

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

**Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)**

**João Filipe Riva Tonini**

Vitória, ES  
Fevereiro, 2010

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

**Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)**

**João Filipe Riva Tonini**

**Orientadora:** Leonora Pires Costa  
**Co-orientadora:** Ana Carolina O. Q. Carnaval

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

Vitória, ES  
Fevereiro, 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Tonini, João Filipe Riva, 1985-

T665f Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica : *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae) / João Filipe Riva Tonini. – 2011.

52 f. : il.

Orientadora: Leonora Pires Costa.

Coorientador: Ana Carolina Oliveira de Queiroz Carnaval.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Zoologia. 2. Evolução. 3. Genética de populações. 4. Herpetologia. 5. Conservação da natureza. 6. Filogeografia. I. Costa, Leonora Pires. II. Carnaval, Ana Carolina Oliveira de Queiroz. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

---



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

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)"

AUTOR: JOÃO FILIPE RIVA TONINI

ORIENTADORA: Prof. Dr. LEONORA PIRES COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:

Dr. LEONORA PIRES COSTA  
Orientadora

Dr. VALÉRIA FAGUNDES  
Membro Interno

Dr. MIRCO SOLÉ  
Membro Interno

Dra. RENATO NEVES FEIO  
Membro Externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 11 de fevereiro de 2011.

## AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) forneceram suporte financeiro a essa pesquisa. M. Napoli (MZUFBA), M. Solé (UESC), C.F.B. Haddad (UNESP-RC), M.T. Rodrigues e R. Amaro (USP), J. Pombal Jr. (MNRJ), A. Carnaval e R. Damasceno (MVZ), V. Fagundes, S. Ramira e J.L. Gasparini (UFES) disponibilizaram importantes amostras que possibilitaram a realização do presente estudo. M. Portugal, A. Loss, R. Rocha, E. Ferreira, S. Ramira, J. Justino, A. Pavan, F. Martins, C. Miranda, R.B. Ferreira auxiliaram nos procedimentos laboratoriais, análises filogenéticas e/ou contribuíram com valiosos comentários. Os integrantes do Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia da UFES ajudaram nas campanhas de campo. M. Forlani gentilmente identificou os espécimes de *Chiasmocleis*. P. Bernardo, C. Ribeiro, R. Gonçalves, A.S. Murakami, M.M. Roberto, R. Ferreira e G. Patricio forneceram suporte logístico para a visita às coleções, congressos e disciplinas. À L.D. Centoducatte agradeço por todos os ensinamentos em SIG e, juntamente com meus familiares, deixo meu mais profundo obrigado por todo apoio emocional-afetivo e compreensão ao longo desses árduos anos de pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Objetivo</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. Adequação do sistema de estudo</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Material e métodos</b>	
<b>2.1. Táxons e amostras</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2. Extração, amplificação, sequenciamento e alinhamento</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3. Análises filogenéticas e populacionais</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Resultados</b>	
<b>3.1. <i>Dendropsophus elegans</i></b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. Complexo <i>Chiasmocleis</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.1. <i>Chiasmocleis leucosticta</i> e <i>Chiasmocleis mantiqueira</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.2. <i>Chiasmocleis schubarti</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.3. <i>Chiasmocleis capixaba</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.4 <i>Chiasmocleis carvalhoi</i></b> .....	<b>22</b>
<b>4. Discussão</b>	
<b>4.1. Comparação dos padrões filogeográficos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2. Isolamento por distância ou por quebra filogeográfica?</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. Diferenças entre áreas de baixada e de altitude elevada</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4. Zona de contato para <i>Chiasmocleis</i></b> .....	<b>30</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>32</b>
<b>Referências</b> .....	<b>32</b>
<b>Figuras</b> .....	<b>39</b>
<b>Tabelas</b> .....	<b>41</b>
<b>Informação Suplementar</b> .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Índices de diversidade genética, indicadores de expansão demográfica e teste de Mantel para *Dendropsophus elegans*.....
- Tabela 2. Datação com relógio molecular do tempo de separação entre os subclados de *Dendropsophus elegans*.....
- Tabela 3. Valores de Fst (esquerda e abaixo) e valores de distância genética (direita a acima; Tamura-Nei) para as subclados de *Dendropsophus elegans*. Todos os valores de Fst com  $p < 0,05$ .....
- Tabela 4. Valores de Fst (esquerda e abaixo) e valores de distância genética (direita a acima; Tamura-Nei) para os subclados de *Chiasmocleis carvalhoi*. Todos valores de Fst com  $p < 0,05$ , exceto os valores referentes a S.....
- Tabela 5. Datação com relógio molecular do tempo de separação entre os subclados de *Chiasmocleis carvalhoi*.....
- Tabela 6. Índices de diversidade genética, indicadores de expansão demográfica e teste de Mantel para *Chiasmocleis carvalhoi*.....
- Tabela IS 1. Localidades com amostras de *Dendropsophus elegans* que foram incluídas no presente estudo.
- Tabela IS 2. Localidades com amostras de *Chiasmocleis* spp. que foram incluídas no presente estudo.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição geográfica e árvore de Inferência Bayesiana indicando os subclados de *Dendropsophus elegans* (A) e *Chiasmocleis carvalhoi* (B), identificadas a partir dos haplótipos do gene mitocondrial ND2. Em A o círculo azul e vermelho representa localidade Serra/ES, onde encontrei haplótipos que foram compartilhados entre os clados Centro e Sul. Em B os círculos em azul e marrom indicam as localidades onde houve haplótipos comuns aos clados Norte e Centro. Os \* mostram os clados com suporte acima de 95% de probabilidade Bayesiana e/ou 0,95 de bootstrap.....
- Figura 2. Destaque para os subclados de *Dendropsophus elegans*, segundo o gene mitocondrial ND2, que ocorrem próximas a região do Rio Doce. Localidades muito próximas dentro do clado Centro possuem haplótipos em subclados distintos, além disso localidades na mesma latitude porém em lado opostos ao rio estão em subclados separados. Note que as localidades do subclado S1 são geograficamente próximas das localidades do clado Centro, contudo são filogeneticamente muito divergentes. O círculo azul e vermelho no subclado C2 corresponde a localidade da Serra/ES, que teve haplótipos nos clados Centro e Sul. Em marrom estão as áreas com maior altitude e em verde as de menor altitude. Os \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade Bayesiana e/ou 0,95 de bootstrap.....
- Figura IS 1. Árvore de inferência bayesiana do gene mitocondrial ND2 de *Dendropsophus elegans*. Os números de tomo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Os \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade posterior.
- Figura IS 2. Árvore de inferência bayesiana do gene mitocondrial ND2 de *Chiasmocleis schubarti*, *C. capixaba* (em vermelho), *C. carvalhoi* (com as subpopulações), *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*. Os números de tomo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Em azul estão os haplótipos provenientes da morfoespécie *C. schubarti* que se posicionaram dentro do clado de *C. carvalhoi*. \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade posterior.



- Figura IS 3. Árvore de Máxima Verossimilhança para o gene mitocondrial ND2 de *Dendropsophus elegans*. Os números de tombo ou de captura dos táxons estão identificados na árvore. Os \* indicam os clados com suporte acima de 0,95 de bootstrap.
- Figura IS 4. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene mitocondrial ND2 de *Chiasmocleis schubarti*, *C. capixaba* (em vermelho), *C. carvalhoi* (com as subpopulações), *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*. Os números de tombo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Em azul estão os haplótipos da morfoespécie *C. schubarti* que se posicionaram dentro do clado de *C. carvalhoi*. Os \* indicam os clados com suporte acima de 0,95 de bootstrap.
- Figura IS 5. Mapa da distribuição espacial das amostras de *Dendropsophus elegans* incluídas presente estudo. Números correspondem as localidades listadas na Tabela IS 1.
- Figura IS 6. Mapa da distribuição espacial das amostras de *Chiasmocleis* spp. incluídas presente estudo. Números correspondem as localidades listadas na Tabela IS 2.



**Filogeografia comparada dos anuros endêmicos da Mata Atlântica *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) e *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)**

**Resumo:** Desde o surgimento da filogeografia, muitos dados foram gerados sobre os padrões de distribuição das populações de organismos da Mata Atlântica. Algumas quebras filogeográficas tiveram grande destaque, como por exemplo as existentes na região dos rios São Francisco e Doce, além de uma quebra também na região sul do referido bioma. Trabalhos utilizando paleomodelos climáticos para inferir a distribuição no passado de taxons da Mata Atlântica incorporaram um componente preditivo aos estudos filogeográficos no Brasil. Além disso, forneceram cenários para que fosse possível testar as hipóteses de expansão demográfica de organismos da Mata Atlântica, associada aos períodos glacial e interglacial do Pleistoceno. Quando investigado o histórico demográfico de táxons que hoje habitam áreas frias e de altitude, observou-se expansão demográfica durante o Pleistoceno. Já os organismos que habitam áreas de baixada, foi observado que retraíram sua distribuição durante o Pleistoceno, e apresentaram expansão demográfica do norte para o sul depois do fim do último glacial. No presente trabalho, utilizo anuros endêmicos da Mata Atlântica (*Dendropsophus elegans* e espécies representativas do gênero *Chiasmocleis*) para inferir padrões biogeográficos regionais e investigar os processos históricos e ecológicos que os acarretaram. Para isso, utilizo sequências do gene mitocondrial ND2 de 148 amostras de *D. elegans* e 92 amostras de *Chiasmocleis* spp. Os resultados mostram que os dois táxons corroboram com a hipótese, já descrita na literatura, da existência elevados índices de diversidade haplotípica entre os rios São Francisco e Doce. Contudo, táxons provenientes de localidades na região mais ao sul da Mata Atlântica apresentaram sinais de expansão demográfica e baixos índices de diversidade haplotípica. As amostras provenientes de locais de maior altitude, dentro ou fora das áreas climaticamente estáveis propostas por outros autores, sugerem que as populações dessas regiões permaneceram isoladas durante muito tempo, acumulando diferenças genéticas significativas. Isto se contrapõe ao ocorrido com as populações que hoje habitam as baixadas, as quais sofreram contração populacional durante o último glacial, expandindo-se desde então. Em *Chiasmocleis*, espécies fenotipicamente distintas agruparam-se em um mesmo clado, apesar de ambas morfoespécies serem também reciprocamente monofiléticas. Isso pode representar um possível evento de hibridação, que pode ter ocorrido devido ao contato secundário entre indivíduos de ambas morfoespécies ou a uma diversificação recente com retenção de polimorfismo ancestral. Porém, o relógio molecular mostrou que a divergência entre os clados é muito antiga, cerca de 14,5 M.a., para aceitar a hipótese de diversificação recente.

**Palavras-chave:** Anfíbios, altitude, biogeografia, genética de populações, Neotrópico, zonas de contato, filogeografia, DNA mitocondrial.

**Compared phylogeography of endemic Atlantic forest anurans *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) and *Chiasmocleis* spp. (Anura, Microhylidae)**

**Abstract:** A considerable number of data sets have been published on the phylogeography and distribution patterns of Atlantic forest organisms. Some phylogeographic breaks are consistently observed across taxa, such as those existing along the São Francisco and Doce rivers, as well as a secondary break in the southern region of the biome, close to Paranapanema river. Studies using climatic data to infer paleo distributions of Atlantic forest taxa incorporated a predictive component to phylogeographic studies in Brazil. Furthermore, provided scenarios that it was possible to test the hypothesis of demographic expansion of Atlantic forest taxa associated with glacial and interglacial periods in the Pleistocene. When investigating the demographic history of taxa now inhabiting cold and high altitude areas, there was a demographic expansion during the Pleistocene. However, the taxa that inhabit lowland forests, it was observed that shrank its distribution during the Pleistocene and showed demographic expansion from north to south after the end of the last glacial. Here I use endemic taxa of the Atlantic forest (*Dendropsophus elegans* and some representative species of the genus *Chiasmocleis*) to study local phylogeographic patterns and to investigate the historical and ecological processes underlying the structure of the populations sampled and the observed patterns. To this end, I used 148 specimens of *D. elegans* and 92 samples of *Chiasmocleis* spp., all of which had a portion of the mitochondrial gene ND2 sequenced. The results show that both taxa corroborate the hypothesis already describe in the literature of the existence of high levels of haplotype diversity between San Francisco and Doce rivers, and less stable areas in southern Atlantic forest. However, samples from areas in the southern region of the Atlantic showed signs of demographic expansion and low levels of haplotype diversity. Samples from areas of higher altitude, inside or outside climatically stable areas proposed by other authors, showed that local populations have remained isolated for a long time and accumulated genetic differences. This differs from the processes inferred for populations that currently inhabit the lowland forests, which have suffered population contraction during the last glacial maximum and expanded in the interglacial. In *Chiasmocleis*, phenotypically distinct species were grouped into a single clade, although both morphospecies also be reciprocally monophyletic. This may represent a possible hybridization event, that may have occurred due to secondary contact between individuals of both morphospecies or a recent diversification with retention of ancestral polymorphism. However, the molecular clock showed that the divergence between clades is very old (14.5 Myr) to accept the hypothesis of recent diversification.

**Keywords:** amphibians, altitude, biogeography, contact zones, population genetics, Neotropics, phylogeography, mtDNA.

## 1. Introdução

Nos últimos 23 anos, estudos filogeográficos baseados em sequências de DNA mitocondrial têm sido realizados em centenas de espécies (Avice et al. 1987, Avice 2009, dentre muitos). Os primeiros estudos filogeográficos no Brasil se iniciaram nos anos 90, sendo as primeiras publicações os trabalhos de Patton et al. (1994) na floresta Amazônica, de Lara et al. (1996) na Mata Atlântica, de Gonzales et al. (1998) nos pampas e Cerrado, e de Carnaval (2002) nos brejos de altitude e na Caatinga. A partir dos primeiros trabalhos de filogeografia com táxons endêmicos da Mata Atlântica (Lara et al. 1996, Zamudio & Greene 1997, Mustrangi & Patton 1997, Leite 2003, Geise et al. 2001), e de filogeografia comparada envolvendo espécies também de outros biomas brasileiros (Costa 2003), começaram a perceber que a Mata Atlântica não seria uma unidade biogeográfica única. Estudos envolvendo dados de ocorrência de vários grupos de fauna, utilizando metodologia cladística, revelaram a existência de uma separação da Mata Atlântica em um componente norte e sul (Costa et al. 2000). Posteriormente, pesquisas envolvendo diferentes grupos de espécies endêmicas da Mata Atlântica (e.g. Pellegrino et al. 2005, Ribeiro et al. 2005, Moraes-Barros et al. 2006, Cabanne et al. 2007, Carnaval & Bates 2007, Fitzpartick et al. 2009, Carnaval et al. 2009, Brunes et al. 2010, Ribeiro et al. 2010, Resende et al. 2010, Thomé et al. 2010) relevaram novas hipóteses biogeográficas para explicar a relação de parentesco entre as populações, a distribuição espacial das mesmas e os processos que influenciaram nos padrões observados. Contudo, devido a sua complexidade topográfica ao apresentar muitas escarpas e variações verticais abruptas, além do efeito das variações climáticas do Pleistoceno e de eventos neotectônicos, a Mata Atlântica apresenta padrões biogeográficos ainda pouco compreendidos (Carnaval & Moritz 2008).

Estudos filogeográficos na Mata Atlântica relevaram zonas de quebra de fluxo gênico (quebras filogeográficas), incluindo uma quebra na região do Rio São Francisco (Pellegrino et al. 2005, Carnaval et al. 2009), na região do Rio Doce (Costa 2003, Pellegrino et al. 2005, Tchaicka et al. 2007, Brunes et al. 2010, Resende et al. 2010, Thomé et al. 2010, Costa & Leite, *in press*) e na região sul da Mata Atlântica (Grazziotin et al. 2006, Cabanne et al. 2007). Tais regiões onde essas quebras ocorrem podem ser nomeadas de zonas de suturas, onde espécies (Remington, 1968) ou mesmo linhagens genealógicas distintas (Hewitt, 2001) entram em contato secundário após terem evoluído em isolamento. Ao longo de zonas de contato secundário ao sul da Mata Atlântica já foram evidenciados eventos de hibridação em

carnívoros (Trigo et al. 2008), anuros (Haddad et al. 1994, Brunes et al. 2010) e orquídeas (Pinheiro et al. 2010). Brunes et al. (2010) observaram também uma zona de intergradação fenotípica em espécies de anuros arborícolas nas remediações do Rio Doce.

Estudos de filogeografia e modelagem paleoclimática de anfíbios amplamente distribuídos nas florestas de baixada da Mata Atlântica identificaram uma área de refúgio climático entre os rios São Francisco e Doce (então chamada de refúgio da Bahia), onde o clima permaneceu estável desde o último glacial (Carnaval & Moritz 2008, Carnaval et al. 2009). Werneck et al. (2010), ao modelar a distribuição das florestas secas da América do Sul ao longo do Pleistoceno, também percebeu que estas não se expandiram o suficiente ao ponto de ocupar os refúgios da Bahia e Pernambuco identificados por Carnaval & Moritz (2008). Uma outra zona de refúgio climático foi proposta por Thomé et al. (2010) ao sul da Mata Atlântica.

Dados palinológicos (Ledru et al. 2007) de espécies de ambientes frios confirmaram a expansão demográfica, do sul para o norte da Mata Atlântica, de plantas do gênero *Podocarpus*, *Hedyosmum*, *Weinmannia*, *Ilex* e *Araucaria*, além da presença também dos gêneros *Myrtaceae*, *Melastomataceae/Combretaceae*, *Celtis*, e *Alchornea* indicadoras de floresta semidecídua, ao longo das flutuações climáticas no Quaternário ao sul da Mata Atlântica. Carnaval et al. (2009) ao estudarem os padrões filogeográficos de anuros de áreas quentes (*Hypsiboas albomarginatus* e *H. semilineatus*) reportaram que essas espécies estiveram, durante o período glacial do Pleistoceno, restritas as áreas quentes do norte da Mata Atlântica e se expandiram do norte para sul ao final do glacial, padrão contrário ao observado por Ledru et al. (2007) para espécies de ambientes frios.

Apesar do volume de dados já produzidos até então, a Mata Atlântica ainda abriga padrões biogeográficos que precisam ser melhor definidos. Nesse sentido, anfíbios anuros são bons modelos para estudos filogeográficos, uma vez que geralmente apresentam baixa mobilidade individual, muitas vezes acompanhada por alta filopatria aos locais de nascimento (Beebe 1996). Por conseguinte, populações de anfíbios tendem a ter elevada estrutura genética ao longo de pequenas distâncias geográficas, e também a reter sinais de eventos históricos que levaram às distribuições atuais das espécies (Zeisset & Beebe 2008). Devido a essas características, tornam possível identificar quebras filogeográficas sem a necessidade da existência de barreira geográfica (e.g. Irwin 2002). Assim sendo, esse grupo difere significativamente de outras espécies com maior mobilidade – tais como pássaros e insetos

voadores, e muitas plantas que geram sementes ou pólen transportados por longas distâncias. Anfíbios também são amostrados em grandes números, especialmente em comparação a pequenos mamíferos ou répteis de pequena mobilidade que sejam potencialmente passíveis de apresentar forte sinal filogeográfico.

A partir do que se foi produzido até então sobre filogeografia de organismo da Mata Atlântica, no presente estudo pretendo testar para os táxons abordados as hipóteses de isolamento por distância, assim como verificar se os padrões filogeográficos encontrados corroboram com as quebras filogeográficas já relatadas na literatura para táxons com ocorrência na Mata Atlântica. Além disso, testar se o histórico demográfico dos haplótipos provenientes de locais estáveis climaticamente ao longo das glaciações do Pleistoceno, regiões de refúgios, diferem do padrão demográfico dos haplótipos provenientes de áreas instáveis climaticamente, fora dos refúgios.

### 1.1. Objetivo

I Inferir os padrões filogeográficos de *Dendropsophus elegans* e de espécies do gênero *Chiasmocleis*, endêmicas da Mata Atlântica, e investigar os processos históricos e ecológicos passíveis de atuarem na estruturação demográfica dos táxons amostrados e nos padrões observados.

### 1.2. Adequação do sistema de estudo

As vantagens na utilização de anfíbios em estudos filogeográficos estão relacionadas com a diversidade de hábitos de vida que apresentam, tais como estratégia reprodutiva (e.g. explosiva ou prolongada), sensibilidade à alterações no ambiente (e.g. hábito especialista ou generalista) e tipo de locomoção (e.g. fossorial ou arborícola). Através do estudo de espécies com características distintas, podemos elucidar de que maneira as alterações físicas numa determinada região geográfica afetaram organismos de hábitos distintos. As características citadas podem, por exemplo, interferir na capacidade de dispersão dos organismos. Como um exemplo, Jocque et al. (2010) discutem que a dispersão é o processo chave que conecta diferentes escalas espaciais e temporais, relacionando processos ecológicos e evolucionários. A relação antagônica entre capacidade de dispersão e de especialização ecológica às condições locais é, assim, vista como um importante direcionador de padrões de diversidade em grande escala (Dynesius & Jansson 2000). Dessa forma, a especialização ecológica tende

a ser negativamente relacionada a dispersão devido principalmente a diminuição da probabilidade do organismo encontrar condições favoráveis à medida em que aumenta sua especialização ecológica (Jocque et al. 2010). O equilíbrio entre a dispersão e a força da seleção para condições locais determina o impacto do fluxo de genes e especialização ecológica local (Case & Taper 2000). Uma vez que as condições climáticas locais mediam o posicionamento de organismos ao longo de um gradiente ambiental, o clima influi nas taxas de dispersão de populações naturais, por sua vez afetando as taxas de especialização ecológica e, a longo prazo, também taxas de especiação (Jocque et al. 2010).

## 2. Material e métodos

### 2.1. Táxons e amostras

*Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824) é conhecida popularmente como “perereca de moldura” (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001). É uma espécie de pequeno porte (cerca de 4,5 cm de comprimento rostro-cloacal), de distribuição ampla no ecossistema da Mata Atlântica, desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Habita áreas abertas, desde lagoas costeiras e ambientes brejosos ao nível do mar até regiões serranas de 900 metros de altitude, e utiliza como sítio de vocalização plantas herbáceas ao redor de corpos d’água. Apresenta reprodução prolongada, isto é, em vários meses ao longo do ano, e os ovos são depositados nas plantas pouco acima da superfície da água. Coloniza rapidamente ambientes alterados, como açudes e corpos d’água próximos a áreas antropizadas, mostrando oportunismo e grande adaptabilidade (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001). De acordo com Faivovich et al. (2006), *D. elegans* pertence ao grupo *Dendropsophus leucophyllatus* composto por oito espécies: *Dendropsophus anceps* (A. Lutz, 1929); *Dendropsophus bifurcus* (Andersson, 1945); *Dendropsophus ebraccatus* (Cope, 1874); *Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824); *Dendropsophus leucophyllatus* (Beireis, 1783); *Dendropsophus rossalleni* (Goin, 1959); *Dendropsophus sarayacuensis* (Shreve, 1935); *Dendropsophus triangulum* (Günther, “1868” [1869]). Foram obtidas 148 amostras de *D. elegans* de 50 localidades (Tabela IS 1, Figura IS 5, Anexo 1) ao longo de grande parte da distribuição da espécie (exceto amostras do Rio Grande do Sul), variando de 1 a 16 indivíduos por localidade.

As espécies do gênero *Chiasmocleis* Méhely, 1904 são conhecidas popularmente como “rãzinhas-do-chão-da-mata”. São táxons de pequeno porte, chegando a atingir 3 cm de comprimento rostro-cloacal. Habitam a serrapilheira e possuem hábito de se enterrar no



período seco, emergindo às centenas após fortes temporais, principalmente na primavera e verão. A reprodução explosiva ocorre em poças temporárias que se formam na borda e no interior de mata (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001). O gênero *Chiasmocleis* está atualmente representado na Mata Atlântica do Brasil por 11 espécies, distribuídas da seguinte maneira: *C. alagoana* Cruz, Caramaschi & Freire, 1999, no Estado de Alagoas (Cruz et al. 1999); *C. cordeiroi* Caramaschi & Pimenta, 2003, *C. crucis* Caramaschi & Pimenta, 2003, *C. gnoma* Canedo, Dixo & Pombal, 2004 e *C. sapiranga* Cruz, Caramaschi & Napoli, 2007, no Estado da Bahia (Caramaschi & Pimenta 2003, Canedo et al. 2004, Cruz et al. 2007); *C. capixaba* Cruz, Caramaschi & Izecksohn, 1997, nos estados da Bahia e Espírito Santo (Cruz et al. 1997, Van Sluys 1998); *C. schubarti* Bokermann, 1952, nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (Cruz et al. 1997, Pimenta & Silvano 2002); *C. carvalhoi* Cruz, Caramaschi & Izecksohn, 1997, nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Cruz et al. 1997, Pimenta et al. 2002, Silva-Soares et al. 2009); *C. mantiqueira* Cruz, Feio & Cassini, 2007, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Cruz et al. 2007); *C. atlantica* Cruz, Caramaschi & Izecksohn, 1997, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Cruz et al. 1997); e *C. leucosticta* (Boulenger, 1888), nos estados de São Paulo e Santa Catarina (Cruz et al. 1997).

Os táxons desse gênero incluídos no presente estudo foram identificados a partir de caracteres morfológicos diagnósticos já descritos na literatura para *Chiasmocleis* (Cruz et al. 1997, Cruz et al. 2007) e revisados recentemente (M. Forlani, dados não publicados). As espécies incluídas no presente estudo são: *C. capixaba*, *C. schubarti*, *C. carvalhoi*, *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*. Foram obtidas 100 amostras de 21 localidades (Tabela IS 2 e Figura IS 6) ao longo da Mata Atlântica, dos estados de São Paulo à Bahia, variando de 1 a 10 indivíduos por localidade.

## 2.2. Extração, amplificação, sequenciamento e alinhamento

Amostras de tecidos animal (músculo ou fígado) conservadas em álcool hidratado (92%) foram utilizadas para extrair o DNA seguindo o protocolo de Bruford et al. (1992). Para a amplificação do gene mitocondrial NADH subunidade 2 (ND2) foram utilizados o conjunto de primers L4437/HND2PB (aprox. 700pb; Macey et al. 1997, Carnaval & Bates 2007) para *D. elegans* e ND2ALAR/ND2ELEUF1 (aprox. 950pb; Carnaval & Bates 2007) para *Chiasmocleis*. A cada reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para ambos os conjuntos

de primers, com volume final de 12,5  $\mu$ L, contendo 1X de tampão de reação, 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de solução de dNTP, 0,12  $\mu$ M de cada primer, 0,75 unidades de Taq Platinum (Invitrogen Co.) e 10-50 ng de DNA. O perfil de PCR incluiu uma etapa inicial de desnaturação a temperatura de 94°C por 5 minutos, 30-40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos. Na purificação do produto de PCR foi utilizada a enzima Exosap (GE Healthcare Life Sciences) e na reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye v3.1 (Perkin Elmer, Applied Biosystems<sup>TM</sup>, Foster City, California) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. As amostras de DNA de cada indivíduo foram sequenciadas nas duas direções no sequenciador automático ABI 310 ou ABI 3700. O trabalho laboratorial foi desenvolvido no Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade – UFES e na Embrapa.

O alinhamento das sequências foi feito no ClustalW (Larkin et al. 2007) através da interface do programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) e conferidas e editadas manualmente.

### 2.3. Análises filogenéticas e demográficas

A Inferência Bayesiana e a Máxima Verossimilhança foram as técnicas de reconstrução filogenética utilizadas para identificar a estrutura filogenética global dos principais clados. O modelo de evolução foi escolhido com o auxílio do programa Modeltest (Posada & Crandall 1998), utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC). A topologia e a estimativa da probabilidade posterior para a Inferência Bayesiana foram geradas no programa BEAST (Drummond & Rambaut 2007), assim como a estimativa do tempo de divergência entre as linhagens, utilizando a análise *Markov chain Monte Carlo* (MCMC). O programa rodou por 20 milhões de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 1000 gerações totalizando 20 mil árvores. Os parâmetros (taxas de substituição) foram modificados de acordo com o modelo de evolução nucleotídica escolhido. A qualidade dos parâmetros calculados foi avaliada no programa Tracer e o consenso das árvores foi gerado no programa TreeAnnotator descartando as 2 mil primeiras árvores, sendo ambos os programas parte do pacote do BEAST (Drummond & Rambaut 2007). Foi aplicado o relógio molecular relaxado que permite variação do comprimento dos ramos de acordo com a distribuição log-normal não-correlacionada (Drummond et al. 2006). A taxa utilizada para calibrar o relógio molecular seguiu o sugerido por estudos recentes (0,957% por milhão de anos, Crawford 2003). A filogenia de Máxima Verossimilhança foi gerada no portal PHYML (Guindon & Gascuel

2003), e o suporte estatístico dos cladogramas obtido através do bootstrap, com 1000 replicações. O grupo externo escolhido para enraizar a árvore das morfoespécies de *Chiasmocleis* incluídas no presente estudo foi *Stereocyclops incrassatus*, *Dermatonotus muelleri*, *Dasypops schirchi*, *Chiasmocleis shudikarensis* e *Chiasmocleis jimi* (e.g. Meijden et al. 2007). Já para *D. elegans* o grupo externo escolhido foi *Dendropsophus ebracetus* (EU034096) e *Hypsiboas faber* (FJ502765) (e.g. Wiens et al. 2010), ambas as sequências retiradas do GenBank.

Para as análises demográficas os grupos foram obtidos através da estrutura global dos cladogramas nas análises filogenéticas. Posteriormente, foram realizadas análises preliminares com os parâmetros demográficos, a partir dos agrupamentos propostos pelas análises filogenéticas, a fim de encontrar o arranjo que melhor representasse a estrutura genética e, conseqüentemente, apresentasse valores estatisticamente significativos.

Os índices de diversidade genética (diversidade haplotípica e nucleotídica) e os testes de Neutralidade/expansão demográfica, D de Tajima (Tajima 1989) e Fs de Fu (Fu 1997), foram obtidos com auxílio do programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al. 2005), assim como o indicador de fluxo gênico Fst e a Análise Molecular de Variância (AMOVA), sendo os valores com  $p < 0,05$  considerados significativos para todas as análises acima, exceto para FS onde um  $p < 0,02$  foi considerado significativo. A porcentagem de divergência entre as populações foi estimada no programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) utilizando o modelo de evolução e o parâmetro gamma definido pelo AIC, ou um modelo mais semelhante disponível no banco de dados do programa MEGA 4.0. Para testar a influência da distância geográfica na estruturação das populações foi utilizado o teste de Mantel (Sokal & Rohlf 1995), a fim de se comparar a matriz de distância genética com a de distância geográfica.

### 3. Resultados

#### 3.1. *Dendropsophus elegans*

As 148 amostras sequenciadas para *D. elegans* resultaram em 83 haplótipos para o gene ND2 e foram encontrados 202 sítios polimórficos (750 pb). O modelo de evolução escolhido pelo AIC foi TrN+I+G (Tamura & Nei 1993), sendo o valor de proporção de sítios invariáveis = 0,286 e o valor de distribuição gamma = 0,869. As árvores de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança apresentaram topologias semelhantes (Figuras IS 1 e 3, respectivamente), variando apenas no suporte estatístico dos cladogramas. Dessa forma, ao longo

dos resultados serão apresentados somente as árvores de Inferência Bayesiana com os haplótipos do gene ND2 para *D. elegans*.

As filogenias apresentaram três grandes clados nomeados posteriormente como Norte, Centro e Sul da Mata Atlântica (Figura 1A e Figura IS 3). Nestes, foi possível identificar clados menos inclusivos – ou subclados – que tiveram suporte estatístico. No clado Norte foi possível identificar três subclados, enquanto que os clados Centro e Sul foram divididos em dois subclados. A maior divergência genética encontrada foi entre os clados (Centro(Sul Norte) de 11,7% e entre os clados (Norte Centro) foi de 8,4%.

O teste de Mantel evidencia que a divergência genética está diretamente relacionada com a distância geográfica, tanto na análise incluindo todas as amostras do gene ND2 de *D. elegans* ( $R=0,493$ ) quanto dentro dos clados Norte ( $R=0,225$ ), Centro ( $R=0,579$ ) e Sul ( $R=0,089$ ), todos os resultados com  $p<0,01$  (Tabela 1).

Segundo o relógio molecular, a separação do clado Sul com os clados Norte + Centro iniciou-se à aproximadamente 9,51 (5-15,4) M.a. e a separação entre os clados Norte e Centro foi datada de 6,38 (3,5-9,8) M.a. (Tabela 2), ambas no período geológico do Mioceno.

Os maiores valores de diversidade haplotípica foram registrados nos subclados C1 e N2 (Tabela 1) e os maiores valores de diversidade nucleotídica foram registrados nas populações S2 e N2 (Tabela 1). Os testes de neutralidade/expansão, quando calculados com base na totalidade de haplótipos do gene ND2 para *D. elegans*, não apresentaram resultados significativos. No entanto, quando analisados separadamente, os clados Sul e Centro, e os subclados N3 (sul do estado BA), C1 (norte do estado ES e MG, ao norte do rio Doce) e S2 (estados RJ, SP, PR) apresentaram sinais significativos de expansão demográfica recente (Tabela 1). Sendo que, os subclados S1 e C2 possuem haplótipos compartilhados, assim como o subclados N3 e N2, e N3 e C1 (Figura IS 1 e 3).

A AMOVA mostrou que os dados apresentam forte estruturação genética, sendo 60,87% da variação dos dados proveniente das diferenças genéticas entre clados (graus de liberdade = 2); 31,43% da variação devido às diferenças entre os subclados dentro de cada clado (graus de liberdade = 4); e 7,7% da variação dos dados está associada às diferenças dentro dos subclados (graus de liberdade = 142). Os valores de  $F_{st}$  foram elevados (acima de 0,51; valor referente a comparação par-a-par entre os subclados S1 e S2) nas comparações entre todos os clados e subclados, indicando pouco fluxo gênico (Tabela 3), sendo todos os resultados de AMOVA e  $F_{st}$  com  $p<0,05$ .

Maiores graus de estruturação e divergência genética foram detectados nos clados Norte e Centro. No clado Norte, os subclados N1 (norte do rio São Francisco) e N2 (sul do rio São Francisco) apresentam divergência genética de 4,3% - correspondendo a uma separação há 2,74 (1,4-4,3) M.a. (Plioceno), mediante a aplicação de um relógio molecular. No clado Centro, os subclados C1 (norte do Rio Doce) e C2 (sul do Rio Doce) apresentaram divergência genética de 2,2% e valores elevados de  $F_{st}$  (0,72), sendo a data estimada de separação 2,31 (1,1-3,8) M.a. (Pleistoceno). Nesses dois últimos subclados (C1 e C2) há haplótipos com ocorrência próxima (cerca de 34 km de distância), mas pertencendo a subclados distintos (Figura 1A).

Haplótipos provenientes da localidade Serra/ES (região de baixada situada ao sul do Rio Doce) foram recuperados tanto no clado C2 como S1. Além disso, haplótipos de localidades ao sul do estado do Espírito Santo estiveram exclusivamente no clado Sul, juntamente com haplótipos de localidades ao sul da Mata Atlântica provenientes dos estados RJ, SP e PR (Figura 1A). O subclado N2 possui haplótipos compartilhados com os subclados N3 e C1.

### 3.2. *Complexo Chiasmocleis*

A partir das 92 amostras sequenciadas para os *Chiasmocleis*, foi possível indentificar 75 haplótipos para o gene ND2 e foram encontrados 482 sítios polimórficos (950 pb). O modelo de evolução escolhido pelo AIC foi GTR+I+G (Lanave et al. 1984), sendo o valor de proporção de sítios invariáveis = 0,283 e o valor de distribuição gamma = 0,912. As árvores de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança apresentaram topologias semelhantes (Figuras IS 2 e 4, respectivamente), variando apenas no suporte estatístico dos clados. Dessa forma, ao longo dos resultados serão apresentados somente as árvores de Inferência Bayesiana com os haplótipos do gene ND2 para *Chiasmocleis*.

A filogenia do gene ND2 para as espécies de *Chiasmocleis* inclusas no presente estudo apresentou também a divisão em três grandes clados, que refletiram uma organização taxonômica. Contudo, os clados apresentaram-se organizados geograficamente segundo a distribuição de cada morfoespécie. Uma vez que, *C. schubarti* possui uma distribuição centro-norte da Mata Atlântica, *C. capixaba* ocorre na região centro-leste, *C. carvalhoi* se distribui na região centro-sul, *C. mantiqueira* possui distribuição sudoeste e *C. leucosticta* ocorre ao sul da Mata Atlântica (Frost 2010, Forlani, 2010).

Os clados foram nomeados posteriormente em clado Norte (composto por haplótipos da morfoespécie *C. schubarti*), Centro (composto por haplótipos da morfoespécie *C. carvalhoi*) e Sul (composto por haplótipos das morfoespécies *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*) (Figura IS 2). Nos clados Norte e Sul foi possível identificar dois subclados, e no clado Centro quatro subclados (Figura IS 2). A maior divergência genética encontrada foi entre os clados Sul em relação ao Norte + Centro (31,1%), e entre os clados Norte e Centro foi de 21,8% (Figura IS 2). Os valores muito mais elevados de divergência, quando comparado aos valores de *D. elegans*, refletem as diferenças genéticas entre as morfoespécies.

A AMOVA mostrou que os grupos possuem forte estruturação genética, sendo que 88,34% da variação dos dados provem das diferenças entre clados principais (graus de liberdade = 2); 10,15% da variação é devida às diferenças entre os subclados dentro de cada clado (graus de liberdade = 7); e 1,51% da variação dos dados está associada a diferenças dentro dos subclados (graus de liberdade = 80). Além disso, quando analisados os *Chiasmocleis* na totalidade, o teste de Mantel mostrou que a divergência genética e distância geográfica estão positivamente associadas ( $R=0,544$   $p<0,01$ ), mesmo dentro das espécies, todos os resultados acima com  $p<0,05$ . Os cálculos de  $F_{st}$  foram realizados somente para *C. carvalhoi*, a qual possui amostragem mais representativa.

Segundo o relógio molecular, a separação do clado Sul com os clados Norte e Centro iniciou-se à aproximadamente 21,9 (14,1-32,1) M.a. e a separação entre os clados Norte e Centro foi datada de 14,5 (9,2-21,4) M.a. Ambas as datas que remetem a separação dos principais clados são do período geológico do Mioceno, assim como em *D. elegans*.

### 3.2.1. *Chiasmocleis leucosticta* e *Chiasmocleis mantiqueira*

Dentre as três morfoespécies de *Chiasmocleis* endêmicas da Mata Atlântica com ocorrência na região sul deste ecossistema, apenas *C. atlantica* não foi incluída no presente estudo, devido a raridade de tecidos desta disponíveis em coleções científicas.

As amostras do subclado formado por *C. leucosticta* e *C. mantiqueira* são de localidades mais ao sul da nossa amostragem que foram incluídas na filogenia de *Chiasmocleis*, e estas formaram o clado Sul (Figura IS 2). Apesar de termos poucas amostras dessas duas espécies, com estas foi possível termos uma idéia das divergências genéticas e da datação do relógio molecular para as espécies de *Chiasmocleis* que ocorrem mais ao sul da

Mata Atlântica, quando comparadas às amostras de localidades da região centro e norte. O teste de Mantel não apresentou resultados significativos para esse clado ( $R=0,41$   $p=0,385$ ).

### 3.2.2. *Chiasmocleis schubarti*

Incluímos nas análises filogenéticas 25 amostras da morfoespécie *C. schubarti*. O clado formado pelos haplótipos do gene ND2 dessa morfoespécie foi nomeado de Norte, pois correspondiam às amostras de localidades mais ao norte que possuíamos. Neste clado foi possível identificar dois subclados: um formado por haplótipos provenientes de localidades na Bahia e outro formado por amostras de localidades do Espírito Santo (Figura IS 2), sendo os valores de  $F_{st}$  entre estes igual a 0,75 com  $p<0,05$ . A divergência genética entre os subclados é de 10,1% e o relógio molecular sugere uma separação a 7,1 (3,9-10,8) M.a. (Mioceno). O teste de Mantel resultou em valores positivos e significativos ( $R=0,55$   $p<0,01$ ), indicando uma relação direta entre distância genética e geográfica.

### 3.2.3. *Chiasmocleis capixaba*

Nas análises filogenéticas foram inclusas oito amostras de *C. capixaba*, sendo que essas amostras não formaram um clado monofilético e estiveram sempre inseridas no clado de *C. carvalhoi*. As amostras provenientes de localidades em que existe simpatria entre espécies de *Chiasmocleis*, indicaram que houve intergradação de haplótipos de diferentes espécies, como por exemplo na localidade Cariacica/ES onde ocorrem *C. carvalhoi*, *C. schubarti* e *C. capixaba*.

### 3.2.4. *Chiasmocleis carvalhoi*

Devido a amostragem de *C. carvalhoi* ter sido a mais representativa dentre os táxons de *Chiasmocleis*, contendo amostras ao longo de toda a distribuição da espécie, o padrão filogeográfico obtido será discutido apenas para esse táxon.

O clado nomeado de Centro é composto por 61 amostras do gene mitocondrial ND2 da morfoespécie *Chiasmocleis carvalhoi*, com amostras distribuídas do sul do estado da Bahia ao estado de São Paulo, sendo que dentre estas foram identificados 49 haplótipos. A separação mais antiga deste clado foi entre os subclados compostos pelas amostras dos estados da Bahia e do norte do Espírito Santo (ambos ao norte do Rio Doce), com os subclados da região

centro-sul do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo essa divergência de 7,6% e a data de separação das linhagens de 6,62 (4,2-9,3) M.a., no período do Mioceno (Figura 1B).

O subclado com amostras da Bahia (N1) e seu grupo irmão composto por amostras provenientes de localidades do Espírito Santo (N2; norte do Rio Doce), quando comparados tiveram valores de  $F_{st}$  igual a 0,89 (Tabela 4) e a divergência entre os mesmos foi de 6,8% (Tabela 4), com a data de separação das linhagens estimada em 3,9 (1,8-6,3) M.a., ocorrendo no Plioceno (Tabela 5).

Os demais subclados reuniram amostras da região centro-sul do estado do Espírito Santo (nomeados C1 e C2) e amostras dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (nomeados S). Os subclados da região central do Espírito Santo (C1 e C2) formaram dois ramos com baixo suporte nas análises filogenéticas, contudo caracterizados como dois nas análises populacionais (Tabela 4). Sendo a divergência genética entre eles de 2,4% (Tabela 4), o valor de  $F_{st}$  igual a 0,73 (Tabela 4) e a data de separação à 2,63 (1,4-4,1) M.a., ocorrendo no Plioceno (Tabela 5).

Ainda foi possível identificar dois subclados adicionais, como grupo irmão do clado da região central do Espírito Santo (C1 + C2), sendo um formado por haplótipos do sul do Espírito Santo e o outro por haplótipos do Rio de Janeiro e São Paulo. A divergência entre estes foi de 7,9% (Tabela 4) e a data de separação estimada em 4,4 (2,2-6,9) M.a. (Tabela 5), estimada para o Plioceno. Apesar destes dois últimos subclados representarem claramente subclados distintos, dado os elevados valores de divergência, nas análises populacionais foram considerados como um único, devido ao pequeno número de amostras dessa região mais ao sul da distribuição de *C. carvalhoi*.

O teste de Mantel apresentou resultados positivos e significativos para o clado de *Chiasmocleis carvalhoi* ( $R=0,081$   $p<0,01$ ; Tabela 6), apesar da baixa intensidade do valor do teste. As subpopulações N2 e C2 apresentaram sinais de expansão demográfica devido aos valores negativos do  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu (Tabela 6). A AMOVA mostrou que os grupos estão estruturados geneticamente, sendo que 59,48% da variação dos dados provê das diferenças entre clados Norte, Centro e Sul de *C. carvalhoi* (graus de liberdade = 2); 35,97% da variação é devida às diferenças entre os subclados dentro de cada clado (graus de liberdade = 2); e 4,55% da variação dos dados está associada a diferenças dentro dos subclados (graus de liberdade = 57).



Dentro dos subclados N2, C1 e C2 estão presentes também haplótipos do gene ND2 proveniente de indivíduos identificados fenotipicamente como *C. schubarti* e *C. capixaba* (Figura IS 2). Além disso, um haplótipo para o gene ND2 de *C. schubarti* dessa localidade ficou no clado originalmente dessa espécie, porém dois outros estiveram no subclado C1 de *C. carvalhoi*, sendo a divergência entre o clado de *C. schubarti* com *C. carvalhoi* de 21,8%. Esse compartilhamento de haplótipos entre diferentes morfoespécies também foi reportado nos resultados para outras localidades ou em áreas próximas onde ocorre simpatria de mais de um desses táxons do gênero (Figura IS 2).

#### 4. Discussão

##### 4.1. Comparação dos padrões filogeográficos

A presença de ramos curtos conectando os principais clados de *D. elegans* e *C. carvalhoi* sugere que as espécies passaram por um processo de diversificação recente e abrupta. Apenas o haplótipo do gene ND2 de *D. elegans* da localidade Petrópolis/RJ apresentou comprimento de ramo alongado comparativamente aos demais (Figura 1A e Figura IS 1). Em ambas árvores filogenéticas, os haplótipos de localidades ao Norte e Centro da Mata Atlântica são mais semelhantes entre si relativamente às amostras do Sul (Figuras 1A, IS 1 e IS 2). Padrão semelhante foi observado para os anuros *Rhinella* gr. *crucifer* (Thomé et al. 2010).

Carnaval & Moritz (2008) argumentam táxons provenientes de áreas com alta estabilidade climática (refúgios) ao longo do último glacial, deveriam apresentar valores mais elevados de diversidade haplotípica e tamanho populacional constante, quando comparadas com táxons amostrados em áreas de instabilidade climática. Populações localizadas em áreas previstas como instáveis do ponto de vista climático, ao sul da Mata Atlântica, deveriam apresentar sinais de expansão demográfica após o último glacial. Os resultados para *D. elegans* confirmam essa predição e, tal como observado por Carnaval et al. (2009) em *H. albomarginatus*, apresentam sinais de expansão nos clados distribuídos na região sul da Mata Atlântica. Outros autores também reportaram expansão populacional e/ou baixa diversidade haplotípica para as populações do sul da Mata Atlântica para uma série de organismos, como observado por Graziotin et al. (2006) para a serpente *Bothrops jararaca*, por Cabanne et al. (2007) para a ave *Xyphorhynchus fuscus*, por Tchaicka et al. (2007) para o cachorro-do-mato

*Cerdocyon thous*, por Martins et al. (2007 e 2009) para o morcego *Desmodus rotundus* e por Fitzpatrick et al. (2009) para os anuros *Thoropa miliaris* e *T. taophora*.

Os dois grupos de estudo mostraram evidência de divergência entre uma linhagem localizada ao sul do Brasil e um grupo distribuído na região central e norte da Mata Atlântica. Minha datação preliminar sugere que essa divergência é muito antiga, datando do Mioceno (21,6 M.a. para *Chiasmocleis* e 9,6 M.a. para *D. elegans*). Aparentemente não há nenhuma barreira geográfica ainda existente, já reportada na literatura, que possa ser relacionada a essa separação. Porém, tal como discutido por Irwin (2002), quebras filogeográficas podem existir sem que haja necessariamente uma barreira geográfica – especialmente em casos de isolamento genético por distância. Dados adicionais, incluindo sequências de múltiplos genes nucleares, são necessários para elucidar essa questão no tocante a *Chiasmocleis* e *D. elegans*.

Ao modelar a distribuição histórica das florestas secas da América do Sul no Pleistoceno, Werneck et al. (2010) predisseram que estas teriam se expandido consideravelmente, e o refúgio da Bahia predito por Carnaval & Moritz (2008) teria um tamanho menor. As análises populacionais de *D. elegans* e *C. carvalhoi* corroboram hipóteses de Carnaval & Moritz (2008) e Werneck (2010). Os haplótipos de *D. elegans* provenientes de áreas estáveis de florestas úmidas (onde não teria havido substituição da floresta úmida pela floresta seca), tal como onde foi previsto o refúgio de Pernambuco (subclado N1 de *D. elegans*) e Bahia (subclado N2 de *D. elegans*), não apresentaram sinais de expansão demográfica. Já a área de abrangência geográfica dos subclados N3 e C1 para *D. elegans*, e N2 e C2 para *C. carvalhoi*, onde, segundo Werneck et al. (2010), teria ocorrido a substituição das florestas úmidas pelas secas no último glacial, apresentaram sinais de expansão demográfica. Uma hipótese para o fato de N1 em *D. elegans* apresentar baixos valores de diversidade haplotípica pode ter relação com o refúgio de Pernambuco ter tamanho pequeno, se comparado ao da Bahia, e abrigado assim pouca diversidade genética devido a um pequeno tamanho populacional. Isso corrobora com a hipótese de Carnaval & Moritz (2008), a qual sugere um menor tamanho para o refúgio de Pernambuco relativamente ao refúgio da Bahia.

Apesar das datas de separação entre os clados principais inclusos no presente trabalho terem sido anteriores aos dados utilizados nos modelos para o Pleistoceno propostos por Carnaval & Moritz (2008) e Werneck et al. (2010) (LGM: 21 mil e LIG: 130 mil anos atrás,

respectivamente), é razoável assumir que a floresta atlântica teve comportamento semelhante em épocas anteriores, mas de clima comparável às modeladas.

Os resultados de *D. elegans* indicam rupturas filogeográficas já relatadas na literatura, na região que compreende o Rio São Francisco (e.g. Pellegrino et al. 2005, Carnaval et al. 2009), na região do Rio Doce (e.g. Costa 2003, Pellegrino et al. 2005, Tchaicka et al. 2007, Brunet et al. 2010, Resende et al. 2010, Thomé et al. 2010), assim como ao sul da Mata Atlântica na região do Rio Paraíba do Sul (Grazziotin et al. 2006, Cabanne et al. 2007). Ainda restam dúvidas quanto ao papel dos rios como barreiras em estudos herpetológicos (Gascon et al. 1998, Pellegrino et al. 2005). Porém, em épocas nas quais a floresta úmida foi substituída pela floresta seca, os vales em que se encaixam rios podem ter se secado. A falta de água nesses vales pode ter sido uma barreira a dispersão e/ou contato entre as populações de margens opostas, uma vez que os anuros são sensíveis a perda de água por evaporação. Associado ao fato dos anuros terem baixa mobilidade, isso pode ter ocasionado as quebras aqui observadas.

#### 4.2. Isolamento por distância ou por quebra filogeográfica?

Irwin (2002) discute que espécies com baixa capacidade de dispersão, podem apresentar quebras genealógicas causadas tanto por barreiras geográficas quanto por isolamento por distância (que não é resultado de uma barreira geográfica). No teste de Mantel, observei relações fortes da influência da distância geográfica na divergência genética entre os clados de *D. elegans* (Tabela 1) e *Chiasmocleis* (valores no sub-item 3.2), o que sugere um isolamento por distância, provavelmente devido a característica de baixa mobilidade dos anfíbios anuros.

Se levado em consideração que *D. elegans* habita áreas abertas e antropizadas, possui grande potencial de adaptabilidade e oportunismo (Izeckson & Carvalho-e-Silva 2001), além de ter ampla distribuição ao longo da Mata Atlântica (Frost 2010), a distância geográfica não deveria ser uma barreira ao contato entre as populações. Apesar dos resultados relacionados a distância geográfica, os maiores graus de estruturação e divergência genética de *D. elegans*, corroboram com a região geográfica das principais regiões de quebras filogeográficas já relatadas na literatura, sendo estas a quebra filogeográfica do Rio São Francisco e do Rio Doce.

Irwin (2002) argumenta que em um cenário de isolamento por distância, isto é sem barreiras geográficas, uma amostragem insuficiente pode sugerir, erroneamente, uma quebra filogeográfica. Esse argumento possivelmente pode ser utilizado para questionar a separação dos clados de *D. elegans* na região do Rio São Francisco, onde possuímos menos amostras que na região do Rio Doce. Contudo, se inicialmente as populações *D. elegans* tivessem sido estruturadas por um isolamento e por distância e posteriormente houvesse o efeito de um evento vicariante, como por exemplo a seca dos rios ao longo das glaciações (ver discussão no item seguinte), então os dois processos (tanto o isolamento por distância quanto as quebras filogeográficas) seriam responsáveis pela padrão observado.

#### 4.3. Diferenças entre áreas de baixada e de altitude elevada

Devido a ênfase na amostragem na região sul do estado da Bahia e Espírito Santo, foi possível refinar a quebra filogeográfica da região do Rio Doce. Haplótipos de duas localidades (Prado/BA e Trancoso/BA) estiveram presentes tanto no subclado N3 quanto no subclado C1 em *D. elegans*, isso pode ser um exemplo da existência de contato entre esses grupos genéticos. Como predito por Werneck et al. (2010) e sugerido pelos resultados dos testes de expansão/neutralidade do presente estudo, essa região pode ter sido ocupada por florestas secas durante o Quaternário, o que poderia ter ocasionado separação entre os dois subclados. Com o fim do último glacial, esses subclados puderam se expandir e recentemente entrar em contato secundário.

Em *D. elegans*, os haplótipos de localidades ao sul do Rio Doce pertencentes ao subclado C2, estão a cerca de 34 km de distância de localidades onde ocorrem haplótipos do subclado C1 (norte do Rio Doce). Ao sul do Doce não se observam haplótipos pertencentes ao subclado C1, nem indícios de expansão populacional. O subclado C1 apresentou sinais de expansão demográfica e valores mais elevados de diversidade haplotípica do que C2, porém não apresentou sinais de expansão. Valores altos de diversidade haplotípica ao norte e ao sul da região do Rio Doce foi também encontrado por Resende et al. (2010) para populações da formiga *Diponera lucida*. Esses autores também encontraram sinais de expansão demográfica apenas na região ao norte do Rio Doce, na mesma área geográfica da ocorrência dos haplótipos do subclado C1 de *D. elegans*.

Em *C. Carvalhoi*, assim como em *D. elegans*, os dados apontam para uma história biogeográfica distinta entre os haplótipos das áreas de baixada ao norte do Rio Doce quando

comparada com de altitudes elevadas ao sul do Rio Doce. Os subclados N2 (baixada ao norte do Rio Doce) e C2 (baixada ao sul do Rio Doce) apresentaram sinais de expansão, ambas com alta diversidade haplotípica. O subclado C2 de *C. carvalhoi* ocorre na mesma região geográfica que o subclado C1 de *D. elegans*, que também apresentou sinais de expansão populacional e alta diversidade haplotípica. Em *C. carvalhoi*, o subclado C1 ocupa uma localidade de maior altitude (550-738m, Cariacica/ES), não apresentando sinais de expansão demográfica. Além disso, os subclados C1 e C2 de *C. carvalhoi* entram em contato na localidade Cariacica/ES. Valores elevados de divergência foram encontrados entre estes subclados de *C. carvalhoi*, bem como valores significativos de  $F_{st}$  (Tabela 4). A data de separação é estimada em 2,63 M.a. (Tabela 5), correspondendo ao final do período do Pleistoceno e início do Plioceno.

Em *C. carvalhoi*, os subclados N2 e C2 compartilham haplótipos provenientes de áreas de baixada ao norte e ao sul do Rio Doce. Isso pode indicar que o Rio Doce não teria gerado uma separação significativa para essa morfoespécie. Por outro lado, os elevados valores de divergência,  $F_{st}$  (Tabela 4) e AMOVA sugerem uma estruturação genética, que pode estar associada à menor capacidade de dispersão e ao hábito mais especializado de *C. carvalhoi*, se comparado a maior capacidade de dispersão e a maior adaptabilidade de *D. elegans*. Quanto mais especializado o organismo, maior é a dificuldade dele dispersar (e.g. Jocque et al. 2010), contribuindo para manutenção do isolamento e de elevadas taxas de divergência genética.

Uma hipótese para esses resultados é que a região norte do Espírito Santo (norte do Rio Doce), apesar de ter mantido remanescentes florestais durante o último glacial, se restringiu a pequenos fragmentos (e.g. Resende et al. 2010). Com a alteração nas condições ambientais, as populações que estavam separadas teriam entrado em contato novamente, produzindo os elevados índices de diversidade e deixando resquícios de expansão populacional.

Já ao sul do Rio Doce, uma hipótese para a alta diversidade haplotípica, mesmo sendo esta uma área onde os modelos paleoclimáticos de Carnaval & Moritz (2008) e Werneck et al. (2010) predisseram como pouco estáveis, baseia-se na informação de que haplótipos dos subclados C2 de *D. elegans* e C1 de *C. carvalhoi* sejam provenientes de locais com altitudes acima de 550 m (ao passo que na região norte do ES, a paisagem predominante são as de matas de baixada, também chamadas de Tabuleiros). De acordo com essa nova hipótese, aqui levantada, esses locais mais altos teriam sido alvo de forças seletivas diversificadoras. Uma outra hipótese mais especulativa, é que essas áreas de altitude elevada poderiam ter

remanescentes de floresta úmida durante o último glacial, e possivelmente a biota dessas localidades já estaria adaptada as menores temperaturas relativamente à biota das regiões de baixada.

Com o avanço da era glacial ao longo do Pleistoceno, as florestas na região sul do Rio Doce teriam se restringido as regiões serranas, que dominam atualmente grande parte da paisagem da região sul do Espírito Santo (Figura 2). Assim, a fauna desses locais teria ficado abrigada nesses refúgios de altitude, enquanto as populações da baixada sofriam os impactos da glaciação. Um exemplo de cadeia montanhosas no sul do ES é a chamada Serra da Boa Vista, que possui ampla extensão e conecta grande parte dos remanescentes florestais serranos atuais. Dentre as áreas que poderiam ter abrigado remanescentes florestais ao longo das glaciações do Pleistoceno estão o município de Santa Teresa, o Parque Estadual da Pedra Azul, o Parque Estadual de Forno Grande, Área de Proteção Ambiental Goiapaba-Açu e a Reversa Biológica de Duas Bocas, todas localidades com elevada biodiversidade de espécies (e.g. Passamani et al. 2000, Ramos & Gasparini 2004, Rodder et al. 2009, Tonini et al. 2010), e onde novas espécies tem sido descritas (Faivovich et al. 2010). Um outro exemplo que sustenta essa hipótese de remanescentes de mata em regiões de altitude elevada ao longo das glaciações é o longo ramo encontrado para o haplótipo de Petrópolis/RJ para a *D. elegans*.

Apesar de *C. carvalhoi* e *D. elegans* apresentarem padrões filogeográficos semelhantes na região do Rio Doce (tal como discutido acima), os resultados do teste de Mantel diferiram entre os táxons. As localidades dos haplótipos do clado Centro de *C. carvalhoi* coincide com a região de ocorrência do clado Centro de *D. elegans*, mas os valores do teste de Mantel para estes foram de 0,579 em *D. elegans* e 0,140 em *C. carvalhoi*. Ou seja, a distância geográfica teria exercido uma influência muito maior na divergência genética de *D. elegans* do que de *C. carvalhoi*. Os hábitos de vida dos táxons podem explicar essas diferenças (e.g. Irwin 2002). Os indivíduos da espécie *D. elegans* são conhecidos por apresentar um grande potencial de adaptabilidade à mudanças do meio (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001). Este grande potencial de adaptabilidade, aliada ao fato dos indivíduos desse táxon conseguirem ser reproduzir ao longo de todo o ano e, por serem arborícolas (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001), à maior capacidade de locomoção dos mesmos (e conseqüentemente de dispersão) podem tornar *D. elegans* menos susceptível às mudanças ambientais relativamente a *C. carvalhoi*.

Os indivíduos de *C. carvalhoi* possuem maiores restrições no seu hábito de vida, e são mais especialistas do que *D. elegans*, e quanto mais especializada a espécie, menor é a probabilidade dela encontrar condições favoráveis a sua sobrevivência (Jocque et al. 2010). Dessa forma, uma pequena mudança no meio, principalmente em termos de mudança nos regimes de chuvas (já que esses organismos possuem reprodução explosiva) pode ter influenciado no sucesso de dispersão. Se o clima estiver relacionado com as diferenças entre os resultados de *D. elegans* e *C. carvalhoi* para a região do Rio Doce - em especial a severidade e a duração da estação favorável à reprodução - pode ter afetado a capacidade de dispersão dos indivíduos e a evolução das populações, consequentemente as taxas de divergência (e.g. Jocque et al. 2010). Portanto, eventos locais de alterações no ambiente poderiam ter influenciado de maneira mais severa *C. carvalhoi* do que *D. elegans*.

#### 4.4. Zona de contato para *Chiasmocleis*

A ocorrência de haplótipos de *C. schubarti* e *C. capixaba* no clado dos indivíduos identificados morfológicamente como *C. carvalhoi*, pode estar relacionada a eventos de hibridação. Na filogenia do gene ND2 para esses táxons, a divergência encontrada entre o clado de *C. schubarti* (Figura IS 2) e *C. carvalhoi* (Figura IS 2) é de 21.8%, sendo que o tempo estimado de separação entre os mesmos é de 14,5 M.a. (Mioceno). Sendo assim, a hipótese de diversificação recente dessas espécies, para explicar o fato de compartilharem haplótipos de indivíduos fenotipicamente distintos, parece não ser a mais adequada.

Apesar de termos incluído oito amostras de *C. capixaba*, em nossas análises não houve formação de um clado monofilético desse táxon, sendo que todos os haplótipos do gene ND2 de *C. capixaba* estiveram dentro do clado de *C. carvalhoi*. O fato da filogenia do ND2 não ter relevado *C. capixaba* como monofilético, aliado a semelhança do canto entre os dois táxons (e.g. Wogel et al. 2004) e ao fato da distribuição geográfica de *C. capixaba* estar totalmente dentro da área de distribuição de *C. carvalhoi* (Frost 2010), pode indicar que *C. capixaba* não seja uma espécie válida. Contudo, como utilizamos apenas um marcador molecular, optamos em não apresentar uma hipótese taxonômica para esses táxons.

O principal mecanismo de reconhecimento macho-fêmea entre anuros é através do canto, característico de cada espécie, sendo este um tipo de isolamento pré-zigótico. Contudo, nas espécies *C. schubarti*, *C. carvalhoi* e *C. capixaba*, os cantos são semelhantes. Wogel et al. (2004) ao descrever o canto de *C. carvalhoi* e *C. capixaba* apresentam um cluster obtido

segundo caracteres acústicos onde essas das últimas espécies formaram um agrupamento, e *C. schubarti*, juntamente com *C. leucosticta* e *C. atlantica*, um outro agrupamento distinto. Wogel et al. (2004) argumentam que a principal diferença no canto entre os dois agrupamentos é a duração do canto e a frequência dominante, onde no grupo de *C. capixaba* e *C. carvalhoi* teriam canto mais curto com alta frequência dominante, ao contrário do grupo de *C. schubarti*. Alguns parâmetros acústicos do canto de *C. carvalhoi* e *C. capixaba* mensurados por Wogel et al. (2004) como duração do canto, número de pulsos e frequência dominante chegam a se sobrepor entre as duas espécies, quando levado em consideração o desvio padrão dos mesmos. Nelson (1973) ao descrever o canto de *C. schubarti* apresenta valores de intervalo entre as notas e frequência dominante próximos aos do canto de *C. carvalhoi* e *C. capixaba*. Esses fatores, somados a reprodução explosiva após as fortes chuvas onde centenas de indivíduos se agrupam ao redor de corpos d'água para se reproduzir (Izecksohn & Carvalho-e-Silva 2001), poderiam ter ocasionado o cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes ou a fecundação acidental de óvulos de uma espécie por espermatozoides de outra a medida que os mesmo eram liberados no corpo d'água.

O estado do Espírito Santo é um zona de simpatria para essas três morfoespécies, sendo que em algumas localidades, como Cariacica/ES, ocorrem todas. Além disso, nessa zona de simpatria já foi reportada a sobreposição na distribuição de outras espécies de anuros que possuem intergradação fenotípica, por exemplo *Phyllomedusa bahiana* e *P. burmeisteri* (Haddad et al. 1994, Brunet et al. 2010).

Na maioria dos estudos de hibridação, o mtDNA é o marcador escolhido (e.g. Ptacek et al. 1994, Evans et al. 2004), devido as suas altas taxas de mutação e informatividade para examinar a diversificação entre espécies próximas (Pamilo & Nei 1988, Hudson & Coyne 2002). Por outro lado, fluxo gênico e introgressão entre linhagens/espécies próximas pode ocasionar incongruência entre genealogias de genes citoplasmáticos e nucleares (e.g. Maddison 1997, Nichols 2001, Seehausen 2004, Mallet 2008). Assim, novos dados devem ser adicionados para confirmar a hipótese de hibridação no gênero *Chiasmocleis*. Como exemplo, dados de micro-satélites, genes nucleares e cariótipo, para que seja possível refinar a evolução desses táxons e compreender melhor essa potencial região de zona híbrida.



### Referências bibliográficas

Avice, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Jr, Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.

Avice, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3-15.

Ayres, J.M. & Clutton-Brock, T.H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *Am. Nat.* 140, 531–537.

Beebee, T.J.C. 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London.

Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. & Burke, T. 1992. Single-locus and DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.). *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 225-269.

Brunes, T.O., Sequeira, F., Haddad, C.F.B., Alexandrino, J. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of tree frogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 1120-1133

Carnaval, A.C.O.Q. & Bates, J. 2007. Amphibian DNA shows marked genetic structure and track Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *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.

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.

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.

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.

Costa, L.P. & Leite, Y.L.R. *in press*. Historical fragmentation shaping vertebrate diversification in the Atlantic forest biodiversity hotspot. In: Patterson, B.D. & Costa, L.P. (Ed.). *Bones, Clones, and Biomes: The history and geography of recent neotropical mammals*. University of Chicago Press, Chicago.

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.

Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill Publishing Co., New York.

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

Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J. & Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biol.*, 4, 699-710.

Evans, B.J., Kelley, D.B., Melnick, D.J. & Cannatella, D.C. 2005. Evolution of RAG-1 in polyploid clawed frogs. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1193–1207.

Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.

Faivovich, J., Gasparini, J.L. & Haddad, C.F.B. 2010. A new species of the *Scinax perpusillus* group (Anura: Hylidae) from Espírito Santo, Brazil. *Copeia*, 1, 97–102.

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

Frost, D.R. 2010. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.0 (1 February, 2007). Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>> American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 4 de setembro de 2010.

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

Gascon, C.S., Loughheed, S.C. & Bogart, J.P. 1998. Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: a test of the riverine barrier hypothesis. *Biotropica*, 30, 104–119.

Geise, L., Smith, M.F. & Patton, J.L. 2001. Diversification in the Genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in southeastern South America: mitochondrial DNA sequence analysis. *Journal of Mammalogy*, 82, 92–101.

Gonzalez, S., Maldonado, J.E., Leonard, J.A., Vila, C., Duarte, J.M.B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N. & Wayne, R.K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7, 47-56.

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

Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.

Haddad, C.F.B., Pompal Jr., J.P. & Batistic, R.F. 1994. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *Journal of Herpetology*, 28, 425–430.

Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537–549.

Hudson, R.R. & Coyne, J.A. 2002. Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, 56, 1557–1565.

Irwin, D.E. 2002. Phylogeography Breaks Without Geographic Barriers to Gene Flow. *Evolution*, 56, 2383-2394.

Izeckson, E. & Carvalho-e-Silva, S.P. 2001. Anfíbios do Município do Rio de Janeiro. Editora UFRJ, Rio de Janeiro, 148p.

Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*, 20, 86–93.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

Lara, M.C., Patton, J.L. & da Silva, M.N.F. 1996. The simultaneous diversification of South America echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 403-413.

Ledru, M.P., Salatino, M.L.F., Ceccantini, G., Salatino, A., Pinheiro, F. & Pintaud, J.C. 2007. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions*, 13, 761–771.

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 California Publications in Zoology, 132, 1-118.

Macey, J.R., Larson, A., Ananjeva, N.B., Fang, Z. & Papenfuss, T.J. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 91-104.

Maddison, W.P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46, 523–536.

Mallet, J. 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the case of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363, 2971–2986.

Martins, F.M., Ditchfield, A.D., Meyer, D. & Morgante, J.S. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoology Systematic Evolution Research*, 45, 372–378.

Martins, F.M., Templeton, A.R., Pavan, A.C.O., Kohlbach, B.C. & Morgante, J.S. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 2009, 9, 294.

Meijden, A., Vences, M., Hoeg, S., Boistel, R., Channing, A. & Meyer, A. 2007. Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) and a discussion of competing hypotheses concerning their biogeographical origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1017–1030.

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.

Mustrangi, M.A. & Patton, J.L. 1997. Phylogeography and Systematics of the Slender Mouse Opossum (Marsupialia, Didelphidae), Berkeley, California. University of California Press, California.

Nelson, C.E. 1973. Mating calls of the Microhylinae: descriptions and phylogenetic and ecological considerations. *Herpetologica*, 29, 163-176.

Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 358–364.

Pamilo, P. & Nei, M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 568–583.

Passamani, M. 2000. Análise da comunidade de marsupiais em Mata Atlântica de Santa Tereza, Espírito Santo. *Boletim do Museu Biologia Prof. Mello Leitão*, 1, 215-228.

Patton, J.L., da Silva, M.N.F., Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 244, 1–306.

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.

Peres, S.A., Patton, J.L. & Da Silva, M.N.F. 1996. Riverine barriers and gene flow in Amazonian saddle-back tamarins. *Folia Primatol.* 67, 113–124.

Pinheiro, F., de Barros, F., Palma-Silva, C., Meyer, D., Fay, M.F., Suzuki, R.M., Lexer, C. & Cozzolino, S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 19, 3981–3994.

Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 19, 817–818.

Ptacek, M.G., Gerhardt, H.C. & Sage, R.D. 1994. Speciation by polyploidy in treefrogs: multiple origins of the tetraploid *Hyla versicolor*. *Evolution*, 48, 898–908.

Ramos, A.D. & Gasparini, J.L.R. 2004. Anfíbios do Goiapaba-Açu, Fundão, Estado do Espírito Santo. Gráfica Santo Antônio, Vitória.

Remington, C.L. 1968. Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. Pages 321–428 em T. Dobzhansky, M. K. Hecht & W. C. Steere, eds. *Evolutionary biology*. Plenum, New York.

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.

Ribeiro, R.C., Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P. & Lovato, M.B. 2005. Genetic Variation in Remnant Populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an Endangered Tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, 95, 1171–1177.

Ribeiro, R.C., Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P. & Lovato, M.B. 2010. Phylogeography of the endangered rose wood *Dalbergia nigra* (Fabaceae) insights in to the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, ?, 1–12.

Rödger, D., Teixeira, R.L., Ferreira, R.B., Dantas, R.B., Pertel, W. & Guarneire, G.J. 2007. Anuran hotspots: the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo, southeastern Brazil. *Salamandra*, 43, 91–110.

Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 198–207.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995). *Biometry*. New York, W. H. and Freeman.

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

Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512–516.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.

Tchaicka, L., Eizirik, E., Oliveira, T.G., Candido, J.F. & Freitas, T.R.O. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, 16, 819–838.

Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera Jr., 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., Carão, L.M., Pinto, I.S., Gasparini, J.L., Leite, Y.L.R. & Costa, L.P. 2010. Non-volant tetrapods from Reserva Biológica de Duas Bocas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 10, 339-351.

Trigo, T.C., Freitas, T.R.O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J.C.R., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Bonatto, S.L. & Eizirik, E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology* 17, 4317–4333.

Werneck, F.P., Costa, G.C., Colli, G.R., Prado, D.E. & Sites Jr, J.W. 2010. Revisiting the historical distribution of seasonally dry tropical forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. *Global Ecology and Biogeography*, no. doi: 10.1111/j.1466-8238.2010.00596.x

Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X. & Moen, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 871–882.

Wogel, H. Abrunhosa, P.A. & Prado, G.M. 2004. The tadpole of *Chiasmocleis carvalhoi* and the advertisement calls of three species of *Chiasmocleis* (Anura, Microhylidae) from Atlantic rainforest of southeastern Brazil. *Phyllomedusa*, 3, 133-140.

Zamudio, K.R. & H.W. Greene. 1997. Phylogeography of the Bushmaster (*Lachesis muta*, Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 62, 421-442.

Zeisset, I. & Beebee, T.J.C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101, 109–119.

## Figuras

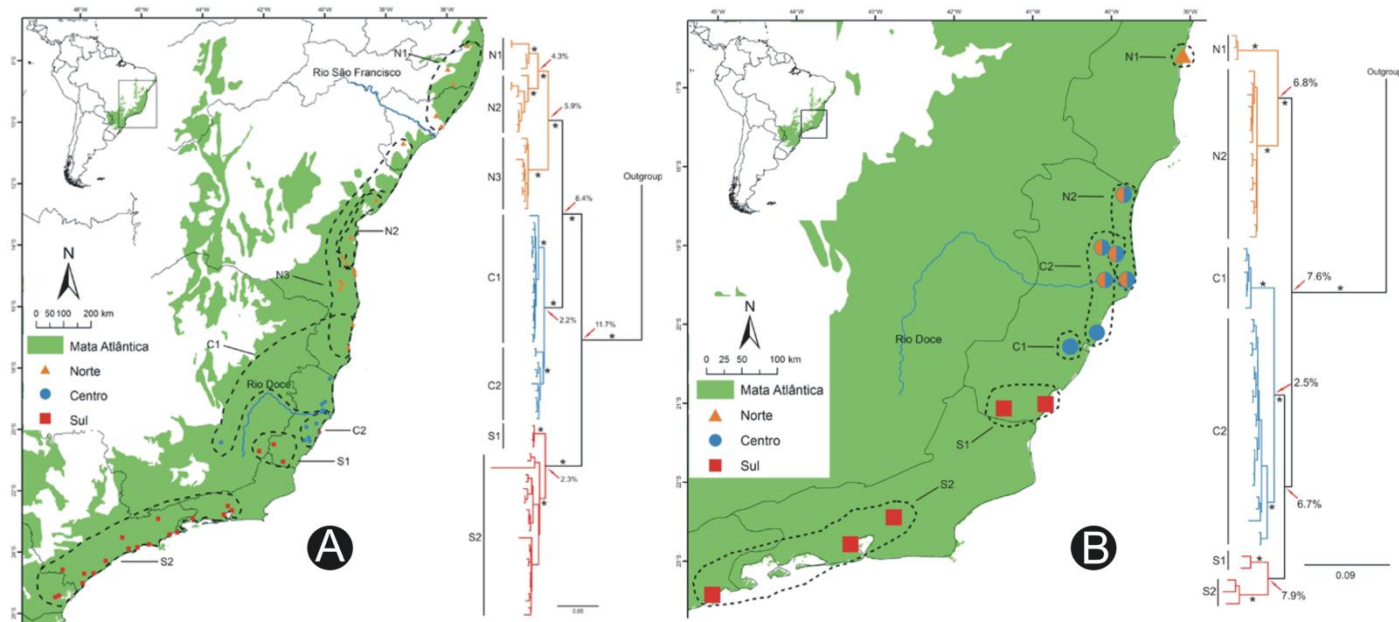


Figura 1. Distribuição geográfica e árvore de Infrência Bayesiana indicando os subclados de *Dendropsophus elegans* (A) e *Chiasmocleis carvalhoi* (B), identificadas a partir dos haplótipos do gene mitocondrial ND2. Em A o círculo azul e vermelho representa localidade Serra/ES, onde encontrei haplótipos que foram compartilhados entre os clados Centro e Sul. Em B os círculos em azul e marrom indicam as localidades onde houve haplótipos comuns aos clados Norte e Centro. Os \* mostram os clados com suporte acima de 95% de probabilidade Bayesiana e/ou 0,95 de bootstrap.



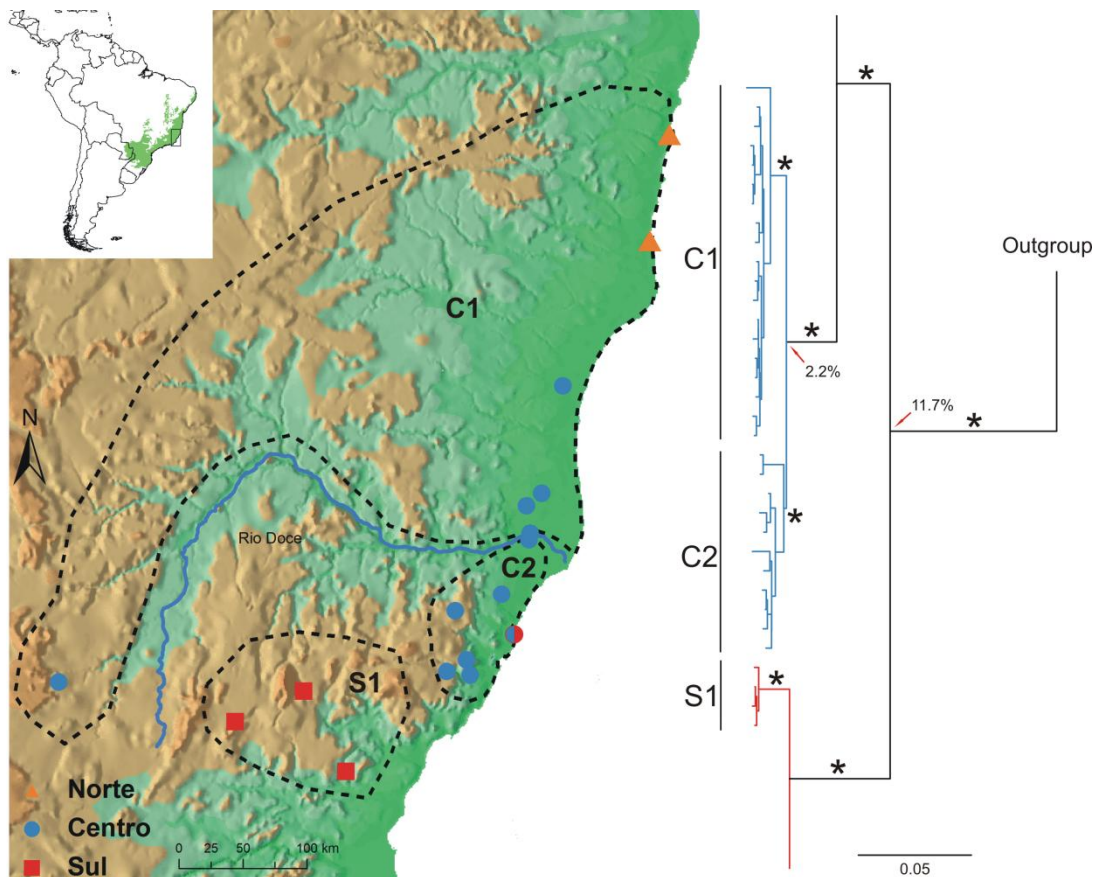


Figura 2. Destaque para os subclados de *Dendropsophus elegans*, segundo o gene mitocondrial ND2, que ocorrem próximas a região do Rio Doce. Localidades muito próximas dentro do clado Centro possuem haplótipos em subclados distintos, além disso localidades na mesma latitude porém em lado opostos ao rio estão em subclados separados. Note que as localidades do subclado S1 são geograficamente próximas das localidades do clado Centro, contudo são filogeneticamente muito divergentes. O círculo azul e vermelho no subclado C2 corresponde a localidade da Serra/ES, que teve haplótipos nos clados Centro e Sul. Em marrom estão as áreas com maior altitude e em verde as de menor altitude. Os \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade Bayesiana e/ou 0,95 de bootstrap.

## Tabelas

Tabela 1. Índices de diversidade genética, indicadores de expansão demográfica e teste de Mantel para *Dendropsophus elegans*.

	N	Nh	Hd	SD	$\Pi$	SD	D	<i>P</i>	FS	<i>p</i>	R	<i>P</i>
All	148	83	0.971	±0.006	0.225	±0.108	0.813	0.783	-6.338	0.186	0.493*	0.000
N	55	25	0.901	±0.031	0.033	±0.016	0.548	0.763	1.365	0.731	0.225*	0.000
C	45	28	0.972	±0.014	0.013	±0.006	-0.488	0.346	-11.137*	0.002	0.579*	0.000
S	48	30	0.891	±0.040	0.019	±0.009	-2.062*	0.002	-5.265	0.065	0.089*	0.001
N1	11	5	0.667	±0.163	0.009	±0.005	-0.407	0.366	2.123	0.853		
N2	11	9	0.946	±0.065	0.011	±0.006	-0.587	0.285	-1.517	0.194		
N3	33	11	0.748	±0.073	0.003	±0.001	-1.813*	0.022	-3.788	0.026		
C1	25	18	0.968	±0.025	0.006	±0.003	-1.868*	0.012	-12.581*	0.000		
C2	20	10	0.892	±0.063	0.006	±0.003	-0.318	0.408	-2.220	0.127		
S1	5	5	0.900	±0.161	0.005	±0.003	-0.073	0.532	0.051	0.379		
S2	43	25	0.859	±0.050	0.013	±0.006	-1.675*	0.026	-5.156	0.064		

N, número de sequências; Nh, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; D, D de Tajima; FS, FS de FU; R, teste de Mantel; SD, desvio padrão; \*,  $p < 0,05$  considerado significativo para D e R, e  $p < 0,02$  considerado significativo para FS.

Tabela 2. Datação com relógio molecular do tempo de separação entre os subclados de *Dendropsophus elegans*.

	Idade (M.a.)	IC 95%
C1/C2	2.31	1.11-3.84
N1/N2	2.74	1.44-4.33
N1+N2/N3	4.44	2.42-6.84
N/C	6.38	3.58-9.83
S1/S2	2.76	1.33-4.57
N+C/S	9.51	5-15.4

Tabela 3. Valores de Fst (esquerda e abaixo) e valores de distância genética (direita a acima; Tamura-Nei) para as subclados de *Dendropsophus elegans*. Todos os valores de Fst com  $p < 0,05$ .

	N1	N2	N3	C1	C2	S1	S2
N1	-	0.043	0.058	0.083	0.082	0.109	0.123
N2	0.756	-	0.060	0.087	0.084	0.113	0.123
N3	0.925	0.916	-	0.085	0.082	0.111	0.124
C1	0.921	0.914	0.952	-	0.022	0.104	0.115
C2	0.909	0.899	0.949	0.722	-	0.102	0.110
S1	0.927	0.914	0.970	0.946	0.938	-	0.023
S2	0.899	0.894	0.928	0.906	0.894	0.512	-

Tabela 4. Valores de Fst (esquerda e abaixo) e valores de distância genética (direita a acima; Tamura-Nei) para os subclados de *Chiasmocleis carvalhoi*. Todos valores de Fst com  $p < 0,05$ , exceto os valores referentes a S.

	N1	N2	C1	C2	S
N1	-	0.07	0.093	0.083	0.098
N2	0.951	-	0.079	0.073	0.090
C1	0.981	0.973	-	0.024	0.072
C2	0.962	0.961	0.738	-	0.067
S	0.979	0.606	-6.200	-2.158	-

Tabela 5. Datação com relógio molecular do tempo de separação entre os subclados de *Chiasmocleis carvalhoi*.

	Idade (M.a.)	IC 95%
N1/N2	3.98	1.87-6.36
C1/C2	2.36	1.45-4.15
S1/S2	4.41	2.28-6.96
N/C+S	5.34	3.17-7.81

Tabela 6. Índices de diversidade genética, indicadores de expansão demográfica e teste de Mantel para *Chiasmocleis carvalhoi*.

	N	Np	Hd	SD	$\Pi$	SD	D	$p$	FS	$p$	R	$p$
All	61	49	0.990	±0.005	0.201	±0.098	-0.212	0.444	-7.431	0.039	0.081*	0.011
N	21	18	0.981	±0.023	0.189	±0.096	-1.047	0.148	-2.958	0.110	0.290*	0.000
C	34	26	0.979	±0.014	0.078	±0.040	-0.717	0.247	-7.613	0.023	0.140*	0.000
S	6	5	0.933	±0.122	0.802	±0.465	0.446	0.679	3.157	0.861	0.495*	0.010
N1	3	3	1.000	±0.272	0.026	±0.021	NA	NA	NA	NA	NA	NA
N2	18	15	0.974	±0.029	0.034	±0.019	-1.869*	0.020	-6.773*	0.002		
C1	9	6	0.833	±0.127	0.030	±0.018	-0.674	0.279	0.163	0.492		
C2	25	20	0.980	±0.018	0.039	±0.021	-1.406	0.073	-9.260*	0.000		

N, número de sequências; Np, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; D, D de Tajima; FS, FS de FU; R, teste de Mantel; SD, desvio padrão; \*,  $p < 0,05$  considerado significativo para D e R, e  $p < 0,02$  considerado significativo para FS. NA, não aplicável.

## Informação Suplementar



Figura IS 1. Árvore de inferência bayesiana do gene mitocondrial ND2 de *Dendropsophus elegans*. Os números de tomo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Os \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade posterior.

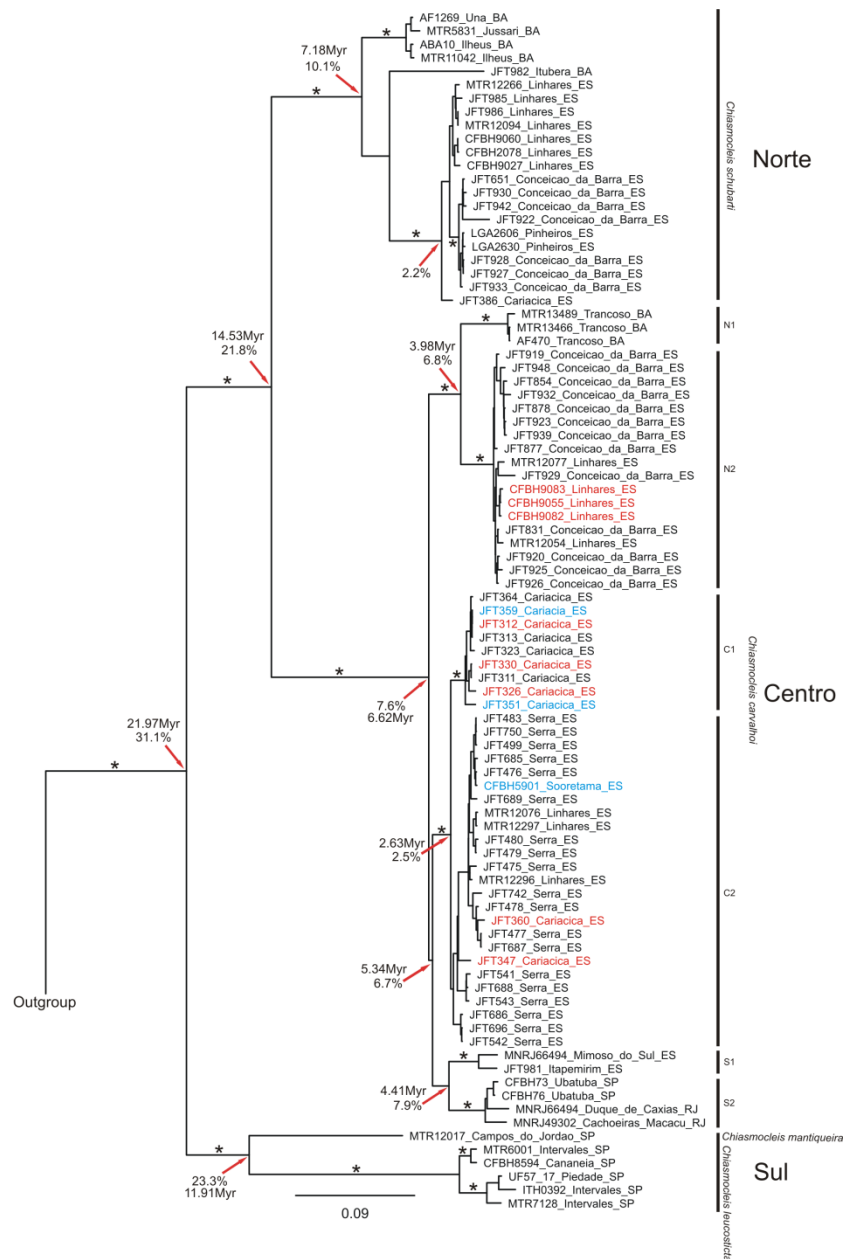


Figura IS 2. Árvore de inferência bayesiana do gene mitocondrial ND2 de *Chiasmocleis schubarti*, *C. capixaba* (em vermelho), *C. carvalhoi* (com as subpopulações), *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*. Os números de tomo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Em azul estão os haplótipos provenientes da morfoespécie *C. schubarti* que se posicionaram dentro do clado de *C. carvalhoi*. \* indicam os clados com suporte acima de 95% de probabilidade posterior.



Figura IS 3. Árvore de Máxima Verossimilhança para o gene mitocondrial ND2 de *Dendropsophus elegans*. Os números de tombo ou de captura dos táxons estão identificados na árvore. Os \* indicam os clados com suporte acima de 0,95 de bootstrap.

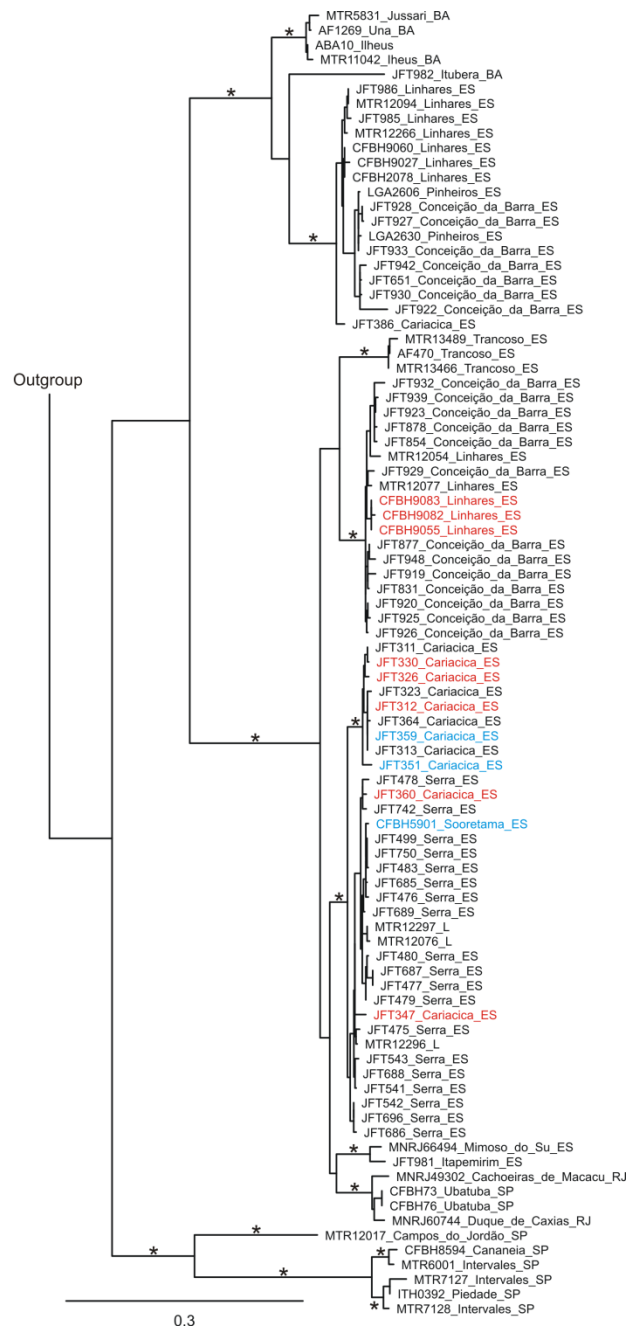


Figura IS 4. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene mitocondrial ND2 de *Chiasmocleis schubarti*, *C. capixaba* (em vermelho), *C. carvalhoi* (com as subpopulações), *C. mantiqueira* e *C. leucosticta*. Os números de tombo ou de captura dos táxons e as localidades onde as amostras foram coletadas estão identificados na árvore. Em azul estão os haplótipos da morfoespécie *C. schubarti* que se posicionaram dentro do clado de *C. carvalhoi*. Os \* indicam os clados com suporte acima de 0,95 de bootstrap.



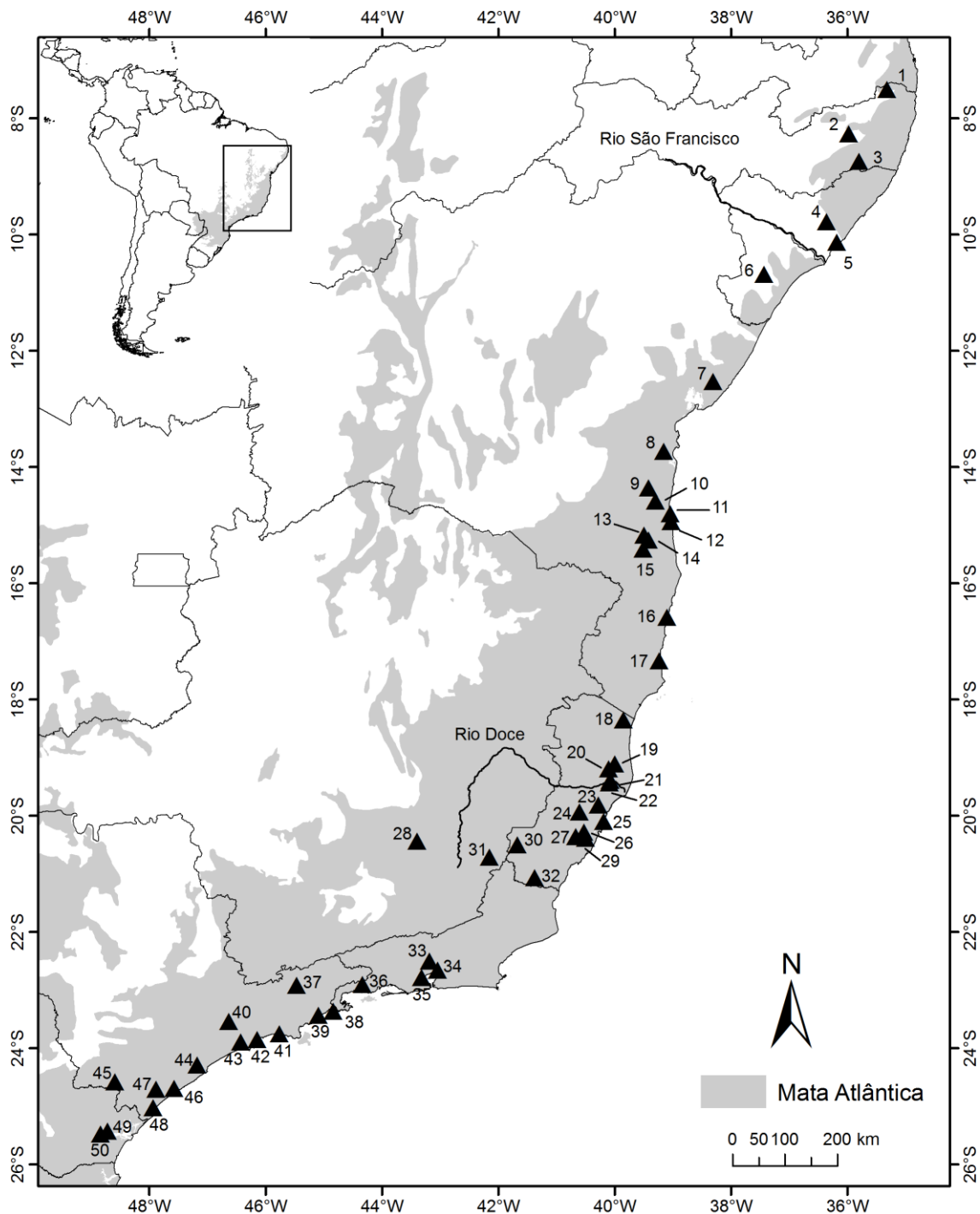


Figura IS 5. Mapa da distribuição espacial das amostras de *Dendropsophus elegans* incluídas presente estudo. Números correspondem as localidades listadas na Tabela IS 1.

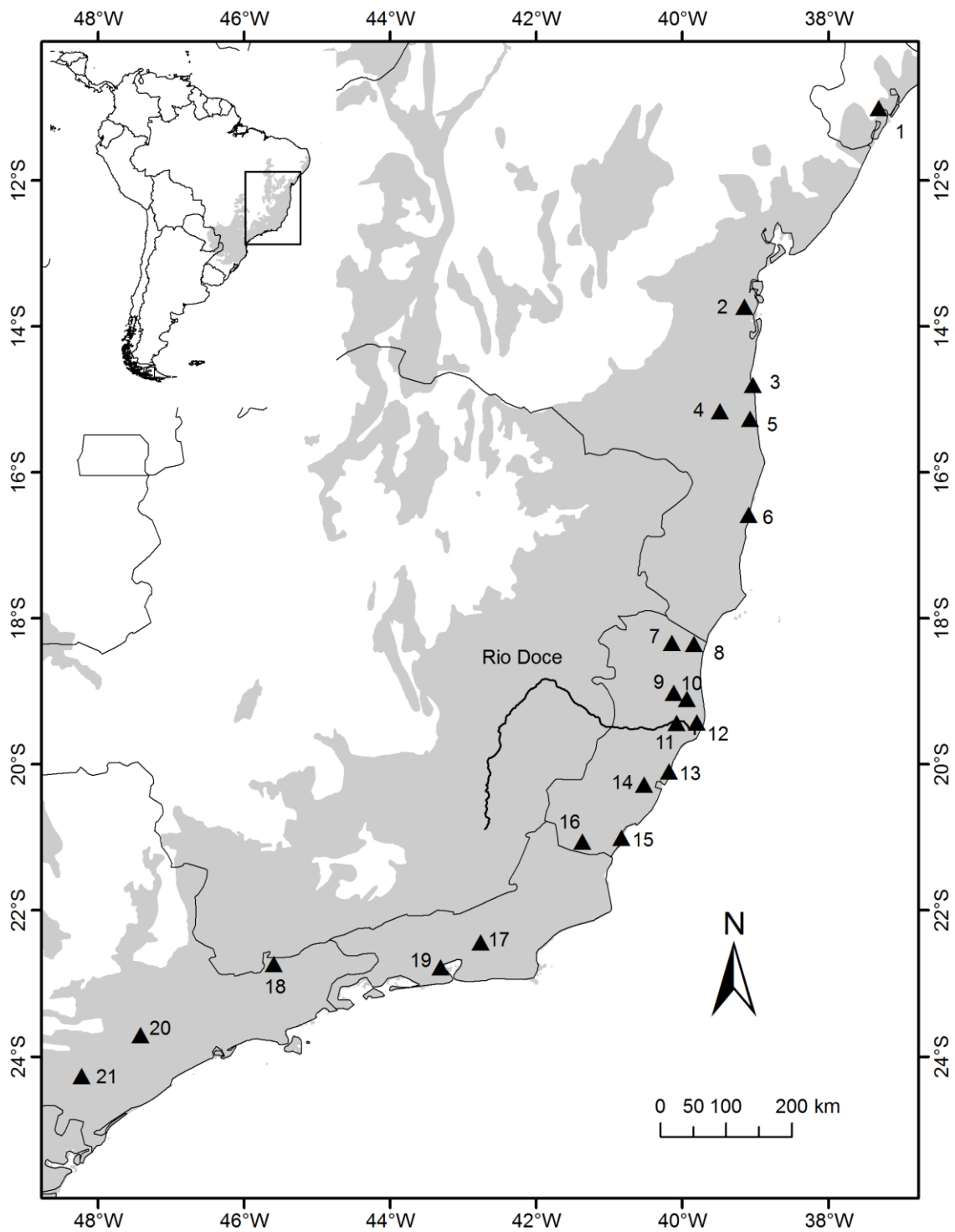


Figura IS 6. Mapa da distribuição espacial das amostras de *Chiasmocleis* spp. incluídas presente estudo. Números correspondem as localidades listadas na Tabela IS 2.

Tabela IS 1. Localidades com amostras de *Dendropsophus elegans* que foram incluídas no presente estudo.

Número	Município	Estado	Latitude	Longitude
1	Timbauba	PE	-7.5031	-35.3140
2	Brejo dos Cavalos	PE	-8.2667	-35.9667
3	Jaqueira	PE	-8.7389	-35.7932
4	Campo Alegre	AL	-9.7795	-36.3503
5	Coruripe	AL	-10.1335	-36.1761
6	Itabaiana	SE	-10.6850	-37.4253
7	Mata de São João	BA	-12.5309	-38.2999
8	Ituberá	BA	-13.7325	-39.1505
9	Aurelino Leal	BA	-14.3608	-39.4086
10	Uruçuca	BA	-14.5868	-39.2914
11	Ilhéus	BA	-14.8015	-39.0365
12	Oliveira	BA	-14.9377	-39.0232
13	Jussari	BA	-15.1694	-39.4882
14	Arataca	BA	-15.2593	-39.4123
15	Camacan	BA	-15.4145	-39.5012
16	Trancoso	BA	-16.5846	-39.0929
17	Prado	BA	-17.3326	-39.2308
18	Conceição da Barra	ES	-18.3553	-39.8417
19	Linhares	ES	-19.1098	-39.9925
20	Sooretama	ES	-19.1969	-40.0978
21	Linhares	ES	-19.3909	-40.0715
22	Linhares	ES	-19.4364	-40.0814
23	Aracruz	ES	-19.8196	-40.2743
24	Santa Teresa	ES	-19.9361	-40.6006
25	Serra	ES	-20.1025	-40.1833
26	Cariacica	ES	-20.2811	-40.5219
27	Domingos Martins	ES	-20.3633	-40.6592
28	Mariana	MG	-20.3779	-45.4166
29	Viana	ES	-20.3893	-40.4948
30	Ibitirama	ES	-20.5000	-41.6667
31	Alvorada	MG	-20.7166	-42.1500
32	Mimoso do Sul	ES	-21.0664	-41.3684
33	Petrópolis	RJ	-22.5050	-43.1786
34	Magé	RJ	-22.6567	-43.0398
35	Duque de Caxias	RJ	-22.7868	-43.3131
36	Ariro	RJ	-22.9050	-44.3284
37	Pindamonhangaba	SP	-22.9236	-45.4598
38	Picinguaba	SP	-23.3667	-44.8333

Tabela IS 1. continuação

Número	Município	Estado	Latitude	Longitude
39	Ubatuba	SP	-23.4340	-45.0860
40	São Paulo	SP	-23.5400	-46.6300
41	São Sebastião	SP	-23.7571	-45.7624
42	Bertioga	SP	-23.8553	-46.1394
43	Cubatão	SP	-23.8956	-46.4257
44	Itariri	SP	-24.2946	-47.1733
45	Iporanga	SP	-24.5800	-48.5900
46	Iguape	SP	-24.6975	-47.5710
47	Pariquera-Açu	SP	-24.7102	-47.8840
48	Cananéia	SP	-25.0244	-47.9323
49	Antonina	PR	-25.4286	-48.7119
50	Morretes	PR	-25.4790	-48.8317

Tabela IS 2. Localidades com amostras de *Chiasmocleis* spp. que foram incluídas no presente estudo.

Número	Município	Estado	Latitude	Longitude
1	Itaporanga	SE	-11.0129	-37.3091
2	Ituberá	BA	-13.7325	-39.1505
3	Ilhéus	BA	-14.8035	-39.0360
4	Jussari	BA	-15.1697	-39.4882
5	Una	BA	-15.2695	-39.0698
6	Trancoso	BA	-16.5846	-39.0929
7	Pinheiros	ES	-18.3405	-40.1452
8	Conceição da Barra	ES	-18.3553	-39.8417
9	Linhares	ES	-19.0235	-40.1184
10	Linhares	ES	-19.1057	-39.9389
11	Linhares	ES	-19.4303	-39.8038
12	Linhares	ES	-19.4364	-40.0814
13	Serra	ES	-20.1025	-40.1833
14	Cariacica	ES	-20.2811	-40.5219
15	Itapemirim	ES	-21.0118	-40.8340
16	Mimoso do Sul	ES	-21.0659	-41.3659
17	Cachoeiras de Macacu	RJ	-22.4460	-42.7641
18	Campos do Jordão	SP	-22.7387	-45.5939
19	Duque de Caxias	RJ	-22.7868	-43.3131
20	Piedade	SP	-23.7132	-47.4213
21	Intervales	SP	-24.2732	-48.2288

