foram repetidas as análises com e sem essas sequências (Ab\_CFBH10870 e Ab\_CFBH10871) e optou-se pela não inclusão destes dois haplótipos nas análises filogenéticas concatenadas, por estes gerarem ruído nos resultados. As divergências observadas nesses dois haplótipos aparentam ser de natureza genética e não evolutiva, por isso não são discutidas neste trabalho.

A rede de haplótipos obtida para o gene COI (Figura 9) também não demonstra claramente a relação de S10550coi com os demais haplótipos, bem como os dois cladogramas formados por Ab\_CFBH 10870 e Ab\_CFBH10871. Estes haplótipos demonstram alta divergência genética entre si e em relação aos demais. No entanto, é possível perceber indicativos de estruturação populacional pelo número de passos evolutivos que separam os grupos de haplótipos, formando quatro grupos geográficos distintos. Vale ressaltar também o fato da rede deixar os haplótipos de Setiba, sul do ES, mais aproximados do haplótipo S10550 (Maricá,RJ) do que os outros haplótipos provenientes de Maricá, RJ. Assim como feito no gene ND2, os três haplótipos de alta diversidade genética citados acima também foram testados nas análises para o gene COI e não foi verificada mudança significativa na topologia das árvores ou nas outras análises e por isso estes foram incluídos nos resultados e nas análises.

### **3.3 Padrões Haplótípicos para o gene ND2 em *Physalaemus crombiei***

Os resultados obtidos para *P. crombiei* apresentaram 27 haplótipos únicos, com diversidade haplotípica de 0,967 ( $\pm 0,016$ ) e diversidade nucleotídica de 0,05351 ( $\pm 0,01314$ ). Os testes de neutralidade e expansão, D de Tajima e F de Fu, não encontraram valores significativos para ND2 nessa espécie (Tabela 1).

O filograma obtido evidenciou a presença de três grupos geográficos principais (Figura 3). O clado PN foi formado apenas por haplótipos do município de Pinheiros, extremo norte do ES, assim como o clado NSor agregou três haplótipos, todos

provenientes do município de Sooretama, norte do ES, todos três únicos. Já os demais haplótipos, da região centro-sul do ES formaram o clado CS, que incorporou os haplótipos provenientes de Povoação, Santa Teresa, Serra até a Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica, sendo esta a localidade mais ao sul da amostragem. A divergência genética (Tabela 4) encontrada foi de 14,3% entre o clado mais ao norte (PN) e o clado da localidade de Sooretama, ES (NSor). Entre PN e o clado centro-sul (CS) foi detectado 18,6% de divergência e entre SN e CS 17,8%.

A rede de haplótipos evidenciou a divisão entre os três cladogramas encontrados nas árvores filogenéticas, não sendo possível contabilizar os passos evolutivos entre os três grupos de haplótipos devido a alta divergência entre eles (Figura 10). Além disso, pode-se observar uma proximidade maior entre os haplótipos que formam o clado CS, se comparado aos outros dois. O relógio molecular estimou em cerca de 11 m.a. a divisão entre os dois cladogramas do norte (PN e NSor) e o clado CS, e em cerca de 6 m.a. a separação entre os dois cladogramas do norte (Tabela 5).

### **3.4 Padrões Haplótípicos para o gene COI em *Physalaemus crombiei***

Os dados obtidos para o gene COI evidenciaram a presença de 17 haplótipos únicos entre as populações amostradas. A diversidade haplotípica foi de 0.931 ( $\pm 0.018$ ), e a diversidade nucleotídica foi 0.04779 ( $\pm 0.01231$ ). Os testes D de Tajima e F de Fu também não apresentaram valores significativos para esse marcador molecular (Tabela 1).

Em *P. crombiei*, assim como nos resultados obtidos para o gene ND2, os filogramas obtidos para o COI apresentam três cladogramas com suporte (Figura 4). O haplótipo Pc\_CFBH5993, proveniente da população de Sooretama, foi alocado dentro do clado CScoi, separado dos outros haplótipos de Sooretama que formam um clado em separado (NSorcoi), sendo esta a única diferença relevante na topologia das árvores obtidas. O clado Ncoi agregou os haplótipos de Pinheiros e o clado NSorcoi os haplótipos de Sooretama, enquanto todos os demais haplótipos foram abarcados no clado CScoi. O clado mais ao norte, PNcoi, apresentou divergência de 9,8% em relação ao clado NSorcoi e 18,4% do clado CScoi, já entre os cladogramas NSorcoi e CScoi a divergência genética observada foi de 17,2% (Tabela 4).

A conformação da rede de haplótipos obtida para o gene COI (Fig. 11) em *P. crombiei*, mostrou-se semelhante à obtida para o gene ND2. É notada a clara divisão entre os grupos de haplótipos que correspondem aos três cladogramas obtidos nas análises

filogenéticas (Figs. 4 e 11), dada a alta divergência genética encontrada entre os clados, bem como se percebe maior distanciamento dos haplótipos incluídos nos clados PNcoi e NSorcoi, quando comparados aos do clado CScoi.

### **3.5 Mapas das Áreas Historicamente Estáveis**

Os valores de AUC (*A. brunoi* - 0,885 e *P. crombiei* 0,947) obtidos para os modelos foram satisfatórios (Figura 5), ambos superiores a 0,8. O modelo da distribuição sob as condições do presente mostraram-se compatíveis com a distribuição histórica das duas espécies estudadas. *Aparasphenodon brunoi* apresentou ainda uma sobreprevisão próxima ao leste da Amazônia nos modelos do Presente e LIG, enquanto em *P. crombiei*, pôde-se observar uma área incomum próxima ao Paraguai e Argentina.

A interseção dos mapas dos modelos da distribuição atual com as duas projeções de condições ambientais passadas demonstrou pronunciada fragmentação de habitats e pequenas áreas de refúgio historicamente estáveis. Uma na região de Pernambuco, encontrada com tamanho e distribuição variável entre as duas espécies, um refúgio na Bahia, que apresentou-se notadamente reduzido e fragmentado em *P. crombiei* e uma pequena área próxima a margem sul do Rio Doce, semelhante em tamanho e localização para ambas espécies. Para *P. crombiei*, encontrou-se ainda, uma área de refúgio ao sul do Rio Paraíba do Sul, no Rio de Janeiro.

## **4. Discussão**

### **4.1 Padrões encontrados em *Aparasphenodon brunoi* na região central da Mata Atlântica**

As análises em ambos marcadores mitocondriais empregados neste estudo demonstraram considerável estruturação geográfica ao longo da área amostrada, com variação genética nas linhagens norte, central e sul da região estudada, assim como verificado na rede de haplótipos. Os dados de genética populacional apresentaram altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, porém, esses valores podem estar sendo influenciados pelo número amostral de cada população, que pode não ter sido amostrada em sua totalidade.

Tal diferenciação nos componentes norte e sul da Mata Atlântica já foi observada em outros estudos para a região norte do ES e sul da Bahia (mamíferos - Costa, 2003; Leite, 2003; Caldara, 2008, Moraes-Barros et al., 2006; aves - Cabannes et al., 2007 e 2008; lagartos – Pellegrino et al., 2005; serpentes – Grazziotin et al., 2006),

assim como a região norte do RJ e sul do ES (Siqueira, 1994; Costa, 2003; Leite, 2003; Moraes-Barros et al., 2006; Martins, 2011). Tanto os clados encontrados ao norte e ao sul da área amostrada englobaram haplótipos do ES mais próximos geograficamente de sua localização e, embora o número amostral dos clados do norte e do sul tenham sido insuficientes para definir com maior refinamento as zonas de quebra, é possível inferir que algumas populações das regiões norte e sul do ES estão mais aparentadas aos clados extremos (N, Ncoi e S, Scoi), enquanto a região central do estado, que é atribuída aos clados C e Ccoi, parece possuir haplótipos mais aparentados entre si e com ramos mais curtos (Figuras 1; 2; 3 e 4). Tal estrutura pode estar associada, entre outros fatores, à heterogeneidade ambiental das áreas (Siqueira, 1994; Wüster et al., 2005; Graham et al., 2006).

A localidade de Costa Bela, no município da Serra, que localiza-se na região geográfica intermediária dos clados centrais, possui um haplótipo que aparece como grupo irmão dos haplótipos de Setiba - (em ND2), cerca de 60km ao sul, assim como haplótipos que mostram-se mais relacionados aos haplótipos de Aracruz e Linhares (em ND2), cerca de 40 e 80km respectivamente ao norte, o que indica que a região central do ES é uma área mais homogênea (Silva et al., 2004), aparentemente com pouca variação influenciada por distância e que essas localidades no centro-sul do ES estão, ou estiveram até recentemente conectadas. Tal conformidade pode significar eventos recentes ocorridos nessa região, com fluxo genético tendo ocorrido recentemente (Martins, 2011), não tendo passado tempo suficiente para que haja maior diferenciação entre as populações.

Ao investigar a filogeografia de espécies de anuros no nordeste do Brasil, Carnaval, (2002), observou que uma das espécies, *Proceratophrys boiei*, compartilhava haplótipos entre fragmentos de mata onde seria incomum haver fluxo gênico de acordo com a topografia e distribuição florestal atualmente observada para o local e apontou esta característica, juntamente com a baixa divergência genética, como sendo um indicativo de que tais áreas estiveram conectadas num passado recente. O compartilhamento de haplótipos, assim como diversificação rápida e recente também foram apontadas como indicador de recente conexão entre áreas por Cabanne et al., (2008), que ao estudar a distribuição de linhagens de *Xiphorhynchus fuscus* (Aves:Dendrocolaptidae) ao longo da Mata Atlântica, encontrou indícios de contrações populacionais com posterior expansão e prováveis áreas de contato secundário entre elas.

Padrão semelhante foi registrado em relação às amostras de MG (PERD) para ambos os genes, em que análises agregaram haplótipos de MG, um haplótipo da ReBio CV, Pinheiros, ES e outro de ReBio CVRD, Linhares, ES – estes últimos a cerca de 280km de distância da localidade de MG - formando um clado com suporte superior a 95% na análise bayesiana para ambos os genes testados (Figura 1 e 2 ) Vale ressaltar ainda que, o PERD apresenta altitude variando de 236 a 515m, enquanto as localidades de Pinheiros e da ReBio CVRD encontram-se em altitudes de cerca de 80 e 50m respectivamente, permitindo-se inferir novamente que a aparente similaridade e conexão desses locais se mostra determinante em detrimento das diferenças altitudinais. O haplótipo da ReBio Córrego do Veado (CV), Pinheiros, ES, distancia-se 30km do haplótipo da FLONA do Rio Preto, Conceição da Barra, ES, e ainda assim esse último foi atribuído em todas as análises aos clados do norte, embora esteja a cerca de 140km da localidade de Prado, e 220km de distância de Caraíva, ambas na Bahia e com haplótipos atribuídos aos clados N e Ncoi. Já ao sul, o haplótipo da Marataízes, sul do ES, agregado aos haplótipos de Maricá, RJ, nos clado S e Scoi, está a cerca de 30km da localidade de Setiba, enquanto distancia-se cerca de 300km dos haplótipos dos clados em que se encontra, S e Scoi, mais uma vez valendo-se ressaltar a necessidade da maior número amostral nesses locais para refinamento da quebra filogeográfica entre os clados em questão.

*Aparasphenodon brunoi* é uma espécie intimamente relacionada aos ambientes de restinga (Sazima & Cardoso, 1980; Teixeira et al., 2002) e parece ocupar áreas de mata de interior apenas quando essas oferecem habitats similares aos litorâneos (Feio et al., 1998). O litoral brasileiro, em especial a faixa da região central da Mata Atlântica, foi historicamente moldado e erodido por transgressões e regressões marinhas, principalmente durante o Quaternário (Dominguez et al., 1981; Tessler & Goya, 2005), o que deixa as planícies litorâneas sujeitas a constantes situações de montagem e desmontagem e torna as formações vegetais de restinga ambientes instáveis, estando sob forte influência das condições abióticas do litoral (Cogliatti-Carvalho et al., 2001). Tal fato pode explicar em parte a divergência genética observada entre os clados N e Ncoi, e S e Scoi (Tabelas 2 e 3) quando comparados respectivamente ao clado central C e Ccoi, pois, em épocas de transgressão, populações podem ter sido isoladas durante o avanço do mar, o que pode ter causado sua diferenciação genética (Pellegrino et al., 2005; Wüster et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2009).

Dominguez et al, (1981) descreve o processo de sedimentação dos rios Doce (ES) e Paraíba do Sul (RJ), e enumera a existência histórica de transgressões e regressões marinhas nessa área ao longo do Quaternário. No sul da Bahia e nos Rios Doce e Paraíba do Sul encontram-se depósitos marinhos associados à última (120.000 anos atrás; a.a - Pleistoceno) e penúltima (5.000-5.200 a.a - Holoceno) transgressões marinhas. Na penúltima transgressão foram sedimentados depósitos arenosos cujos topos situam-se de 6 a 10m, em média, acima da preamar, e na última transgressão o mar esteve 5m acima de seu nível atual. Valendo-se ressaltar também que, embora o enfoque do trabalho supracitado seja a influência das transgressões nas feições deltaicas dos rios que desembocam no Oceano Atlântico, é evidente que as mudanças no nível do mar afetaram toda a costa além da foz dos rios, modificando o relevo, a salinidade e condições do solo desses locais, e que essas mudanças também causaram efeitos distintos em cada local a depender das características de cada área.

Tais mudanças provavelmente causaram conseqüências na composição de espécies da fauna e flora dessas áreas (Tessler & Goya, 2005; Carnaval & Moritz, 2008), fato este que está de acordo com a expansão populacional indicada pelos testes de neutralidade para essa espécie (Tabela1), já que, por ocuparem áreas instáveis, algumas populações podem ter passado por gargalos populacionais seguidos de uma recente expansão de suas populações (Pröhl et al., 2010). Esses eventos podem ser uma das explicações para a estruturação genética ao norte e ao sul do ES nesta espécie, e também demonstram que o ES, em especial sua região central, é historicamente uma área instável, como já verificado em outros estudos (Pellegrino et al., 2005; Carnaval et al., 2009), o que explicaria a expansão de linhagens genéticas recentes para a região central do ES. A última regressão marinha (a menos de 5.200 a.a; Dominguez et al., 1981) pode ter possibilitado a re-colonização desse local, com o contato entre populações antes isoladas.

Restingas são formações vegetais abertas, típicas da costa brasileira. São estabelecidas em ambientes de duras condições ambientais, como alta salinidade, constante insolação, solo arenoso e exposto atingindo cerca de 70°C em alguns locais no verão (Scarano, 2002). Por essa razão são formadas por espécies vegetais resistentes, capazes de colonizar este tipo de ambiente e, embora apresentem alta riqueza de espécies, são dominadas por poucas espécies vegetais, geralmente pioneiras, conhecidas como plantas berçário (Franco & Nobel, 1989; Young et al., 1995). A mono-



dominância e estruturas oligárquicas são comuns nas formações vegetais que ocupam ambientes de condições extremas.

Os ambientes de Restinga formam-se em ilhas de vegetação que são propiciadas pelas espécies berçário, pioneiras no ambiente. A depender da espécie berçário, é formado um tipo de comunidade vegetal ao seu redor, o que faz com que ilhas de vegetação, mesmo quando próximas, possam ter a composição, riqueza de espécies, diversidade e estrutura diferentes, portanto com diferenças nas características próprias de cada ilha. O tamanho das ilhas também varia de acordo com a espécie dominante, podendo haver co-dominância em algumas ilhas. Além disso, as ilhas podem diminuir caso ocorra a morte de alguma das espécies berçário. Ilhas pequenas podem ser ilhas recém formadas e ilhas grandes podem representar a fusão de várias ilhas menores.

Espécies de bromélia são pioneiras nesse tipo de ambiente, algumas delas favorecendo a entrada de espécies lenhosas. Bromélias fornecem o micro-habitat mais comumente citado como o frequentado por *A. brunoi* (Feio et al., 1998; Duellman & Trueb, 1994), sendo discutida inclusive a possível relação entre determinadas espécies preferidas, a depender do tamanho das folhas e do volume de água acumulada por cada uma (Mesquita et al., 2004). Esses ambientes tão variáveis e heterogêneos devem ter influenciado a diferenciação das populações de *A. brunoi* ao longo da costa.

Ainda sobre a região litorânea, Viana & Santos, (2002), estudaram a diversidade de abelhas em planícies costeiras no Brasil, e chamaram atenção para o fato de que essas áreas de vegetação costeira estão sobre forte influência de ambientes vizinhos e que é esperado, portanto, encontrar certa similaridade entre suas composições de espécies, nas áreas de contato ou nas zonas de transição vegetacional. Além disso, comentam sobre a existência de possíveis barreiras geográficas físicas e climáticas como limitantes à dispersão de algumas espécies, bem como a composição de espécies de abelhas estar sujeita à influência da composição vegetal e à variação de fatores abióticos. Embora as barreiras provavelmente não sejam exatamente as mesmas para anfíbios e abelhas, a heterogeneidade na composição vegetal ao longo do cinturão norte-sul de restinga na costa atlântica provavelmente é um fator determinante na estrutura geográfica observada entre as populações de *A. brunoi* e consequência de diferenças climáticas e processos históricos ocorridos que moldaram também as populações de organismos que vivem nesses ambientes.

#### **4.2 Padrões encontrados em *Physalaemus crombiei* na região central da Mata Atlântica**

As análises apontam para estrutura geográfica importante entre os clados de Pinheiros (NP) e Sooretama (NSor) (Figuras 3 e 4) norte do ES, quando comparados entre si, bem como quando comparados aos clados do centro-sul para os dois marcadores mitocondriais. A julgar pela filogenia obtida para os clados CS e CScoi, as populações de *P. crombiei* não parecem ter sofrido influência do gradiente altitudinal como fator causador de alguma diferenciação genética populacional. Pode-se observar haplótipos de Santa Teresa, com pontos de até 800m de altitude amostrados e da ReBio DB, em Cariacica com cerca de 500m de altitude sendo agrupados a haplótipos da localidade de Costa Bela, Serra e de Povoação, Linhares, ambas no litoral capixaba (Figura 3 e 4).

Os clados NP, NPcoi e NSor, NSorcoir apresentaram altos índices de divergência genética (Tabela 4) e, embora sejam geneticamente mais próximos um do outro que dos clados centro-sul em ambos os genes, estes apresentam-se também consideravelmente distantes entre si. O fato de ocuparem matas de tabuleiro pode ser um fator determinante na divergência apresentada nessas populações. Ao passo que os clados CS e CScoi encontram-se em matas de altitude e de transição rumo ao litoral, os clados de Pinheiros e Sooretama são oriundos de matas de baixada que possuem características distintas na composição vegetal, índice pluviométrico e temperatura anual (Siqueira, 1994; Scarano, 2002). A partir da margem norte do Rio Doce não se tem mais a influência marcante da Serra do Mar influenciando o clima entre o litoral e o continente (Scarano, 2002). Sem essa barreira, as mudanças climáticas - e por conseqüência a Mata Atlântica - modificam-se mais gradualmente à medida que avançam pra dentro do continente e é nesse contexto que surgem as matas de tabuleiro, na parte norte do ES, e seguem em direção à BA. A área de mata ao norte do ES parece ser mais semelhante ao sul da BA que com o resto do estado, provavelmente influenciada pelo clima super-úmido encontrado a partir do sul da BA (Siqueira, 1994). Essa diferença ambiental histórica observada pode ser determinante para as diferenças encontradas entre as linhagens dos clados de Pinheiros (NP e NPcoi) e de Sooretama (NSor e NSorcoi), enquanto as diferenças verificadas entre as matas de tabuleiro ao norte do Rio Doce e as matas ao sul podem explicar a divergência encontrada entre os clados Centro-sul (CS e CScoi). Assim como o padrão identificado nas análises para *A. brunoi*, em *P. crombiei* pode-se notar novamente sinais de recente fluxo gênico entre as

populações da região centro-sul do ES, principalmente de haplótipos localizados ao sul do Rio Doce. Silva et al., (2004), identificou quatro áreas de endemismo (Pernambuco, Centro da Bahia, Costa da Bahia e Serra do Mar) para passeriformes na Mata Atlântica, sendo o norte do ES juntamente à costa da BA considerados como uma área de endemismo separada de áreas do interior da BA e de parte do nordeste de MG; a região ao sul do Rio Doce distinguiu-se como uma unidade biogeográfica homogênea.

Além das diferenças ecológicas atualmente observadas, populações relativamente próximas, como as de Pinheiros e Sooretama, podem ter se diferenciado por um evento vicariante passado e estarem, historicamente, ocupando áreas e micro-habitats diferenciados. Tais mudanças podem ter afetado tanto os clados do norte separadamente como ter gerado a divergência entre esses e o clado centro-sul. Crawford et al., (2007), estudaram as diferenças na resposta à habitats secos no grupos de espécies *Craugastor fitzingeri* e verificaram que, mesmo em complexos de espécies que compartilham história filogenética próxima, é possível haver considerável diferença na estrutura filogeográfica encontrada, e atribuíram essas diferenças a distintas características ecológicas entre os anuros estudados.

Wüster et al., (2005), encontrou significativa correlação entre características morfológicas em espécies de víboras e diferenças ecológicas, e verificou que pressões do ambiente ocupado podem moldar as espécies nos diferentes habitats, comentando a importância de se ter cuidado ao interpretar mudanças de caráter quando estas coincidem com mudanças ecológicas em uma espécie. Eventos de fragmentação passados, afetando o território das espécies, parecem ter causado as diferenças ecológicas observadas atualmente e já foram sugeridos como causadores das diferenças entre populações de anfíbios (Carnaval, 2002; Carnaval et al., 2009), serpentes (Graziotin et al., 2006), aves, (Cabanne et al., 2008) e mamíferos (Costa, 2003; Leite, 2003; Caldara, 2008, Moraes-Barros et al., 2006).

A descontinuidade na composição florística da Mata Atlântica aparece bem conhecida na literatura, sendo o regime de chuvas, as condições do solo, salinidade e temperatura, fatores importantes para as espécies vegetais pioneiras que viabilizam a colonização do ambiente (Scarano, 2002). Segundo Leitão-Filho (1987), nessa formação a variação florística é consideravelmente maior se comparada a Floresta Amazônica e a Floresta de Planalto. Isso se deve às variações climáticas ao longo de sua área de distribuição.

### **4.3 Considerações históricas sobre a Mata Atlântica e coerência geográfica observada nos padrões filogeográficos encontrados para *Aparasphenodon brunoi* e *Physalaemus crombiei***

A Mata Atlântica é tida como a formação vegetal mais antiga no Brasil, estando formada a cerca de 70 milhões de anos (Leitão-Filho, 1987). Embora demonstre alguma afinidade com outras formações florestais brasileiras, com as quais já esteve em contato no passado (ex: Amazônia, Cerrado - Costa, 2003), parece evidente que a história evolutiva da Mata Atlântica possui características próprias e distintas das demais (Martins, 2011).

Behling (1998), tentou reconstruir e verificar as mudanças na vegetação e no clima ao longo do quaternário tardio por meio da análise palinológica de parcelas do solo em 10 transectos de norte a sul do Brasil e verificou diversas mudanças em diferentes tipos de vegetação típicas de locais com clima diferentes dos atualmente observados. Ele verificou que na Mata Atlântica do sudeste brasileiro tanto áreas de baixada como de altitude apresentaram a floresta semidecídua tropical moderna sendo substituída por gramíneas subtropicais e matas de galeria durante o último período glacial até o início do Holoceno, indicando um longo período de seca ao longo do ano, clima frio e com geadas. Já no Holoceno tardio (~1.500a.a.) temos o início da época mais chuvosa, com os períodos de seca mais curtos desde o último período Glacial Máximo e apenas no último milênio tem-se a substituição das gramíneas típicas do Cerrado pela floresta semidecídua na região sudeste.

A retração das áreas de mata, e seu posterior avanço, provavelmente teve efeito importante no isolamento genético das populações de ambas as espécies alvo deste trabalho. A Serra do Mar estende-se do sul do país até a região norte do Rio de Janeiro e representa uma barreira física aos ventos vindos do oceano, influenciando consideravelmente o clima nessa faixa. A face voltada para o mar da Serra do Mar possui os maiores índices pluviométricos observados em toda Mata Atlântica, superior a 3600mm, enquanto a face continental fica entre 1300mm a 1600mm de chuva anuais (Scarano, 2002). Essa dicotomia causa uma diferença abrupta no clima entre as duas faces e separa também abruptamente a floresta tropical e semidecídua, principalmente nos estados de São Paulo e Paraná, mais ao sul da região sudeste. O clima varia consideravelmente ao longo da costa e os índices pluviométricos caem do sul de São Paulo até o norte do estado do Rio de Janeiro.

O clima seco encontrado nessa faixa é provocado pela ressurgência oceânica de Cabo Frio (Araujo, 1997), região onde a floresta semidecídua chega até a costa, sendo este um ponto de interrupção na floresta tropical chuvosa ao longo do litoral, próximo a região de Campos dos Goytacazes, RJ (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). É possível que essa mudança climática e a conseqüente mudança na mata dessa região tenha impacto na ocorrência dos cladós do sul em *A. brunoi* até a região de Marataízes, ES. Provavelmente essas populações do sul do ES e norte do RJ se diferenciam das demais por ocuparem, e terem ocupada historicamente, locais de clima mais seco e frio.

A floresta tropical chuvosa reaparece no Espírito Santo com o aumento dos índices pluviométricos anuais e a diminuição da sazonalidade até atingir o clima quente e super-úmido no sul da Bahia (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Como demonstrado em análises florísticas (Scarano, 2002), tais mudanças climáticas ao longo da costa têm forte influência na diferenciação florística entre norte e sul da floresta tropical chuvosa da Mata Atlântica. Esses dois blocos de mata apresentam-se em duas formas florísticas distintas que modificam-se gradualmente na transição entre a floresta tropical chuvosa para a floresta semidecídua na região de Campos dos Goytacazes, acompanhando a redução no volume de chuva ao sul. As montanhas da Serra do Mar surgem cada vez mais distantes da costa da região do ES e, particularmente a partir da margem norte do Rio Doce, vão diminuindo em altitude (Scarano, 2002). Essa disposição geográfica abre espaço nessa área para o estabelecimento de uma ampla zona de planície costeira conhecida como Mata de Tabuleiro, que aparece mais discreta ao norte do RJ indo até o nordeste brasileiro. Nessa área, mudanças no regime de chuvas são mais graduais em direção ao interior do continente e apresentam intervalos menores no ES, leste de MG e sul da BA, quando comparados a SP e estados vizinhos.

Siqueira, (1994) identificou esses dois blocos na Mata Atlântica ao realizar a ordenação florística ao longo de toda área da Mata Atlântica, por meio de dados binários. Nesse estudo, ele verificou que as áreas pertencentes ao ES ora aparecem ligadas ao bloco nordeste, ora ligadas ao bloco sul/sudeste ou ainda isoladas e chamou atenção para esse comportamento intermediário como um indicativo de uma flora arbórea intermediária entre os dois blocos existentes. É sugerido também que a região do Espírito Santo seja uma área de sobreposição na distribuição geográfica dos dois grandes blocos florísticos e/ou um centro de diversidade muito importante. Trabalhos florísticos mais antigos (Rizzini, 1967; Coimbra-Filho & Câmara, 1996) realizados na Mata Atlântica já encontraram resultados parecidos.

É possível notar vários pontos concordantes entre a conformação atual da Mata Atlântica e a topologia dos filogramas obtidos para as duas espécies de anuros envolvidas no presente estudo, o que converge com a idéia de eventos ao longo do quaternário que moldaram a Mata Atlântica e as populações de espécies nela abrigadas (Martins, 2011, Carnaval & Moritz, 2008). *Aparasphenodon brunoï* apresentou clados que distribuem-se geograficamente acompanhando os aparentes limites e áreas diferenciadas da Floresta Atlântica. As populações do extremo norte do ES foram agrupadas com populações da BA, ficando separadas dos haplótipos do ES (Figuras 1 e 2), enquanto amostras do extremo sul do estado (Lagoa do Gomes, Marataízes, ES) se mostraram mais relacionadas a populações do RJ. Tais limites coincidem com as áreas acima citadas, onde o clima e a fisionomia da mata modificam-se ao longo da costa atlântica, com a mudança de floresta semidecídua para floresta tropical chuvosa no norte do RJ e sul do ES, a mudança para as matas de tabuleiro a partir da margem norte do Rio Doce e o estabelecimento do clima super-úmido no sul da BA e norte do ES. Martins (2011), comparou os padrões filogeográficos encontrados para diferentes organismos já estudados na Mata Atlântica (anfíbios, lagartos, serpentes, aves e mamíferos) e verificou zonas de contato entre clados na região próxima ao Rio Doce e também no sul do ES. Carnaval & Moritz (2008), por meio de modelos paleoclimáticos, encontraram congruência nas áreas historicamente estáveis e verificaram áreas de refúgio na região da BA, entre os Rios Doce e São Francisco, e no limite entre os estados de ES e RJ, para espécies animais e de plantas.

Carnaval et al., (2009) empregaram paleomodelos para três espécies de anuros da Mata Atlântica (*Hypsiboas albomarginatus*, *H. semilineatus* e *H. faber*), relacionando dados de ocorrência das espécies e dados climáticos, das condições atuais e em épocas extremas do Quaternário tardio (6.000 e 21.000 a.a.), para gerar mapas de estabilidade de área, afim de encontrar prováveis zonas de refúgio que se mantiveram em condições mais estáveis historicamente ao longo dos eventos geoclimáticos ocorridos na Mata Atlântica. As três espécies por eles investigadas demonstraram relação entre os haplótipos amostrados nas populações do sul do ES e RJ e em *H. semilineatus* houve forte relação entre populações do ES e da BA. Os paleomodelos apontaram para a existência de um refúgio em Pernambuco, na região da Bahia e outro mais ao sul, em São Paulo. A área apontada como estável para o refúgio da BA engloba a parte norte do ES, o que indica conexão histórica entre essas áreas. Estudos clássicos

de biogeografia também já identificaram quebras na distribuição norte-sul de anfíbios (Lynch, 1979; Müller, 1973) e lagartos (Vanzolini, 1988) na Mata Atlântica.

O mesmo refúgio na região da Bahia já havia sido predito por Carnaval & Moritz, (2008), sendo seu limite norte o Rio São Francisco e o limite sul o Rio Doce. *Hypsiboas albomarginatus* e *H. faber* (Carnaval et al., 2009) podem não ter demonstrado evidências claras de relação entre populações do ES e BA devido aos locais e haplótipos amostrados ou por diferenças de cada espécie, porém, há evidente diferenciação entre sul e norte do Rio Doce. Os autores comentam que alguma variação nos modelos, bem como nas relações filogeográficas entre clados nas populações, podem apresentar certa variação, pois a floresta e sua fauna associada podem diferir na tolerância às condições climáticas e ao nicho ocupado, o que também já foi verificado por Wüster et al., (2005), para serpentes, por Crawford, (2007), para anfíbios e por Cabanne et al., (2008) para aves. Além disso, Costa et al., (2003) chamou atenção para a existência de vários padrões relacionados a certas espécies, ao invés de um padrão geral.

Vale ser ressaltada, também, a existência de relação entre haplótipos do ES com haplótipos de MG. *Aparasphenodon brunoi* apresentou um clado formado por haplótipos de MG e do norte do ES. A relação entre populações desses estados já foi verificada por Carnaval et al., (2009), para as três espécies anteriormente citadas e por Thomé et al., (2010) para o complexo de espécies *Rhinella crucifer*. Oliveira-Filho & Fontes (2000), comentam a mudança mais gradual e sutil entre a floresta tropical chuvosa e a floresta semidecídua a partir do ES, especialmente na região do Rio Doce em direção ao norte. Áreas de baixa altitude penetram longas distâncias rumo ao interior do continente ao longo dos vales das bacias dos Rios Doce, Mucuri e Jequitinhonha, permitindo o estabelecimento de espécies típicas de florestas tropicais chuvosas de áreas baixas. É sugerido também, que tal disposição geográfica deve explicar a notável conexão florística entre zonas de floresta semidecídua da bacia do Rio Doce e a floresta tropical chuvosa das matas de tabuleiro no ES e sul da BA.

Tanto na Amazônia quanto na Mata Atlântica, diversas espécies típicas de floresta chuvosa são capazes de expandir sua área de ocupação dentro de áreas de marcada sazonalidade climática por meio de matas de galeria (Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Scarano, 2002). O vale da bacia do Rio Doce parece funcionar como uma ponte que conecta matas do ES e MG, permitindo a expansão de espécies costeiras de matas chuvosas em áreas continentais. O mesmo mecanismo deve se aplicar para as conexões observadas entre BA e MG pelas bacias dos Rios Mucuri e Jequitinhonha. Conexões

entre haplótipos de populações desses estados já foram registradas para mamíferos (Costa et al., 2003), serpentes (Grazziotin et al., 2006), aves (Silva et al., 2004; Cabanne et al., 2008) e anfíbios (Carnaval et al., 2009; Thomé et al., (2010). Além disso, colonização de espécies litorâneas de anuros em matas de interior, acompanhando o curso de rios, já foi verificada para os Rios Jequitinhonha (Feio & Caramaschi, 1995; Feio & Cramaschi, 2002), Doce (Nascimento et al., 1994) e Paraíba do Sul (Feio & Ferreira 2005).

Há de se ressaltar que ambas as espécies abordadas ocupam desde o litoral até matas de interior, inclusive com variações na altitude nos locais de ocorrência, bem como apresentam simpatria em alguns dos locais amostrados (ver tabela 7 e 8). Portanto, pode-se inferir que populações de MG de *P. crombiei* também apresentem alguma conexão com os haplótipos do norte do ES, assim como observado em *A. brunoi* e já verificado nos grupos animais acima citados. A coleta de indivíduos de *P. crombiei* em MG mostra-se importante para melhor esclarecimento da relação histórica entre essas áreas.

No presente trabalho não foram amostradas populações de *P. crombiei* provenientes da BA, o que dificulta o estabelecimento de relações mais claras entre os clados do norte nessa espécie. Porém, a julgar pela estrutura populacional observada em *A. brunoi*, a atual fisionomia da Mata Atlântica, a alta divergência genética verificada entre os clados norte dessa espécie e pelos padrões já reportados para anfíbios e outros grupos animais, as populações de *P. crombiei* dos clados de Pinheiros (NP, NPcoi) possivelmente: I - Apresentam maior afinidade com populações do extremo norte do ES e/ou sul da BA; II – Apresentam maior relação com haplótipos de populações de MG ou III – Representam um clado individual nessa área.

A alta divergência (Tabela 4) observada entre os clados da região de Sooretama (Figuras 3 e 4) e Pinheiros, ambos no norte do ES, indicam uma história biogeográfica diferenciada nessa espécie. É possível que diferenças ecológicas desta espécie, assim como menor tolerância a mudanças climáticas (ver Crawford et al., 2007), tenham moldado historicamente as populações de *P. crombiei* com algumas diferenças quando comparada a *A. brunoi*, fazendo com que as populações do norte do ES tenham se diferenciado após ocupar as matas de tabuleiro no norte deste estado. Estudos envolvendo espécies de *Physalaemus* identificaram forte correlação entre a distância geográfica e a divergência genética observada, com possível ligação com a fidelidade de habitat na espécie (Lampert et al., 2003; Pröhl et al., 2010). O tamanho reduzido de *P.*



*crombiei* pode influenciar negativamente sua capacidade de dispersão (Marsh et al., 2000), bem como a filopatria observada em algumas espécies de anfíbios (Joly & Cohas, 2003), o que poderia tornar a espécie mais suscetível a mudanças ocorridas no ambiente passado, causando estruturação geográfica importante ao longo de sua distribuição. Porém, maior esforço amostral é necessário, principalmente nas populações ao norte do Rio Doce, para melhor investigação dos fatores determinantes na estruturação filogeográfica encontrada entre os clados dessa área.

O limite sul de *P. crombiei* parece relacionar-se à mudança florística e climática observada ao sul do ES e norte do RJ. Como já mencionado, o clima seco proporcionado pela ressurgência oceânica de Cabo Frio permite o estabelecimento da floresta semidecídua desde o interior até a costa nessa região. É notada maior sazonalidade climática com períodos de seca, observando-se mudanças no regime de chuvas (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). A floresta semidecídua aparece como historicamente menos estável no trabalho de Behling & Lichte, (1997), sendo em grande parte substituída por *Araucaria* e gramíneas subtropicais no último período glacial máximo, indicando o estabelecimento de um clima frio e seco. Tais variações históricas (climáticas e florísticas), a menor capacidade de dispersão da espécie (se comparada a de *A. brunoi*) e as diferenças ecológicas atualmente observadas, provavelmente constituíram barreiras ou fatores que dificultaram a expansão da área de ocorrência de *P. crombiei* mais ao sul.

Pröhl et al., (2010), verificaram a divergência genética entre linhagens de *Physalaemus pustulosus* em uma região entre a Costa Rica e o Panamá e encontraram altos valores de divergência entre populações. Além disso, encontraram diferenças ecológicas marcantes entre as linhagens. Na ocasião, eles identificaram uma população homogênea ao norte e uma população dividida em três subpopulações ao sul, havendo uma lacuna entre as populações norte e sul. A população do norte ocupa florestas de pinheiros em locais secos, enquanto as populações do sul distribuem-se em florestas com altos índices de precipitação anual e apresentam exigências ecológicas diferenciadas. É sugerido que essas populações foram separadas em eventos vicariantes históricos e evoluíram de modo a se especializarem a nichos diferentes nos ambientes atualmente ocupados, havendo uma lacuna de ocorrência entre elas devido à falta de adequabilidade do habitat.

Em outro trabalho envolvendo *P. pustulosus*, Lampert et al., (2003), comentam que, embora haja alguma mobilidade em escala de centenas de metros nessa espécie,

poucos quilômetros (cerca de 4km) são necessários para que se observe altos índices de diferenciação genética entre as populações. É visto também forte influência de rios como barreira ao fluxo gênico para essa espécie e sugerido que a migração que ainda ocorra através deste deve ser ocasionada por transporte humano acidental. Lampert et al., (2003), verificaram que a mobilidade está mais relacionada aos machos, enquanto a filopatria relaciona-se mais às fêmeas, porém não exclusivamente. Machos parecem procurar ocupar poças sem grandes distâncias umas das outras para reprodução (Marsh et al., 2000; Pröhl et al., 2010).

Diferenças nas exigências ambientais parecem explicar a alta divergência genética encontrada entre as populações de *P. crombiei* no presente trabalho, assim como devem limitar sua distribuição ao sul, indicando que essa espécie apresenta menor tolerância a climas secos e mais frios se comparada a *A. brunoi*, e que tal variação é tão importante para ela quanto para a diferenciação entre a floresta tropical chuvosa e a semidecídua encontradas na Mata Atlântica. Além disso, a baixa capacidade de dispersão e fidelidade ao habitat deixa a espécie mais suscetível a mudanças ambientais, o que sugere pouca tendência a persistir em áreas não adequadas ou a colonizar novos locais. As mudanças ocorridas ao longo do Quaternário possivelmente separaram populações que em seguida evoluíram, se especializando em diferentes nichos nos locais em que houveram adequadas condições ecológicas para a espécie. Carnaval (2002) observou para duas espécies de anfíbios que os padrões filogeográficos encontrados refletem exigências táxon-específicas.

A distribuição conhecida para *P. crombiei* vai da região de Cachoeiro de Itapemirim, sul do ES, até a região norte de Itabuna, Bahia (Peixoto & Pimenta, 2004; Almeida et al., 2011). Portanto, *P. crombiei* apresenta-se mais restrita do que *A. brunoi*, cuja distribuição conhecida vai desde o sul da BA até o litoral norte de São Paulo, ocorrendo desde o litoral até altitudes de discretamente maiores no interior do continente (Feio et al., 1998; Rocha et al., 2004). *Physalaemus crombiei* também demonstra uma tendência a ocupar desde áreas baixas até maiores altitudes. São encontrados desde o litoral (Almeida et al., 2011) até cerca de 800m de altitude em Santa Teresa, sua localidade tipo (Frost, 2012). Também já foi registrado para o PERD, MG (Rievers, 2010), onde também se tem registro de *A. brunoi* (Feio et al., 1998), e também a 980m de altitude na Serra do Ouro Branco, MG (São-Pedro & Feio, 2011).

A capacidade de colonizar diferentes altitudes pode estar relacionada a características reprodutivas e outros mecanismos particulares de ambas as espécies.

Embora sua atividade reprodutiva se intensifique notadamente em épocas chuvosas, *P. crombiei* é uma espécie de reprodução prolongada, vocalizando ao longo de todo o ano. O grupo *P. signifer*, no qual *P. crombiei* encontra-se atualmente incluído, apresenta característica reprodutiva diferenciada entre os *Physalaemus*, que é a tendência a reproduzir-se em ambiente terrestre (Pupin et al., 2010). Haddad & Pombal, (1998) comentam que o modo reprodutivo, semelhante ao de *P. crombiei*, observado em outra espécie do grupo *signifer* corresponde a uma adaptação a imprevisibilidade de chuvas. Por ser uma espécie de pequeno porte e viver geralmente em locais propícios para o acúmulo de água da chuva (folhiço úmido, buracos em troncos, chão úmido próximo a córregos), sua reprodução e manutenção da umidade podem estar menos relacionadas à disposição de água proveniente das épocas de chuva. Embora os resultados indiquem que ambientes com sazonalidade marcada com épocas de seca não sejam adequados ao estabelecimento desta espécie, como visto ao norte do RJ e extremo sul do ES, é possível que a queda na temperatura, ou a associação dessas duas variáveis, encontrada a partir dessa região seja mais determinante para a não ocorrência da espécie.

Fato semelhante ocorre em *A. brunoi*. Essa espécie reproduz-se principalmente em poças que se formam em buracos no solo em épocas de chuva. Principalmente em restingas, que são ambientes abertos, as poças ficam expostas a alta incidência solar e é sugerido que o tempo de metamorfose dos girinos seja curto (Teixeira et al., 2002). Essa espécie ocupa preferencialmente bromélias, utilizando essas plantas como abrigo diurno, já tendo sido encontrada correlação entre o tamanho da bromélia e o tamanho do animal, além disso, o tamanho e forma da bromélia relacionam-se com a quantidade de água que essa é capaz de acumular. (Teixeira et al., 2002; Mesquita et al., 2004).

Trueb et al., (1970) aponta a ossificação no crânio como uma provável adaptação a ambientes com pouca oferta de água. O comportamento de *pharyngosis* das pererecas de capacete é eficiente em selar a entrada de esconderijos, na defesa à predação e manutenção do volume de água dos abrigos. Adicionalmente a cabeça ossificada representa uma superfície com menor taxa de perda de água pela pele (Andrade & Abe, 1997), o que demonstra que apesar de atualmente também ocorrer em matas mais fechadas do interior essa espécie evoluiu de maneira a apresentar mecanismos para evitar a perda de água, mais um indicativo de sua origem em áreas abertas e com altas temperaturas. Embora os índices pluviométricos na restinga sejam altos (1100mm a 1500mm anuais), o solo arenoso reduz a quantidade de água disponível, sendo o ajuste da cabeça à axila das folhas das bromélias importante para

manutenção da umidade e condições fisiológicas adequadas (Mesquita et al., 2004). Este mesmo autor encontrou atividade diurna em alguns indivíduos vocalizando dentro das bromélias em dias úmidos. Os mecanismos contra perda de água observados em *A. brunoi* (Andrade & Abe, 1997) provavelmente relacionam-se a distribuição norte-sul mais ampla observada nessa espécie quando comparada a *P. crombiei*.

Teixeira et al., (2002) encontrou maior número de indivíduos ocupando as bromélias na estação seca, do que na chuvosa, indicando mais uma vez a utilização dessa para a manutenção da umidade corporal. Adicionalmente, por ser um hilídio, *A. brunoi* apresenta a capacidade de ocupar vários extratos na mata devido à presença de discos digitais em suas patas (Prado e Pombal Jr., 2005), o que possibilita que a espécie ocupe outros habitats nas matas continentais em florestas mais úmidas por serem mais fechadas.

Devido a pele permeável, a manutenção da umidade é vital para os anfíbios que são suscetíveis a perda de água por evaporação, sendo esse um dos principais fatores limitantes a ocorrência de algumas espécies (Andrade & Abe, 1997). Nesse sentido, as características acima citadas relacionam-se principalmente aos hábitos de vida, locais de ocorrência e aparentes particularidades ecológicas relacionadas à manutenção da umidade corporal e consequente manutenção das características fisiológicas importantes para a sobrevivência de ambas as espécies. Tais fatores parecem estar intimamente relacionados à sua distribuição, desde ambientes mais abertos e expostos ao sol no litoral, até áreas de matas mais fechadas em maiores altitudes.

#### **4.4 Tempo de divergência estimado com o relógio molecular entre os clados encontrados para *Aparasphenodon brunoi* e *Physalaemus crombiei***

As estimativas do tempo de divergência (Tabela 5) encontradas para *A. brunoi* datam do Plioceno-Pleistoceno, o que concorda com outros trabalhos que estimaram o tempo de divergência entre clados na Mata Atlântica (Carnaval, 2002; Cabanne et al., 2008; Thomé et al., 2010). A separação entre o clado S e o clado C representam a divisão mais antiga entre as populações amostradas, cerca de 3,2 milhões de anos atrás, enquanto os clados C e N apresentam separação de cerca de 2 milhões de anos atrás. Carnaval, (2002) encontrou estimativas de divisão entre populações (1,1 – 3,4 milhões de anos atrás) com divergência genética entre clados, semelhantes às verificadas no presente estudo e sugeriu que tais índices sejam reflexo de eventos de fragmentação ocorridos antes ou no início do Pleistoceno. Ao observar as estimativas de tempo

encontradas, nota-se uma provável fragmentação na Mata Atlântica ocorrida entre o norte do ES e sul da Bahia, que isolou as populações nos clados N e C, assim como isolou também a população do clado MG em *A. brunoi*, representando um evento importante para a distribuição geográfica dessa espécie.

Juntamente a esses prováveis eventos entre os clados N, C e MG, a divisão ao sul do ES e norte do RJ separando o clado S e C, embora aparentemente mais antiga que as separações ocorridas nos clados ao norte (Tabela 5), poderia explicar a politomia verificada no clado central, indicando que mudanças climáticas durante o Pleistoceno (Avice & Johns, 1998) influenciaram drasticamente as condições existentes nas matas da região central do ES, o que explicaria a politomia com ramos curtos observada nessa região. É sugerido que mudanças nas condições ambientais ocorridas na região do ES tenham isolado populações ao sul e norte dessa região, bem como isolaram populações que colonizaram, previamente, o interior do continente através da bacia do Rio Doce chegando até MG (ver pág. 30). Com o retorno das condições climáticas e ambientais favoráveis essas populações puderam, recentemente, se expandir e colonizar novamente o centro do ES. Clados politômicos e isolados no ES já foram encontrados em outros estudos (Pellegrino et al., 2005; Carnaval et al., 2009), porém os padrões podem variar de acordo com as características da espécie.

*Physalaemus crombiei* apresentou valores estimados que evidenciam separações mais antigas no relógio molecular, o que está de acordo com seus ramos discretamente mais longos se comparados aos observados em *A. brunoi* (Figuras 1,2,3 e 4). Os clados de Pinheiros e Sooretama, norte do ES, dividiram-se a cerca de 6,7 milhões de anos atrás, enquanto a estimativa para a divisão entre o clado sul S e NP + NSor ocorreu a cerca de 11,4 milhões de anos atrás, portanto ambas datando da parte final do Mioceno. A julgar pela alta divergência observada entre os clados dessa espécie (Tabela 4), os eventos causadores do isolamento entre as populações não seriam corretamente atribuídos ao Pleistoceno como em *A. brunoi*. As datas de divergência combinam com a deposição da Formação Barreiras. Os sedimentos do Barreiras foram depositados por uma série de leques aluviais, a formação é encontrada ao longo da costa brasileira, do Rio de Janeiro até o Pará e foram depositadao durante o Mioceno – Pleistoceno sob clima seco e com os níveis do mar abaixo dos observados no presente (Dominguez et al., 1981; Pellegrino et al., 2005). O Barreiras representa o limite interior das planícies costeiras, bem como representam a marca do níveis máximos atingidos pelas transgressões marinha no Pleistoceno (Dominguez et al., 1981; Tessler & Goya,

2005). Os ramos dos haplótipos de NP e NSor aparecem mais longos nas árvores, indicando uma colonização mais antiga dessas áreas e convergindo com a disposição do clado central observado em *A. brunoi*. No entanto, esta é uma conclusão preliminar, pois os ramos mais longos dos clados do norte podem ser ocasionados pelo baixo número amostral nessas localidades, demonstrando apenas aqueles haplótipos mais diferenciados, o que influencia as análises. Ao contrário do que foi visto em *A. brunoi*, em que populações ao norte e ao sul do Rio Doce parecem ainda manter fluxo gênico, *P. crombiei* apresenta sinais de uma divisão importante ao norte e ao sul do rio. A divergência mais alta, verificada para ambos os genes, foi encontrada nessa área. Embora haja alguns haplótipos do norte que apareçam agrupados aos do sul, a topologia das árvores demonstram uma divisão mais marcada nessa espécie. Lampert et al., (2003) chamam a atenção para pouca mobilidade em uma espécie co-genérica e sobre a possibilidade do fluxo gênico através de rios ocorrer por transporte humano acidental. Além disso, alguns autores (Martin et al., 1993; Suguio & Nogueira, 1999) defendem a idéia de que foi apenas no início do Plioceno, e em condições de alta umidade, que os rios da costa atlântica se aproximaram do curso atualmente observado, abrindo caminho através da Formação Barreiras, época que combina com as datas encontradas nessa espécie (Tabela 5).

#### **4.5 Modelos paleoclimáticos e a distribuição histórica de *Aparasphenodon brunoi* e *Physalaemus crombiei* na região central da Mata Atlântica**

Os paleomodelos (Figura 5) encontraram áreas climaticamente estáveis que podem ter representado refúgios para as espécies em questão. Além disso, as estimativas do tempo de divergência encontradas para *A. brunoi* são compatíveis com a hipótese de que mudanças climáticas ocorridas no Quaternário causaram a fragmentação de habitats e foram determinantes para a diferenciação geográfica entre as populações verificadas nessa espécie.

A cerca de 20.000 anos atrás, durante a Última Glacial Máxima (LGM – Figura 5) o mar apresentava-se recuado em níveis mais baixos que os atuais, expondo quase totalmente a plataforma continental, e o clima era predominantemente frio e seco (Behling, 2002b; Tessler & Goya, 2005). O modelo prevê que nessa época as populações ocupavam predominantemente a região norte da Mata Atlântica. Além dessa área estável mais contínua, ao norte da Mata Atlântica, foi predita uma pequena porção ao sul do Rio Doce. Áreas atualmente cobertas pelo mar parecem ter sido colonizadas

durante uma possível expansão das áreas de restinga em direção ao oceano. As matas litorâneas sofreram menor influência das adversidades climáticas e, principalmente, a floresta tropical chuvosa manteve-se mais constante ao longo da costa se comparada à floresta semi-decídua, historicamente mais instável em algumas áreas (Behling & Lichte, 1997). Como já discutido, a partir da porção sul do ES e norte do RJ, observa-se nas condições atuais uma queda na precipitação, aumento da sazonalidade e climas mais frios. Como demonstrado em estudos paleopalinológicos, tais condições estiveram intensificadas durante o LGM, havendo substituição das matas nessa região, em direção ao sul, por gramíneas e algumas plantas de clima subtropical, representando, portanto, condições desfavoráveis à ocorrência dessas espécies.

Durante a Última Interglacial, cerca de 120.000 anos atrás (LIG – Figura 5), notou-se maior disponibilidade de áreas com condições adequadas a ocorrência de *A. brunoi* ao norte e sul, bem como observa-se maior semelhança na disposição entre essas áreas ambientalmente favoráveis e as observadas no modelo do presente, sugerindo condições mais semelhantes entre essas épocas. Além de aplicáveis a *A. brunoi*, é possível que os modelos do presente, LGM e LIG estejam sendo predizentes também para as demais espécies de *Aparasphenodon*, o que pode revelar pontos importantes nos padrões de diversificação do gênero. *Aparasphenodon arapapa* Pimenta, Napoli, and Haddad, 2009, *A. bokermanni* Pombal, 1993 e *A. brunoi* ocorrem ao longo da costa brasileira, ocupando ambientes semelhantes: predominantemente áreas de restinga e matas associadas ao litoral, estando os limites de *A. bokermanni* e *A. brunoi*, aparentemente, coincidindo com a ocorrência da outra, enquanto a área de ocorrência de *A. arapapa* encontra-se dentro da distribuição de *A. brunoi*, o que reforça semelhanças ecológicas entre as espécies do gênero.

*Aparasphenodon arapapa* é conhecida para uma região restrita na costa da BA, nas localidades de Ituberá e Cairu, localizadas entre os rios Paraguaçu e Contas (Pimenta et al., 2009; Frost, 2012). *Aparasphenodon brunoi* ocorre desde a região de Ituberá, na BA até o litoral norte de SP (Sazima & Cardoso, 1980; Rocha et al, 2004; Frost, 2012) e *A. bokermanni* é conhecida do litoral sul de SP e Santa Catarina, no sul do Brasil (Frost, 2012). Há, portanto, uma estrutura geográfica observada na distribuição do gênero *Aparasphenodon* no Brasil, embora ocupem áreas com características similares. Devido ao padrão de simpatria e a semelhança nos ambientes ocupados, é sugerido que *A. arapapa* e *A. brunoi* diferenciaram-se sendo moldadas por fatores microambientais específicos, enquanto a alopatria verificada entre *A. brunoi* e *A.*

*bokermanni*, aparentemente acompanha as mudanças bioclimática, já citadas, encontradas na região sul de SP.

Embora discussões taxonômicas não façam parte do escopo no presente trabalho, com base nos padrões filogeográficos e índices de divergência genética encontrados (Tabelas 2 e 3), há possibilidade da existência de mais de uma espécie na área amostrada ou de um processo de diferenciação em andamento no norte do ES e sul da BA, ao sul do ES e norte do RJ e na população de MG. Porém, amostragem maior é necessária na região para confirmação desses indícios.

Em extenso estudo sobre as relações entre os anuros com ossificação cranial, Trueb (1970), chamou atenção para a próxima relação de parentesco entre *Aparasphenodon* e o gênero monotípico *Corythomantis*, estando esses dois gêneros diferenciados entre as demais pererecas de capacete. A autora sugere ainda ancestralidade comum para ambos os gêneros: *Corythomantis* e *Aparasphenodon* apresentam semelhanças na ocupação do habitat, nos ambientes de ocorrência, ambas apresentam ossificação cranial e mecanismos para ocupar áreas abertas e com maior exposição ao sol (Sazima & Cardoso, 1980; Andrade & Abe, 1997; Jared et al., 1999). A espécie *C. greeningi* apresenta-se amplamente distribuída desde áreas litorâneas até o interior do nordeste brasileiro, sendo encontrada também no nordeste de MG (Feio & Caramaschi, 1995; Frost, 2012). Essa espécie ocupa principalmente áreas de Caatinga (Sazima & Cardoso, 1980; Andrade & Abe, 1997; Jared et al, 1999), sendo encontrada também em zonas de transição entre Caatinga, Cerrado e matas arbustivas da floresta atlântica (Sazima & Cardoso, 1980). Portanto, *C. greeningi* apresenta-se como o componente mais ao norte na estrutura geográfica desses dois gêneros de hílídios com ossificação cranial.

Trueb, (1970), formulou uma hipótese sobre a diversificação entre os dois gêneros compatível com os modelos obtidos durante o LGM e LIG e com os padrões filogeográficos encontrados para *A. brunoi* no presente estudo. Com base na literatura, a autora sugere que, durante o Plioceno, áreas de matas abertas e climas mais secos eram mais amplamente distribuídas pela América do Sul, estando o ancestral comum bem distribuído nesse contínuo, na época. Mais recentemente, durante o Pleistoceno, mudanças climáticas moldaram a floresta tropical e causaram o isolamento das populações desse ancestral, que diferenciou-se em populações de animais ligeiramente menores que ocuparam áreas de vegetação xérica da Caatinga (*Corythomantis*) e outra



de animais maiores que ocuparam as áreas relativamente mais úmidas, de mata arbustiva aberta e com distribuição mais ampla ao longo do litoral (*Aparasphenodon*).

Embora a modelagem realizada não tenha sido feita para todo o gênero, a conformidade com a distribuição de *Aparasphenodon* visualizada no modelo do presente (Figura 5) deve ser resultado do fato dessas espécies cogenéricas ocuparem ambientes com características semelhantes, o que levou o modelo a predizer a distribuição de *A. brunoi* além do limite norte e sul de sua área de ocorrência conhecida. As adaptações à ambientes secos e as estratégias de manutenção da umidade corporal observadas em *Corythomantis* indicam uma origem na região nordeste, onde tais ambientes são mais distribuídos e tais características são necessárias para ocupá-los. Bookerman (1966) apontou esta região como provável local do tipo da espécie. Devido a essas características e às áreas estáveis previstas nos modelos, talvez o gênero *Aparasphenodon* tenha tido sua origem na mesma região.

Durante o LGM (~20.000 anos atrás) é possível ver uma área inferida como adequada à colonização para *A. brunoi* desde a região de Pernambuco no nordeste até a margem sul do Rio Doce. Já durante o LIG (~120.000 anos atrás) pode-se notar mais distribuída a área ambientalmente adequada até a região de Santa Catarina no sul do Brasil, portanto abarcando toda a área de distribuição histórica do gênero no país. É possível que depois de estabelecida ao longo de toda sua área de ocorrência no litoral, as populações ancestrais de *Aparasphenodon* tenham se diferenciado devido a eventos durante e posteriores ao LIG, podendo-se exemplificar, como já citado, a transgressão e regressão marinha ocorridas nessa época (Dominguez et al., 1981; Martin et al., 1993; Tessler & Goya, 2005) e as diferentes condições climáticas observadas atualmente ao longo da costa (Araujo, 1998; Scarano, 2002), causadoras de distinções na composição florística do cinturão litorâneo das matas, incluindo a restinga.

O mapa que apresenta a interseção entre os modelos e evidencia as prováveis áreas de refúgio que se mantiveram estáveis ao longo do LGM, LIG e no Presente (Fig. 5), demonstram alguns pontos concordantes a outros paleomodelos disponíveis na literatura. Paleomodelos de estabilidade de áreas testados para anfíbios e outros organismos (Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval et al., 2009) demonstram refúgios mais amplos na porção norte da Mata Atlântica. Carnaval & Moritz, (2008), modelaram as prováveis áreas historicamente estáveis na Mata Atlântica, e compararam seus resultados com estudos paleopalínológicos, filogeográficos e de áreas de endemismo realizados na Mata Atlântica. Estes autores encontraram um refúgio ao norte do Rio São Francisco

(Refúgio de Pernambuco) e outro localizado ao sul do Rio São Francisco, estendendo-se até uma pequena porção ao sul do Rio Doce (Refúgio da Bahia). Foi encontrada congruência entre os modelos por eles obtidos e dados palinológicos, bem como para boa parte dos estudos filogeográficos analisados; porém são citados estudos que verificaram sinais de populações com colonização antiga ao sul do Rio Doce. Os modelos obtidos por Carnaval et al., (2009), utilizando três espécies de anfíbios amplamente distribuídos na Mata Atlântica, mostram resultados semelhantes. Foram encontrados prováveis áreas estáveis na região de Pernambuco, na região da Bahia, incluindo áreas maiores ao sul do Rio Doce. Foi ainda detectada uma provável área estável na região de São Paulo para uma das espécies, havendo portanto a adição de um refúgio ao sul.

Os refúgios encontrados para *A. brunoi* encontram-se dentro das áreas estáveis, propostas como refúgios históricos na Mata Atlântica. As áreas apontadas como mais estáveis no presente estudo estão contidas nos, já citados, refúgios de Pernambuco, uma área mais ampla na Bahia e em uma pequena área localizada no sul do Rio Doce no ES. Se comparados aos refúgios propostos, encontrados nos trabalhos acima citados, os refúgios de *A. brunoi* possuem área reduzida e extremamente relacionada ao litoral, o que está de acordo com as características da espécie e com sua distribuição histórica.. Uma maior amostragem mostra-se necessária para verificar claramente as relações entre os modelos produzidos e os padrões filogeográficos obtidos. Porém, baseando-se em análise comparativa dos dois conjuntos de dados, é possível a formulação de hipóteses concordantes: I – Desde o LGM até as condições atuais, a área adequada para a ocorrência de *A. brunoi* encontrada na região da Bahia, proposta como mais estável, expandiu para o sul chegando até o norte do ES, o que explicaria o clado N encontrado para essa espécie; II – A julgar pela reduzida área proposta como estável, abaixo da margem sul do Rio Doce, pode-se inferir que a população de *A. brunoi* enfrentou um gargalo populacional, com expansão demográfica recente na região central do ES. Palma-Silva et al., (2009) atribuíram à região ao sul do Rio Doce no ES, como área de provável refúgio para uma espécie de bromélia que também ocorre no litoral. Como já citado a porção sul da Mata Atlântica possui relevo mais montanhoso e encostas se comparada ao norte, onde predominam baixadas. Isso deixa espécies do norte da Mata Atlântica mais suscetíveis aos eventos de transgressões marinhas. Na penúltima transgressão pleistocênica os níveis dos mares estiveram cerca de 6 a 10m acima do nível atual e na última, a até cerca 5.100 a.a, o nível dos mares esteve cerca de 4 metros acima

do atualmente observado na costa leste brasileira (Dominguez et al., 1981; Tessler e Goya, 2005). Esses eventos provavelmente impactaram as planícies litorâneas, atuando diretamente sobre o ambiente de restinga historicamente ocupado por *A. brunoi*.

Não se observou nenhum apontamento indicando a presença de refúgio histórico na região da Bacia do Rio Doce em direção ao interior do continente. Porém o modelo do presente alcançado neste estudo confirma esta como uma área adequada para a ocorrência da espécie. Os dados paleopalinológicos de Behling (1998), revelaram indícios de clima seco e redução nas matas de galeria para regiões de MG, e sua substituição por gramíneas e vegetação associada ao Cerrado, o que também foi confirmado pelos modelos de Carnaval & Moritz, (2008). As populações do norte do RJ necessitam de maior amostragem para esclarecimento dos padrões e relações dos organismos dessa região com os demais.

Observação similar a feita sobre os modelos de *A. brunoi* pode ser aplicada para *P. crombiei*. A predição dos modelos parece se aplicar as demais espécies do grupo *signifer* e não apenas a espécie em questão. O grupo *signifer* inclui *P. crombiei* e mais treze espécies que distribuem-se desde o estado de Alagoas até o Rio Grande do Sul, estando a maioria das espécies distribuídas entre os estados da BA, ES MG, RJ e SP (Nascimento et al., 2005; Frost, 2012). Este grupo representa um complexo de espécies crípticas, várias delas simpátricas (Nascimento et al., 2005; Prado & Pombal Jr., 2005; Rievers, 2010; Tonini et al., 2011), com modos reprodutivos e ocupação do habitat semelhantes (Pupin et al., 2010) que ocorrem desde o litoral até maiores altitudes no interior do continente. Mesmo espécies cogenéricas, porém de outros grupos de espécies, também são encontradas ocupando o mesmo ambiente (observação pessoal) que *P. crombiei*. Essa similaridade de características de ocupação e a simpatria das espécies indica a clara possibilidade dos modelos poderem ser aplicados para outras espécies do gênero e estarem modelando características ambientais comuns a elas.

Essa possibilidade explicaria o fato do modelo do presente ter incluído áreas ao sul e ao norte da distribuição esperada para *P. crombiei* (Peixoto & Pimenta, 2004; Frost, 2012). De fato, espécies cogenéricas próximas a ela ocorrem nessa área. O limite norte observado no modelo de *P. crombiei* aparece associado ao Rio Mucuri, na BA. Essa observação faz sentido a julgar pela distribuição conhecida da espécie. Embora Peixoto & Pimenta (2004) relatem a distribuição de *P. crombiei* como mais ampla, da região de Itabuna, BA, até o sul do ES, não são encontrados dados na literatura que demonstrem a ocorrência dessa espécie além do município de Nova Viçosa, extremo sul

da Bahia (Almeida et al., 2011; Frost, 2012). É indicado que, o que Peixoto & Pimenta (2004) consideraram ser *P. crombiei*, na porção ao norte de Nova Viçosa, sul da Bahia, tratava-se na verdade de *P. camacan* Pimenta, Cruz & Silvano, 2005, cuja localidade tipo é no município de Una, BA, e que também pertence ao grupo *signifer*. Talvez os limites do plano de fundo usado para o modelo (Itabuna, BA – Cachoeiro, ES) tenham influenciado esses resultados, amostrando características em áreas além da distribuição da espécie ao norte, sendo possível que o modelo fosse mais específico se o limite norte do plano de fundo utilizado fosse reduzido à Nova Viçosa, sul da BA, porém, a já mencionada, ocorrência sintópica e simpátrica verificada nas espécies deste gênero torna difícil a aplicação de um modelo mais específico dentro desse complexo de espécies.

Durante o LGM (Figura 5), percebe-se que *P. crombiei* não acompanhou o avanço da linha do litoral ao longo da costa a partir da região do Rio Doce, diferindo do encontrado para *A. brunoi*, o que novamente demonstra diferenças nas exigências ecológicas e tolerância às características ambientais observadas entre as duas espécies deste trabalho. Embora também ocupe as matas no litoral, *P. crombiei* não possui semelhantes adaptações, já citadas para *A. brunoi*, que permitam sua vida em ambientes extremos como as matas abertas de restinga litorâneas. Além disso, mesmo que seja encontrado reproduzindo-se em áreas abertas e bordas de mata em épocas chuvosa, *P. crombiei* é uma espécie associada ao interior de mata (Peixoto & Pimenta, 2004; Pupin et al., 2010), vivendo comumente no folhiço úmido. É possível que espécies cogenéricas próximas tenham expandido consideravelmente seu território durante o LGM. A área apontada como adequada durante o LGM incorpora a maior parte da distribuição do grupo *signifer* e talvez possa caracterizar parte da colonização histórica desse complexo ou sua área de refúgio. Há a possibilidade de espécies semelhantes estarem co-existindo nos refúgios, porém já sendo espécies diferentes.

O LIG representa uma época de condições desfavoráveis para a distribuição dessa espécie e, talvez, também para outros *Physalaemus* do grupo *signifer*. Áreas distantes da distribuição histórica dessa espécie, como as observadas no modelo nos três tempos para a parte oeste da Mata Atlântica, mesmo que tenham apresentado características viáveis à sobrevivência de *P. crombiei*, dificilmente foram colonizadas devido a baixa vagilidade da espécie e a presença de áreas inadequadas entre elas. É possível que o refúgio de Pernambuco, verificado nos três tempos do modelo, mostre a ocupação histórica de *P. caete*, Pombal & Madureira, 1997, espécie restrita a região de

Alagoas, nordeste brasileiro (Frost, 2012). Nascimento et al, (2005), pela análise de caracteres morfométricos, apontaram o grupo *signifer* como monofilético e comentaram a existência de espécies largamente distribuídas e outras de distribuição restrita, pertencentes ao grupo. É sugerido pelo presente trabalho, que *P. crombiei* seja uma das espécies de distribuição restrita desse grupo, com indícios de expansão recente na região central do ES (Figura 3, 4 e 7).

Os possíveis refúgios encontrados na interseção dos modelos (Figura 5) indicam que as áreas estáveis, com características adequadas à ocorrência da espécie, permanecem praticamente as mesmas observadas em LIG, porém ainda mais reduzidos. Diferenças nas exigências ecológicas e competição entre as espécie de *Physalaemus* desse grupo devem ser fatores importantes que permitem a colonização de algumas áreas por algumas espécies e não por outras cogenéricas. Possivelmente, populações ancestrais isoladas nos refúgios demonstrados tenham se diferenciado ocupando locais separados, que embora separados, apresentavam características semelhantes. Além disso, ao se observar a recorrente simpatria entre as espécies, há a possibilidade de que algumas só não ocorram em determinadas áreas por não conseguirem se dispersar.

Além do refúgio de Pernambuco, outra congruência observada entre as áreas estáveis encontradas nos modelos para *P. crombiei* e *A. brunoi*, é a presença, localização e tamanho do refúgio ao sul do Rio Doce. Além de ambas as espécies possuírem compartilhamento de haplótipos semelhante na região central do ES, chama atenção o fato do grupo *signifer* possuir distribuição muito similar à observada para as espécies de *Aparasphenodon*, indicando tolerância a mudanças ocorridas historicamente parecidas, lembrando-se ainda que as duas espécies alvo do trabalho compartilham a característica de ocupar áreas litorâneas até altitudes mais elevadas em matas no interior.

Apesar dessas similaridades, notam-se algumas limitações entre os padrões filogeográficos obtidos para *P. crombiei* e os modelos gerados. Os ramos observados nas árvores são mais longos nas populações provenientes dos clados do norte (NP e NSor) (Figura 3 e 4) que as encontradas no centro do ES (CS). Esse dado contradiz o modelo que indica que as populações do centro do ES persistiram mais que as do norte. O reduzido refúgio encontrado, também nessa espécie, pode ser indicativo de um gargalo populacional ocorrido na área e posterior expansão populacional, após a volta de condições ideais, o que esta de acordo com a filogenia obtida para o clado CS. Talvez o modelo não tenha sido capaz de recuperar o refúgio ao norte do Rio Doce,

devido a heterogeneidade ambiental desses locais, podendo ter ocorrido influência da diferença amostral entre os clados a norte e sul do rio.

Dada a divergência genética encontrada entre populações de *P. crombiei*, pode-se dizer que estas provavelmente não representam apenas uma espécie. Carnaval & Bates, (2007), encontraram níveis semelhantes de divergência nas populações amostradas para *Ischnocnema gr. ramagii*. Recentemente, Vittorazzi, (2010), em estudo cromossômico de diferentes populações de *P. cuvieri* relatou que essas correspondem na verdade a um complexo de espécies crípticas. O criptismo também é uma característica observada no grupo *signifer* tendo sido já comentada entre *P. crombiei* e *P. obtectus* (Santos et al., 2009; Rievers, 2010), ambas ocorrendo nas mesmas regiões no ES (Frost, 2012), e recentemente registradas para o PERD, MG (Feio et al., 1998; Rievers, 2010). Santos et al. (2009), encontrou *P. obtectus* e *Physalaemus* sp. (aff. *obtectus*) em MG, porém verificou diferenças significativas entre o canto das mesmas, indicando serem estas espécies distintas. Foram percebidas pelos autores semelhanças entre o canto de *Physalaemus* sp. (aff. *obtectus*) e *P. crombiei*, podendo este ser mais um local de ocorrência simpátrica dessas espécies.

Outra possibilidade é a ocorrência de *P. camacan* no norte do ES, além do sul da Bahia, já que esta trata-se, também, de uma espécie críptica em relação a *P. crombiei* (Peixoto & Pimenta, 2004; Pimenta et al., 2005), o que estaria de acordo com a já comentada semelhança das matas de tabuleiro entre o norte do ES e sul da BA. Portanto, existe a possibilidade de que dois ou mais táxons do grupo *signifer* tenham sido amostrados e empregados no presente estudo como uma mesma espécie. Sendo assim, é sugerido que o táxon atualmente reconhecido como *P. crombiei* no ES, represente mais que uma única espécie. Em qualquer caso, um estudo envolvendo análises moleculares e morfológicas é necessário para o esclarecimento destas questões levantadas.

## 5. Conclusão

Este estudo adiciona novas informações que contribuem para a compreensão dos padrões de diversidade de anuros da Mata Atlântica, particularmente para *Aparasphenodon* e *Physalaemus*. É percebido que as duas espécies alvo do trabalho carecem de informações a respeito de sua distribuição geográfica histórica. *Aparasphenodon brunoi*, relacionada sempre a matas de restinga, vem tendo crescente registro em matas de interior em maiores altitudes e *Physalaemus crombiei* vem tendo sua área de ocorrência ampliada continuamente nos últimos anos.

A divergência genética intraespecífica e os padrões filogeográficos encontrados sugerem a hipótese de diferenciação ao longo de gradientes ecológicos, nas duas espécies. Foram reveladas várias congruências no padrão de distribuição de ambas as espécies, que parecem ter alguns mecanismos fisiológicos e reprodutivos que contribuem para uma menor dependência do regime de chuvas. Além disso, o Rio Doce parece ter representado uma barreira importante ao fluxo gênico de *P. crombiei* e ambas as espécies apresentaram um refúgio pequeno e bem localizado na margem sul do Rio Doce, revelando uma história evolutiva parecida, na região central do ES, sendo indicada uma recente expansão populacional para as duas espécies nessa região.

Vale ressaltar, que com base na distribuição das populações e haplótipos, as filogenias encontradas e as divergências observadas entre clados filogeográficos, os resultados preliminares deste estudo apontam para a possível ocorrência de espécies distintas ao norte do Espírito Santo mais sul da Bahia, centro do Espírito Santo, e sul do ES mais norte do Rio de Janeiro, o que está de acordo com outros estudos realizados na Mata Atlântica. Tais limites coincidem com os já relatados em outros trabalhos (Rizzini, 1967; Coimbra-Filho & Câmara, 1996; Costa, 2003; Carnaval et al., 2009; Martins, 2011, Costa & Leite *in press*). No entanto, maior número amostral e comparação a dados morfológicos mostram-se necessários para clara definição dos limites encontrados entre clados e a tomada de decisões taxonômicas.

## Referências Bibliográficas

- Almeida, A. P., Gasparini, J. L., Peloso P. L. V.. 2010. Frogs of the state of Espírito Santo, southeastern Brazil – The need for looking at the “coldspots”. *Check List*, 7(4), 542-560.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.
- Anderson, R. P., Raza, A.. 2010. The effect of the extent of the study region on GIS models of species geographic distributions and estimates of niche evolution: preliminary tests with montane rodents (genus *Nephelomys*) in Venezuela. *Journal of Biogeography*, 37: 1378–1393
- Andrade, D. V. and A. S. Abe. 1997. Evaporative water loss and oxygen uptake in two Casque-Headed tree frogs , *Aparasphenodon brunoi* and *Corythomantis greeningi* (Anura, Hylidae ). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A: 685–689
- Araujo, D. S. D. 1997. The Cabo Frio region. In: Davis, S. D.; Heywood, V. H.; HerreraMcBryde, O.; Villa-Lobos, J. & Hamilton, A. C. (eds.). *Centres of Plant Diversity: a guide and strategy for their conservation*. Vol 3: The Americas. WWF/ IUCN. Oxford. Pp. 373-375.
- Argôlo, A. J. S., 2000. Geographic distribution. *Aparasphenodon brunoi*. *Herpetological Review*, 31(2): 108.
- Avise, J. C.; Walker, D.; and Johns, G. C.. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings. Biological sciences*, 265(1407): 1707–1712.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Bandelt, H. J., Forster, P. G., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Behling, H., Lichte, M..1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research* 48: 348–358.
- Behling, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology* 99:143-156.
- a.Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 19-27.
- Behling H., Negrelle, R. R. B. 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the late Quaternary. *Quaternary Research*, 56: 383–389.



- b.Behling, H.. 2002, Carbon storage increases by major forest ecosystems in Tropical South America since the Last Glacial Maximum and the early Holocene. *Global and Planetary Change*, 33: 107 - 116.
- Bernardes, A. T., Nascimento, L. B., Feio, R. N. & Caramaschi, U. 1994. Herpetofauna. In *Anais do Workshop sobre pesquisas prioritárias para o Parque Estadual do Rio Doce* (M.A. Drumond, P.M. Andrade & F.J. Cerceaux, orgs.). Instituto Estadual de Florestas & Engevix Engenharia S.A., Belo Horizonte, p. 49-56.
- Bookerman, W. C. A. 1996. Lista Anotada das Localidades tipo de Anfíbios brasileiros. Universidade de São Paulo, 183p.
- Cabanne, G.S., Santos, F.R., Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91: 73–84.
- Cabanne, G. S., d'Horta, F. M., Sari, E. H. R., Santos, F. R. & Miyaki, C. Y.. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 760–773
- Caldara, V. Jr 2008. Identidade taxonômica e variação geográfica dos ouriços cacheiros do leste do Brasil (Mammalia: Erethizontidae: Sphiggurus). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 68 pp.
- Carnaval, A.C.O.Q. 2002. Phylogeography of four frogs species in Forest Fragments of Northeastern Brazil – A preliminary study. *Integrative and Comparative Biology*, 42:913-921.
- Carnaval, A.C.O.Q; Bates, JM. 2007. Amphibian DNA Shows Marked Genetic Structure and Tracks Pleistocene Climate Change in Northeastern Brazil. The Author(s). Journal compilation © 2007 The Society for the Study of Evolution. 61: 2942 – 2957.
- Carnaval, A.C.O.Q. & Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*. 35: 1-15.
- Carnaval, A.C.O.Q.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T. & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*. 323: 785-789.
- Cogliatti-Carvalho, L., Freitas, A. F. N., Rocha, C. F. D., & Van Sluys, M. 2001. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revista brasileira de Botânica*, 24(1): 1-9.

- Coimbra-Filho, A.F. & Câmara, I.G. 1996. Os limites originais do Bioma Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil. FBCN Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza, Rio de Janeiro. 96 pp.
- Costa, L. P. & Leite, Y. L. R. (in press) Historical Fragmentation Shaping Vertebrate Diversification in the Atlantic Forest Biodiversity Hotspot. Bones, clones and biomes: the history and geography of Recent Neotropical mammals (ed. By B. Patterson & L.P. Costa). University of Chicago Press, Chicago.
- Costa, L. P. 2003. 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.
- Crawford, A.J.. 2003. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, 12: 2525-2540.
- Crawford, A.J., Bermingham, E., Polania, C, 2007. 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
- Dominguez, J. M. L., Bittencourt, A. C. S. P. & Martins, L.. 1981. Esquema evolutivo da sedimentação quaternária nas feições deltaicas dos rios São Francisco (SE/AL), Jequitinhonha (BA), Doce (ES) e Paraíba do Sul (RJ ). *Revista Brasileira de Geociências*. 11(4): 227-23
- Duellman, W. E. & Trueb, L.. 1994. *Biology of amphibians*. The John Hopkins University Press. USA: Baltimore.
- Duellman, W. E.. 1999. *Patterns of distribution of amphibians*. The Johns Hopkins University Press. USA: Baltimore.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J. & Rambaut, A.. 2006. *PLoS Biology* 4, e88
- Drummond, A. J. & Rambaut A.. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Feio, R. N., Caramaschi, U. 1995. Aspectos Zoogeográficos dos Anfíbios do Médio Rio Jequitinhonha, Nordeste de Minas Gerais, Brasil. *Revista Ceres*, 42(239): 53-61.
- Feio, R. N., Braga, U. M. L., Wiederhecker, H. & Santos, P. S., 1998, Anfíbios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais). Universidade Federal de Viçosa, Instituto Estadual de Florestas, 32p.
- Feio, R. N. & Caramaschi, U. 2002. Contribuições ao conhecimento da herpetofauna do nordeste do estado de Minas Gerais, Brasil. *Phyllomedusa*, 1: 105-111.

- Feio, R.N. and P.L. Ferreira. 2005. Anfíbios de dois fragmentos de Mata Atlântica no Município de Rio Novo, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoociências*, 7(1): 121-128.
- Fitzpatrick, S. W.; Brasileiro, C. A.; Haddad C. F. B. & Zamudio K. R.. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, 18(13): 2877-2896.
- Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M. D.; Meyer, A.; Marty, C.; Blanc, M.; Gilles, A.. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2): 567-582.
- Franco, A. C., Nobel, P. S. 1989. Effect of nurse plants on the microhabitat and growth of cacti. *Journal of Ecology*, 77: 870-886.
- Fu, Y. X.. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-92
- Frost, D.R. 2012. Amphibian Species of the World: an online reference. V2.21 (29 janeiro 2012). Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.
- Galindo-Leal, C., and I. G. Câmara. 2003. Atlantic Forest Hotspot Status: An Overview. In *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats and Outlook*, edited by C. Galindo-Leal and I. G. Câmara, 3-11. Washington: Island Press.
- Graham, C. H., Moritz, C. & Williams, S. E.. 2006. Habitat history improves prediction of biodiversity in a rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 632-636.
- Grazziotin, F.G.; Monzel, M.; Echeverrigaray, S. & S.L. Bonatto. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* Complex (Serpentes:Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15: 3969-3982.
- Hugall, A., Moritz, C., Moussalli, A. & Stanisic, J.. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rain forest landsnail *Gnarosiphia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 6112-6117.
- Lampert KP, Rand AS, Mueller UG and Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the tungara-frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology*, 12: 3325-3334.
- Lynch, J. D. 1979. The Amphibians of the Lowland Tropical Forests. In *The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution and Dispersal*, ed., W. E. Duellman, 189-216. Lawrence: Museum of Natural History, University of Kansas.

- Haddad, C. F. B., Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *BioScience*, 55: 207–217.
- Haddad, C. F. B., Sazima, I., 2004. A new species of *Physalaemus* (Amphibia; Leptodactylidae) from the Atlantic forest in southeastern Brazil. *Zootaxa*, 79: 1–12.
- Heyer, W. R. & Maxson, Linda R. 1982. Distributions, relationships and zoogeography of lowland frogs. The *Leptodactylus* complex in South America, with special reference to Amazonia. In: Prance, G. T., *Biological diversification in the tropics*. New York: Columbia University Press, pp.375-388.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. & Jarvis, A.. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25: 1965-1978.
- Jared, C., Antoniazzi, M. M., Katchburian, E., Toledo, R. C., Freymuller, E.. 1999. Some aspects of the natural history of the casque-headed tree tree-frog *Corythomantis greeningi* Boulenger (Hylidae). *Annales Des Sciences Naturelles Biologie Animale et Zoologie*, 3: 105-115.
- Joly, P., Morand, C. & Cohas, A.. 2003. Habitat fragmentation and amphibian conservation: building a tool for assessing landscape matrix connectivity. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 132–S139.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M.. 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences*, 10: 189-191.
- Leitão-Filho, H. F.. 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e sub tropicais do Brasil. *IPEF*, 35: 41-46.
- Leite, Y. L. R.. 2003. Evolution and Systematics of the Atlantic Tree Rats, genus *Phyllomys* (Rodentia. Echimyidae), with Description of Two New Species. *University of Califórnia Publications in Zoology*. 132: 1-118.
- Librado, P. & Rosas, J.. 2009. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452. (doi:10.1093/bioinformatics/btp187).
- Marsh, D. M., Rand, A. S., Ryan, M. J. 2000. Effects of inter-pond distance on the breeding ecology of túngara frogs. *Oecologia*, 122: 505-513
- Martin, L., Suguio, K., Flexor, J. M. 1993. As flutuações do nível do mar durante o Quaternário superior e a evolução geológica dos deltas brasileiros. *Boletim IGUSP, Publicação Especial* 15: 186pp.

- Martins, F. M. 2011 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
- Mayr, E. & O'Hara, R. J.. 1986 The Biogeographic Evidence Supporting the Pleistocene Forest Refuge Hypothesis. *Evolution*, 40(1): 55-67
- Medrano, J. F., Aasen, E. & Sharrow, L.. 1990. DNA extraction from nucleated red-blood cells. *Biotechniques*, 8: 43.
- Mello, C. L., Metelo, C. M. S., Suguio, K. & Kohler, H. C.. 1999. Quaternary sedimentation, neotectonics and the evolution of the Doce river middle valley lake system (southeastern Brazil). *Revista do Instituto Geológico IG São Paulo*, 20(1/2): 29-36
- Mesquita, D. O., Costa, G. C. & Zatz, M. G.. 2004. Ecological aspects of the casque-headed frog *Aparasphenodon brunoi* (Anura, Hylidae) in a Restinga habitat in southeastern Brasil. *Phyllomedusa*, 3(1):51-59.
- Moraes-Barros, N., Silva, J.A.B., Myiaki, C.Y. & Morgante, J.S.. 2006. Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genética*, 126: 189-198.
- Müller, P. 1973. Dispersal Centres of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm. *Biogeographica*, 2. The Hague: Dr. W. Junk.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J.. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Nascimento, L. B., U. Caramaschi, and C. A. G. Cruz . 2005. Taxonomic review of the species group of the genus *Physalameus Fitzinger*, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jimenez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix Steindachner*, 1836 (*Amphibia, Anura, Leptodactylidae*). *Arquivos do Museu Nacional*, 63: 297-320.
- Oliveira-Filho, A. T. & Ratter, J. A. 1995. A study of the origin of Central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany*, 52: 141-194.
- Oliveira-Filho, A. T. & Fontes, M. A. L.. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*, 32:793-810.
- Pearson R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., Peterson, A. T.. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*, 34: 102- 117.
- Pellegrino, K.C. M.; Rodrigues, M.T.; Waite, A.N.; Morando, M.; Yassuda, Y.Y. & Sites Jr, J.W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus*

- darwini complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85: 13–26.
- Phillips, SJ; Anderson, RP; Robert, E.S.. 2006. Maximum Entropy Modeling of Species Geographic Distribution. *Ecological Modelling*, 190: 231-259.
- Pimenta, B. V. S., Napoli, M. F. & Haddad, C. F. B. 2009. A new species of casque-headed tree frog, genus *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Hylidae), from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2123: 46–54.
- Posada, D.. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.
- Prado, G. M.; Pombal Jr, J. P.. 2005. Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo da Reserva Biológica de Duas Bocas, Sudeste do Brasil, *Arquivos do Museu Nacional*, 63(4):685-705.
- Peixoto, O. L., Pimenta, B. 2004. *Physalaemus crombiei*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acessado em 10 de janeiro de 2012.
- Pröhl, H., Ron, S. R. & Ryan M. J. 2010. Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American túngara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. *BMC Evolutionary*, 10:146
- Pupin, N.C., Gasparini, J. L., Bastos, R. P., Haddad, C. F.B., Prado, C. P. A.. 2010. Reproductive biology of an endemic *Physalaemus* of the Brazilian Atlantic forest, and the trade-off between clutch and egg size in terrestrial breeders of the *P. signifer* group. *The Herpetological Journal*, Reino Unido, 20(3): 147-156.
- Resende, H. C., Yotoko, K. S. C., Delabie, J. H. C., Costa, M. A., Campiolo, S., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., Fernandes-Salomão, T. M. 2010. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 949–960.
- Rievers, C. R. 2010. Anfíbios Anuros de Serrapilheira do Parque Estadual do Rio Doce: resposta à disponibilidade de recursos e aos fatores climáticos. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, pela Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2010.
- Rizzini, C.T. 1967. Delimitação, caracterização e relações da flora silvestre hiléiana. *Atlas Simp. Biota Amazônica*, 4: 13-36.
- Rocha., C. F., Carvalho-e-Silva, S. P., Van Sluys, M. 2004. *Aparasphenodon brunoi*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acessado em 30 de janeiro de 2012.

- São-Pedro, V. A. & Feio, R. N.. 2011. Anuran species composition from Serra do ouro Branco, Southernmost Espinhaço Mountain Range, state of Minas Gerais, Brazil. *Check List*, 7(5): 671-680.
- Santos, F. M.; Leite, F. S. F. & Garcia, P. C. A. 2009. Ocorrência de Descrição do Canto de *Physalaemus* sp. (aff. *obtectus*) em Minas Gerais. *Anais de IV Congresso Brasileiro de Herpetologia. Soc. Bras. Herp. Pirinópolis, Goiás*.
- Sazima, I. & Cardoso, A. J.. 1980. Notas sobre a distribuição de *Corythomantis greeningi* Boulenger, 1896 e *Aparasphenodon bruno*i Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Hylidae). *Iheringia, Série Zoológica*, 55: 3-7.
- Silva, J. M. C., Souza, M. C. & Castelletti, C. H. M.. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13: 85-92.
- Siqueira, M. Fm. 1994. Análise Florística e ordenação de Espécies Arbóreas da Mata Atlântica através de dados binários. Dissertação. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.
- SBH. 2011. *Brazilian amphibians – List of species*. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 12 de dezembro de 2011.
- Scarano, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany* 90: 517-524.
- SOS Mata Atlântica & INPE 1993. Atlas da Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados do Domínio da Mata Atlântica no Período 1985-1990. Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo.
- Suguio, K. & Nogueira, A. C. R.. 1999. Revisão crítica dos conhecimentos geológicos sobre a formação (ou grupo?) Barreiras do Neógeno e o seu possível significado como testemunho de alguns eventos geológicos mundiais. *Geociências*, S. Paulo, 18: 461-479.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):585–595.
- Teixeira, R. L.; Schneider, J. A. P.; Almeida, G. I. 2002. The occurrence of amphibians in bromeliads from a Southeastern Brazilian restinga habitat, with special reference to *Aparasphenodon bruno*i (Anura, Hylidae). *Brazilian Journal of Biology*, 62(2), 263-268.
- Tessler, M.G.; Goya, S.C. (2005) - Processos costeiros condicionantes do litoral brasileiro. *Revista do Departamento de Geografia* (ISSN: 0102-4582), 17:11-23, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Disponível em: [http://www.geografia.flch.usp.br/publicacoes/rdg/RDG\\_17/Moyses\\_Gonzalez\\_Tessler.pdf](http://www.geografia.flch.usp.br/publicacoes/rdg/RDG_17/Moyses_Gonzalez_Tessler.pdf).

- Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera, J. F. A., & Alexandrino, J.. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1018–1031.
- Tonini, J.F.R., L.M. Carão, I.S. Pinto, J.L. Gasparini, Y.L.R. Leite and L.P. Costa. 2010. Non-volant tetrapods from Reserva Biológica de Duas Bocas. *Biota Neotropica*, 10(3): 339-351.
- Tonini, J.F.R., Mendonça, I. S., Coutinho, A. B. & Gasparini J. L. 2011 Anurans from Costa Bela, state of Espírito Santo, southeastern Brazil: inventory at an urban area and the re-discovery of *Allobates* in the state. *Herpetology Notes*, 4: 435-444
- Trueb, L.. 1970. Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with co ossified skulls (Family Hylidae). *Univ. Kansas Publ., Museum of Natural History*, 18: 547–716
- Vallinoto, M., Sequeira, F., Sodre, D., Bernardi, J. A. R., Sampaio, I. & Schneider, H. 2010. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoologica Scripta*, 39:128–140.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. In: L. Eguiarte, V. Souza, (eds.). *Ecología Molecular*. INE, México. Cap. 14, p. 441-466.
- Vanzolini, P.E. & Williams, E.E. (1970) South american anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, 19: 1–298.
- Viana, B. F. & Alves, dos S. I.. 2002 Bee Diversity of the Coastal Sand Dunes Of Brazil. IN: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (eds) - Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasília. p.135-153.
- Vittorazzi, S. E. 2010. Isolamento e caracterização de DNA repetitivo de *Physalaemus cuvier* e localização cromossômica em espécies do grupo “*cuvieri*” de *Physalaemus* (Amphibia, Anura, Leiuperidae). Dissertação. Mestrado em Biologia Celular e Estrutural. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. SP.
- Zamudio, K. R. & Greene, H. W.. 1997. Phylogeography of the Bushmaster (*Lachesis muta*, Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 62: 421-442.
- Young, D. R., Shao, G., Porter, J. H. 1995. Spatial and temporal growth dynamics of Barrier Islands shrub thickets. *American Journal of Botany*, 82 : 638-645.



- Waltari, E., Hijmans, R. J., Peterson, A. T., Nyári, Á. S., Perkins, S. L., Guralnick, R. P.. 2007. Locating Pleistocene Refugia: Comparing Phylogeographic and Ecological Niche Model Predictions. *Plos One*, 2(7): 563.
- Wüster, W., Duarte, M. R. & Salomão, M. D. G. 2005. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. *Journal Zoology London*, 266: 1–10.

## Anexo I

**Tabela 1.** Índices de diversidade genética obtidos para os marcadores moleculares ND2 e COI em *A. brunoi* e *P. crombiei*

Aparasphenodon brunoi ND2					
N	H	Hd	$\Pi$	D	Fs
25	19	0,973 $\pm$ 0,019	0,0352 $\pm$ 0,013	<b>-1,97433*</b>	0,354
Aparasphenodon brunoi COI					
N	H	Hd	$\Pi$	D	Fs
22	15	0,952 $\pm$ 0,029	0,0462 $\pm$ 0,018	<b>-2,03456*</b>	1,957
Physalaemus crombiei ND2					
N	H	Hd	$\Pi$	D	Fs
40	27	0,967 $\pm$ 0,016	0,053 $\pm$ 0,013	-0,60870	1,953
Physalaemus crombiei COI					
N	H	Hd	$\Pi$	D	Fs
42	17	0,931 $\pm$ 0,018	0,047 $\pm$ 0,012	-0.38901	8.977

N – número de amostras; H – número de haplotipos; Hd – diversidade haplotípica;  $\pi$  – diversidade nucleotídica; ; D - D de Tajima ( $p < 0.05^*$ ); Fs – F de FU.

**Tabela 2.** Índices de divergência genética do marcador molecular ND2 obtido para os clados de *A. brunoi*

Aparasphenodon brunoi ND2		
Clados	DGen. (%)	EP
N - C	2,4	$\pm$ 0.004
N - MG	2,6	$\pm$ 0.005
MG - C	2,4	$\pm$ 0.004
N - S	3,9	$\pm$ 0.006
MG - S	3,7	$\pm$ 0.006
C - S	3,4	$\pm$ 0.005
N - S10550	23,8	$\pm$ 0.017
MG - S10550	23,6	$\pm$ 0.016
C - S10550	24,3	$\pm$ 0.017
S - S10550	22,9	$\pm$ 0.016

DGen – Divergência genética em porcentagem; EP – Erro Padrão. Os clados contêm aqueles encontrados e citados nos resultados

**Tabela 3.** Índices de divergência genética do marcador molecular COI obtido para os clados de *A. brunoi*

<i>Aparasphenodon brunoi</i> COI		
Clados	DGen. (%)	EP
N - C	0,8	±0.003
N - MG	0,6	±0.003
MG - C	1,0	±0.003
N - S	1,2	±0.003
MG - S	1,8	±0.004
C - S	1,9	±0.004
N - S10550	21,5	±0.022
MG - S10550	21,4	±0.022
C - S10550	21,5	±0.022
S - S10550	20,9	±0.021
N - FL10870	22,1	±0.021
MG - FL10870	22,1	±0.021
C - FL10870	22,2	±0.021
S - FL10870	22,1	±0.021
S10550 - FL10870	25,8	±0.023
FL10870 - FL10871	13,2	±0.015
N - FL10871	7,8	±0.012
MG - FL10871	7,9	±0.012
C - FL10871	8,3	±0.012
S - FL10871	8,7	±0.012
S10550 - FL10871	23,6	±0.022

DGen – Divergência genética em porcentagem;  
EP – Erro Padrão. Os clados contêm aqueles encontrados e citados nos resultados

**Tabela 4.** Índices de divergência genética dos marcadores moleculares ND2 e COI obtidos para os clados de *P. crombiei*

<i>Physalaemus crombiei</i> ND2		
Clados	DGen, (%)	EP
PN - NSOr	14,3	±0,014
PN - CS	18,6	±0,016
NSO - CS	17,8	±0,015
<i>Physalaemus crombiei</i> COI		
Clados	DGen, (%)	EP
PN - NSOr	9,8	±0,012
PN - CS	18,4	±0,019
NSO - CS	17,2	±0,018

DGen – Divergência genética em porcentagem; EP – Erro Padrão. Os clados contêm aqueles encontrados e citados nos resultados

**Tabela 5.** Estimativas do tempo de divergência entre os clados encontrados para o gene ND2 em *A. brunoi* e *P. crombiei*. O Relógio Molecular foi calibrado para 0,957% mutações por milhões de anos seguindo Crawford, (2003)

<i>Aparasphenodon brunoi</i> ND2	
Clados	Td estimado
N – C	2,00 (0,94-3,65)
C – MG	1,84 (0,89-3,33)
S – C	3,14 (1,55-5,75)
<i>Physalaemus crombiei</i> ND2	
NP – NSOr	6,75 (3,25-9,71)
CS – NSOr + NP	11,39 (5,69-15,82)

Os clados encontrados para o gene ND2 citados no texto. Td extimado = Tempo de divergência estimado e intervalo de confiança 95%.

**Tabela 6.** Localidades amostradas para *A. brunoi*, haplótipos provenientes das amostras obtidas e coordenadas empregadas nos modelos

<i>Aparasphenodon brunoi</i>			
Haplótipo	Localidade	Latitude	Longitude
JFT486		-20,1025	-40,1833
JFT523	Costa Bela, Serra, ES	-20,1025	-20,1025
JFT705		-20,1025	-20,1025
JFT727		-20,1025	-20,1025
JFT835	FLONA do Rio Preto, Conceição da Barra, ES	-18,3553	-39,8442
LGA3616	ReBio Córrego do Veado, Pinheiros, ES	-18,3707	-40,1417
CFBH03		-19,7680	-40,1764
CFBH04	Aracruz, ES	-19,7680	-40,1764
CFBH46		-19,7680	-40,1764
CFBH48		-19,7680	-40,1764
CFBH378	Setiba, Guarapari, ES	-20,5919	-40,4002
CFBH379		-20,5919	-40,4002
CFBH4123	Caraíva, BA	-16,45	-39,065
CFBH7693	Prado, BA	-17,1318	-39,3519
CFBH8322		-22,9619	-42,8691
CFBH8334	Restinga de Maricá, Maricá, RJ	-22,9619	-42,8691
CFBH10550		-22,9619	-42,8691
CFBH9042	ReBio Companhia Vale do Rio Doce, Linhares, ES	-19,1606	-39,9928
CFBH9216	Fazenda Luzitânia, Linhares, ES	-19,3911	-40,0722
CFBH10449	Lagoa do Gomes, Município de Marataízes, ES	-21,0000	-40,8238
CFBH10869		-19,4362	-40,0768
CFBH10870	FLONA de Goytacazes, Linhares, ES	-19,4362	-40,0768
CFBH10871		-19,4362	-40,0768
MTR17572		-19,5388	-42,5458
MTR17615	PERD, Marliéria, MG	-19,5388	-42,5458
MTR17693		-19,5388	-42,5458
D.S.	Porto Seguro, BA	-16,4497	-39,0647
D.S.	Conceição da Barra, ES	-18,5933	-39,7322
D.S.	Guriri, ES	-18,7161	-39,8588
D.S.	Linhares, ES	-19,3911	-40,0722
D.S.	Vitória, ES	-20,3194	-40,3377
D.S.	Itapemirim, ES	-21,0111	-40,8338
D.S.	Guanabara, RJ	-22,9028	-43,2075
D.S.	Grumari, RJ	-22,9030	-43,2075
D.S.	Ubatuba, SP	-23,4302	-45,0697

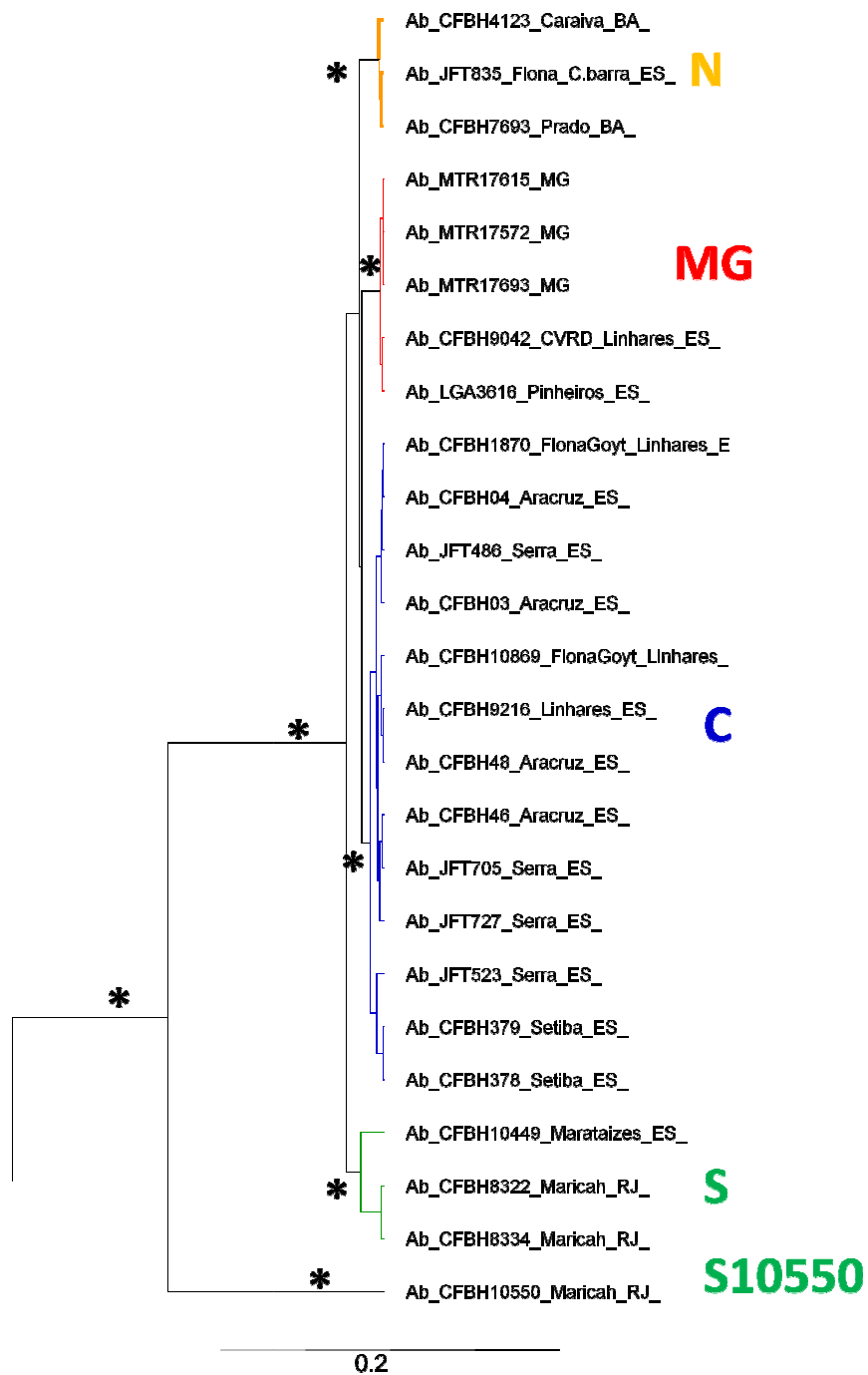
D.S. – Pontos de dados secundários empregados nos modelos. Encontrados em bases de dados online e trabalhos científicos. Sigla dos haplótipos referentes à tabela 6: JFT – João Filipe Tonini (Coleção de tecidos e DNA da UFES); LGA – Laboratório de Genética Animal (UFES); CFBH – Célio Fernando Baptista Haddad (UNESP) e MTR - Miguel Trefaut Rodrigues (USP).

**Tabela 7.** Localidades amostradas para *P. crombiei*, haplótipos provenientes das amostras obtidas e coordenadas empregadas nos modelos

<i>Physalaemus crombiei</i>			
Haplótipo	Localidade	Latitude	Longitude
JFT722		-19,9600	-40,5200
JFT752		-19,9600	-40,5200
JFT753		-19,9600	-40,5200
JFT754		-19,9600	-40,5200
JFT786		-19,9600	-40,5200
JFT787	Rec. Da Preguiça, Santa Teresa, ES	-19,9600	-40,5200
JFT788		-19,9600	-40,5200
JFT789		-19,9600	-40,5200
JFT790		-19,9600	-40,5200
JFT791		-19,9600	-40,5200
JFT793		-19,9600	-40,5200
JFT794		-19,9600	-40,5200
JFT700		-20,1025	-40,1833
JFT701		-20,1025	-40,1833
JFT702		-20,1025	-40,1833
JFT703	Costa Bela, Serra, ES	-20,1025	-40,1833
JFT715		-20,1025	-40,1833
JFT730		-20,1025	-40,1833
JFT731		-20,1025	-40,1833
JFT02		-20,2811	-40,5219
JFT22		-20,2811	-40,5219
JFT180	Duas Bocas, Cariacica, ES	-20,2811	-40,5219
JFT204		-20,2811	-40,5219
JFT205		-20,2811	-40,5219
JFT232		-20,2811	-40,5219
LGA3602		-18,3707	-40,1417
LGA3603		-18,3707	-40,1417
LGA3604	ReBio Córrego do Veado, Pinheiros, ES	-18,3707	-40,1417
LGA3605		-18,3707	-40,1417
LGA3644		-18,3707	-40,1417
CFBH5899		-19,2272	-39,9729
CFBH5900	Sooretama, ES	-19,2272	-39,9729
CFBH5993		-19,2272	-39,9729
CFBH5988	Santa Teresa, ES	-19,9591	-40,5402
CFBH9051		-19,58	-39,7908
CFBH9061	Plantação de Cacau - Povoação, Linhares, ES	-19,58	-39,7908
CFBH9075		-19,58	-39,7908
CFBH12372		-19,7805	-40,5083
CFBH12373		-19,7805	-40,5083
CFBH12374	ReBio Augusto Ruschi, Santa Teresa, ES	-19,7805	-40,5083
CFBH12375		-19,7805	-40,5083
CFBH12376		-19,7805	-40,5083

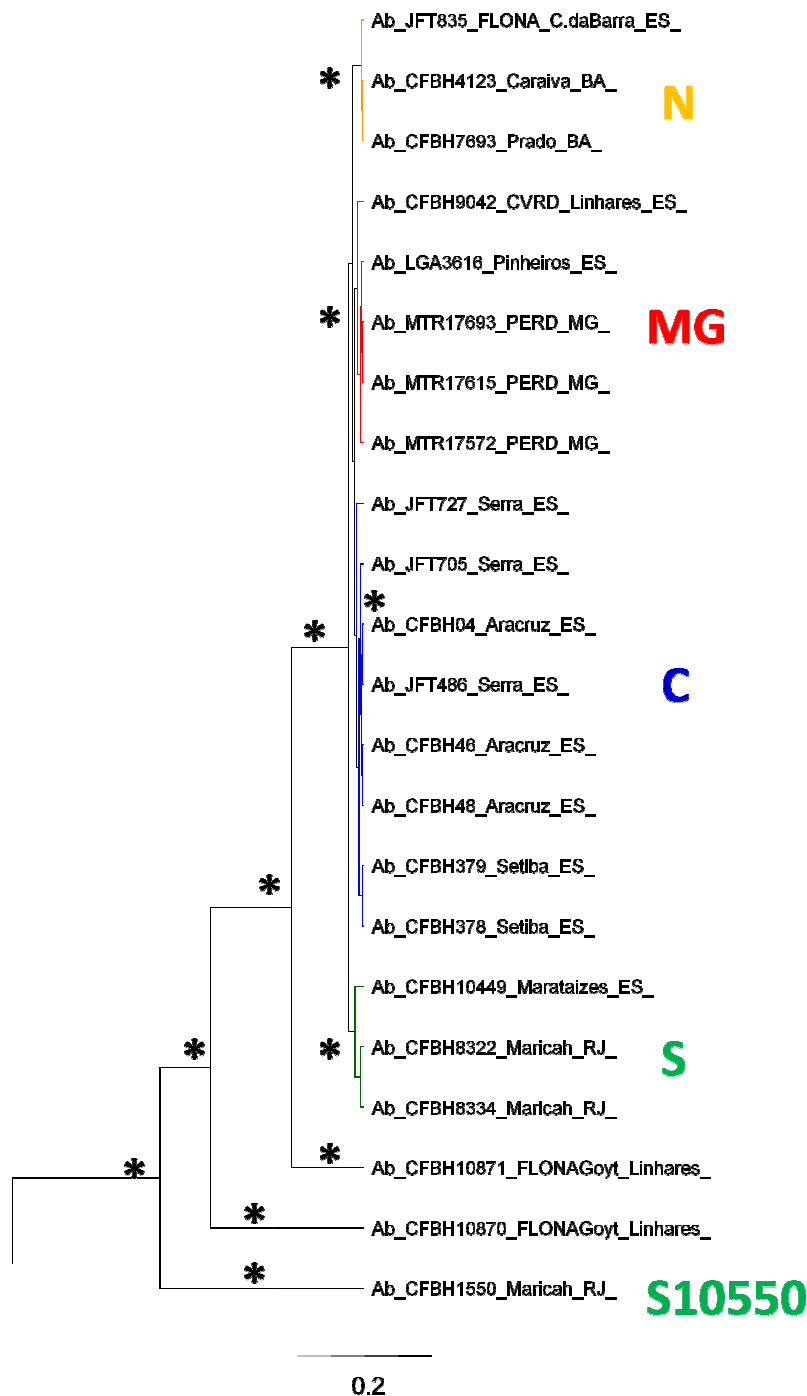
CFBH12377		-19,7805	-40,5083
CFBH12378		-19,7805	-40,5083
CFBH12396		-19,7805	-40,5083
D.S.	Conceição da Barra, ES	-18,5933	-39,7322
D.S.	Linhares, ES	-19,3911	-39,9333
D.S.	Linhares, ES	-19,3911	-40,0722
D.S.	Aracruz, ES	-19,8202	-40,2733
D.S.	Nova Lombardia, Santa Teresa, ES	-19,9358	-40,6002
D.S.	Fundão, ES	-19,9325	-40,4066
D.S.	Castelo, ES	-20,6036	-41,1847
D.S.	Anchieta, ES	-20,8058	-40,6455
D.S.	Cachoeiro de Itapemirim, ES	-20,8333	-41,0666

D.S. – Pontos de dados secundários empregados nos modelos. Encontrados em bases de dados online e trabalhos científicos. Sigla dos haplótipos referentes à tabela 7: JFT – João Filipe Tonini (Coleção de tecidos e DNA da UFES); LGA – Laboratório de Genética Animal (UFES); CFBH – Célio Fernando Baptista Haddad (UNESP).

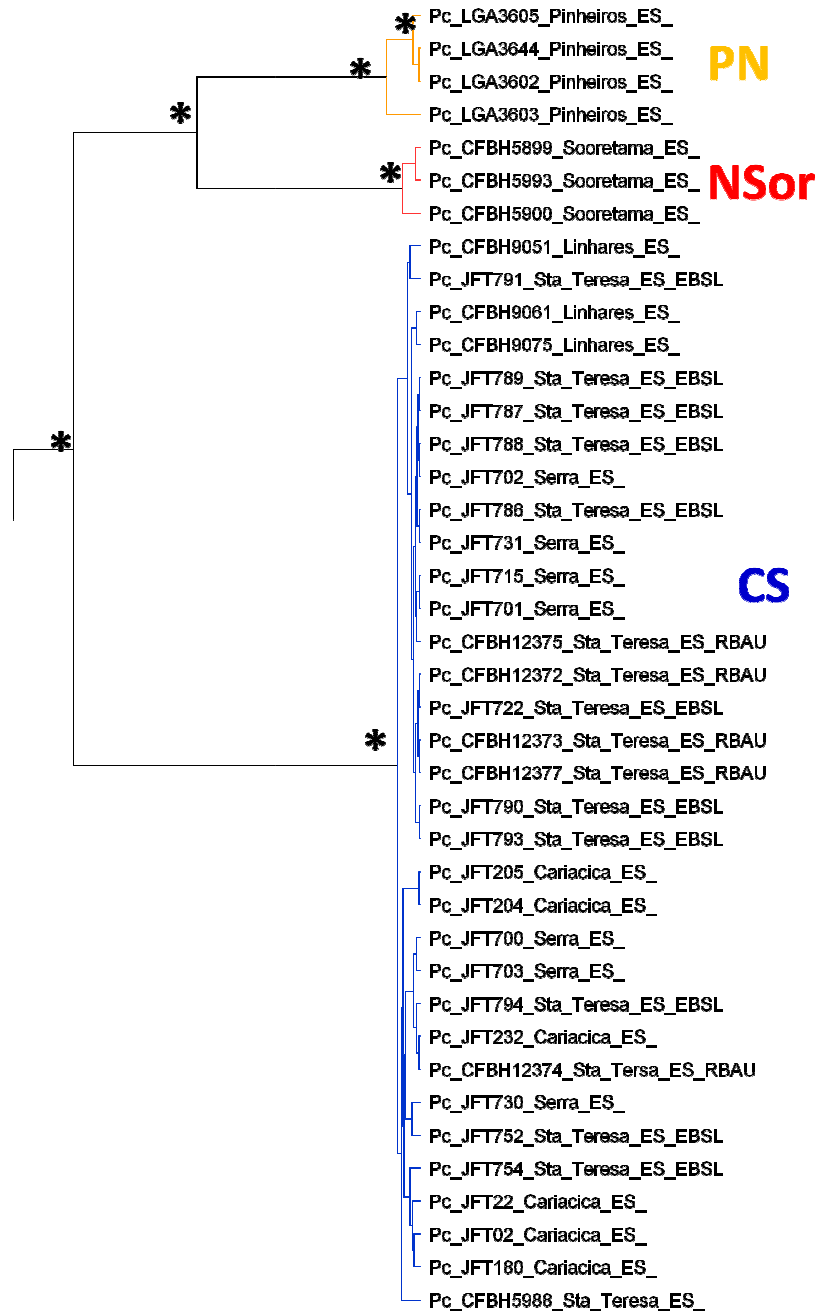


**Figura 1.** Relações filogenéticas das populações de *A. brunoi* amostradas, obtidas para o marcador molecular ND2. Os \* indicam suporte superior a 95% na bayesiana e 90% na verossimilhança. Grupo externo não demonstrado. As cores referem-se aos pontos exibidos nos mapas (Figuras 5 e 6).





**Figura 2.** Relações filogenéticas das populações de *A. brunoi* amostradas, obtidas para o marcador molecular COI. Os \* indicam suporte superior a 95% na bayesiana e 90% na verossimilhança. Grupo externo não demonstrado. As cores referem-se aos pontos exibidos nos mapas (Figuras 5 e 6).



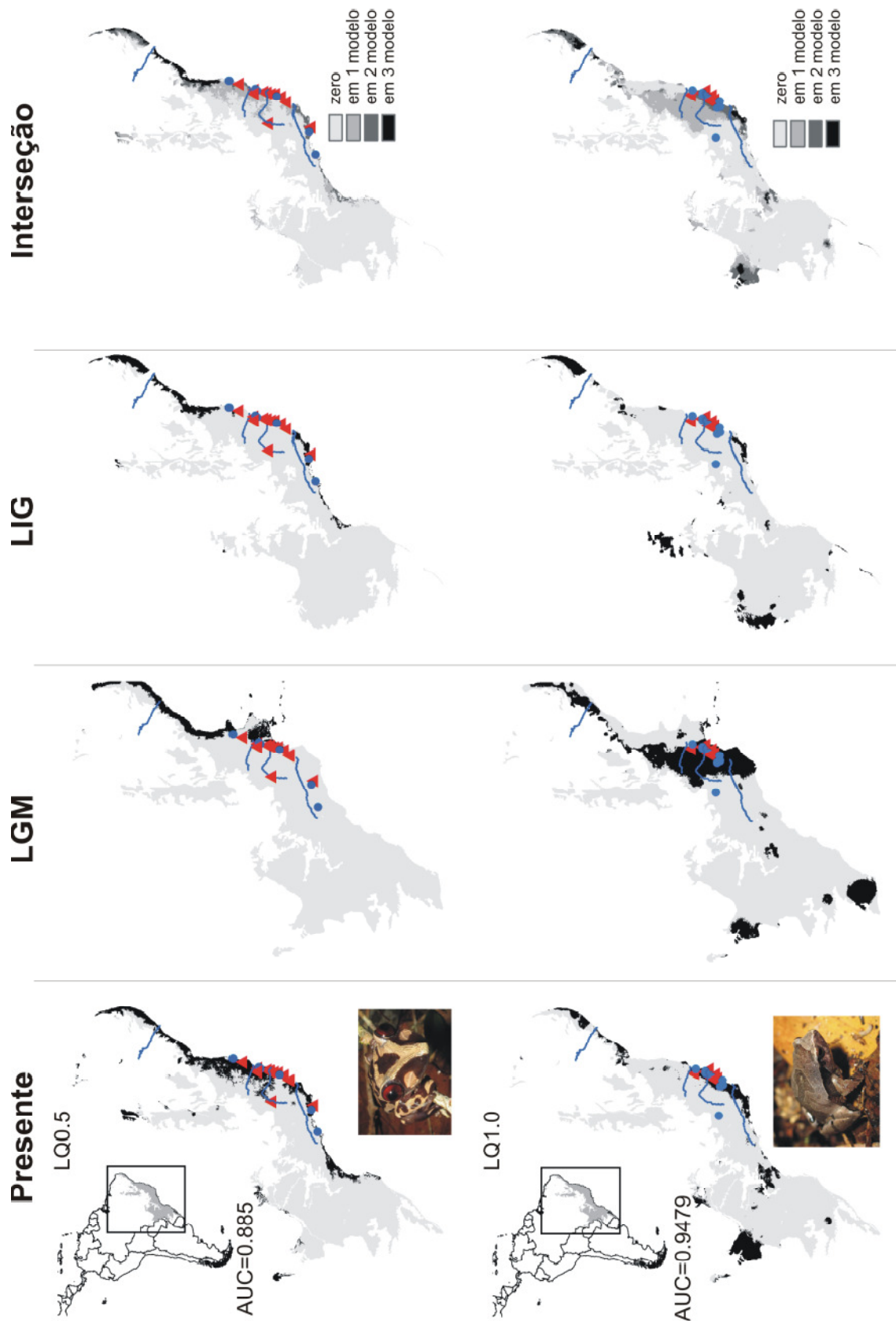
0.05

**Figura 3.** Relações filogenéticas das populações de *P. crombiei* amostradas, obtidas para o marcador molecular ND2. Os \* indicam suporte superior a 95% na bayesiana e 90% na verossimilhança. Grupo externo não demonstrado. As cores referem-se aos pontos exibidos nos mapas (Figura 5 e 7).

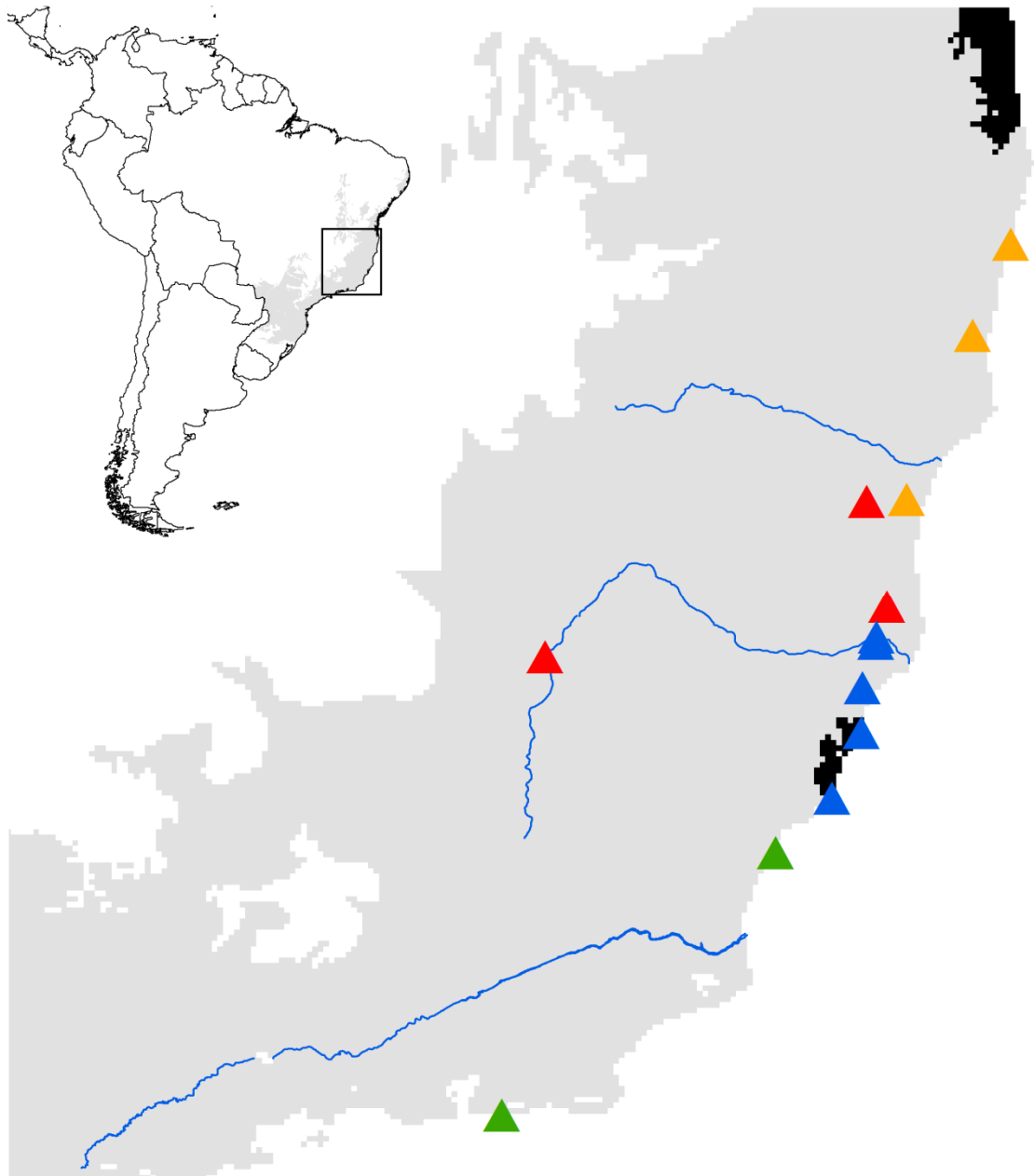


0.03

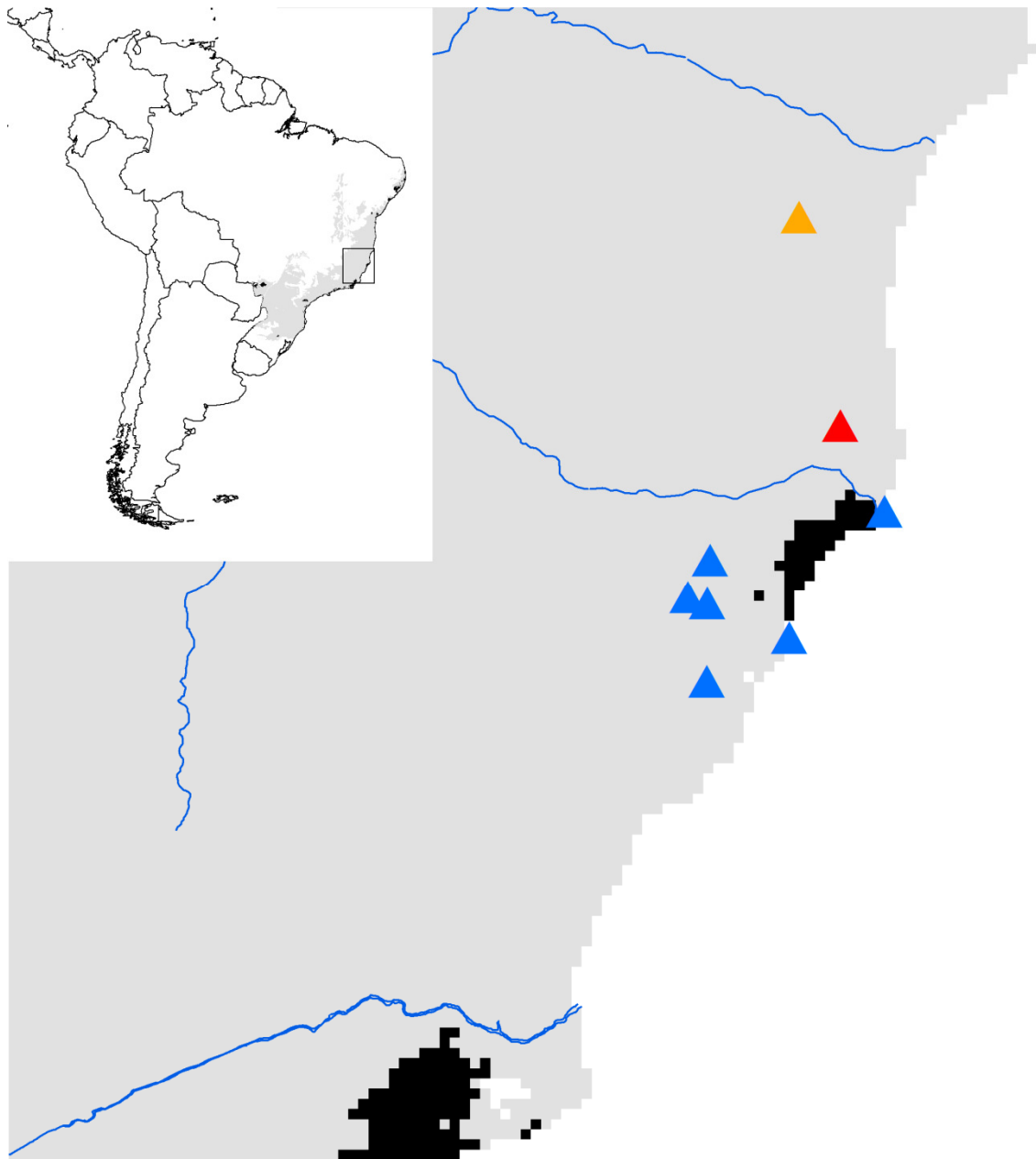
**Figura 4.** Relações filogenéticas das populações de *P. crombiei* amostradas, obtidas para o marcador molecular COI. Os \* indicam suporte superior a 95% na bayesiana e 90% na verossimilhança. Grupo externo não demonstrado. As cores referem-se aos pontos exibidos nos mapas (Figura 5 e 7).



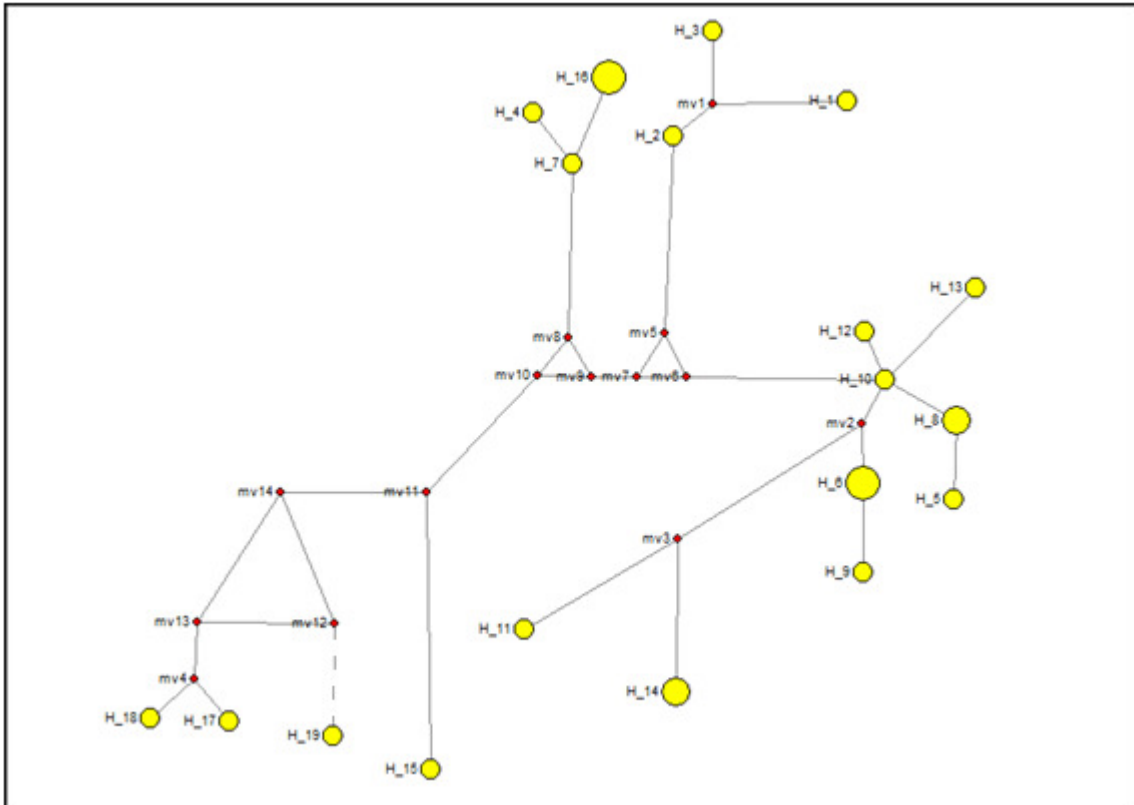
**Figura 5.** Mapas dos modelos de distribuição sob as condições atuais, durante o LGM, e LIG para *A. brunoi* e *P. crombiei*. Os triângulos vermelhos representam os pontos de onde se obteve haplótipos no presente trabalho e os círculos azuis correspondem a registros de presença obtidos em bases de dados online e trabalhos científicos, ambos utilizados nos modelos.



**Figura 6.** Mapa de interseção entre os modelos, indicando os prováveis refúgios para *A. brunoi*. Triângulos amarelos correspondem aos locais originários do clado norte (N), os vermelhos do clado de Minas Gerais (MG) e os verdes dos clados mais ao sul (S e S10550).



**Figura 7.** Mapa de interseção entre os modelos, demonstrando os prováveis refúgios para *P. crombiei*. Triângulos amarelos representam a localidade do clado de Pinheiros, ES (NP), o vermelho do clado DE Sooretama, ES (NSor) e os azuis correspondem às localidades dos haplótipos do clado centro-sul (CS).



**Figura 8.** Rede de relações haplotípicas para o gene ND2 em *A. brunoi*. ----- (~0,5cm) Equivale a uma mutação. Círculos amarelos correspondem a haplótipos. Círculos vermelhos representam haplótipos não amostrados. Linhas tracejadas indicam conexões incertas entre os haplótipos de alta divergência.

**Hap\_1:** 1 [Ab\_CFBH4123\_Caraiva\_BA]

**Hap\_2:** 1 [Ab\_CFBH7693\_Prado\_BA]

**Hap\_3:** 1 [Ab\_JFT835\_Flona\_C.barra\_ES]

**Hap\_4:** 1 [Ab\_LGA3616\_Pinheiros\_ES]

**Hap\_5:** 1 [Ab\_CFBH10869\_FlonaGoyt ES\_ES]

**Hap\_6:** 3 [Ab\_CFBH1870\_FlonaGoyt ES; Ab\_CFBH04\_Aracruz\_ES; Ab\_JFT486\_Serra\_ES]

**Hap\_7:** 1 [Ab\_CFBH9042\_CVRD\_Linhares\_ES]

**Hap\_8:** 2 [Ab\_CFBH9216\_Linhares ES; Ab\_CFBH48\_Aracruz\_ES]

**Hap\_9:** 1 [Ab\_CFBH03\_Aracruz\_ES]

**Hap\_10:** 1 [Ab\_CFBH46\_Aracruz\_ES]

**Hap\_11:** 1 [Ab\_JFT523\_Serra\_ES\_]

**Hap\_12:** 1 [Ab\_JFT705\_Serra\_ES\_]

**Hap\_13:** 1 [Ab\_JFT727\_Serra\_ES\_]

**Hap\_14:** 2 [Ab\_CFBH378\_Setiba\_ES; Ab\_CFBH379\_Setiba\_ES]

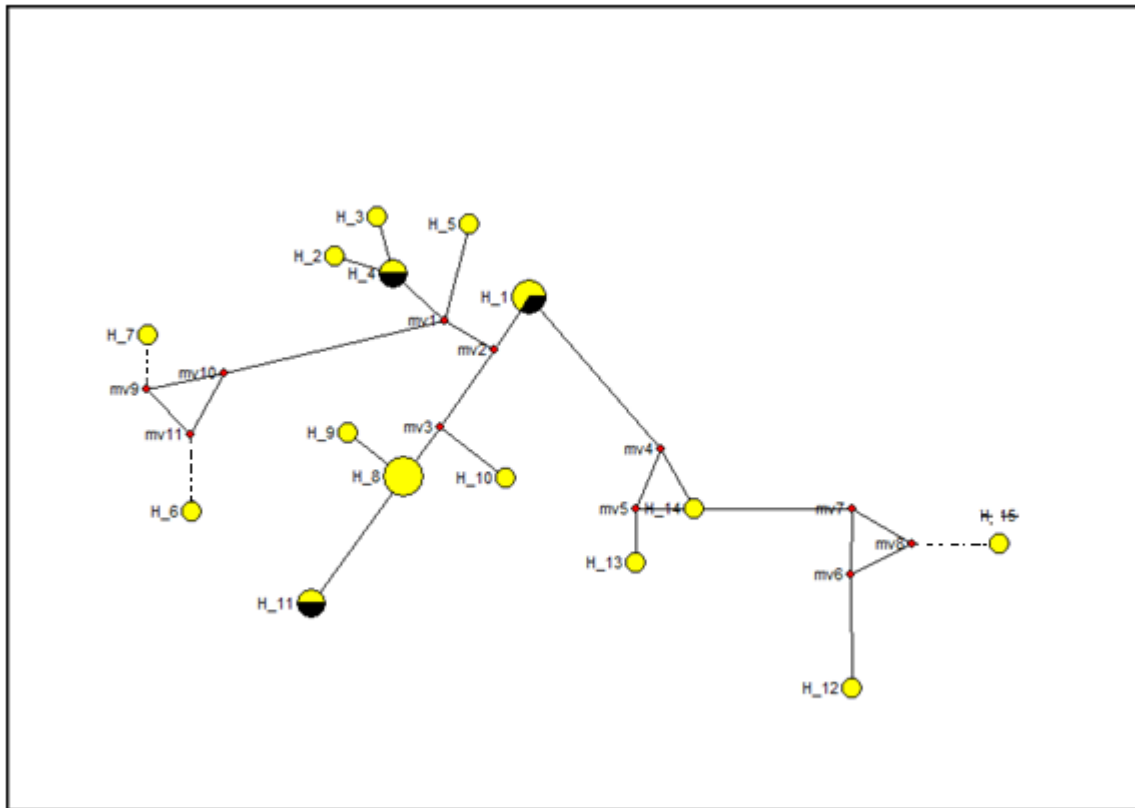
**Hap\_15:** 1 [Ab\_CFBH10449\_Marataizes ES]

**Hap\_16:** 3 [Ab\_MTR17572\_MG; Ab\_MTR17615\_MG; Ab\_MTR17693\_MG]

**Hap\_17:** 1 [Ab\_CFBH8322\_MaricahRJ]

**Hap\_18:** 1 [Ab\_CFBH8334\_Maricah RJ]

**Hap\_19:** 1 [Ab\_CFBH10550\_Maricah RJ]



**Figura 9.** Rede de relações haplotípicas para o gene COI em *A. brunoi*. ----- (~0,5cm) Equivale a uma mutação. Círculos amarelos correspondem a haplótipos. Círculos vermelhos representam haplótipos não amostrados. Linhas tracejadas indicam conexões incertas entre os haplótipos de alta divergência.

**Hap\_1:** 3 [Ab\_CFBH4123\_Caraiva BA; Ab\_CFBH7693\_Prado BA; Ab\_JFT835\_FLONA\_C.da Barra ES]

**Hap\_2:** 1 [Ab\_LGA3616\_Pinheiros ES]

**Hap\_3:** 1 [Ab\_MTR17572\_PERD MG]

**Hap\_4:** 2 [Ab\_MTR17615\_PERD MG ; Ab\_MTR17693\_PERD MG]

**Hap\_5:** 1 [Ab\_CFBH9042\_CVRD\_Linhares ES]

**Hap\_6:** 1 [Ab\_CFBH10870\_FLONAGoyt ES]

**Hap\_7:** 1 [Ab\_CFBH10871\_FLONAGoyt ES]

**Hap\_8:** 4 [Ab\_CFBH04\_Aracruz ES; Ab\_CFBH46\_Aracruz ES; Ab\_CFBH48\_Aracruz\_ES; Ab\_JFT486\_Serra ES]

**Hap\_9:** 1 [Ab\_JFT705\_Serra ES]

**Hap\_10:** 1 [Ab\_JFT727\_Serra ES]

**Hap\_11:** 2 [Ab\_CFBH378\_Setiba ES; Ab\_CFBH379\_Setiba ES]

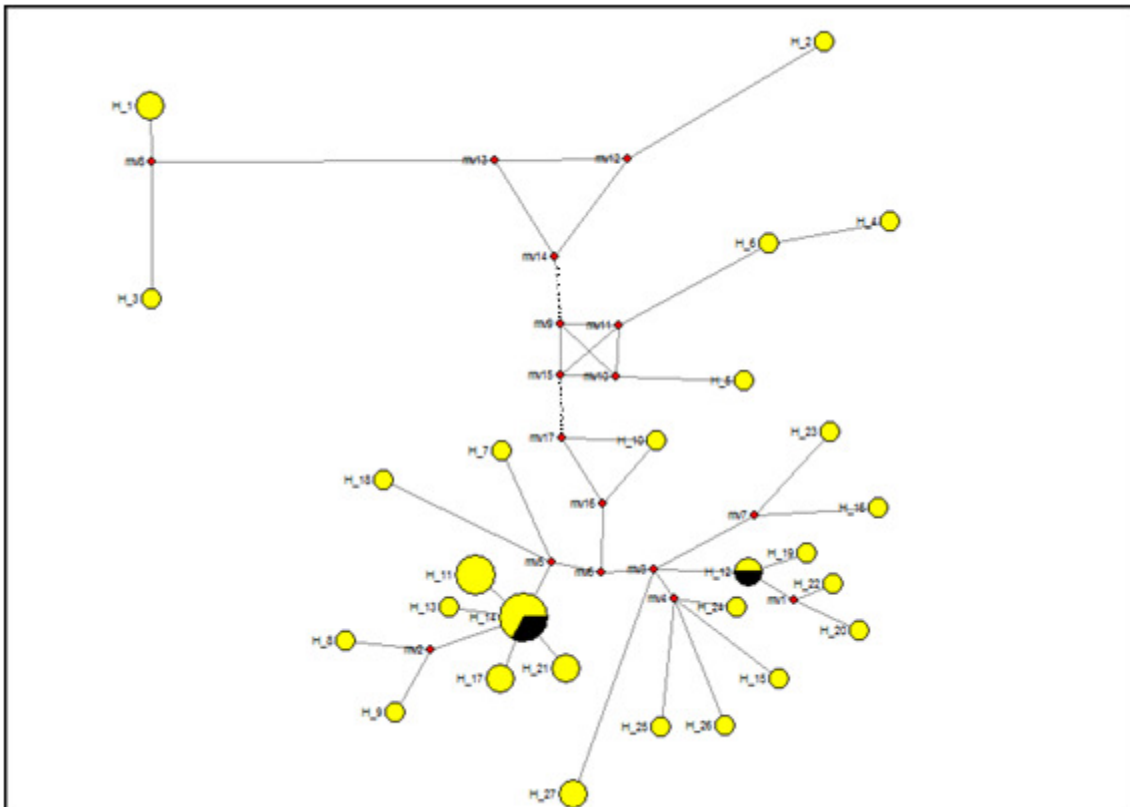
**Hap\_12:** 1 [Ab\_CFBH10449\_Marataizes ES]

**Hap\_13:** 1 [Ab\_CFBH8334\_MaricahRJ]

**Hap\_14:** 1 [Ab\_CFBH8322\_MaricahRJ]



**Hap\_15:** 1 [Ab\_CFBH10550\_Maricah RJ]



**Figura 10.** Rede de relações haplotípicas para o gene ND2 em *P. crombiei*. ----- (~0,5cm) Equivale a uma mutação. Círculos amarelos correspondem a haplótipos. Círculos vermelhos representam haplótipos não amostrados. Linhas tracejadas indicam conexões incertas entre os haplótipos de alta divergência.

**Hap\_1:** 2 [Pc\_LGA3602\_Pinheiros ES; Pc\_LGA3644\_Pinheiros ES]

**Hap\_2:** 1 [Pc\_LGA3603\_Pinheiros ES]

**Hap\_3:** 1 [Pc\_LGA3605\_Pinheiros ES]

**Hap\_4:** 1 [Pc\_CFBH5899\_Sooretama ES]

**Hap\_5:** 1 [Pc\_CFBH5900\_Sooretama ES]

**Hap\_6:** 1 [Pc\_CFBH5993\_Sooretama ES]

**Hap\_7:** 1 [Pc\_CFBH9051\_Linhares ES]

**Hap\_8:** 1 [Pc\_CFBH9061\_Linhares ES]

**Hap\_9:** 1 [Pc\_CFBH9075\_Linhares ES]

**Hap\_10:** 1 [Pc\_CFBH5988\_Sta\_Tereesa ES]

**Hap\_11:** 4 [Pc\_CFBH12372\_Sta\_Teresa ES; Pc\_CFBH12373\_Sta\_Teresa ES;  
Pc\_CFBH12377\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT722\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_12:** 2 [Pc\_CFBH12374\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT232\_Cariacica ES]

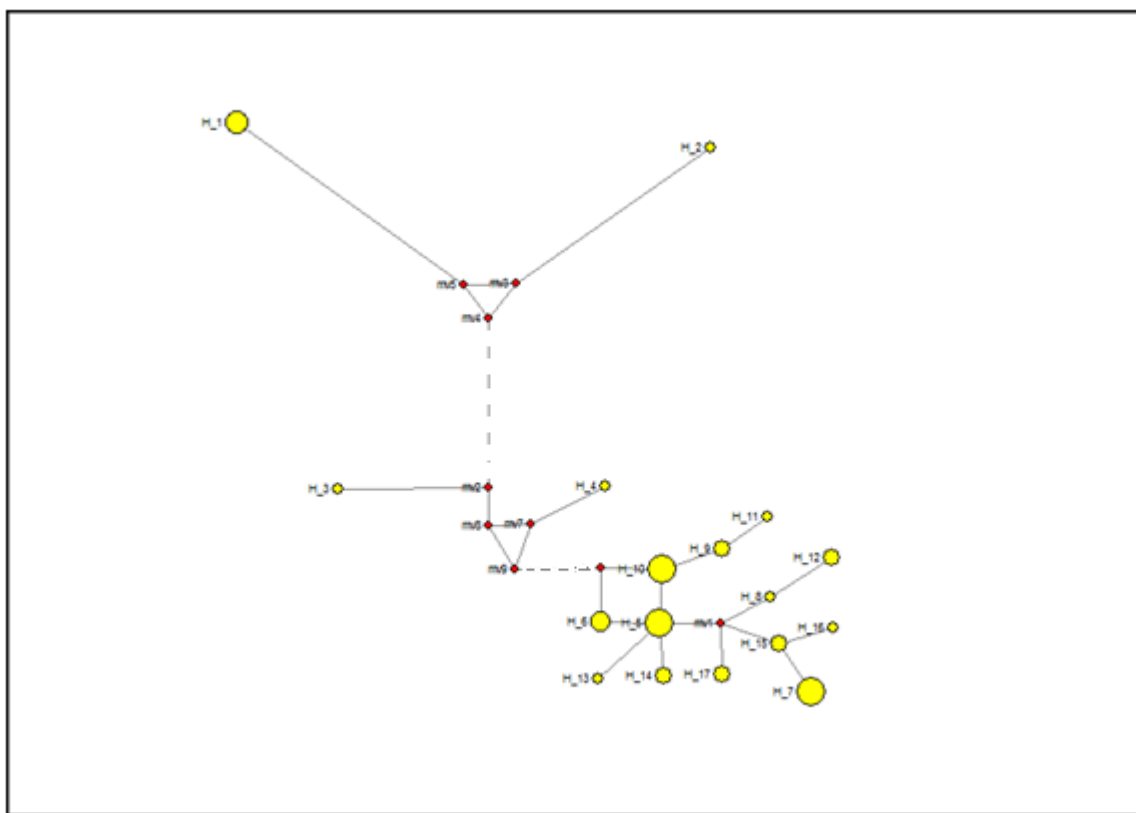
**Hap\_13:** 1 [Pc\_CFBH12375\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_14:** 6 [Pc\_JFT787\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT786\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT788\_Sta\_Teresa ES;  
Pc\_JFT789\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT702\_Serra\_ES; Pc\_JFT731\_Serra\_ES]

**Hap\_15:** 1 [Pc\_JFT754\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_16:** 1 [Pc\_JFT752\_Sta\_Teresa ES]

- Hap\_17:** 2 [Pc\_JFT790\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT793\_Sta\_Teresa ES]  
**Hap\_18:** 1 [Pc\_JFT791\_Sta\_Teresa ES]  
**Hap\_19:** 1 [Pc\_JFT794\_Sta\_Teresa ES]  
**Hap\_20:** 1 [Pc\_JFT700\_Serra ES]  
**Hap\_21:** 2 [Pc\_JFT701\_Serra ES; Pc\_JFT715\_Serra ES]  
**Hap\_22:** 1 [Pc\_JFT703\_Serra ES]  
**Hap\_23:** 1 [Pc\_JFT730\_Serra ES]  
**Hap\_24:** 1 [Pc\_JFT02\_Cariacica ES]  
**Hap\_25:** 1 [Pc\_JFT22\_Cariacica ES]  
**Hap\_26:** 1 [Pc\_JFT180\_Cariacica ES]  
**Hap\_27:** 2 [Pc\_JFT204\_Cariacica ES; Pc\_JFT205\_Cariacica ES]



**Figura 11.** Rede de relações haplotípicas para o gene COI em *P. crombiei*. ----- (~0,5cm) Equivale a uma mutação. Círculos amarelos correspondem a haplótipos. Círculos vermelhos representam haplótipos não amostrados. Linhas tracejadas indicam conexões incertas entre os haplótipos de alta divergência.

- Hap\_1:** 4 [Pc\_LGA3644\_Pinheiros ES; Pc\_LGA3605\_Pinheiros ES; Pc\_LGA3604\_Pinheiros ES; Pc\_LGA3602\_Pinheiros ES]  
**Hap\_2:** 1 [Pc\_LGA3603\_Pinheiros ES]  
**Hap\_3:** 1 [Pc\_CFBH5899\_Sooretama ES]  
**Hap\_4:** 1 [Pc\_CFBH5900\_Sooretama ES]  
**Hap\_5:** 6 [Pc\_CFBH5993\_Sooretama ES; Pc\_CFBH12377\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT793\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT794\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT731\_Serra ES; Pc\_JFT715\_Serra ES]  
**Hap\_6:** 3 [Pc\_CFBH9051\_Linhares ES; Pc\_CFBH9061\_Linhares ES; Pc\_JFT722\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_7:** 6 [Pc\_CFBH9075\_Linhares ES; Pc\_CFBH12374\_Sta\_Ter ES; Pc\_CFBH12376\_Sta\_Ter ES;  
Pc\_JFT700\_Serra\_ES; Pc\_JFT703\_Serra\_ES; Pc\_JFT232\_Cariacica ES]

**Hap\_8:** 1 [Pc\_CFBH5988\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_9:** 2 [Pc\_CFBH12372\_Sta\_Teresa ES; Pc\_CFBH12375\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_10:** 6 [Pc\_CFBH12373\_Sta\_Teresa\_ES; Pc\_JFT754\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT787\_Sta\_Teresa  
ES; Pc\_JFT788\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT790\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT791\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_11:** 1 [Pc\_CFBH12396\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_12:** 2 [Pc\_JFT752\_Sta\_Teresa ES; Pc\_JFT730\_Serra\_ES\_]

**Hap\_13:** 1 [Pc\_JFT789\_Sta\_Teresa ES]

**Hap\_14:** 2 [Pc\_JFT701\_Serra\_ES; Pc\_JFT702\_Serra\_ES\_]

**Hap\_15:** 2 [Pc\_JFT02\_Cariacica\_ES; Pc\_JFT180\_Cariacica\_ES]

**Hap\_16:** 1 [Pc\_JFT22\_Cariacica\_ES]

**Hap\_17:** 2 [Pc\_JFT204\_Cariacica\_ES; Pc\_JFT205\_Cariacica\_ES]

## Anexo II

### **Perfil de PCR para o gene ND2 foi a mesma para as duas espécies:**

1x 94°C – 5min

40x 94°C – 30seg / 51°C – 30seg / 72°C – 45seg

1x 72°C – 10min

#### **Primers ND2:**

ND2ELEUF1(5-CACCCACGMGCCATTGAAGC-3)

ND2ALAR(5-TAAAGTGTCTGAGTTGCATTCA-3)

#### **Mix de PCR – ND2:**

9,05µ l – Água; 1,25µ l – Buffer; 0,5 µ l – MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µ l – dNTPs; 0,15 µ l de cada primer; 0,15 µ l – Taq Polimerase.

### **Perfil de PCR do gene COI para *A. brunoi*:**

1x 94°C – 5min

40x 94°C – 30seg / 47°C – 45seg / 72°C – 1min15seg

1x 72°C – 10min

### **Perfil de PCR do gene COI para *P. crombiei*:**

1x 94°C – 5min

40x 94°C – 30seg / 45°C – 30seg / 72°C – 45seg

1x 72°C – 10min

#### **Primers COI:**

LCO 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'

HCO 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

#### **Mix de PCR – COI para *A. brunoi*:**

8,22µ l – Água; 1,25µ l – Buffer; 0,5 µ l – MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µ l – dNTPs; 0,25 µ l de cada primer; 0,15 µ l – Taq Polimerase; 0,62 µ l – DMSO.

#### **Mix de PCR – COI para *P. crombiei*:**

9,05µ l – Água; 1,25µ l – Buffer; 0,5 µ l – MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µ l – dNTPs; 0,15 µ l de cada primer; 0,15 µ l – Taq Polimerase.

### **Grupo externo para *A. brunoi* (espécie e número do GenBank):**

*Hypsiboas faber* - FJ502745.1 – ND2

*Anura* sp. - HQ987356.1 - COI

### **Grupo externo para *P. crombiei* (espécie e número do GenBank):**

*Thoropa miliaris* - GQ174946.1 – ND2

*Epipedobates hahneli* - DQ502717.1 - COI