UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização molecular de três espécies de *Trachycephalus* (Anura: Hylidae): investigando potenciais híbridos interespecíficos

Fernanda Couto Zaidan

Vitória, ES
Abril, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização molecular de três espécies de *Trachycephalus* (Anura: Hylidae): investigando potenciais híbridos interespecíficos

Fernanda Couto Zaidan

Orientadora: Valéria Fagundes

Coorientadora: Leonora Pires Costa

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

Vitória, ES
Abril, 2014

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos que ajudaram na conclusão desta jornada. Obrigada Profª. Drª. Valéria Fagundes, que abriu as portas do Laboratório de Genética Animal para mim e possibilitou o meu "retorno" à ciência, me mostrou como ser uma profissional dedicada e ética e, mais que tudo, esteve disponível para me apoiar em momentos de incertezas e também para celebrarmos momentos de alegrias. Agradeço à minha co-orientadora Profª. Drª. Leonora Pires Costa, pelas contribuições para o melhor desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço aos Profs. Drs. Marcelo Vallinoto, Yuri Leite e aos suplentes por aceitarem participar como membros avaliadores da minha dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo financiamento do projeto, bolsa de mestrado e suporte.

Aos professores do PPGBAN que se dedicaram para contribuir com a minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal (LGA): Ana Heloisa de Carvalho, Arturo Martinelli, Cristina Massariol, Daniele Angeli, Débora Dalvi, Gabriel Dalbem, Lorena Dinelli, Lucas Vianna, Mariana Azevedo, Marianna Machado, Marina Monjardim, Rosana Nunes, Sílvia Caldara, Thaís Volpi, Victor Colombi, Yuri Marins e demais que por lá passaram, pela troca de experiências e bons momentos. Em especial à ao Eduardo Muhl, por se dispor a subir o Mestre Álvaro para coletarmos. À todos os colegas de mestrado, em especial Bruna Fonseca, Jeronymo Dalapicolla e Letícia Zanchetta, por servirmos de apoio mútuo nas dificuldades da biologia molecular.

Ao colega João Felipe Tonini, que me apresentou aos *Trachycephalus* e suas problemáticas e sempre se mostrou disposto a compartilhar novos conhecimentos. Ao colega Edicarlos Pralon, que foi fundamental nas coletas no topo do Mestre Álvaro e em Costa Bela, e sacrificou alguns de seus finais de semana para ajudar uma pessoa que ele mal conhecia. Ao colega João Gasparini, que também, sem me conhecer pessoalmente, facilitou meu contato com importantes herpetólogos. Aos diversos pesquisadores que

me doaram amostras de tecido dos *Trachycephalus* e que sanaram minhas dúvidas muitas vezes: Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, Prof. Dr. Renato Feio, Prof. Dr. José Pombal Jr., Prof. Dr. Guarino R. Colli, Profª. Drª. Teresa Cristina Ávila Pires, Prof. Dr. Eduardo Ferreira e Profª. Drª. Juliana Zina. Principalmente agradeço a todos os coletores e curadores das respectivas coleções de tecidos, pois sem vocês esse trabalho não seria possível.

À Juliana Justino, do Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade, por proporcionar um ambiente adequado de trabalho e por ser sempre tão prestativa e gentil ao me ajudar a entender o que os produtos de PCR queriam dizer.

Aos meus pais Elizabeth e Salim, por me apoiarem em todos os aspectos da minha vida e por serem referências de valores, amor e respeito. Vocês tornaram possível a realização de mais um sonho e têm minha eterna gratidão por terem me dado a vida, por cuidarem de mim e me ajudarem a ter equilíbrio e persistência em mais essa etapa.

Obrigada Gláucio, por acreditar em mim e em nós, como parceiros de vida. Você quem motivou minha vinda a Vitória e possibilitou a criação de laços de amizade e raízes aqui. Tenho muito orgulho de você e o admiro por sempre buscar melhorar como pessoa e profissional. Agradeço também pela paciência em adaptar e melhorar minhas figuras, o que ajudou a enriquecer este trabalho.

Aos amigos, que, apesar da saudade, reconhecem que não precisamos estar perto para que nos sintamos conectados. Enfim, a amizade de vocês me faz lembrar sempre que as coisas da vida são melhores quando compartilhadas.

Muito obrigada.

Aos meus pais, sempre amorosos e presentes.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO..... 01

II. OBJETIVOS E METAS..... 06

II.1. Objetivo Geral..... 06

II.2. Metas..... 06

III. MATERIAL E MÉTODOS..... 07

III.1. Amostra..... 07

III.2. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA..... 08

III.3. Análise dos dados..... 11

III.3.1. *Avaliação da identidade molecular das espécies e dos indivíduos*..... 11

III.3.2. *Verificação da ocorrência de híbridos interespecíficos*..... 13

IV. RESULTADOS..... 15

IV.1. Identidade molecular das espécies..... 15

IV.2. Potenciais híbridos interespecíficos..... 23

V. DISCUSSÃO..... 35

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 49

VIII. APÊNDICES..... 55

VIII.1. Apêndice I..... 55

VIII.2. Apêndice II..... 60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de localidades por estado (nL) e de indivíduos (n) de cada espécie de *Trachycephalus* analisadas no presente estudo..... 09

Tabela 2. Concentrações e quantidades dos reagentes e *primers* utilizados nas reações de PCR de cada gene e perfis das PCRs..... 10

Tabela 3. Relação do número de sequências geradas por espécie nos genes mitocondriais COI e ND2 e no gene nuclear Tirosinase..... 15

Tabela 4. Distância genética intraespecífica (diagonal) e interespecífica (cinza) para os genes ND2, COI e Tirosinase das espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni)..... 18

Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) para os genes ND2, COI e TYR exclusivos de *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) e que são diferentes entre as três..... 19

Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene ND2..... 19

Tabela 7. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene COI.…..... 20

Tabela 8. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene TYR..... 20

Tabela 9. Conjunto de evidências dos potenciais indivíduos híbridos, incluindo a identificação morfológica de cada indivíduo, as identificações nos genes COI e ND2 (DNAmt) e na tirosinase (DNAn) nas análises filogenéticas, pelas distâncias interespecíficas e na comparação com os SNPs espécie-específicos..... 29

Tabela 10. Distância genética intraespecífica (cinza) e interespecífica (rosa) para os genes ND2, COI e Tirosinase das espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni). A distância genética entre os haplótipos observados dos potenciais híbridos em relação às espécies parentais são apresentadas em verde..... 30

Tabela 11. Identificação dos potenciais híbridos por meio de SNPs espécie-específicos. Em vermelho *T. mesophaeus* =Tme, em verde *T. nigromaculatus*=Tni,em azul *T. typhonius*=Tty e em cinza alelos de *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*..... 32

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplares típicos de *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* e distribuição geográfica de cada espécie, hachurado em cinza, (Haddad et al. 2013 Os pontos são as localidades amostradas 05

Figura 2. Vista lateral (indivíduo JFT 473) e dorsal (indivíduo LGA3924) de potenciais híbridos de *Trachycephalus*..... 08

Figura 3. Pico duplo em eletroferograma do gene tirosinase indicando heterozigose na posição 144 (quadrado). Y=C+T segundo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)…….. 13

Figura 4. Árvores filogenéticas do gene ND2, COI e TYR. Valores acima dos ramos correspondem ao suporte da ML e probabilidades posteriores da IB, respectivamente..... 17

Figura 5. Árvores filogenéticas dos genes ND2, COI e Tirosinase concatenados. Valores acima dos ramos correspondem ao suporte da ML e probabilidades posteriores da IB, respectivamente..... 17

Figura 6. Rede de haplótipos dos genes COI, ND2 e Tirosinase. A frequência dos haplótipos é proporcional ao tamanho dos círculos. Círculos pretos representam haplótipos intermediários gerados pelo programa. O tamanho das linhas é proporcional ao número de passos mutacionais (até 5 passos). Números acima das barras representam o número de passos mutacionais (exceto na tirosinase) e corresponde, em sua maioria, a um único passo mutacional..... 22

Figura 7. Árvores de haplótipos dos genes ND2 e COI com os indivíduos de morfologia intermediária e os demais exemplares que apresentaram incongruências citonucleares Tty = *T. typhonius*, Tme= *T. mesophaeus* e Tni= *T. nigromaculatus*..... 27

Figura 8. Árvore da tirosinase com destaque para o posicionamento dos alelos dos prováveis híbridos (indicado pelo número do haplótipo). Os espécimes que tiveram alelos agrupados com espécies diferentes estão destacados com um asterisco. Ver haplótipos no Apêndice II..... 28

Figura 9. Rede de haplótipos dos genes COI, ND2 e Tirosinase com os indivíduos híbridos. Verde representa os haplogrupos de *T. nigromaculatus* (Tni), vermelho *T. mesophaeus* (Tme) e azul *T. typhonius* (Tty). Os haplótipos dos indivíduos híbridos estão indicados pelas cores na legenda, com distinção do DNA mitocondrial (DNAmt) e DNAnuclear DNAn)..... 31

Figura 10. Correspondência dos SNPs espécie-específicos de *T. mesophaeus* (vermelho), *T. typhonius* (azul) e *T. nigromaculatus* (verde) com os indivíduos híbridos em relação ao DNA mitocondrial e DNA nuclear..... 32

Figura 11. Possíveis heredogramas dos indivíduos híbridos, representados pelos losangos. Os círculos representam o indivíduo materno e o retângulo o paterno. A primeira linha dentro de cada figura geométrica indica o DNAmt e a segunda linha indica o DNAn. As siglas indicam *T. nigromaculatus* (Tni), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. typhonius* (Tty). F1 seria primeira geração e F2 seria segunda geração ou posterior..... 33

Figura 12. Mapa com distribuições das espécies *T. mesophaeus* (área hachurada), *T.* 34

nigromaculatus (área cinza escuro) e *T. typhonius* (área cinza clara), com localidades dos possíveis híbridos (círculos). Destacados pelas setas estão os híbridos em que uma das possíveis espécies parentais não é conhecida para a localidade. No caso dos indivíduos de Baixa Grande do Ribeiro/PI e Chapada dos Guimarães/MT não ocorre *T. nigromaculatus* e nos indivíduos da Serra/ES não há registros de *T. typhonius* para o Espírito Santo. O genoma dos indivíduos está representado pelas cores das respectivas espécies nos círculos, sendo o lado esquerdo correspondente ao DNAmt e o lado direito os alelos do DNAn.....

Figura 13. Relações filogenéticas entre oito espécies de *Trachycephalus*, incluindo *T. mesophaeus, T. nigromaculatus* e *T. typhonius*. Os valores sobre os ramos são os tempos de divergências dos clados e os valores em frente aos nós são o *bootstrap* da análise de Máxima Verossimilhança (Adaptado de Pyron e Wiens 2013)..... 36

Resumo

Animais híbridos representam um desafio à taxonomia e sistemática, pois correpondem a unidades evolutivas geralmente sem clara delimitação morfológica, comportamental e genética. Híbridos podem ser morfologicamente intermediários aos parentais ou, devido à introgressão e retrocruzamentos, suas características podem se misturar tornando difícil sua identificação. Uma das formas de identificação de híbridos é por meio de ferramentas de biologia molecular, que ao utilizarem marcadores de DNA mitocondrial (herança exclusiva materna) e DNA nuclear (herança materna e paterna), permitem a comparação entre informações genéticas. Além da hibridização existem outras fontes de conflito entre dados moleculares provenientes do DNA mitocondrial e DNA nuclear, como por exemplo a retenção de polimorfismos ancentrais. Em localidades do Espírito Santo, Brasil, foram coletados indivíduos de morfologia distinta de *Trachycephalus mesophaeus* e *T. nigromaculatus*, que são as únicas espécies do gênero conhecidas nesse estado. Porém, estudos piloto usando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) agruparam esses espécimes com amostras de *T. typhonius*. Devido a estas incongruências, foram sequenciados fragmentos de dois genes mitocondriais - COI e Nicotinamida Desidrogenase subunidade 2 (ND2) e um exon nuclear (tirosinase) de 173 indivíduos de *Trachycephalus*, de forma a esclarecer as identificações taxonômicas e investigar a correspondência entre caracteres morfológicos e genéticos nesta linhagem, na sua área de ocorrência As filogenias moleculares, divergências genéticas, redes de haplótipos e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) confirmaram as três espécies acima mencionadas como linhagens evolutivas distintas e revelaram mais sete indivíduos potencialmente híbridos, mas morfologicamente assinalados a *T. mesophaeus, T. nigromaculatus* ou *T. typhonius*.. Devido à taxa de evolução lenta da tirosinase, as espécies mais recentes *T. typhonius* e *T. nigromaculatus* parecem não terem sido sorteadas completamente nesse gene. Já *T. mesophaeus*, que é a espécie mais antiga das três, foi recuperada inequivocamente em todas as análises. De forma inédita, as análises moleculares evidenciaram a ocorrência de introgressão bidirecional entre *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* e entre *T. nigromaculatus* e *T. mesophaeus*, sendo que há indícios de indivíduos F1 (cruzamentos entre espécies parentais puras gerando híbridos). A utilização do gene ND2 mostrou-se mais eficiente do que o gene COI nas filogenias e, apesar da tirosinase ser um gene nuclear de evolução lenta, contribuiu para a identificação de incongruências citonucleares. Nossos resultados mostram que a história filogenética de *Trachycephalus* é complexa e que o uso de marcadores nucleares de evolução mais rápida e ampliação dessas análises para outras espécies do gênero podem revelar mais eventos de hibridização.

Palavras-chave: Hibridação, polimorfismo, marcadores genéticos, anfíbio.

Abstract

Hybrids are evolutionary units generally without clear morphological, behavioral and genetic delimitation, thus representing a challenge to taxonomy and systematics. They can morphologically resemble their parents or, due to introgression, their characteristics can be diluted with a prevailing appearance of one of the parental species, which could hinder identification. One way to identify hybrids is through molecular biology tools, such as mitochondrial DNA (maternal inherintance exclusively) and nuclear DNA (maternal and paternal inheritance), allowing genetic comparisons. Besides hybridization, conflicting mtDNA and nDNA identifications may have other explanations, such as Incomplete Lineage Sorting. Some individuals collected in localities of Espírito Santo State, Brazil, presented a mix of morphological characters of *T. mesophaeus* and *T. nigromaculatus*, which are the only *Trachycephalus* species known to the region. However, previous studies using COI sequences grouped theses individuals as *T. typhonius.* Giving this, we sequenced fragments of two mitochondrial genes (COI and ND2) and part of the nuclear exon of tyrosinase of 173 individuals of *Trachycephalus*, in order to better clarify the taxonomic uncertainty, and the link between morphological and genetic characters behind the identifications, according to the occurrence area. Results of molecular phylogenies, genetic divergences, haplotype networks, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) confirmed .*T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus*, and *T. typhonius* as distinct evolutionary lineages and revealed seven more individuals potentially hybrids, but morphologically assigned to one species. Due to the slow mutation rate of tyrosinase, the most recently diverged species (*T. typhonius* and *T. nigromaculatus)* have not completely sorted in this gene. *Trachycephalus mesophaeus* is the oldest species of the three, and it was identified unambiguously in all analysis. Here, for the first time, evidence of bidirectional introgression between *T. nigromaculatus* and *T. typhonius* and between *T. nigromaculatus* and *T. mesophaeus*, with signs of F1 individuals, is presented. The use of ND2 gene seems to be more efficient than COI to recover the phylogenies in this particular group and, although tyrosinase is a slow evolving gene, it contributed significantly in order to identify cytonuclear incongruences. Our results indicate a complex phylogenetic history of *Trachycephalus*, and that more introgressive hybrids may be identified with the use of faster nuclear markers and the inclusion of more species of the genus in the analyses..

Keywords: Hybridization, polymorphism, molecular markers, amphibian.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm desmistificado a perspectiva tradicional de que a hibridização interespecífica é um fenômeno raro entre animais, oferecendo evidências de que táxons de diferentes grupos comumente compartilham uma história de hibridização introgressiva (Avise 1994; Mallet 2005; 2008). No entanto, identificar árvores filogenéticas conflitantes de DNA mitocondrial e DNA nuclear pode ter outros significados evolutivos, tal como o sorteamento incompleto de polimorfismos ancestrais (*Incomplete Lineage Sorting* – ILS). Adicionalmente, distinguir entre esses eventos é uma tarefa complexa, ainda mais se esses eventos ocorreram recentemente (Parham *et al*. 2013).

Em anuros, o relato de cruzamentos interespecíficos gerando híbridos naturais vem sendo cada vez mais frequente em áreas de simpatria ou parapatria de espécies congenéricas como por exemplo *Hyla, Phyllomedusa, Rhinella, Lithobates* e *Oophaga, Dyscophus* (Lamb e Avise 1986; 1987; Haddad *et al*. 1990; Haddad *et al.* 1994; Azevedo *et al.* 2003; Austin *et al.* 2011; Sequeira *et al*. 2011; Thomé *et al.* 2012; Medina *et al*. 2013; Orozco-Terwengel 2013)

A visão sobre híbridos está diretamente associada a indivíduos com características morfológicas intermediárias entre as espécies parentais (Hubbs 1955). A morfologia intermediária é um forte indício de hibridização, porém essa característica não deve ser considerada isoladamente, pois, caso os híbridos sejam férteis, há a possibilidade de indivíduos híbridos retrocruzarem com as espécies parentais e estarem "camuflados" nessas populações sob a morfologia preponderante de uma das espécies. Outro extremo é quando um indivíduo é aparentemente intermediário morfologicamente mas, na realidade, apresenta traços fenéticos raramente observados em uma espécie (Garofalo *et al.* 2012).

Lamb e Avise (1987) conduziram um estudo que demonstrou que a morfologia intermediária em híbridos naturais pode levar a identificações errôneas se for utilizada como critério único. Nesse trabalho foram avaliados dados morfológicos (medidas osteológicas) e moleculares (marcadores mitocondriais e nucleares) das espécies parentais de pererecas *Hyla gratiosa* e *H. cinerea* e identificados os caracteres espécie-

específicos que as distinguem, definindo algumas medidas osteológicas de cada espécie que não mostravam sobreposição. Os autores verificaram com esse estudo que, caso somente a morfologia tivesse sido usada como referência, mais de 40% dos indivíduos híbridos confirmados via análise molecular teriam sido erroneamente identificados como espécies parentais "puras" e que cerca de 25% dos híbridos de retrocruzamentos não teriam sido discriminados de indivíduos F1. Esses resultados exemplificam a importância do uso conjunto de análises morfológicas e genéticas em estudos de hibridização e mostram as limitações inerentes de descrever casos de híbridos baseados somente em critérios morfológicos.

Não obstante a morfologia represente um critério importante na descrição da diversidade em anuros, desde a década de 1970 tem-se observado uma maior integração da taxonomia alfa com outros tipos de dados, como a vocalização, citogenética e sequências de DNA. Juntamente com a morfologia, a vocalização é um importante atributo para a identificação de espécies de anuros, podendo atuar fortemente como uma barreira reprodutiva pré-zigótica (Lodé e Pagano 2000; Ângulo e Reichle 2008; Funk *et al*. 2011). Por outro lado, o canto de anúncio de uma espécie é considerado um caráter evolutivo conservado e táxons aparentados frequentemente apresentam vocalizações similares (Pough *et al.* 2003), o que poderia levar a uma falha no "sistema de reconhecimento de parceiro específico" (Paterson 1993), favorecendo a ocorrência de hibridação entre espécies proximamente relacionadas.

Outra abordagem utilizada de forma complementar na identificação de espécies de anuros é a citogenética, podendo auxiliar na caracterização de híbridos ou de espécies crípticas (Haddad *et al.* 1994; Azevedo *et al*. 2003; Diaz *et al.* 2012; Gruber *et al.* 2013). No entanto, de forma geral, os anuros apresentam um padrão cariotípico bastante conservado, sendo que muitas vezes não são encontradas assinaturas citogenéticas que evidenciem a hibridização natural (Suarez 2010; Catroli 2011). Um exemplo dessa situação foi relatado por Azevedo e colaboradores (2003) que, ao se depararem com indivíduos de morfologia intermediária entre *Rhinella schneideri* e *Rhinella icterica*, tentaram identificar indícios de um cariótipo intermediário. Porém, nenhuma das análises citogenéticas foram informativas, sendo que o tipo intermediário somente pôde ser identificado por eletroforese de proteínas séricas.

A fim de tentar contornar todas as dificuldades inerentes à identificação baseada em caracteres morfológicos, foi proposta uma forma de identificação taxonômica, pela qual seriam encontradas combinações únicas em determinado gene para cada organismo que serviria como um código de barras de DNA, permitindo assim uma identificação taxonômica segura (Hebert 2003; 2010). O gene proposto para servir de código de barras universal foi o citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) e, dentre os benefícios dessa abordagem são destacados: (i) permitir a identificação de espécies, seja em qualquer estágio de vida ou fragmento, (ii) facilitar a descoberta de espécies baseadas em análises de clados, (iii) promover o desenvolvimento tecnologia portátil para sequenciamento de DNA em campo, em inventários de biodiversidade e (iv) permitir percepções sobre a diversidade da vida (Savolainen *et al.* 2005). Essa abordagem inovadora têm sido eficiente na identificação da grande maioria (95%) das espécies examinadas (Mitchell 2008). No entanto, alguns estudos de simulação têm sugerido que o código de barras de DNA pode falhar na descoberta de novas espécies, especialmente aquelas que divergiram recentemente (Mitchell 2008). Uma alternativa encontrada é a utilização complementar de outros genes que apresentam taxa de evolução mais rápida que o COI, e que consigam recuperar linhagens mais recentes do DNA mitocondrial das espécies (Che *et al.* 2012).

Cada vez mais as sequências de DNA têm sido utilizadas em estudos da anurofauna, em conjunto com informações morfológicas, bioacústicas, citogenéticas e biogeográficas (Fouquet *et al.* 2007; Vieites *et al.* 2009; Vieira 2010, Funk *et al.* 2011; Jansen *et al.* 2011; Kieswetter e Schneider 2013; Oliver *et al.* 2013). A junção dessas informações tem indicado uma grande quantidade de espécies crípticas, que são múltiplas espécies morfologicamente indistinguíveis, "escondidas" sob um único binômio taxonômico (Bickford *et al.* 2007).

Nesse contexto, destacamos o gênero de anuro *Trachycephalus* Tschudi, 1838, em que há registros de possíveis indivíduos híbridos entre *T. mesophaeus* (Hensel, 1867) e *T. nigromaculatus* Tshudi, 1823 no município de Santa Teresa (Ramos e Gasparini 2004) e município de Serra, Espírito Santo (Tonini *et al.* 2011), pelo fato de alguns exemplares apresentarem morfologia intermediária ou com características de ambas as espécies. Esses indivíduos foram considerados ambíguos, uma vez que não se podia atribuir a identidade morfológica de uma única espécie. Assim, considerando que

T. mesophaeus e *T. nigromaculatus* são as únicas espécies do gênero de ocorrência conhecida para o Espírito Santo, foi levantada a possibilidade de que esses indivíduos sejam híbridos entre essas duas espécies.

Contudo, estudos pilotos com sequências do gene Citocromo c Oxidase I (COI), indicaram que os indivíduos do município da Serra, Espírito Santo, de morfologia considerada intermediária entre *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus*, apresentam DNA mitocondrial de *T. typhonius* (Linnaeus, 1758) (Mattedi *et al.* 2010), uma espécie de ampla distribuição mas sem ocorrência registrada para o Espírito Santo (Haddad *et al.* 2013) (Figura 1). Dessa forma, como os resultados do estudo anterior não permitiram identificar os indivíduos com base na sequência de DNA, mostraram-se necessários estudos mais detalhados para a identificação de características genéticas das três espécies de *Trachycephalus*, assim como dos indivíduos morfologicamente ambíguos, utilizando não só marcadores mitocondriais, mas também nucleares.

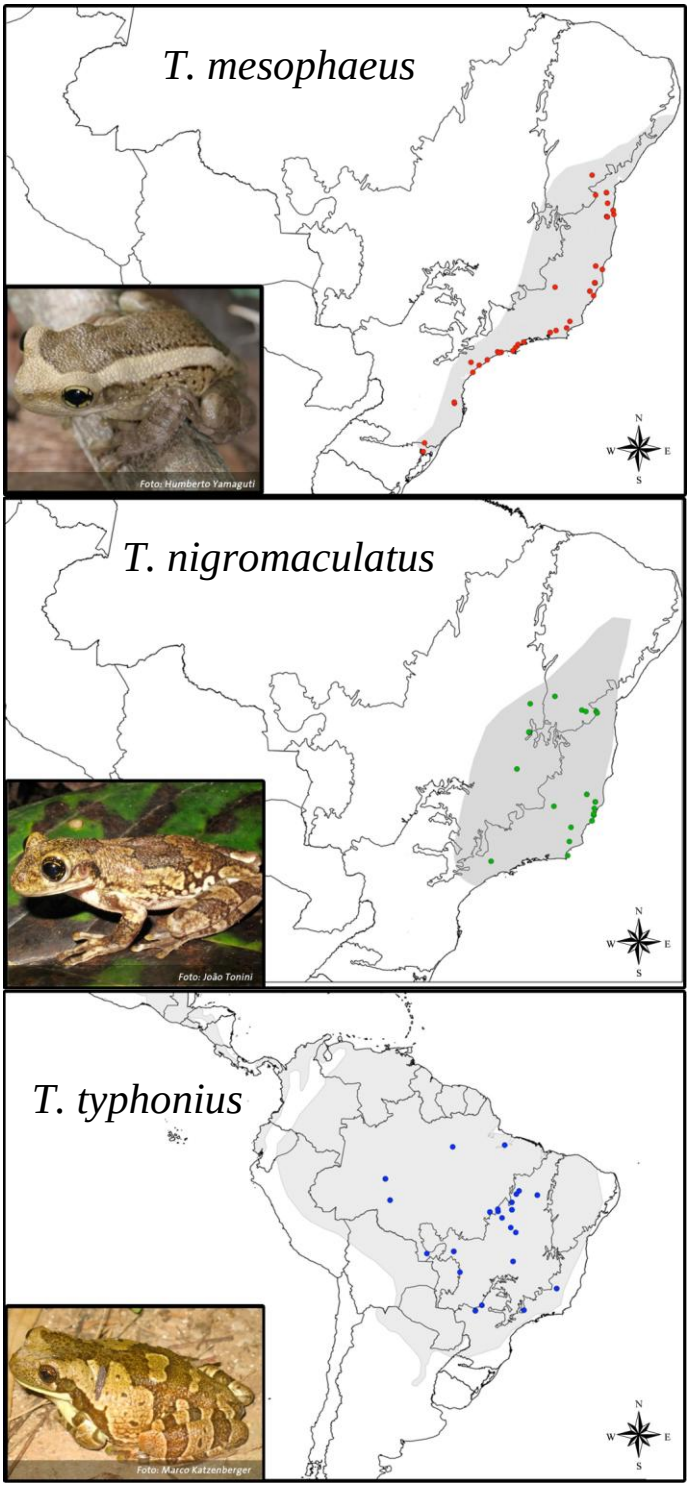


Figura 1. Exemplares típicos de *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* e distribuição geográfica de cada espécie, hachurado em cinza, sendo os pontos marcados no mapa as localidades amostradas (Haddad *et al.* 2013).

II. OBJETIVOS E METAS

II.1. Objetivo Geral

Avaliar características genética das espécies *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* e verificar a ocorrência de hibridização interespecífica.

II.2. Metas

a) Identificar características genéticas de cada espécie de *Trachycephalus*:

   i. identificar polimorfismos únicos (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) de dois genes mitocondriais e um gene nuclear das espécies *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius;*

   ii. estimar os valores de divergência intra e interespecíficos;

   iii. inferir redes de haplótipos das espécies;

   iv. inferir as relações filogenéticas entre as três espécies de *Trachycephalus*;

b) Verificar a ocorrência de híbridos interespecíficos

   i. identificar e descrever a ocorrência de hibridização introgressiva ou retenção de polimorfismo ancestral entre *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius;*

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Amostra

A amostra consiste de 173 indivíduos de 66 localidades, todos previamente identificados por meio da morfologia externa pelos coletores. Destes, 76 exemplares são de *T. mesophaeus* de 32 localidades: 38 de *T. nigromaculatus* de 17 localidades e 55 de *T. typhonius* de 22 localidades (Figura 1, Tabela 1, Apêndice 1).

Quatro indivíduos não foram classificados em uma das três espécies, mas considerados como potenciais híbridos por apresentarem morfologia intermediária. Assim, para o presente estudo, esses quatro indivíduos foram classificados como *Trachycephalus* sp (Tabela 1, Apêndice I, Figura 2).

As amostras de tecidos foram obtidas por doação de pesquisadores de coleções de referência ou são provenientes de coletas realizadas no Espírito Santo e que fazem parte da Coleção de Tecidos e DNA da UFES (Apêndice I).

Para os estudos de identificação molecular e definição de código de barras de DNA por espécie somente foram utilizados os indivíduos cujas identificações por especialistas no grupo foram substanciadas, com base em dados morfológicos sem problemas de identificação.

Para os estudos de verificação de hibridação interespecífica foram analisados os quatro indivíduos de *Trachycephalus* sp. e outros exemplares que mostraram inconsistência entre a identificação morfológica e a identificação molecular. Nesse último caso, todos os exemplares foram reanalisados sob o ponto de vista morfológico pelo coletor, para confirmar a classificação original.

Nos estudos filogenéticos foram utilizados cinco indivíduos de duas espécies da tribo Lophiohylini como grupos externos: *Aparasphenodon brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920 e *Osteocephalus taurinus* Steindachner, 1862 (Apêndice I).

Figura 2. Vista lateral (indivíduo JFT 473) e dorsal (indivíduo LGA3924) de potenciais híbridos de*Trachycephalus.*

III.2. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi obtido de amostras de tecido muscular ou hepático, seguindo o protocolo descrito por Bruford *et al*. (1992), com modificações. A quantidade de DNA foi calculada em espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi avaliada em gel de agarose 1%.

Os estudos foram baseados na análise de sequência de fragmentos de DNA referentes ao exon 1 do gene nuclear da Tirosinase (TYR, 515 pb) e aos genes mitocondriais Nicotinamida Desidrogenase subunidade 2 (ND2, 825 pb) e Citocromo

oxidase subunidade 1 (COI, 640 pb), obtidos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A reação seguiu os perfis específicos conforme Tabela 2 utilizando a concentração de DNA de 50 ng/ml por reação.

Tabela 1. Número de localidades por estado (nL) e de indivíduos (n) de cada espécie de *Trachycephalus* analisadas no presente estudo.

Estado	*T. mesophaeus*		*T. nigromaculatus*		*T. typhonius*		*Trachycephalus* sp.		Total
	nL	n	nL	n	nL	n	nL	n	n
PI					1	5			5
PA					3	3			3
RO					1	4			4
AM					1	3			3
MA					1	1			1
GO					1	2			2
MS					1	2			2
MT					2	9			9
TO					7	17			17
BA	8	28	3	6					34
ES	4	21	7	17			1	4	42
MG	1	1	4	12	1	2			15
RJ	5	6	2	2					8
SP	10	16	1	1	3	7			24
SC	3	3							3
RS	1	1							1
Sub-total	32	76	17	38	22	55	1	4	173

Tabela 2. Concentrações e quantidades dos reagentes e *primers* utilizados nas reações de PCR de cada gene e perfis das PCRs.

Marcador	**ND2**	**COI**	**TYR**
Master Mix [ ]			
dNTP	10 mM	10 mM	10 mM
Tampão	10x	10x	10x
$MgCl_2$	50 mM	50 mM	50 mM
Primers	10 mM	10 mM	10 mM
Platinum® Taq	1 unidade	1 unidade	1 unidade''
Volume total	25 µl	25 µl	25 µl
Perfil (temperatura e tempo)			
Denaturação inicial	94ºC, 5'	94ºC, 5'	94ºC, 30''
Nº de ciclos	10 + 25	35	35
Denaturação	94ºC, 30''	94ºC, 30''	94ºC, 30''
Anelamento	60ºC, 30''+ 58ºC, 30''	47ºC-45''	58ºC, 30''
Extensão	72ºC – 45''	72ºC-45''	72ºC-1'
Extensão final	72ºC – 10'	72ºC-5'	72ºC-6'
Primer forward	ND2ELEUF	LCO1490	TYR1C
Primer reverse	ND2ALAR	HCO2198	TYR1G
Referência	Carnaval e Bates 2007	Folmer *et al*. 1994	Bossuyt e Milinkovitch 2000

Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador ABI Veriti® 3500 (Applied Byostems, EUA). O sucesso da amplificação foi verificado utilizando-se 2µl do produto de PCR e 2µl de BlueJuice® (Invitrogen, EUA) submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% a 100V por 45 minutos. Foi utilizado o corante intercalante de DNA GelRed® (Biotium, EUA) e visualizado sob incidência de luz ultravioleta em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch® (Loccus, Brasil). Todas as PCR foram feitas utilizando-se água Milli-Q® (MilliPore Corporation, EUA) como controle negativo em sala isolada (pré-PCR) e as misturas de PCR foram preparadas em uma capela previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 10% e álcool 70%, onde nenhum DNA é manipulado. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit de purificação ExoSAP-IT® (USB Corporation, EUA) seguindo-se o protocolo do fabricante. Esse método de purificação utiliza duas enzimas hidrolíticas, Exonuclease I e Shrimp Alkaline fosfatase, que degradam restos de *primers* e dNTPs em uma solução tampão, adicionando-se 1 µl da solução do kit diluídos 1:4 para cada 10 µl do produto de PCR.

Geralmente, foi gerada a sequência de DNA a partir da fita senso, utilizando-se o *primer forward.* Porém, quando necessário, a fita antissenso foi utilizada para confirmar ambiguidades. As reações de sequenciamento e precipitação foram realizadas em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems, EUA) do Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da Universidade Federal do Espírito Santo.

III.3. Análise dos dados

A identidade das sequências foi confirmada pelo método BLAST (Altschul 1997), que compara as sequências geradas com as disponíveis no *GenBank*® (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências foram alinhadas no programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) com auxílio da opção ClustalX (Thompson *et al.* 1994) e conferidas visualmente. Para todos os genes utilizou-se a estrutura primária da proteína como referencial para o alinhamento.

III.3.1. Avaliação da identidade molecular das espécies e dos indivíduos

Para a caracterização molecular de uma espécie e de cada indivíduo do presente estudo foram seguidas as seguintes abordagens, nessa ordem:

a) a definição de haplótipos que se agrupavam como um grupo monofilético;

b) cálculo da divergência genética entre os haplótipos, mostrando baixa divergência dentro e alta divergência entre as espécies;

c) definição da relação hierárquica entre os haplótipos em uma rede de haplótipos;

d) identificação de polimorfismos únicos espécie-específicos (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs).

As hipóteses filogenéticas baseadas em critérios de Máxima Verossimilhança (MV) foram obtidas na plataforma online PhyML 3.0 (Guindon *et al*. 2010) e, pela Inferência Bayesiana (IB), no programa MrBayes 3.1 (Ronquist *et al.* 2012), seguindo o padrão de configuração proposto pelo modelo com 2 milhões de gerações iniciais

com amostragens a cada 100 e 25% de *burn-in*, mais 1 milhão de gerações adicionadas sempre que o desvio padrão médio final era superior a 0,01. Os modelos de substituição nucleotídica apropriados para os critérios de MV e IB, foram determinados a partir o programa jModelTest 2.1.3 (Darriba *et al.* 2012), com aplicação do critério de correção de Akaike para a análise de Máxima Verossimilhança e de BIC para a análise de Inferência Bayesiana. Foram considerados clados confiáveis aqueles que apresentaram valores de *bootstrap* acima de 75% (MV) e de probabilidades posteriores acima de 95% (IB). Para recuperar as relações filogenéticas entre as três espécies foram utilizadas todas as sequências dos indivíduos sem dúvidas quanto à identificação.

As distâncias genética intra e interespecíficas foram estimadas no programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) para cada uma das espécies. Na matriz de distância foram utilizados somente os exemplares sem dúvidas na identificação morfológica para definirem-se os padrões de divergência entre as três espécies-alvo. O modelo de substituição nucleotídica foi o Kimura 2 parâmetros, em que as taxas de transição e as taxas de transversão são consideradas separadamente, e foram realizadas 1000 replicações como *bootstrap*.

Os haplótipos foram identificados no programa DnaSP v.5 (Librado e Rozas 2009) e as redes de haplótipos geradas no programa NETWORK 4.1 (Rohl 2000 www.fluxus-engineering.com). Nesse programa as redes de haplótipos são geradas com base na implementação do algoritmo *median–joining*, que gera uma árvore (*minimum spanning tree*) e adiciona os intermediários ausentes usando o algoritmo de máxima parcimônia de Farris (Bandelt *et al.* 1999). Como a tirosinase é um gene nuclear, fez-se necessário usar a ferramenta "*Unphase*" do programa para separar as fases dos indivíduos com alelos heterozigotos (Figura 3). Essa ferramenta utiliza o algoritmo fornecido pelo PHASE (Stephens *et al*. 2001; Stephens e Donelly 2003) que é baseado em um método de coalescência bayesiano para inferir os haplótipos. Devido a essa etapa, cada sequência de uma amostra correspondeu a dois haplótipos na rede.

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) de cada gene foram verificados visualmente e foram considerados *loci* diagnósticos aqueles que se mostraram distintos em comparação a uma ou duas espécies. A numeração dos SNPs teve início a partir do final da sequência de cada *primer*.

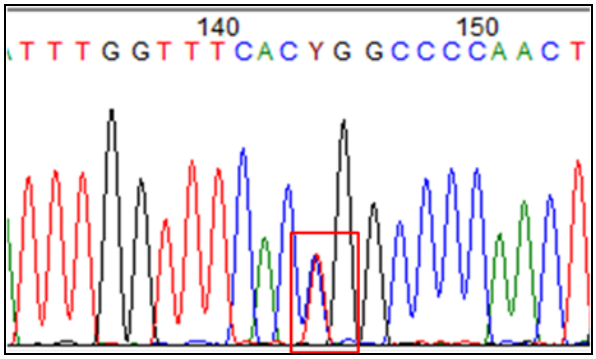


Figura 3. Pico duplo em eletroferograma do gene tirosinase indicando heterozigose na posição 144 (quadrado). Y=C+T segundo IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

III.3.2. Verificação da ocorrência de híbridos interespecíficos

Os exemplares alvo da verificação de ocorrência de hibridação interespecífica foram os quatro indivíduos previamente identificados como *Trachycephalus* sp. do município da Serra, Espírito Santo. Outros sete indivíduos apresentaram identificação morfológica determinada pelo coletor, porém apresentaram discrepâncias sobre a identidade molecular dos genes mitocondriais e nuclear. Assim, por serem suspeitos de serem híbridos, foram tratados em conjunto com os indivíduos da Serra, ES, sendo eles CFBH9156 de Jequié (BA), MTR22113 de Wenceslau Guimarães (BA), MTR12040 de Linhares (ES, MTR2815 de Baixa Grande do Ribeiro (PI), MTR5003 da Chapada dos Guimarães (MT) e MTR509 e MTR510 de Januária (MG).

Todos os indivíduos que apresentaram nos estudos filogenéticos a identificação molecular com um gene mitocondrial de uma espécie e com o gene nuclear de outra espécie foram selecionados como potenciais híbridos, e todos foram sequenciados novamente antes de seguiram para a análise da divergência genética. Foi confirmado como potencial híbrido o exemplar que apresentou valores de divergência molecular e SNPs que confirmassem a incongruência citonuclear.

A partir do conjunto de resultados foram analisados os possíveis híbridos, caso a caso, visando distinguir um padrão de compartilhamento de polimorfismos, que poderiam ser resultado de hibridação interespecífica ou retenção de polimorfismos ancestrais (*Incomplete Lineage Sorting* – ILS).

IV. RESULTADOS

IV.1. Identidade molecular das espécies

A quantidade de sequências geradas de cada espécie por gene estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação do número de sequências geradas por espécie nos genes mitocondriais COI e ND2 e no gene nuclear Tirosinase.

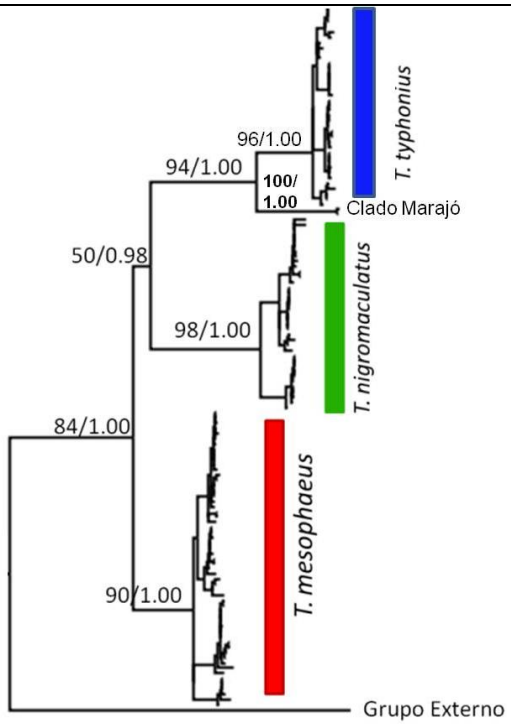
Espécie	Número de sequências geradas			
	COI (645pb)	ND2 (825pb)	Tirosinase (515pb)	Total
T. mesophaeus (n=76)	61	56	57	174
T. nigromaculatus (n=38)	34	36	35	105
T. typhonius (n=55)	31	41	48	120
Sub-total	126	133	140	399

O modelo evolutivo utilizado para a análise de Máxima Verossimilhança do gene COI foi GTR+I+G, sendo a proporção de sítios invariáveis = 0,5420 e a distribuição gama = 1,4550 e o modelo usado na Inferência Bayesiana foi o HKY+G, sendo gama=0,2380. O modelo evolutivo utilizado para a análise de Máxima Verossimilhança no gene ND2 foi o GTR+I+G, sendo inv=0,3540 e gama=1,0190 e o modelo usado na Inferência Bayesiana foi o HKY+I+G, sendo inv=0,2950 e gama=0,7510. O modelo evolutivo utilizado para a análise de MV e IB no gene tirosinase foi o GTR+I+G, sendo inv=0,6660 e gama=0,8090.

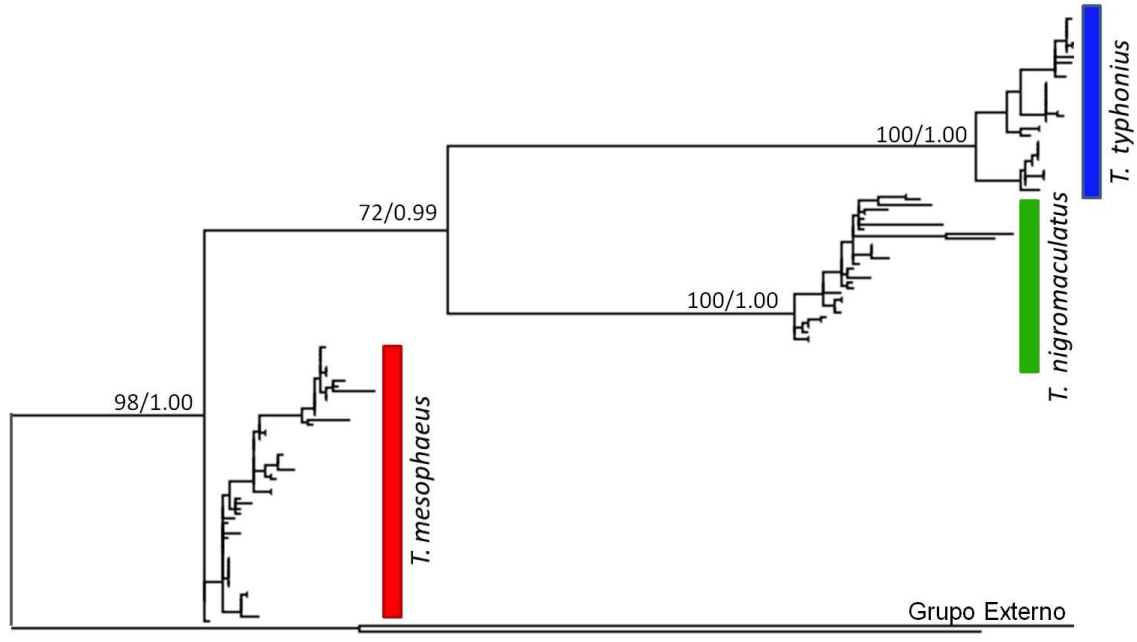
As topologias das árvores dos genes mitocondriais não foram similares. A árvore do ND2 corrobora o monofiletismo das três espécies, apesar de haplótipos divergentes de *T. typhonius* (denominado Clado Marajó). No gene COI *T. mesophaeus* não foi recuperado como monofilético (Figura 4). Diferentemente, no gene nuclear a única espécie que apresentou alto suporte foi *T. mesophaeus*, apesar de *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* formarem agrupamentos distintos entre si (Figura 4). Na análise dos genes concatenados observou-se a formação de três clados com alto suporte (MV>75 e IB >95) correspondente as espécies analisadas (Figura 5).

Ao analisar as filogenias, além dos quatro indivíduos de *Trachycephalus* sp., foram observados sete indivíduos com discrepâncias citonucleares (DNAmt de uma espécie e DNAn de outra espécie) (Figura 7). Esses indivíduos foram retirados das análises posteriores de caracterização das espécies e analisados em conjunto com os indivíduos de *Trachycephalus* sp.

ND2



COI



TYR

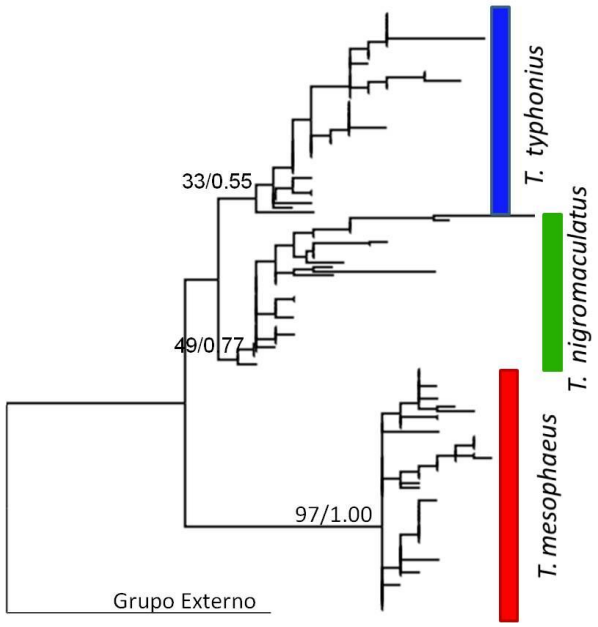


Figura 4. Árvores filogenéticas dos genes ND2, COI e TYR. Valores acima dos ramos correspondem ao suporte da ML e probabilidades posteriores da IB, respectivamente.

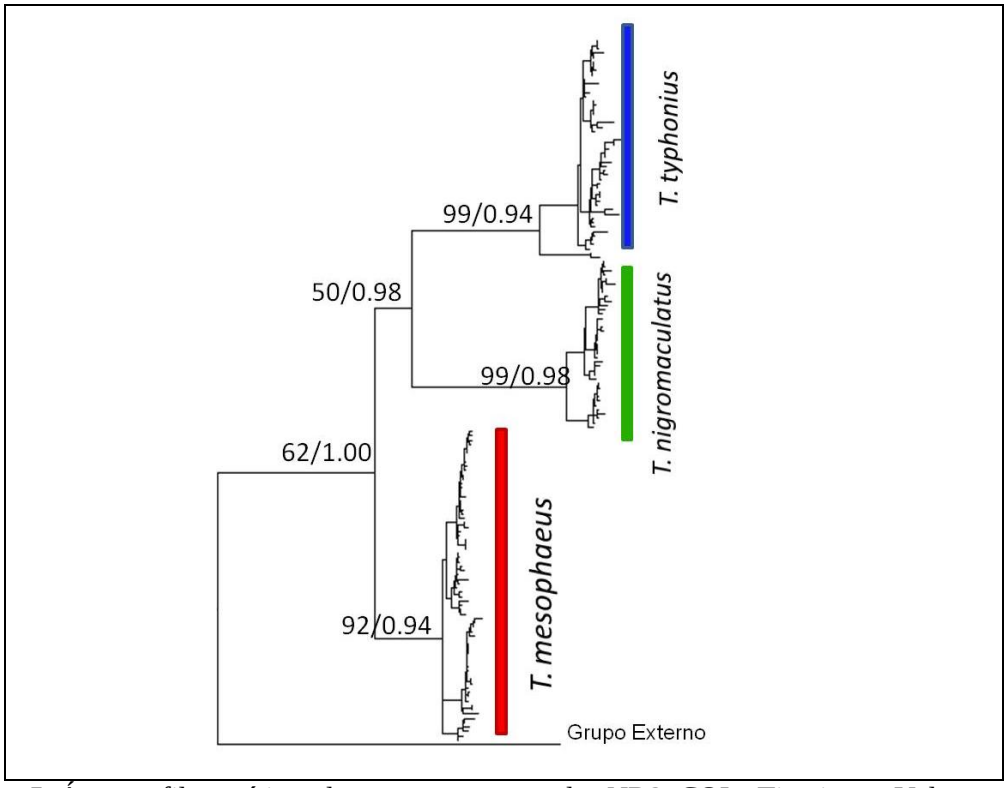


Figura 5. Árvores filogenéticas dos genes concatenados ND2, COI e Tirosinase. Valores acima dos ramos correspondem ao suporte da ML e probabilidades posteriores da IB, respectivamente.

A distância genética intraespecífica no gene ND2 (Tabela 4) variou de 2,1-2,5%, do gene COI variou de 1,1-2,2% e do gene tirosinase mostrou baixa variação intraespecífica de 0,6-0,8%. A divergência interespecífica do gene ND2 variou de 12,5-13,9%, do gene COI de 13,1-16,6% e do TYR variou de 1,6 a 3,2%.

Os valores de divergência genética interespecífica foram, no mínimo, seis vezes maiores que as distâncias intraespecíficas no ND2 e quase três vezes no COI. Nas sequências da tirosinase as distâncias interespecíficas são 2,5 vezes superiores às distâncias intraespecíficas.

Tabela 4. Distâncias genéticas intraespecíficas (diagonal) e interespecíficas (cinza) para os genes ND2, COI e Tirosinase das espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni).

Espécie	1	2	3
ND2			
1.Tty	0,024		
2.Tme	0,129	0,025	
3.Tni	0,139	0,125	0,021
COI			
1.Tty	0,011		
2.Tme	0,131	0,017	
3.Tni	0,166	0,152	0,022
Tirosinase			
1.Tty	0,006		
2.Tme	0,028	0,007	
3.Tni	0,016	0,032	0,008

Foram observados 83 polimorfismos únicos (SNPs) nos três genes analisados (Tabelas 5 a 8). Somente os genes mitocondriais apresentaram juntos 75 SNPs (90,36%). O gene COI apresentou maior frequência de SNPs em relação ao total do tamanho do fragmento do gene (640 pb), com 7,13% de suas bases nitrogenadas correspondendo a polimorfismos únicos, enquanto que no ND2 essa proporção foi de 3,75% (825 pb) e no TYR apenas 1,55% (515pb).

Ao analisar os SNPs diagnosticos foram identificadas posições em que um determinado nucleotídeo em uma espécie era distinto em relação às outras duas (i.e. na posição 105 do gene ND2, ocorre Citosina somente em *T. typhonius* enquanto nas duas outras espécies o nucleotídeo era Timina). Assim, após essa análise, foram detectados 19 SNPs exclusivos a *T. typhonius,* 25 para *T. mesophaeus* e 30 para *T. nigromaculatus* (Tabela 5).

Foram observados SNPs exclusivos que diferenciam cada espécie apenas nos genes mitocondriais (Tabelas 6 e 7). Foram identificadas quatro posições no ND2 (465, 552, 585 e 798) e cinco no gene COI (177, 210, 270, 300 e 522) (Tabelas 5 e 6). Na tirosinase não ocorrem SNPs exclusivos para cada espécie, sendo que duas posições permitem a distinção entre *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* (99 e 235) e seis posições diferem *T. mesophaeus* das duas espécies (102, 171, 180, 236, 242 e 264) (Tabela 7).

Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) para os genes ND2, COI e TYR eL de *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) e que são diferentes entre as três.

Espécies	Tty	Tme	Tni	Tty x Tme x Tni	n
ND2	8	11	7	4	30
COI	11	8	21	5	45
TYR	0	6	2	0	8
Total SNPs	19	25	30	9	83

Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene ND2. Em cinza as posições contendo SNPs espécie-específicos.

	018	**069**	**105**	**141**	**153**	**169**	**219**	**249**	**250**	**252**	**255**	**357**	**462**	**465**	**468**
Tty	T	C	C	A	A	T	C	C	C	A	T	C	C	G	T
Tme	C	T	T	G	A	C	T	T	T	G	T	C	T	T	C
Tni	T	C	T	A	T	C	C	C	T	A	C	T	C	C	C
	504	**534**	**552**	**561**	**580**	**585**	**594**	**610**	**625**	**642**	**657**	**679**	**711**	**798**	**805**
Tty	T	A	A	T	A	A	A	A	G	A	T	C	T	T	G
Tme	C	T	T	C	A	T	A	G	A	G	T	T	C	A	G
Tni	T	A	C	C	T	C	G	G	A	A	C	T	T	G	A

Tabela 7. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene COI.

	066	**069**	**075**	**087**	**090**	**093**	**114**	**132**	**147**	**169**	**171**	**174**	**177**	**201**	**210**
Tty	G	G	C	T	C	T	T	G	A	C	A	G	G	A	A
Tm	G	A	C	T	T	T	T	A	A	C	A	C	A	G	C
Tni	T	A	T	C	T	A	C	A	G	T	G	C	C	G	T
	231	**234**	**243**	**262**	**270**	**300**	**318**	**324**	**330**	**333**	**342**	**357**	**372**	**393**	**396**
Tty	T	A	C	C	C	T	T	C	C	C	C	T	C	T	C
Tm	C	A	C	T	T	C	C	T	T	T	C	T	C	T	T
Tni	C	G	A	C	A	A	T	T	C	T	T	C	T	C	T
	414	**435**	**456**	**474**	**477**	**504**	**520**	**522**	**549**	**555**	**564**	**567**	**568**	**597**	**624**
Tty	T	C	C	A	C	T	C	C	A	A	C	T	C	G	C
Tm	T	T	T	A	T	C	C	T	G	A	C	C	C	G	T
Tni	C	C	C	G	C	T	T	A	G	G	T	T	T	A	T

Tabela 8. Polimorfismos de nucleotídeos únicos que caracterizam as espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni) no gene TYR.

	99	**102**	**171**	**180**	**235**	**236**	**242**	**264**
Tty	C	T	G	G	A	C	A	C
Tme	C	C	A	A	A	A	T	T
Tni	T	T	G	G	C	C	A	C

As redes de haplótipos de todos os genes analisados apresentaram basicamente a mesma conformação, com três agrupamentos estruturados correspondentes a cada espécie e não foi identificado compartilhamento de haplótipos entre as espécies (Figura 6, Apêndices I e II). O haplogrupo de *T. mesophaeus* sempre se posicionou intermediário a *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* nos genes mitocondriais, enquanto que na tirosinase a espécie intermediária foi *T. typhonius*.

Dentre as 128 sequências de COI foram observados 59 haplótipos com alta diversidade haplotípica total (h= 0,96), 188 sítios polimórficos e diversidade nucleotídica π= 0,09085. Os haplogrupos representativos das espécies ficaram separados por 46 a 61 passos mutacionais. Em *T. typhonius* (n=31) foram observados

22 haplótipos (C1-C22), em *T. mesophaeus* (n=61) observaram-se 22 haplótipos (C23-C44) e em *T. nigromaculatus* (n=36) observaram-se 15 haplótipos (C45-C59).

No ND2 foram sequenciados 135 indivíduos que se agruparam em 68 haplótipos, com alta diversidade haplotípica total (h= 0,98), 286 sítios polimórficos e diversidade nucleotídica π= 0,09497. Os haplogrupos representativos das espécies ficaram separados por 36 passos mutacionais. Em *T. typhonius* (n=41) foram observados 18 haplótipos (N1-N18), em *T. mesophaeus* (n=57) observaram-se 32 haplótipos (N19-N52) e em *T. nigromaculatus* (n=37) observaram-se 14 haplótipos (N53-N68).

Na rede de haplótipos da tirosinase os haplogrupos das espécies ficaram separados por 2 a 8 passos mutacionais. Das 284 sequências da tirosinase (dois alelos por indivíduo) de 142 indivíduos de *Trachycephalus* foram observados 135 haplótipos e 75 sítios polimórficos. A diversidade haplotípica foi alta e variou entre as espécies de 0,95 a 0,98. Por outro lado, a diversidade nucleotídica foi baixa, variando entre 0,00752 a 0,00988. Para *T. typhonius*, das 96 sequências de 48 indivíduos de foram obtidos 37 haplótipos, sendo 25 indivíduos homozigotos (52,08%) e 23 indivíduos heterozigotos (47,91%). Para *T. mesophaeus*, das 116 sequências de 57 indivíduos foram obtidos 54 haplótipos, sendo 22 indivíduos homozigotos (38,59%) e 35 heterozigotos (61,40%). Das 72 sequências de 35 indivíduos de *T. nigromaculatus* foram obtidos 41 haplótipos, sendo 11 indivíduos homozigotos (31,4%) e 24 heterozigotos (68,57%).

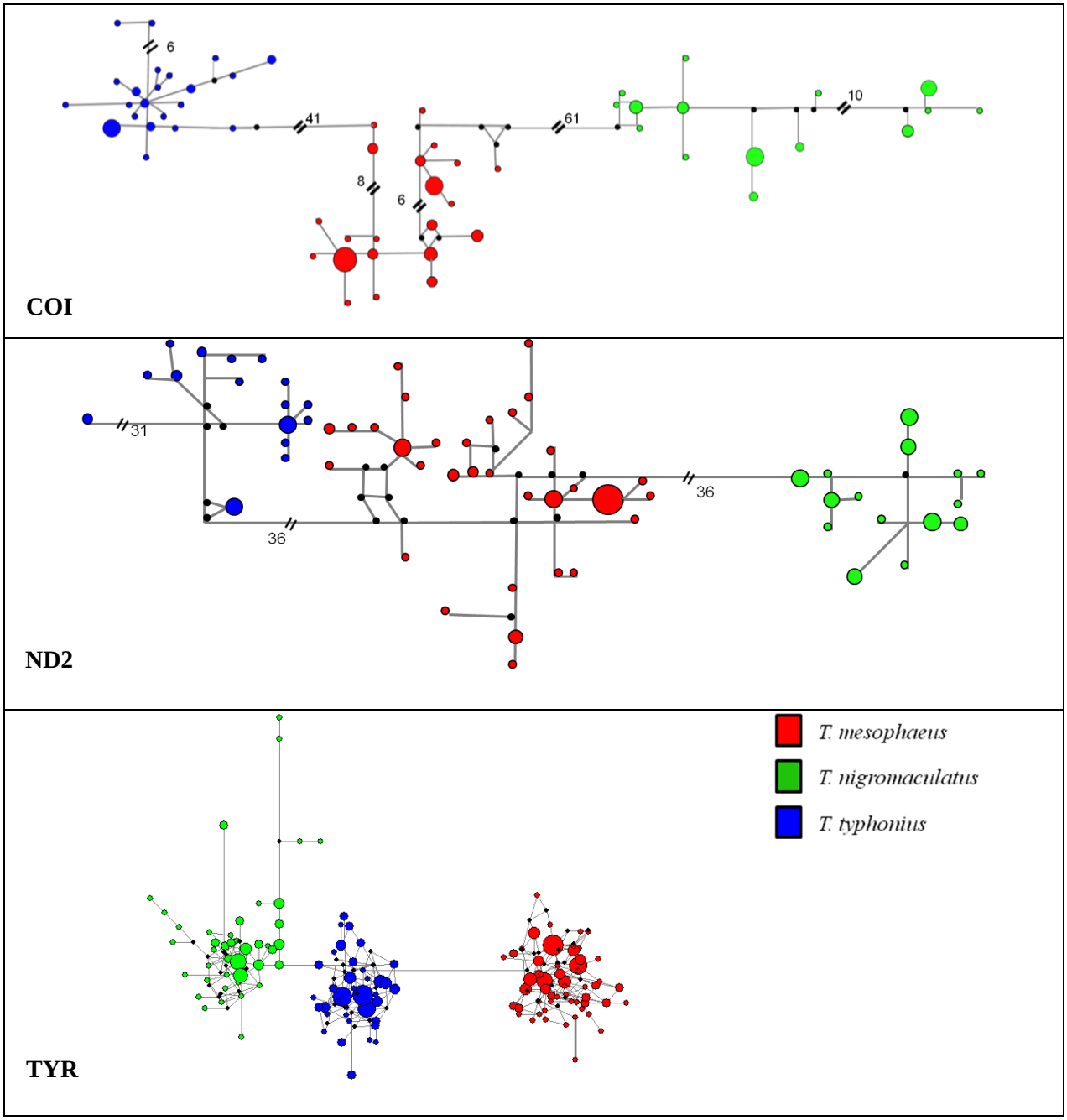


Figura 6. Rede de haplótipos dos genes COI, ND2 e Tirosinase. A frequência dos haplótipos é proporcional ao tamanho dos círculos. Círculos pretos representam haplótipos intermediários gerados pelo programa. O tamanho das linhas é proporcional ao número de passos mutacionais (até 5 passos). Números acima das barras representam o número de passos mutacionais (exceto na tirosinase) e corresponde, em sua maioria, a um único passo mutacional.

IV.2. Potenciais híbridos interespecíficos

A identificação da origem do genoma materno dos onze indivíduos potencialmente híbridos foi verificada pelo posicionamento dos haplótipos dos genes COI e ND2 em árvores filogenéticas. A identificação foi congruente entre os dois genes (Figura 6), revelando o genoma materno de *T. nigromaculatus* para cinco indivíduos de localidades no Espírito Santo (MTR12040), Bahia (CFBH9156), Piauí (MTR2815) e Minas Gerais (MTR509 e MTR510); cinco de *T. typhonius* do Mato Grosso (MTR5003) e do Espírito Santo (JFT473, JFT757, JFT955 e LGA3924) e um da Bahia de *T. mesophaeus* (MTR22113) (Apêndice I, Tabela 9, Figura 12)

A identificação do genoma nuclear (Figura 7) mostrou cinco indivíduos homozigotos quanto ao haplótipo e seis indivíduos heterozigotos, com haplótipos distintos. Os cinco indivíduos homozigotos apresentaram o mesmo haplótipo para o genoma de origem materna quanto paterna, representando uma única espécie, sendo que JFT473, JFT757, JFT955 e LGA3924 associaram-se a *T. nigromaculatus* e CHBH9156 à *T. mesophaeus*. Dos seis indivíduos heterozigotos, embora com haplótipos distintos, quatro indivíduos apresentaram origem do genoma e materno e paterno associada à mesma espécie, enquanto que dois indivíduos mostraram que o genoma materno era distinto do genoma paterno. O indivíduo MTR12040 de Linhares, norte do Espírito Santo apresentou dois haplótipos distintos, mas os dois associados à *T. mesophaeus*. Igualmente, os indivíduos de MTR509 e MTR510 de Januária, Minas Gerais, mostraram alelos distintos, mas ambos associados a *T. typhonius*. Da mesma forma, o indivíduo MTR22113 de Wenceslau Guimarães, Bahia apresentou haplótipos distintos, mas ambos associados à *T. nigromaculatus*. Os indivíduos do Piauí (MTR2815, de Baixa Grande do Ribeiro) e Mato Grosso (MTR5003, de Chapada dos Guimarães) mostraram um haplótipo associado à *T. typhonius* e outro à *T. nigromaculatus* (Figura 7).

A distância genética dos indivíduos híbridos baseada nos respectivos genes mitocondriais mostrou valores que correspondem à variação intraespecífica, dando suporte para a identificação dos genomas maternos (Tabela 8). Para o gene tirosinase,

dada a baixa diferenciação genética entre os haplótipos específicos de *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*, não foi possível confirmar a origem dos genomas maternos e paternos somente por essa ferramenta. Para os genomas associados à *T. mesophaeus* não houve dificuldade em confirmar a identidade do genoma nuclear pela divergência genética.

As redes de haplótipos geradas para cada gene, incluindo os 11 indivíduos possivelmente híbridos, revelaram que os haplótipos de cada espécie se organizaram em agrupamentos distintos e confirmaram a origem dos genomas materno e paternos já identificados pelas árvores filogenéticas e pela distância genética (Figura 8). Novamente os indivíduos heterozigotos do Piauí e Mato Grosso ficaram agrupados com dois haplogrupos distintos, correspondentes a *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*.

A identificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos mostrou SNPs diagnósticos e foi eficiente para identificar o genoma mitocondrial e nuclear de cada indivíduo (Tabela 11 e Figura 9). No entanto, o indivíduo da Chapada dos Guimarães (MTR5003) não seria identificado como híbrido somente os SNPS tivessem sido utilizados. Somente dois SNPs diferem *T. nigromaculatus* de *T. typhonius* e esse indivíduo é heterozigoto na posição 99, fazendo com que a posição 235 o caracterizasse como *T. typhonius* no gene nuclear (Tabela 10).

A integração dos dados moleculares permitiu que fossem feitas extrapolações acerca da origem dos genomas materno e paterno de cada indivíduo potencialmente híbrido. Dessa forma, foram levantadas as possibilidades de os indivíduos parentais serem híbridos ou não: de esses serem heterozigotos ou homozigotos e se poderiam indicar geração F1 ou posterior. No entanto, a confirmação da origem de cada alelo só seria possível clonando-se o gene nuclear.

O indivíduo da Bahia CFBH9156 (Figura 10a) apresentou genoma materno de *T. nigromaculatus* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 9) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. mesophaeus* (Figuras 9, 10, 11 e Tabela 9). O parental materno desse indivíduo era obrigatoriamente um híbrido (F1 ou posterior), pois necessariamente cedeu o haplótipo mitocondrial de *T. nigromaculatus* e um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*. Assim, pela nossa análise, o indivíduo CFBH9156 pode ser um potencial híbrido de geração F2, no mínimo.

Os indivíduos de Minas Gerais MTR509 e MTR510 (Figura 11b) apresentaram genoma materno de *T. nigromaculatus* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 9) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. typhonius* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 9). Os parentais maternos desses indivíduos eram obrigatoriamente híbridos (F1 ou posterior) e também heterozigotos, pois necessariamente cederam o haplótipo mitocondrial de *T. nigromaculatus* e um haplótipo nuclear *T. typhonius*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. typhonius*. Assim, pela nossa análise, os indivíduos MTR509 e MTR510 são potenciais híbridos de geração F2, no mínimo.

O indivíduo do Piauí MTR2815 (Figura 11c) apresentou genoma materno de *T. nigromaculatus* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 10) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 9). Com os presentes dados não há como determinar se o parental materno desse indivíduo era um híbrido, pois sabemos apenas que esse cedeu o haplótipo mitocondrial de *T. nigromaculatus* e um haplótipo nuclear *T. nigromaculatus*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. typhonius*. Assim, pela nossa análise, o indivíduo MTR2815 poderia ser um híbrido de geração F1, no mínimo.

O indivíduo do Mato Grosso MTR5003 (Figura 11d) apresentou genoma materno de *T. typhonius* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 9) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 9). Com os presentes dados não há como determinar se o parental materno desse indivíduo era um híbrido, pois sabemos apenas que esse cedeu o haplótipo mitocondrial de *T. typhonius* e um haplótipo nuclear *T. typhonius*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. nigromaculatus*. Assim, pela nossa análise, o indivíduo MTR5003 poderia ser um híbrido de geração F1, no mínimo.

O indivíduo do Espírito Santo MTR12040 (Figura 11e) apresentou genoma materno de *T. nigromaculatus* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 9) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. mesophaeus* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 9). O parental materno desse indivíduo era obrigatoriamente um híbrido (F1 ou posterior), pois necessariamente cedeu o haplótipo mitocondrial de *T. nigromaculatus* e um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*.

Assim, pela nossa análise, o indivíduo MTR12040 seria um potencial híbrido de geração F2, no mínimo.

O indivíduo da Bahia MTR22113 (Figura 11f) apresentou genoma materno de *T. mesophaeus* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 9) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. mesophaeus* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 9). O parental materno desse indivíduo era obrigatoriamente um híbrido (F1 ou posterior) e também heterozigoto, pois necessariamente cedeu o haplótipo mitocondrial de *T. nigromaculatus* e um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. mesophaeus*. Assim, pela nossa análise, o indivíduo MTR22113 seria um potencial híbrido de geração F2, no mínimo.

Os indivíduos do Espírito Santo JFT 473, JFT757, JFT955 e LGA3924 (Figura 11g) apresentaram genoma materno de *T. typhonius* (Figuras 7, 9, 10 e Tabela 10) e genoma nuclear (materno+paterno) de *T. nigromaculatus* (Figuras 8, 9, 10 e Tabela 11). Os parentais maternos desses indivíduos eram obrigatoriamente híbridos (F1 ou posterior) e também heterozigotos, pois necessariamente cederam o haplótipo mitocondrial de *T. typhonius* e um haplótipo nuclear *T. nigromaculatus*. O parental paterno cedeu um haplótipo nuclear *T. nigromaculatus*. Assim, pela nossa análise, os indivíduos JFT 473, JFT757, JFT955 e LGA3924 seriam potenciais híbridos de geração F2, no mínimo.

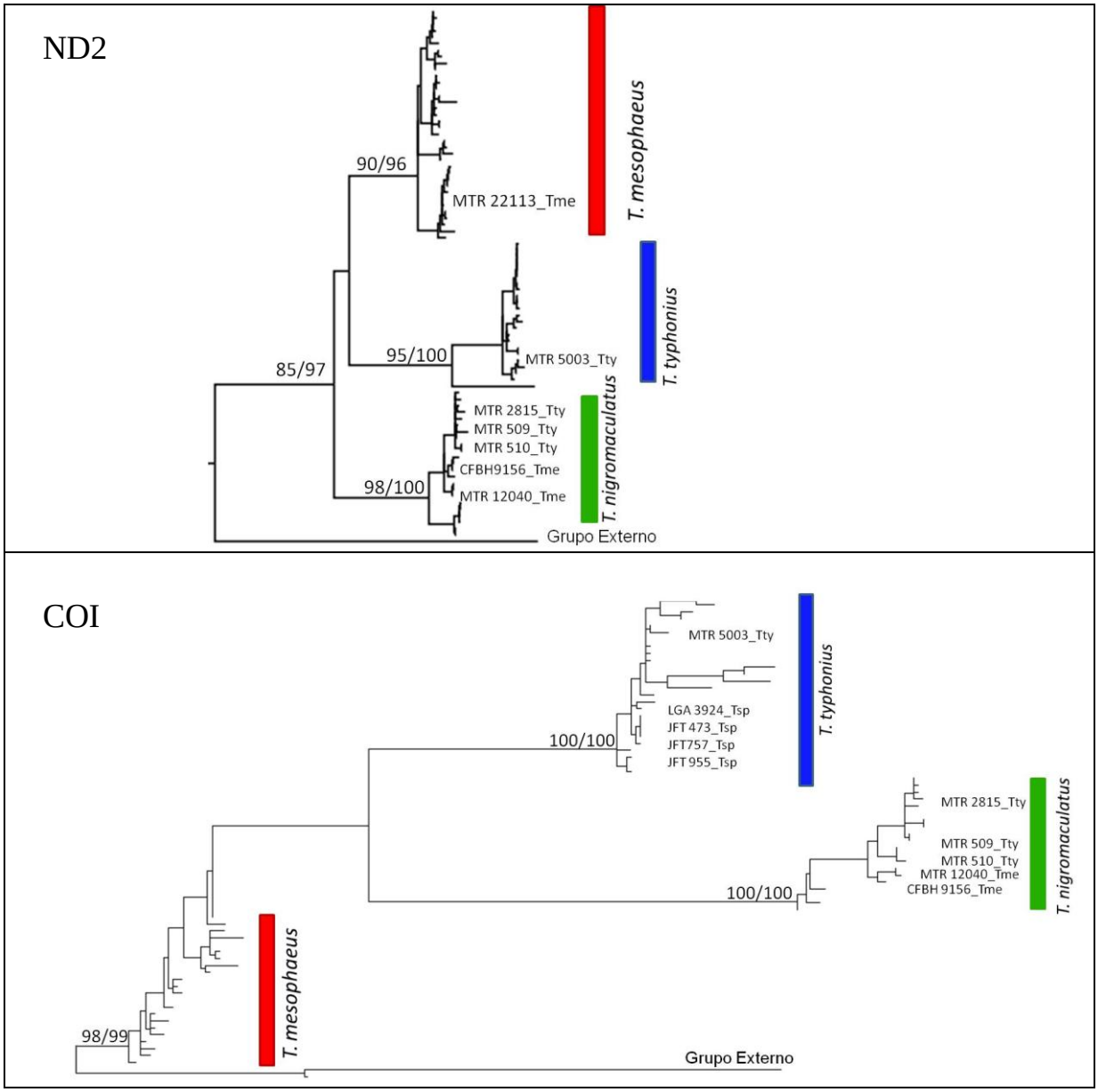


Figura 7. Árvores de haplótipos dos genes ND2 e COI com os indivíduos de morfologia intermediária e os demais exemplares que apresentaram incongruências citonucleares. Tty = *T. typhonius*, Tme= *T.mesophaeus* e Tni= *T.nigromaculatus.*

TYR

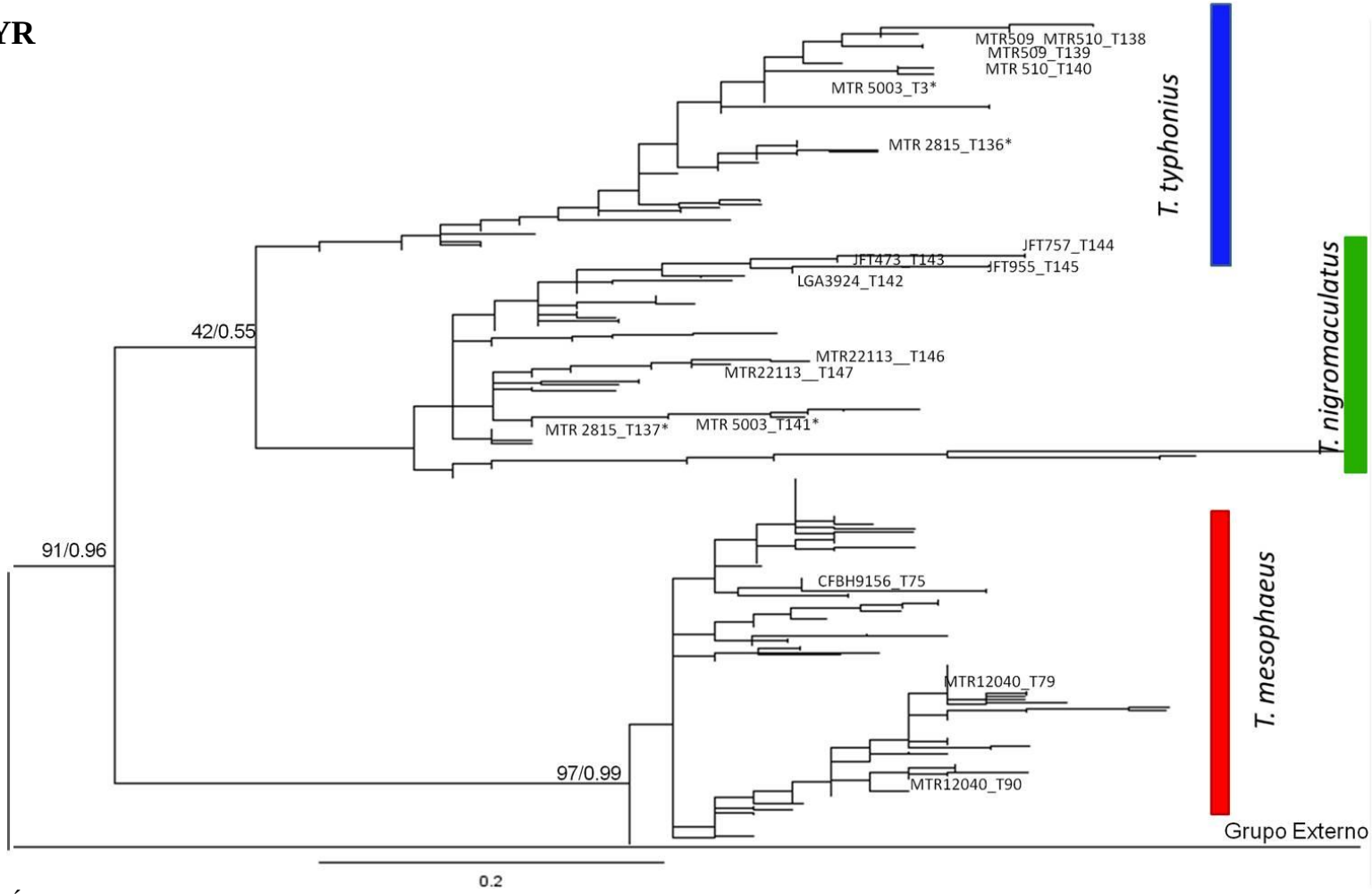


Figura 8. Árvore da tirosinase com destaque para o posicionamento dos alelos dos prováveis híbridos (indicado pelo número do haplótipo). Os espécimes que tiveram alelos agrupados com espécies diferentes estão destacados com um asterisco. Ver haplótipos no Apêndice II.

Tabela 9. Conjunto de evidências dos potenciais indivíduos híbridos, incluindo a identificação morfológica de cada indivíduo, as identificações nos genes COI e ND2 (DNAmt) e na tirosinase (DNAn) nas análises filogenéticas, pelas distâncias interespecíficas e na comparação com os SNPs espécie-específicos.

			Identificação morfológica	Filogenias		Distâncias		SNPs		
Amostra	**Localidade**	**Estado**		**DNAmt**	**DNAn**	**DNAmt**	**DNAn**	**DNAmt**	**DNAn**	**Heterozigoto**
LGA 3924	Serra	ES	N/C	Tty	Tni	Tty	Tty/Tni	Tty	Tni	N
JFT 473	Serra	ES	N/C	Tty	Tni	Tty	Tty/Tni	Tty	Tni	N
JFT 757	Serra	ES	N/C	Tty	Tni	Tty	Tty/Tni	Tty	Tni	N
JFT 955	Serra	ES	N/C	Tty	Tni	Tty	Tty/Tni	Tty	Tni	N
MTR 12040	Linhares	ES	Tme	Tni	Tme	Tni	Tme	Tni	Tme	S
MTR 22113	W. Guimarães	BA	Tme	Tme	Tni	Tme	Tty/Tni	Tme	Tni	S
CFBH 9156	Jequié	BA	Tme	Tni	Tme	Tni	Tme	Tni	Tme	N
MTR 2815	B.G.Ribeiro	PI	Tty	Tni	Tty e Tni	Tni	Tty/Tni	Tni	Tty	S
MTR 5003	C. Guimarães	MT	Tty	Tty	Tty e Tni	Tty	Tty/Tni	Tty	Tty/Tni	S
MTJ 509	Januária	MG	Tty	Tni	Tty	Tni	Tty/Tni	Tni	Tty	S
MTJ 510	Januária	MG	Tty	Tni	Tty	Tni	Tty/Tni	Tni	Tty	S

Tty= *T. typhonius;* Tme= *T. mesophaeus* e Tni= *T. nigromaculatus*; DNAmt = mitocondrial; DNAn = nuclear; N/C = não caracterizado; S = Sim e N = Não.

Tabela 10. Distância genética intraespecífica (cinza) e interespecífica (rosa) para os genes ND2, COI e Tirosinase das espécies *T. typhonius* (Tty), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. nigromaculatus* (Tni). As distâncias genéticas entre os haplótipos observados dos potenciais híbridos em relação às espécies parentais são apresentadas em verde.

Espécie/Indivíduos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ND2									
1. *T. mesophaeus*	0,025								
2. *T. nigromaculatus*	0,124	0,021							
3. *T. typhonius*	0,125	0,135	0,024						
4. ChapGui_Tty (n=1)	0,118	0,140	0,023						
5. BGrande _Tty (n=1)	0,132	0,019	0,138	0,143					
6. Januaria_Tty (n=2)	0,126	0,021	0,129	0,134	0,010				
7. Jequie_Tme (n=1)	0,128	0,024	0,138	0,143	0,017	0,022			
8. Linhares_Tme (n=1)	0,129	0,019	0,135	0,139	0,012	0,015	0,015		
9. Serra_Tsp (n=4)	0,121	0,134	0,019	0,027	0,136	0,127	0,136	0,133	
10. WGui_Tme (n=1)	0,028	0,134	0,120	0,107	0,140	0,134	0,140	0,137	0,115

COI									
1. Tme	0,017								
2. Tni	0,150	0,022							
3. Tty	0,126	0,162	0,011						
4. ChapGui_Tty (n=1)	0,123	0,163	0,006						
5. BGrande _Tty (n=1)	0,149	0,021	0,169	0,169					
6. Januaria_Tty (n=2)	0,144	0,019	0,168	0,169	0,008				
7. Jequie_Tme (n=1)	0,153	0,023	0,168	0,168	0,027	0,025			
8. Linhares_Tme (n=1)	0,152	0,019	0,163	0,164	0,023	0,019	0,017		
9. Serra_Tsp (n=4)	0,128	0,163	0,009	0,004	0,169	0,169	0,168	0,164	

Tirosinase									
1. Tme	0,007								
2. Tni	0,013	0,008							
3. Tty	0,012	0,002	0,006						
4. ChapGui_Tty (n=1)	0,012	0,001	0,000						
5. BGrande _Tty (n=1)	0,012	0,001	0,000	0,000					
6. Januaria_Tty (n=2)	0,012	0,001	0,000	0,000	0,000				
7. Jequie_Tme (n=1)	0,001	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011			
8. Linhares_Tme (n=1)	0,001	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,000		
9. Serra_Tsp (n=4)	0,018	0,008	0,006	0,006	0,006	0,006	0,017	0,017	
10. WGui_Tme (n=1)	0,012	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,011	0,006

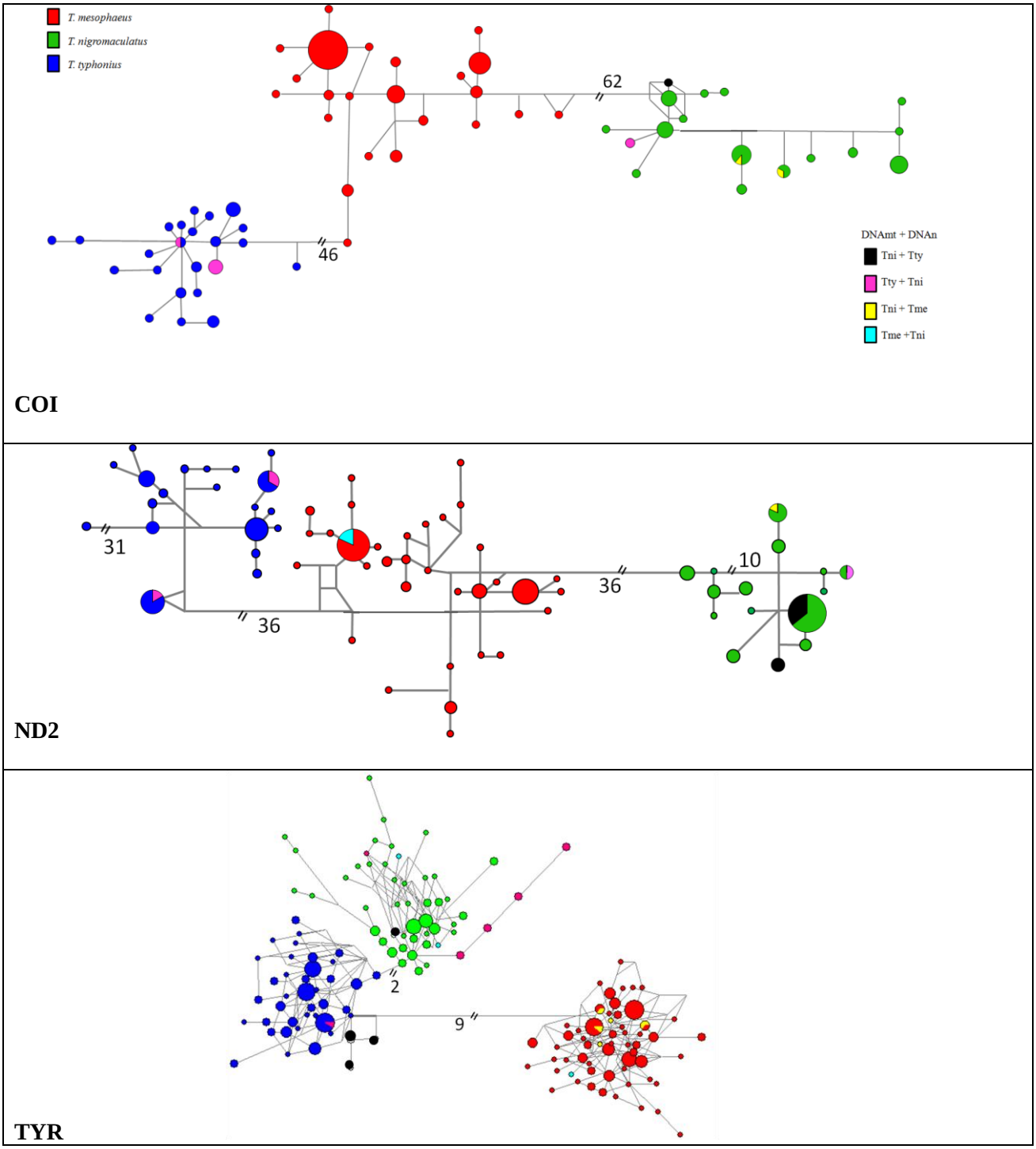


Figura 9. Rede de haplótipos dos genes COI, ND2 e Tirosinase com os indivíduos híbridos. Verde representa os haplogrupos de *T. nigromaculatus* (Tni), vermelho *T. mesophaeus* (Tme) e azul *T. typhonius* (Tty). Os haplótipos dos indivíduos híbridos estão indicados pelas cores na legenda, com distinção do DNA mitocondrial (DNAmt) e DNA nuclear (DNAn).

Tabela 11. Identificação dos potenciais híbridos por meio de SNPs espécie-específicos. Em vermelho *T. mesophaeus* =Tme, em verde *T. nigromaculatus*=Tni,em azul *T. typhonius*=Tty e em cinza alelos de *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*

Amostra	Localidade	Estado	morfologia	DNAmt	DNAn
MTR 22113	W. Guimarães	BA	Tme	Tme	Tni
MTR 12040	Linhares	ES	Tme	Tni	Tme
CFBH 9156	Jequié	BA	Tme	Tni	Tme
MTR 2815	B.G.Ribeiro	PI	Tty	Tni	Tty /Tni
MTJ 509	Januária	MG	Tty	Tni	Tty
MTJ 510	Januária	MG	Tty	Tni	Tty
MTR 5003	C. Guimarães	MT	Tty	Tty	Tty/Tni
LGA 3924	Serra	ES	Tsp	Tty	Tni
JFT 473	Serra	ES	Tsp	Tty	Tni
JFT 757	Serra	ES	Tsp	Tty	Tni
JFT 955	Serra	ES	Tsp	Tty	Tni

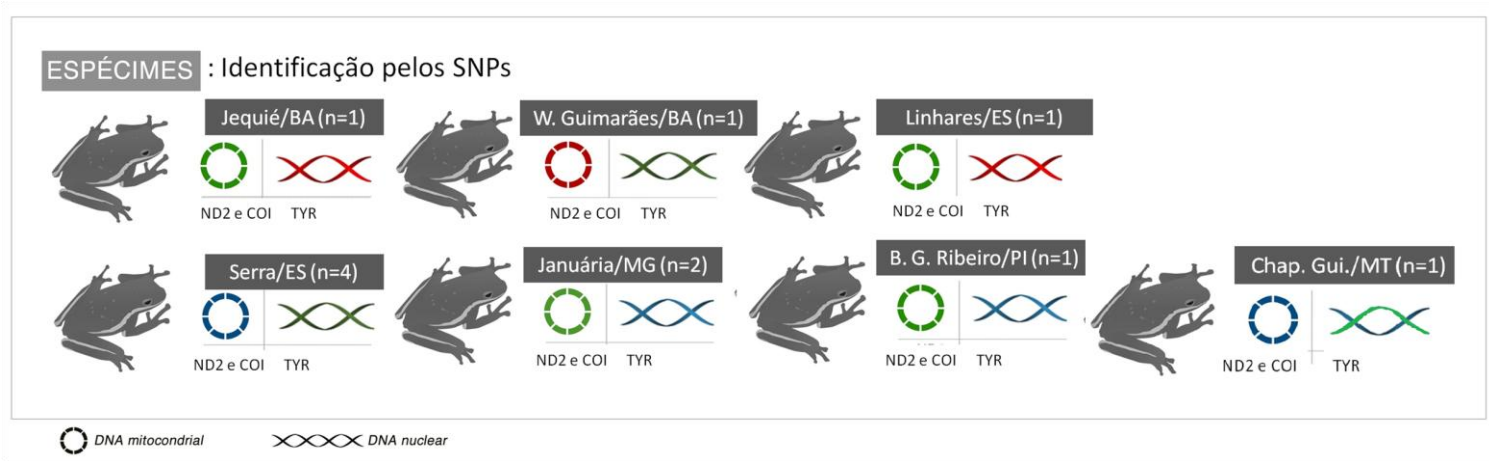


Figura 10. Correspondência dos SNPs espécie-específicos de *T. mesophaeus* (vermelho), *T. typhonius* (azul) e *T. nigromaculatus* (verde) com os indivíduos híbridos em relação ao DNA mitocondrial e DNA nuclear.

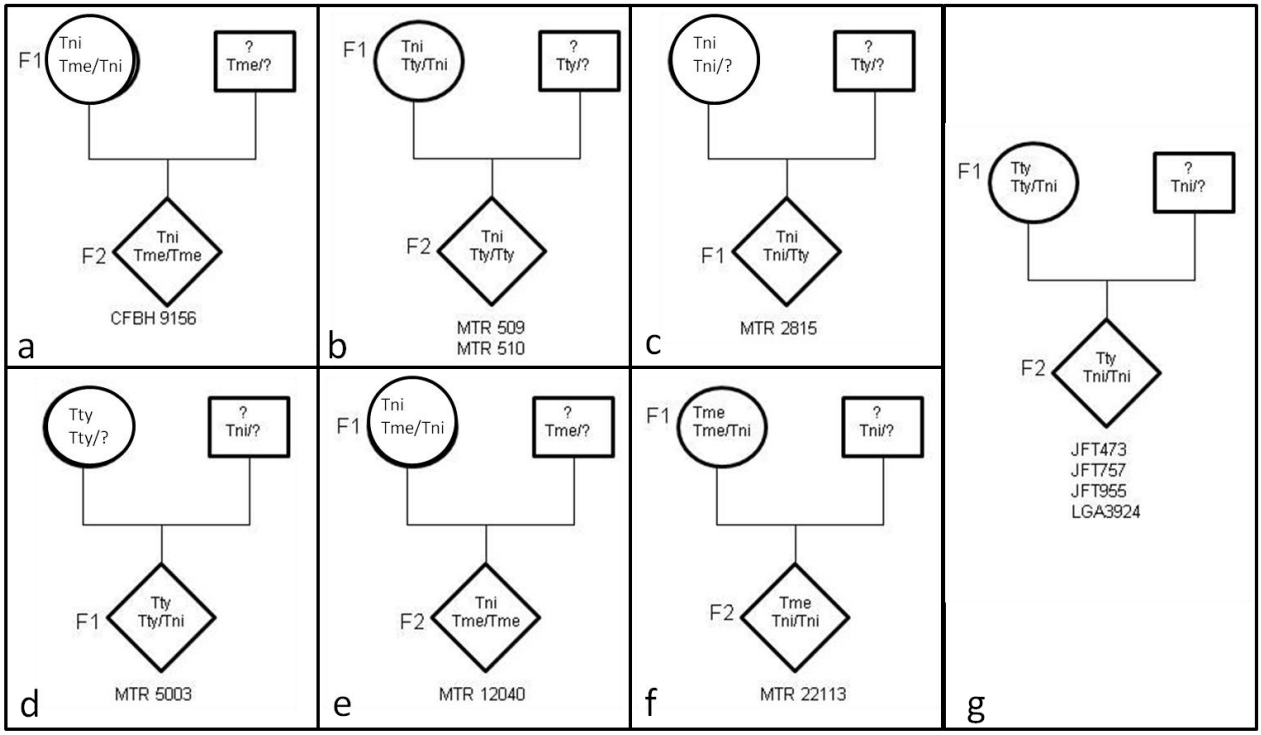


Figura 11. Possíveis heredogramas dos indivíduos híbridos, representados pelos losangos. Os círculos representam o indivíduo materno e o retângulo o paterno. A primeira linha dentro de cada figura geométrica indica o DNAmt e a segunda linha indica o DNAn. As siglas indicam *T. nigromaculatus* (Tni), *T. mesophaeus* (Tme) e *T. typhonius* (Tty). F1 seria primeira geração e F2 seria segunda geração ou posterior.

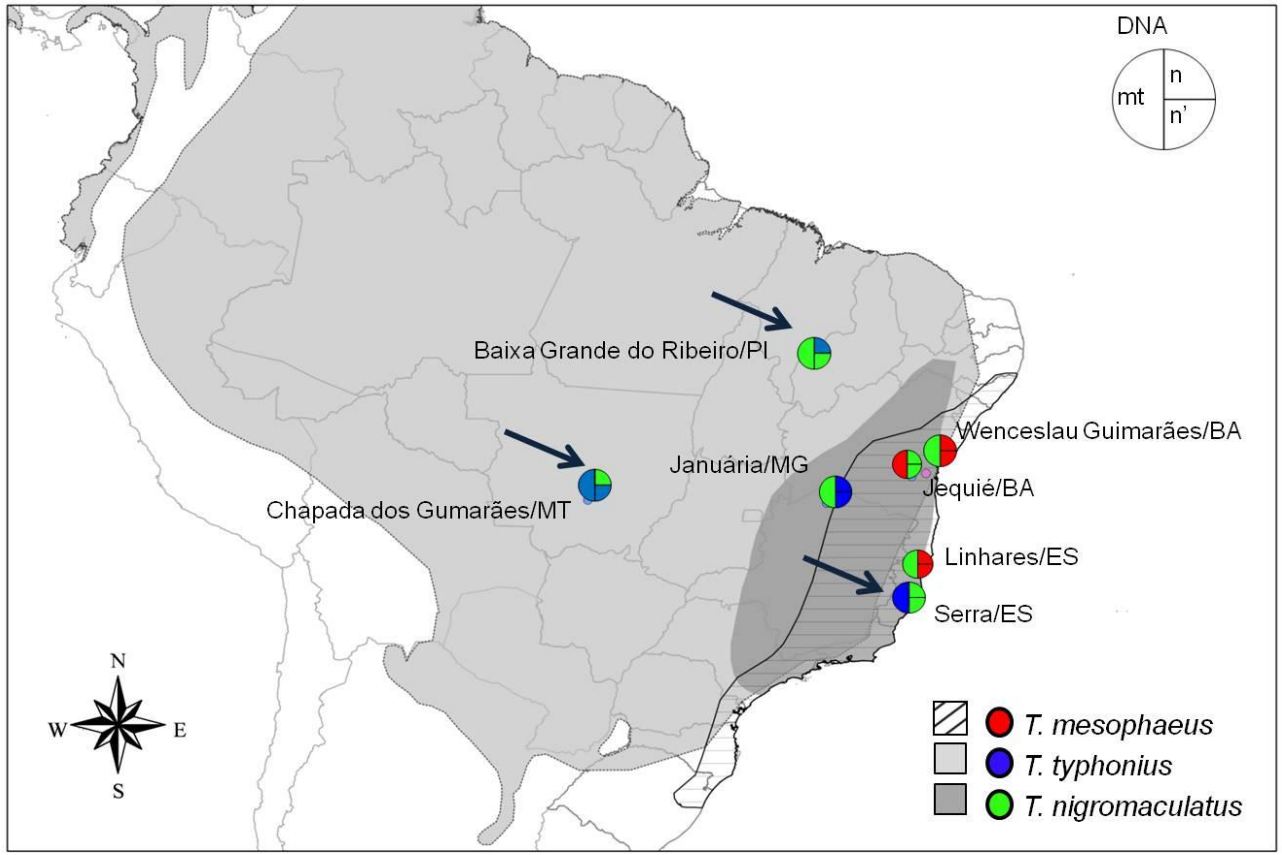


Figura 12. Mapa com distribuições das espécies *T. mesophaeus* (área hachurada), *T. nigromaculatus* (área cinza escura) e *T. typhonius* (área cinza clara), com localidades dos possíveis híbridos (círculos). Destacados pelas setas estão os híbridos em que uma das possíveis espécies parentais não é conhecida para a localidade. No caso dos indivíduos de Baixa Grande do Ribeiro/ PI e Chapada dos Guimarães/MT não ocorre *T. nigromaculatus* e nos indivíduos da Serra/ES não há registros de *T. typhonius* para o Espírito Santo. O genoma dos indivíduos está representado pelas cores das respectivas espécies nos círculos, sendo o lado esquerdo correspondente ao DNAmt e o lado direito os alelos do DNAn.

V. DISCUSSÃO

Identificando assinaturas genéticas para as espécies *T. mesophaeus, T. nigromaculatus* e *T. typhonius*

As abordagens metodológicas utilizadas no presente estudo foram eficazes em identificar assinaturas genéticas das três espécies de *Trachycephalus*. Ou seja, por meio de ferramentas moleculares complementares foi possível identificar características moleculares espécie-específicas que, juntas, permitiram a identificação inequívoca das espécies de *T. mesophaeus, T. nigromaculatus* e *T. typhonius.*

Nas árvores filogenéticas do gene ND2 cada uma das três espécies está representada por um grupo monofilético e com alto suporte. Em contrapartida, o gene COI não apoiou o monofiletismo da espécie *T. mesophaeus* e no gene tirosinase somente a espécie *T. mesophaeus* apresentou suporte estatístico. Numa análise concatenada dos genes, por sua vez, foi possível recuperar as três espécies com alto suporte estatístico, mostrando-se essa como uma eficiente estratégia para estudos de identificação molecular de espécies de *Trachycephalus*.

Nas análises das árvores de genes foram considerados os aspectos da monofilia e suporte estatístico dos clados, porém deve-se levar em consideração que o DNA mitocondrial e o DNA nuclear apresentam características distintas que podem resultar em árvores de genes diferentes das árvores das espécies. De forma geral, árvores de genes mitocondriais tendem a ser mais congruentes com a árvore de espécies do que árvores de genes nucleares, devido ao fato de não haver recombinação no DNA mitocondrial, ao tipo de herança materna, à sua estrutura genética simples, às rápidas taxas de mutações e reduzido tamanho efetivo populacional (N_e) (Moore 1995; Avise 2000; Funk e Omland 2003). Devido às características intrínsecas do DNA nuclear, de apresentar menores taxas de substituição de nucleotídeos e maior tamanho efetivo populacional esse tipo de marcador recupera uma história filogenética mais antiga, pois ele coalesce em um tempo quatro vezes maior que o DNA mitocondrial (Avise 2000; Edwards e Beerli 2000; Moore1995).

Nesse estudo, *T. mesophaeus* foi recuperado como um grupo mais basal e irmão de *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* (*T. mesophaeus* (*T. typhonius* + *T. nigromaculatus*)). Devido

ao fato de *T. mesophaeus* ser a espécie mais basal dentre as três, não é discrepante a observação de esta ter sido a espécie com melhor resolução filogenética na tirosinase (que é um gene nuclear conservado), pois teve mais tempo de acumular mais mutações, o que a torna visivelmente distinta de *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* (Pyron e Wiens 2013) (Figura 13).

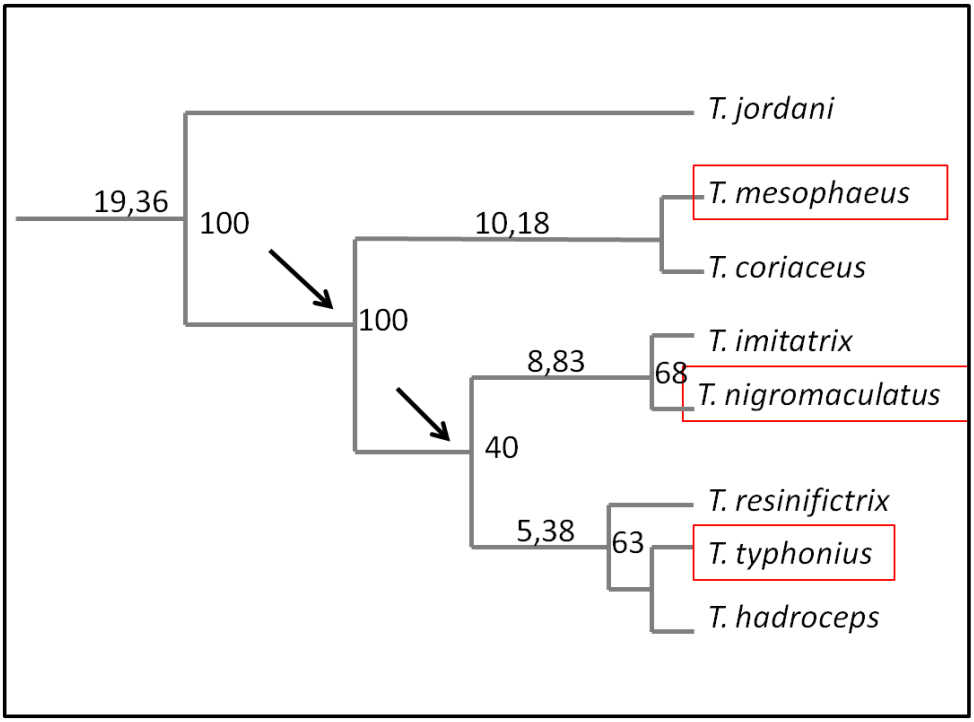


Figura 13. Relações filogenéticas entre oito espécies de *Trachycephalus*, incluindo *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius.* Os valores sobre os ramos são os tempos de divergências dos clados e os valores em frente aos nós são o *bootstrap* da análise de Máxima Verossimilhança (Adaptado de Pyron e Wiens 2013).

A relação entre as espécies de *Trachycephalus* foi congruente com uma proposta filogenética anterior na qual foram utilizadas sequências de três genes mitocondriais e nove exons nucleares (Pyron e Wiens 2013). Nesse estudo foram calculados os tempos de divergência entre as espécies e, assim como no nosso trabalho, *T. mesophaeus* apresentou-se como uma linhagem mais antiga e irmão a *T. nigromaculatus* e *T. typhonius*, que se agruparam como clados irmãos e as espécies mais recentes *T. nigromaculatus* de *T. typhonius* também apresentou baixo suporte na análise de MV. Dessa forma, pode-se sugerir que o resultado encontrado no presente estudo não se deve ao uso de um único marcador nuclear, uma vez que a inclusão de mais genes nucleares do mesmo tipo (exons) não contribuiu para

resolver a separação entre essas duas espécies. Talvez a utilização de outros tipos de marcadores nucleares, como os introns por exemplo, consiga melhorar a detecção de separação entre *T. nigromaculatus* e *T. typhonius.*

Um dos métodos utilizados para identificar limites genéticos entre as espécies foi a distância genética, que é uma medida estatística de quantificação das diferenças genéticas entre grupos. Nos genes mitocondriais foram observados altos valores de distância genética entre as espécies (superiores a 10%) e baixos dentro das espécies (cerca de 2%). As espécies *T. typhonius* e *T. nigromaculatus* apresentaram divergência molecular superior a 12% tanto no COI quanto no ND2, assim como *T. typhonius* e *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus* e *T. mesophaeus*. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os valores de distância genética entre os genes COI e ND2, recomenda-se a utilização de mais de um marcador mitocondrial para acessar os valores de distância genética intra e interespecíficos, pois esses podem apresentar taxas de evolução diferentes.

As distâncias genéticas variaram de acordo com o gene e, no presente estudo, foram congruentes com a literatura que suscita que, em espécies de anuros, estas têm sido consideradas distintas quando apresentam distâncias iguais ou superiores a 10% tanto no gene COI (Vences *et al.* 2005a, Fouquet *et al.* 2007) quanto no gene ND2 (Crawford 2003). Outro gene muito utilizado em estudos de diversidade de anuros é o gene da subunidade maior do DNA ribossomal (rDNA 16S), que assume 5% de divergência entre espécies distintas (Vences *et al.* 2005a; 2005b)

Os valores limites de divergência interespecíficos podem ser usados como uma ferramenta de identificação de espécies caso sejam altos o suficiente para ignorar o intervalo da divergência intraespecífica e baixos o suficiente para poder detectar espécies incipientes ou recentes (Fouquet *et al.* 2007). Apesar de serem bons indicadores preliminares de espécies candidatas (Vences *et al.* 2005a), outros dados devem ser levados em conta na identificação de espécies, não sendo indicado basear-se em apenas um fragmento de DNA, como foi a proposta do *Barcode of Life* (Hebert *et al.* 2003). Por exemplo, em estudo sobre diversidade de anuros, Jansen e colaboradores (2011) encontraram valores de cerca de 3% de divergência no gene rDNA 16S entre algumas populações geograficamente distantes de *Trachycephalus* cf. *typhonius*. Esse valor não indicaria uma nova espécie de acordo com valores de distância conhecidos para o gene rDNA 16S. No entanto, adicionalmente a esse resultado, foi levado

em conta o posicionamento e a distância genética desses indivíduos em análises de Agrupamentos de Vizinhos (*Neighbor-Joining*), levantando a possibilidade de se tratar de um complexo de espécies que divergiram recentemente. A tirosinase não apresentou valores de divergência que permitissem a identificação inequívoca das espécies de *Trachycephalus* aqui estudadas. Fouquet e colaboradores (2007) também obtiveram resultados similares relativos a esse gene ao estudar a diversidade críptica de grupos de anuros neotropicais.

A terminologia *barcode* utilizada na biologia molecular é uma analogia de como é feita a identificação de produtos em lojas por meio de código de barras e foi utilizado pela primeira vez por Hebert e colaboradores (2003), com o objetivo de identificar espécies em larga escala por meio de pequenas sequências de DNA de um mesmo gene (≥500 pares de base). O gene COI foi proposto como *barcode* e na maioria dos casos estudados (>95%) conseguiu identificar corretamente o organismo (Mitchell 2008). No entanto, esse gene pode falhar na descoberta de novas espécies, especialmente se elas divergiram recentemente e não acumularam diferenças fixas em suas sequências do COI; nos casos de hibridização interespecífica e sorteamento incompleto de linhagens (Funk e Omland 2003).

Outro problema na utilização de sequências como *barcode* é a dependência de se ter sequências de referência depositadas no *GenBank* para comparação de similaridade, sendo que é notória a grande quantidade de identificações erradas no mesmo (Shen *et al*. 2013). No entanto, há esforços para tentar identificar esses erros, sendo uma delas o Cold Code (Murphy *et al.* 2013), que é uma iniciativa global de identificar todas as espécies de répteis e anfíbios por meio de código de barras de DNA e procura sugerir correções ao *GenBank.* Deste modo, pode-se dizer que o DNA *barcoding* é útil, não só para identificar espécies, mas pode ter um importante papel em detectar e reparar possíveis erros no *GenBank* (Shen *et al*. 2013).

Um outro método de análise abordado no presente estudo, redes de haplótipos, permitiu visualizar a separação das linhagens correspondentes às espécies. Os haplogrupos referentes às espécies ficaram separados entre si por um elevado número de passos mutacionais (> 40) nos genes mitocondriais, indicando que muitas diferenças genéticas foram acumuladas entre as espécies e evidenciam a separação entre as linhagens. As múltiplas conexões observadas na rede de haplótipos da tirosinase podem ser devido à recombinação nesse gene. Na rede de haplótipos do gene nuclear os haplogrupos das espécies ficaram separados por poucos passos mutacionais e mais uma vez *T. mesophaeus* apresentou-se como

um agrupamento mais distante em relação a *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*, porém as espécies ficaram separadas completamente. Assim como na filogenia e na distância genética, na rede de haplótipos do gene nuclear as espécies *T. typhonius* e *T. nigromaculatus* apresentaram-se proximamente relacionadas.

Uma rede de haplótipos é uma rede filogenética não-enraizada na qual os nós representam haplótipos ou alelos em um grupo de táxons proximamente relacionados ligados entre si de acordo com a similaridade das sequências dos haplótipos (Hudson *et al.* 2010). Por isso, as redes de haplótipos observadas no presente estudo apresentaram resultados semelhantes aos observados nas filogenias. A quantidade de passos mutacionais nos genes mitocondriais que separaram as espécies no presente estudo foi equivalente a outros estudos de espécies congenéricas de anuros (Greenbaum *et al*. 2011) ou maior (Fouquet *et al*. 2007; Bryson *et al.* 2010; Orozco-Terwengel *et al.* 2013)

Verifcou-se ainda que os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes mitocondriais foram eficientes para identificar cada uma das três espécies de *Trachycephalus*, apresentando elevada quantidade de polimorfismos. Os SNPs são promissores marcadores moleculares que representam o tipo mais difundido de variação no DNA em vertebrados (Slate 2009) e por isso vêm sendo amplamente utilizados para a identificação de espécies de interesse econômico (Ackerman *et al*. 2011; Bradbury *et al*. 2011) e também consequentemente assinalar os parentais envolvidos em casos de suspeitas de hibridização (Kalinowski 2010; Lammers *et al*. 2012; Shen *et al.* 2012).

Além da alta divergência interespecífica encontrada no COI, esse gene mostrou um aumento de um terço do número de SNPs em relação ao gene ND2 e, apesar do tamanho da sequência do COI ser menor que o ND2. Com relação à tirosinase, a quantidade de SNPs foi muito pequena, o que já era esperado devido ao fato deste ser um gene nuclear, embora nesse gene tenha sido possível identificar SNPs específicos de *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus*, sendo possível identificar *T. typhonius* somente quando comparado às duas espécies.

Da mesma forma que muitos estudos de identificação de espécies mostraram que se basear em apenas um critério, como morfologia, por exemplo, não é adequado (Lamb e Avise 1987; Mitchell e Samways 2005; Garofalo *et al.* 2012), o presente estudo permite concluir que utilizar sequências de apenas de um gene mitocondrial pode não refletir a diversidade de

espécies de um gênero. O gene COI não seria adequado para a identificação de *T. mesophaeus*, seguindo o critério da monofilia, porém seria considerada uma espécie de acordo com o critério da distância e pelos SNPs. Dessa forma, para resolver problemas taxonômicos, ressalta-se a importância de se utilizar mais de um marcador mitocondrial, de preferência que apresente taxas de evolução mais rápidas que o COI (Che *et al*. 2012), mesmo que geralmente os genes mitocondriais reflitam de forma similar as histórias filogenéticas.

A identificação de SNPs e averiguação das distâncias genéticas mostraram ser boas ferramentas moleculares para a identificação das três espécies de *Trachycephalus.* Além disso, concatenar os genes mostrou ser uma alternativa adequada para dar maior robustez às inferências observadas nas árvores dos genes isolados, uma vez que análises de DNA mitocondrial geralmente são congruentes com análises derivadas de genes nucleares quando há suficiente amostragem dos taxa e análises filogenéticas adequadas são utilizadas (Reyes *et al.* 2004; Kjer e Honeycutt 2007).

O gene ND2 foi o gene que apresentou melhor resolução nas análises filogenéticas, recuperando as três espécies de *Trachycpehalus*. Além dessas características, o ND2 é o único gene com taxa de mutação conhecida para anfíbios, sendo amplamente utilizado em estudos de biogeografia (Crawford 2003; Evans *et al*. 2004; Carnaval e Bates 2007; Tonini *et al.* 2013; Thome *et al.* 2012).

Em estudo recente Zhang e colaboradores (2013) classificaram o gene ND2 como um dos cinco genes mais informativos e que oferecem melhor resolução filogenética em estudos de biodiversidade de anuros, sendo melhor inclusive que os genes rDNA 12S e COI. Neste estudo foi recomendado o gene rDNA 16S como primeira escolha como *barcode* de anfíbios, seguido do ND2, e não a análise conjunta do rDNA 16S e o COI, como previamente proposto por Vences e colaboradores (2005). Dessa forma, o presente estudo comprovou as vantagens de se utilizar o gene ND2 em relação ao COI, recomendando-se a ampla utilização desse gene em estudos acerca da biodiversidade de anuros.

A delimitação das espécies no presente estudo foi baseada em critérios que evidenciassem a separação de linhagens, seguindo o conceito de espécie de De Queiroz (2007) que prediz que espécies são linhagens que evoluem separadamente de outras linhagens. Os critérios operacionais ou linhas de evidência relevantes para avaliar a separação

de linhagens foram a monofilia recíproca, divergência genética, distância de haplogrupos e identificação de SNPs espécie-específicos. Segundo os critérios abordados pode-se concluir que *T. mesophaeus*, *T. nigromaculatus* e *T. typhonius* são espécies distintas, por apresentarem evidências que cada uma corresponde a uma linhagem que evolui independentemente.

Trachycephalus typhonius da Foz do rio Amazonas

Dois exemplares do Pará, um da Ilha de Marajó e outro de Oriximiná (aqui denominados Clado Marajó), identificados pelos coletores como *T. typhonius*, apresentaram características genéticas que os diferenciaram dos demais *T. typhonius*.

Na árvore filogenética dos genes concatenados recuperou-se esse clado como um grupo irmão aos demais exemplares de *T. typhonius*, com um ramo profundo separando-os de todos os outros exemplares e com altos valores de suporte e probabilidades posteriores (ambos acima de 95). Além disso, ao analisar as sequências para identificar SNPs espécie-específicos esses indivíduos apresentavam nucleotídeos distintos de todos os outros *T. typhonius*. Se esses dois indivíduos tivessem sido retirados da amostra, teriam sido amostrados vinte SNPs a mais no ND2, seis no COI e na tirosinase não haveria alterações.

Na rede de haplótipos do gene ND2 o clado Marajó apresentou distância de 31 passos mutacionais dos demais *T. typhonius*, o que foi equivalente à quantidade de passos mutacionais que separou *T. mesophaeus* de *T. nigromaculatus* (36 passos mutacionais). Por outro lado, no gene COI foi analisado o indivíduo da Ilha de Marajó e não foi observada essa disparidade de passos mutacionais dentro do haplogrupo de *T. typhonius* (4 passos). Nos testes de divergência genética considerando essas duas amostras como um grupo à parte os resultados indicaram 9% de divergência em relação aos demais *T. typhonius* no gene ND2, 2% no COI e 1% no TYR. Essas duas amostras contribuem com 30% da diversidade de *T. typhonius* no ND2 e 10% no COI.

Estudos envolvendo o gene COI sugeriram para anfíbios o valor de 10% para divergência entre espécies, porém seriam aceitáveis valores menores para espécies proximamente relacionadas (Vences *et al.* 2005a, Vences *et al*. 2005b; Fouquet *et al.* 2007).

Uma possível interpretação é de que esses exemplares do clado Marajó correspoindam a *T. hadroceps* (Duellman e Hoogmoed, 1992), uma espécie-irmã de *T. typhonius*, com ocorrência na Guiana, Guiana Francesa e Suriname (Frost 2014), que ficam próximos à foz do rio Amazonas, onde os exemplares do clado Marajó foram coletados.

No entanto, recentemente foram descritas duas novas espécies amazônicas de *Trachycephalus*, que até então eram consideradas variações morfológicas de *T. resinifictrix* (Goeldi, 1907) e *T. hadroceps*. As descrições das espécies *T. cunauaru* (Gordo *et al.* 2013) e *T. helioi* (Nunes *et al.* 2013) foram baseadas em características morfológicas e de vocalização, embora em ambos os casos não tenham sido utilizados dados genéticos, o que poderia contribuir para a identificação dos exemplares do clado Marajó.

No entanto, a verificação da morfologia dos exemplares do clado Marajó poderá sanar essas dúvidas e, se confirmadas as identidades dos indivíduos, poderá aumentar a quantidade de localidades em que essas novas espécies de *Trachycephalus* são conhecidas.

Esses resultados mostram que a identificação morfológica pode estar mascarando mais de uma unidade evolutivamente significativa, e que dados moleculares devem ser analisados com cautela, principalmente quando podemos estar tratando de espécies que divergiram recentemente, não sendo adequado nos atermos a valores fixos de divergência genética determinados.

Hibridação em *Trachycephalus*

Pela primeira vez na literatura verificou-se a introgressão de espécies de *Trachycephalus* baseando-se de dados obtidos exclusivamente por estudos moleculares. Mais especificamente encontramos que: i) as três espécies são altamente divergentes em nível mitocondrial, o que foi observado no DNA nuclear somente para *T. mesophaeus* e ii) as discordâncias entre o DNAmt e o DNAn são mais facilmente explicáveis pela hibridização interespecífica (atual ou pretérita) e não pela retenção de polimorfismos ancestrais (*Incomplete Lineage Sorting*, ILS).

Quando a divergência entre as espécies é antiga é esperado que as genealogias reflitam a história de divergência entre as espécies. No entanto, são frequentes os casos em

que as genealogias não refletem a história de divergência esperada (Nunes *et al.* 2010; Zielinski *et al*. 2013). Um processo que tem a capacidade de modificar de maneira contundente e parcialmente apagar a assinatura genética de isolamento pretérito é a hibridização, um processo comum para aproximadamente 25% das plantas e 10% dos animais (Mallet 2005). Ao considerar espécies como linhagens distintas em níveis populacionais ou metapopulacionais (Mayden 1997; de Queiroz 2007) admite-se que possa ocorrer hibridização e fluxo gênico entre espécies desde que esses fenômenos sejam suficientemente raros de modo que a linhagens evolutivas independentes não se fundam em uma só linhagem. A hibridização, em particular, ocorre provavelmente durante os primeiros estágios da especiação, quando as espécies recém-separadas ainda não acumularam diferenças suficientes para prevenir seu intercruzamento (Wu e Ting 2004).

O ILS ocorre quando vários eventos de especiação ocorrem em curto período de tempo e se, para algum gene, o polimorfismo ancestral não for completamente resolvido em duas linhagens monofiléticas quando a segunda especiação ocorrer, então há a possibilidade da árvore de genes ser diferente da árvore de espécies (Tajima 1983; Pamilo e Nei 1988). O ILS em nível de espécie resulta em uma espécie sendo parafilética ou polifilética em uma árvore de genes (Funk e Omland 2003). Dessa forma, se um determinado gene em estudo não tiver alcançado a coalescência em nível de espécie, algumas linhagens de uma espécie podem ficar mais proximamente relacionadas a linhagens de outra espécie que não a sua. Esse problema é particularmente pronunciado em espécies que divergiram recentemente ou em genes de evolução lenta, como muitos genes nucleares (Chen *et al.* 2009).

Dentre os onze indivíduos que se mostraram inconsistentes com a identificação da linhagem materna e paterna nos genes mitocondriais e nuclear, somente os quatro indivíduos da Serra, Espírito Santo, apresentaram identificação morfológica prévia dúbia ou intermediária. Essa característica foi levantada por Hubbs (1955) como uma "regra quase universal de que híbridos interespecíficos são intermediários entre suas espécies parentais em todas as características que as diferem" e se tornou uma ferramenta morfométrica padrão para avaliar suspeitas de hibridização em muitas espécies. No entanto, estudos demonstraram que caracteres morfológicos usados para distinguir espécies parentais podem não ser uniformemente intermediários em híbridos, sendo que a prole pode apresentar maior

similaridade com uma das espécies parentais (Wu *et al*. 2011). Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que analisar somente a morfologia pode levar à conclusões premeditadas sobre a existência de indivíduos híbridos, que na verdade podem representar variações morfológicas intraespecíficas (Garofalo *et al.* 2012) e que ferramentas moleculares são fundamentais para desvendar histórias evolutivas complexas entre espécies (Machado e Hey 2003; Good *et al*. 2008; Sequeira *et al.* 2011; Thomé *et al.* 2012; Zielinski *et al*. 2013).

A primeira hipótese era que esses indivíduos de *Trachycephalus* de morfologia intermediária fossem híbridos entre *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus*, por essas serem as únicas espécies do gênero com registro no Espírito Santo (Almeida *et al.* 2011) e por existirem relatos de indivíduos morfologicamente intermediários entre essas espécies em local onde ocorrem em simpatria (Ramos e Gasparini 2004).

No entanto, as análises do presente estudo confirmaram que esses espécimes apresentam DNA mitocondrial de *T. typhonius*, como previamente indicado por Matedi e colaboradores (2010), o que é um fato curioso já que essa espécie ocorre em todos os estados brasileiros, exceto o Espírito Santo (Haddad *et al*. 2013). Essa provável ausência de registros pode ser devido à falta de um maior esforço amostral, já que é intrigante explicar como uma espécie que ocorre desde o México até o norte da Argentina não esteja presente somente nos limites geográficos do estado do Espírito Santo, com registro nos estados vizinhos.

Dessa forma, a explicação mais parcimoniosa baseada nas evidências morfológicas (características intermediárias) e moleculares (identificação nuclear de *T. nigromaculatus* pelos SNPs e árvore filogenética) favorece a explicação que as incongruências citonucleares observadas nos indivíduos da Serra, Espírito Santo, sejam devido à hibridização introgressiva de *T. typhonius* e *T. nigromaculatus*. Além disso, a morfologia intermediária é um indício de hibridização recente, portanto, isso levaria a crer que existe *T. typhonius* no Espírito Santo, apesar de indivíduos "puros" ainda não terem sido registrados no estado.

Além dos quatro indivíduos do Espírito Santo, outros sete indivíduos cujas amostras de tecidos foram doadas por pesquisadores foram identificados como potenciais híbridos, por serem identificadas espécies parentais diferentes no DNA mitocondrial e no DNA nuclear. Esses indivíduos não apresentavam morfologia duvidosa, informação confirmada com os curadores das coleções. Esse resultado poderia ser um indício de que esses indivíduos seriam

híbridos introgressivos, ou seja, que retrocruzaram com suas espécies parentais e tiveram suas características morfológicas deslocadas para um extremo.

As espécies *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus* ocorrem em simpatria nas localidades das amostras CFBH9156 (Jequié-Bahia) e MTR12040 (Linhares-Espirito Santo). Nesses dois exemplares o DNAmt identificado foi de *T. nigromaculatus* e o DNAn foi de *T. mesophaeus.* Nesses casos a hipótese de hibridização é favorecida em relação à ILS, pois distribuições simpátricas favorecem cruzamentos interespecíficos (Donnelly *et al*. 2004). Além disso, se fosse o caso de ILS, o padrão de compartilhamento de haplótipos entre essas duas espécies deveria ser encontrado uniformemente nessas regiões de simpatria (Ballard 2000), o que não foi observado nas demais amostras de Linhares, Jequié e proximidades Além disso, o clado correspondente à *T. mesophaeus* foi o que apresentou maior confiabilidade estatística nas análises filogenéticas e mais características moleculares que permitiram diferencia-la das demais espécies no gene nuclear (i.e. mais SNPs espécie-específicos e maior divergência em relação às outras espécies).

Foi identificado um exemplar (MTR22113) com DNAmt de *T. mesophaeus* e DNAn de *T. nigromaculatus* em Wenceslau Guimarães, que fica a cerca de 100km de Jequié, Bahia. Nesse caso também as possíveis espécies parentais ocorrem em simpatria e a hipótese de introgressão é favorecida em relação à ILS. Com isso, pode-se concluir que ocorre introgressão bidirecional entre as espécies *T. mesophaeus* e *T. nigromaculatus.*

Três indivíduos foram identificados com DNAmt de *T. nigromaculatus* e DNAn de *T. typhonius*, sendo um do Piauí (MTR2815) e dois de Minas Gerais (MTR509 e MTR510). Não há registros de *T. nigromaculatus* no Piauí, porém, a ocorrência dessa espécie é conhecida nos estado da Bahia e Pernambuco (Haddad *et al.* 2013), que são adjacentes ao Piauí, sendo provável que essa espécie ocorra na localidade onde o potencial híbrido foi coletado. Nesse indivíduo, os alelos nucleares agruparam-se com espécies distintas (*T. nigromaculatus* e *T. typhonius*), o que pode sinalizar que se trata de um indivíduo da primeira geração F1. Os indivíduos de Januária, Minas Gerais, ocorrem em área de simpatria entre as potenciais espécies parentais, o que pode apoiar a hipótese de hibridização. Como foi identificada a situação citonuclear inversa nos espécimes da Serra, ES, pode-se sugerir que ocorre introgressão bidirecional entre as espécies *T. typhonius* e *T. nigromaculatus.*

O exemplar MTR5003 da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, apresentou DNAmt de *T. typhonius*, enquanto que um alelo do DNAn agrupou-se com *T. nigromaculatus* e o outro com *T. typhonius*, o que pode também sinalizar que se trata de um indivíduo F1. No entanto, nesse caso, não há registro de ocorrência de *T. nigromaculatus* no Mato Grosso, mas há registros para Goiás, que é adjacente ao Mato Grosso (Haddad *et al.* 2013). Dessa forma, é possível que essa espécie ocorra na localidade onde o potencial híbrido foi coletado.

Os resultados do presente estudo reforçam que a não-monofilia tanto em genes nucleares como em mitocondriais é mais comum do que é geralmente reconhecido (Funk e Omland 2003; Broughton e Harrison 2003; Machado e Hey 2003; Sequeira *et al.* 2011; Thomé *et al.* 2012).

Hibridização é o cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes (F1) e introgressão é a transferência de genes entre espécies mediada primariamente por retrocruzamentos (F2 ou posterior). A hibridização introgressiva tem sido o foco de estudos evolutivos por muitas décadas e um dos maiores desafios teóricos acerca do tema é provar que o padrão observado de compartilhamento de alelos entre espécies é produto de introgressão e não um processo não contemporâneo, como o sorteamento incompleto de polimorfismos ancestrais (Twyford e Enos 2012).

Apesar de um rigoroso enfoque estatístico ser geralmente necessário para distinguir retenção de polimorfismo ancestral de introgressão (Peters *et. al*. 2007), três abordagens principais têm sido comumente usadas para delinear as hipóteses conflitantes quando os pré-requisitos para um teste estatístico não são atendidos (i. e. poucas amostras por população) e foram sumarizados por Zakharov (2009):

1. *Examinar a topologia das árvores do DNA mitocondrial serve como um método heurístico para revelar a causa da parafilia (Baker et al. 2003). Pouca divergência, com pouca resolução e ausência de clados distintos indicam retenção de polimorfismo ancestral ou especiação recente.* No presente estudo os clados do ND2 apresentaram-se bem distintos, com alto suporte e com ramos profundos, além de as espécies apresentarem alta divergência genética entre elas.
2. *A comparação entre árvores de DNA nuclear e DNA mitocondrial geralmente apoiam a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral se padrões de*

polimorfismos compartilhados e parafilia forem observados entre os genomas (Ballard 2000). No presente estudo foram observados padrões de polimorfismos compartilhados e parafilia entre o DNAn e DNAmt, sendo que os indivíduos discordantes nas análises foram pontuais na amostra.

3. *A hipótese de hibridização é favorecida em relação à retenção de polimorfismo ancestral se distribuições simpátricas permitirem cruzamentos interespecíficos (Donnelly et al. 2004).* Na maioria dos casos observados no presente estudo as espécies envolvidas ocorrem em simpatria.

Dessa forma, os resultados de incongruências no DNAmt e DNAn identificados em alguns indivíduos de *Trachycephalus* encontram grande apoio para serem interpretados como hibridização introgressiva bidirecional, tendo *T. nigromaculatus* como o parental em comum aos híbridos de *T. mesophaeus* e *T. typhonius.* Os indivíduos introgressivos foram identificados em áreas que as espécies ocorrem em simpatria (ou são potencialmente simpátricas) e, em grande parte dos casos, não teriam sido descobertos, se não fosse a identificação molecular.

Conclusões

1. *Trachycephalus mesophaeus, T. nigromaculatus* e *T. typhonius* são espécies distintas bem caracterizadas geneticamente e atenderam aos critérios estipulados para testar a validade das espécies.
2. Para estudos de identificação molecular no gênero *Trachycephalus* não se recomenda a utilização do gene COI, devido à dificuldade em recuperar as três espécies somente com esse gene. Por outro lado, o gene ND2, que não é o mais usado para estudos em anuros, foi o gene que melhor contribuiu para o entendimento das relações entre os indivíduos e as espécies.
3. A utilização da tirosinase, que é um gene de evolução lenta, apresentou bons resultados nas análises concatenadas. Quando analisado isoladamente esse gene diferenciou com clareza *T. mesophaeus* das demais espécies, provavelmente por essa ser a espécie mais antiga das três, e não apresentou

resolução estatística da separação das espécies *T. nigromaculatus* e *T. typhonius*, que são espécies mais recentes.

4. Para a identificação de indivíduos sugere-se a utilização de marcadores nucleares mais conservados (i. e. tirosinase) e mais variáveis (introns ou microsatélites, por exemplo), com diferentes taxas de mutação e que, em conjunto possam refletir a história das espécies.
5. Os SNPs foram altamente eficientes em identificar as espécies e potenciais híbridos. Essa ferramenta é pouco utilizada em estudos com anfíbios e recomenda-se sua identificação em genes nucleares e mitocondriais.
6. No caso de identificação de DNAn de *T. mesophaeus* a hipótese de hibridação foi apoiada indubitavelmente por todas as análises no presente estudo. Quando identificadas as espécies *T. nigromaculatus* ou *T. typhonius* no DNAn, todas as metodologias abordadas tiveram que ser levadas em consideração, sendo que o conjunto dos dados foram informativos, principalmente os SNPs.
7. A identificação de indivíduos híbridos F1 (primeira geração) e introgressivos (gerados por retrocruzamento) em *Trachycephalus* em localidades onde não há registros de uma das espécies parentais ampliam o panorama para estudos evolutivos e biogeográficos nesse gênero.
8. A morfologia deve ser usada como um critério preliminar para identificação de híbridos, sendo inclusive um indicativo de hibridização recente. Porém, onde espécies proximamente relacionadas ocorrem em simpatria a hibridização introgressiva, pode estar difundida de tal forma que somente análises mais refinadas poderão detectar esses eventos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman MW, Habicht C, Seeb LW (2011) Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) under Diversifying Selection Provide Increased Accuracy and Precision in Mixed-Stock Analyses of Sockeye Salmon from the Copper River, Alaska, Transactions of the American Fisheries Society, 140:3, 865-881.

Almeida AP, Gasparini JL, Peloso PLV (2011) Frogs of the state of Espírito Santo, southeastern Brazil - The need for looking at the 'coldspots'. *Check List* 7(4): 542-560.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) A basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Angulo A, Reichle S (2008) Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zool J Linnean Soc*, 152:59–77.

Austin JD, Gorman TA, Bishop D, Moler P (2011) Genetic evidence of contemporary hybridization in one of North America's rarest anurans, the Florida bog frog. *Anim Conserv* 14: 553–561.

Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.

Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York (511 pp.).

Azevedo MFC, Foresti F, Ramos PRR, Jim J (2003) Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus, B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Genet Mol Biol* 26(3): 289-294.

Baker JM, Lopez-Medrano E, Navarro-Siguenza AG, Rojas-Soto OR, Omland KE (2003) Recent speciation in the Orchard Oriole group: divergence of *Icterus spurius spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. *Auk* 120: 848–859.

Ballard JWO (2000) When one is not enough: introgression of mitochondrial DNA in *Drosophila. Mol Biol Evol* 17: 1126–1130.

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16 (1):37-48.

Bickford D, Lohman DJ, Navjot SS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22:148-155.

Bossuyt F, Milinkovitch FC (2000) Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proc Natl Acad Scienc* 97(12): 6585–6590.

Bradbury IR, Hubert S, Higgins B, Bowman S, Paterson IG, Snelgrove PVR, Morris CJ, Gregogy RS, Hardie DC, Borza T, Bentzen P (2011) Evaluating SNP ascertainment bias and its impact on population assignment in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Mol Ecol Resour* 11 (Suppl. 1), 218–225.

Broughton R, Harrison R (2003) Nuclear gene genealogies reveal historical, demographic and selective factors associated with speciation in field crickets. *Genetics* 163(4):1389-1401.

Bruford MW, Hanotte, O; Brookfield JFY, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *In*: Hoelzel, A. R. (Ed.). *Molecular genetics analyses of populations*: A practical Approach. Oxford, 225-269p.

Bryson RW, Nieto-Montes de Oca N, Jaeger JR, Riddle BR (2010) Elucidation of cryptic diversity in a widespread Nearctic treefrog reveals episodes of mitochondrial gene capture as frogs diversified across a dynamic landscape. *Evol* 64:2315–2330.

Carnaval ACOQ, Bates JM (2007) Amphibian DNA Shows Marked Genetic Structure and Tracks Pleistocene Climate Change in Northeastern Brazil. *Evol* 61-12: 2942–2957.

Catroli GF, Kasahara S (2009) Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia: Anura): results and perspectives. *UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde* 15: 67-86.

Che J, Chen H, Yang J, Jin JQ, Jiang K, Yuan Z, Murphy RW, Zhang Y (2012) Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Mol. Ecol. Resources* 12: 247–258.

Chen W, BI K, Fu J (2009) Frequent mitochondrial gene introgression among high elevation Tibetan megophryid frogs revealed by conflicting gene genealogies. *Mol Ecol* 18, 2856–2876.

Crawford AJ (2003) Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol Ecol* 12: 2525–2540.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 772.

de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. Systematic Biology 56(6):879-886.

Diaz LM, Hedges SB e Schimid M (2012) A new cryptic species of the genus *Eleutherodactylus* (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from Cuba. *Zootaxa* 3220: 44–60.

Donnelly MJ, Pinto J, Girod R, Besansky NJ, Lehmann T (2004). Revisiting the role of introgression *vs* shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Heredity* 92: 61–68.

Edwards SV, Beerli P (2000) Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. Evol 54(6), pp. 1839–1854.

Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC (2004) A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. Mol Phylogenet Evol 33:197–213.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*. 3, 294–299.

Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M e Gemmel NJ (2007) Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *Plos One Issue* 10.

Frost DR (2014). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Acesso em 5 março 2014). Electronic Database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, USA.

Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 34, 397–423.

Funk W, Carminer M, Ron SR (2011) High levels of cryptic diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc Roy Soc Lond B.*, 279 (1734) pp. 1806–1814.

Garofalo L, Zaccaroni A, Scaravelli D, Insacco G, Zangrilli MP, Novelletto A, Lorenzini R (2012) Morphology vs Genetics: the hybrid origin of a sea turtle disproved by DNA. *Medit. Mar. Sci*., 13(2): 239-242

Good JM, Hird S, Reid N, Demboski JR, Steppans SJ, Martin-Nimss T, Sullivan J (2008) Ancient hybridization and mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Mol Ecol* 17, 1313–1327.

Gordo M, Toledo LF, Suaréz P, Kawashita-Ribeiro RA, Ávila RW, Morais DH e Nunes I (2013). A New Species of Milk Frog of the Genus *Trachycephalus* Tschudi (Anura, Hylidae) from the Amazonian Rainforest. *Herpetol* 69(4):466-479.

Greenbaum E, Smith EN, de Sá RO (2011) Molecular systematics of the Middle American genus Hypopachus (Anura: Microhylidae). *Mol Phylogenet Evol* 61:265–277.

Gruber SL, Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (2013) Cytogenetic analysis of *Phyllomedusa distincta* Lutz, 1950 (2n = 2x = 26), *P. tetraploidea* Pombal and Haddad, 1992 (2n = 4x = 52), and their natural triploid hybrids (2n = 3x = 39) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). BMC Genetics 14:75.

Guindon S, Dufayard JF, Anisimova M, Hordjik W and Gascuel O (2010) PhyML 3.0: New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3):307-21.

Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D, Gasparini JL, Sazima I (2013) *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica* - Diversidade e Biologia. Anolis Books Editora. 544 p.

Haddad CFB, Pombal JP, Batistic RF (1994). Natural Hybridization between Diploid and Tetraploid Species of Leaf-Frogs, Genus Phyllomedusa (Amphibia). J *Herpetol* 28 (4): p.425.

Haddad CFB, Cardoso AJ e Castanho LM (1990). Hibridação Natural Entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). *Rev Bras Biol*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 50(3): 739-744.

Hebert PDN, de Waard JR e Landry JF (2010) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol. Lett*. 6: 359–362.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL e de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B* 270: 313–321.

Hubbs CL (1955). Hybridization between fish species in nature. *Syst. Zool*. 4: l-20.
Hudson DH, Rupp R, Scornavacca C (2010) *Phylogenetic Networks: Concepts, Algorithms and Applications.* Cambridge: Cambridge University Press.

Jansen M, Bloch R, Schulze A, Pfenninger M (2011). Integrative inventory of Bolivia's lowland amphibians reveals hidden diversity. *Zool Scr* 40 (6): 567–583.

Kalinowski ST (2010) How to use SNPs and other diagnostic diallelic genetic markers to identify the species composition of multi-species hybrids. *Conservation Genet Resour* 2:63–66.

Kieswetter CM, Schneider CJ (2013) Phylogeography in the northern Andes: Complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, Pristimantis w-nigrum (Craugastoridae). *Mol Phylogenet Evol* 69: 417–429.

Kjer KM, Honeycutt RL (2007) Site specific rates of mitochondrial genomes and the phylogeny of eutheria. BMC Evol Biol 7:8

Lamb T, Avise JC (1987) Morphological Variability in Genetically Defined Categories of Anuran Hybrids. *Evol* 41: 157-165.

Lamb T, Avise JC (1986). Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of treefrogs: the influence of mating behavior. *Proc of the National Academy of Sciences*, USA.

Lammers Y, Kremer D, Brakefield PM, Groenenberg DSJ, Pirovanos W, Schilthuizen M (2012) SNP genotyping for detecting the 'rare allele phenomenon' in hybrid zones. *Mol Ecol Resour* 13:237–242.

Librado P, Rosas J (2009) DNAsp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinf* 25:1451-1452.

Lode T., Pagano A. (2000) Variations in call and morphology in male water frogs: Taxonomic and evolutionary implications. *C. R. Acad. Sci. III* (323): 995–1001.

Machado CA, Hey J (2003) The causes of phylogenetic conflict in a classic *Drosophila* species group. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 1193-1202.

Mallet J (2008) Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 2971–2986.

Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol*. 20,

229–237.

Mattedi C, Tonini JF, Nunes R, Gasparini JL, Costa LP (2010). Análises filogenéticas de possíveis híbridos do gênero *Trachycephalus* (Anura, Hylidae). *In*: Resumos do *II Simpósio de Genética e Biologia Molecular do Espírito Santo*, Vitória.

Mayden RL (1997) *A hierarchy of species concepts: the denoument in the saga of the species problem*. In: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR Wilson (eds.), Species: The units of diversity, London: Chapman and Hall, 381-423.

Medina I, Wang IJ, Salazar C, Amézquita A (2013) Hybridization promotes color polymorphism in the aposematic harlequin poison frog, *Oophaga histrionic*. *Ecol Evol* in press.

Mitchell A (2008) DNA barcoding desmistifyed. *Austr J Entomol* 47:169–173.

Mitchell A, Samways MJ (2005) DNA evidence that the morphological 'forms' of Palpopleura lucia (*Drury*) are separate species (Odonata: Libellulidae). *Odonatologica* 34: 173-178.

Moore W (1995) Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-GeneTrees. *Evol* 49:4 pp. 718-726.

Murphy RW, Crawford AJ, Bauer AM, Che J, Donnellan SC, Fritz U, Haddad CFB, Nagy ZT, Poyarkov NA, Vences M, Wang WZ, Zhang YP (2013) Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. *Mol Ecol Resour* 13:161–167.

Nunes I, Suaréz P, Gordo M, Pombal Junior JP (2013) A second species of *Trachycephalus* Tschudi (Anura: Hylidae) with a single vocal sac from the Brazilian Amazon. *Copeia* 4: 634–640.

Nunes MDS, Orozco-Terwengel P, Kreissl M, Schloterer C (2010) Multiple hybridization events between *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana* are supported by mtDNA introgression. *Mol Ecol* 19: 4695–4707.

Parham JF, Papenfuss TJ, van Dijk, Wilson BS, Marte C, Schettino LR, Simison WB (2013) Genetic introgression and hybridization in Antillean freshwater turtles (*Trachemys*) revealed by coalescent analyses of mitochondrial and cloned nuclear markers. *Mol Phylogenet Evol* 67:176–187.

Oliver LA, Rittmeyer EN, Kraus F, Richards SJ e Austin CC (2013) Phylogeny and phylogeography of *Mantophryne* (Anura: Microhylidae) reveals cryptic diversity in New Guinea. *Mol Phylogenet Evol* 67: 600–607

Orozco-Terwengel PF, Andreone ELJ, Vences M (2013) Mitochondrial introgressive hybridization following a demographic expansion in the tomato frogs of Madagascar, genus *Dyscophus*. *Mol Ecol* 22: 6074–6090.

Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Mol Biol Evol* 5(5):568-83.

Paterson HE (1993). *Evolution and the recognition concept of species: collected writings.* S. F. McEvey (Ed.). Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Peters JL, Zhuravlev Y, Fefelov I, Logie A, Omland K (2007). Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evol* 61: 1992–2006.

Pough FH, Harris CM e Heiser JB (2003*) A vida dos vertebrados*. 3ed. Ed Atheneu. São Paulo.

Ramos AD, Gasparini JL (2004) *Anfíbios do Goiapaba-Açu, Fundão, Estado do Espírito Santo*. Gráfica Santo Antônio, Vitória, 75p.

Reyes A, Pesole G, Saccone C (2004) Congruent Mammalian Trees from Mitochondrial and Nuclear Genes Using Bayesian Methods. *Mol Biol Evol* 21(2):397–403.

Rohl A (2000) Network: Phylogenetic Network Analysis, v.3.1.1.1 Fluxus Technology, Ltd: Germany.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinf* 19(12):1572-4.

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:1805–1811.

Sequeira F, Sodré D, Ferrand N, Bernardi JAB, Sampaio I, Schneider H e Vallinoto M (2011) Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads Rhinella marina and R. schneideri inferred from mtDNA and nuclear markers. *BMC Evol Biol* 11:264.

Shen YY, Che X, Murphy RW (2013) Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. *PLOS One* 8: 2.

Slate J, Gratten J, Beraldi D, Stapley J, Hale M e Pemberton JM (2009) Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genet* 136:97–107.

Stephens M, Donnelly (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. Am Journal of Human Genetics, 73, 1162-1169.

Stephens M, Smith N, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. American Journal of Human Genetics, 68, 978-989.

Suarez P (2010) *Estudos cromossômicos em anuros das famílias Hylidae Rafinesque, 1815 e Leptodactylidae Werner, 1896 (Amphibia: Anura)*. Tese (Doutorado em Zoologia) Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará. Belém, Pará.

Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M e Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Thomé MTC, Zamudio KR, Haddad CFB e Alexandrino J (2012) Delimiting genetic units in Neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. *BMC Evol Biol* 12:242.

Tonini JFR, Costa LP, Carnaval ACOQ (2013). Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. *J Zool Systemat Evol Resear* v51.

Tonini JFR, Mendonça IS, Coutinho AB e Gasparini JL (2011) Anurans from Costa Bela, state of Espírito Santo, southeastern Brazil: inventory at an urban area and the re-discovery of *Allobates* in the state. *Herpetol Notes* 4: 435-444.

Twyford AD, Enos RA (2012) Next generation hybridization and introgression. Heredity 108:179–189.

Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR (2005a) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. Phil. Trans. R. Soc. B 360: 1859–1868.

Vences M., Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005b) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in Zoology 2:5.

Vieira KA (2010). *Análise filogenética de* Sphaenorhynchus *Tschudi, 1838 (Anura: Hylidae)*. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Kohler J, Glaw F e Vences M (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. PNAS 106: 20.

Zhang P, Liang D, Mao RL, Hillis DM, Wake DB, Cabbatella DC (2013) Efficient Sequencing of Anuran mtDNAs and a Mitogenomic Exploration of the Phylogeny and Evolution of Frogs. *Mol Biol Evol* 30(8):1899–1915.

Zakharov EV, Lobo NF, Nowak C, Hellman JJ (2009) Introgression as a likely cause of mtDNA paraphyly in two allopatric skippers (Lepidoptera: Hesperiidae). Heredity 102: 590–599.

Zielinski P, Nadachowska BK, Wielstra B, Szkotak R, Marcov SDC, Cogalniceanu D, Babik W (2013) No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Mol Ecol* 22, 1884–1903.

Wu Y, Xia L, Zhang Q, Yang Q, Meng X (2011) Bidirectional introgressive hybridization between *Lepus capensis* and *Lepus yarkandensis*. *Mol Phylogenet Evol* 59: 545–555.

Wu CI, Ting CT (2004) Genes and Speciation. *Nature Reviews Genetics* 5:2, p.114

VII. APÊNDICES

APÊNDICE I

Espécimes utilizados para o sequenciamento de DNA dos genes Citocromo oxidase I COI), Nicotinamida Desidrogenase subunidade 2 (ND2) e exon 1 da Tirosinase (TYR).

Siglas referentes às coleções ou coletores: LGA: Laboratório de Genética Animal, UFES; MNRJ: Museu Nacional, UFRJ; CFBH: Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoologia, UNESP, Campus de Rio Claro; MTR: Miguel Trefaut Rodrigues, Instituto de Biociências, USP; MZUFV: Museu de Zoologia João Moojen, Universidade Federal de Viçosa; MPEG: Museu Paraense Emílio Goeldi; JFT: João Felipe Tonini e JZ: Juliana Zina.

ESTADO: Localidade: (Latitude; longitude em graus decimais): Número de tombo (Haplótipo COI (C); ND2 (N); TYR (T).

Trachycephalus mesophaeus

BAHIA: Arataca: (-15.24; -39.42): MTR 16386 (C33; N45; T44 e T47), MTR 16394 (C34; N46; T47). **Aurelino Leal:** (-14.36; -39.41): CFBH 9297 (N20; T11). **Acuípe:** (-15.07; -39.04): JZ 274 (C31; T29 e T30). **Ilhéus:** (-14.81; -39.05): CFBH 10703 (T8), CFBH 10704 (C30; N20; T6 e T8), CFBH 10707 (C31; N20), CFBH 10708 (C31; N47; T6 e T9), CFBH 10709 (T9 e T10). **Ituberá:** (-13.72; -39.14): MNRJ 51717 (C32; N22; T37 e T40). **Jussari:** (-15.21; -39.46): MTR 5960 (C33; N46; T37 e T47), MTR 5976 (C31; N20; T23 e T39), MTR 5977 (C31; N51; T37). **Uruçuca:** (-14.56; -40.17): JZ 648 (C33; N39; T35 e T36). **Wenceslau Guimarães:** (-13.68; -39.48): MTR 22040 (T11), MTR 22056 (C31; T37), MTR 22108 (C31; T49 e T50), MTR 22109 (C35; N48; T8) MTR 22111 (C36; N49), MTR 22112 (C31; N50; T46), MTR 22115 (C31; N20). **ESPÍRITO SANTO: Conceição da Barra:** (-18.58; -39.74): JFT 855 (C29; N21; T6 e T24), JFT 871 (C37; N37; T6 e T32), JFT 936 (C37; N38; T27). **Linhares:** (-19.43; -40.22) MTR 12113 (C40; N40; T37 e T38), MTR 12253 (C41; T39), MTR 12254 (C29; N41; T10 e T11), MTR 12255 (C29; N42; T39), MTR 12304 (C29; N43; T39 e T43), MTR 12350 (T37 e T44), MTR 12351 (C29; N44; T37 e T38), MTR 12352 (T37), MTR

12353 (C29; T44), MTR 12452 (C29; N21; T23 e T45), CFBH 11914 (C39; N21; T5 e T11). **Santa Teresa:** (-19.96; -40.53) JFT 775 (C29), LGA 2638 (N43; T33 e T34), LGA 2644 (C29; N21; T26), LGA 937 (C29; N21; T39). **Pinheiros:** (-18.36; -40.16) LGA 2746 (C38;T11), LGA 3172 (C29; N21; T37 e T38). **MINAS GERAIS: Marliéria:** (-19.71; -42.74) MTR 17473 (C29; N21; T37 e T39), MTR 17476 (C29; N21; T38 e T48), MTR 17485 (C29; N21; T39 e T48), MTR 17486 (C29; N43; T37 e T48), MTR 17566 (C29; N43; T38 e T39). **SÃO PAULO: Bertioga:** (-23.85; -46.17) CFBH 2489 (C26; N29; T18 e T19), CFBH 2490 (C27; N29; T18 e T19), MTR 535 (C26; N52; T5 e T31). **Caraguatatuba:** (-23.57; -45.26) CFBH 5858 (C26; N29; T6). **Cubatão:** (-23.82; -46.39) CFBH 1967 (C25; N28; T16 e T17). **Eldorado:** (-24.49; -48.08) CFBH 2636 (N27; T5 e T20). **Iguape:** (-24.68; -47.56) MTR 143 (C24; T5 e T6). **Ilha Bela** (-23.76; -45.43) CFBH 6116 (N34; T27 e T28), **Ilha do Cardoso:** (-25.13; -47.96) CFBH 10666 (C23; N19; T7). **Peruíbe:** (-24.33; -47.05) CFBH 8754 (N36; T5 e T25). **Santos:** (-23.89, -46.29) CFBH11560 (C25; N26; T5), CFBH 7848 (C25; N35; T5 e T18). **Ubatuba:** (-23.36; -45.10) CFBH 10738 (C26; N25; T14 e T15), CFBH 2768 (C26; N25; T21), CFBH 2769 (C23; N30; T6), CFBH 2770 (C27; N30; T6 e T22). **RIO DE JANEIRO: Cachoeiras de Macacu:** (-22.47; -42.68) MNRJ 76840 (C44; T6 e T42). **Magé:** (-22.59; -43,05) MNRJ 56169 (C44; N23; T10 e T22). **Macaé:** (-22.30; -42.01) MNRJ 70689 (C43; N24; T39 e T41). **Parati (-**23.20; -44.74) CFBH 349 (N32; T10 e T22). **Santa Maria Madalena:** (-22.14; -41.95) CFBH 13037 (N21; T6 e T24). **SANTA CATARINA: Blumenau:** (-27.03; -49.15) CFBH 13167 (C29; N27; T12 e T13). **Botuvera:** (-27.11; -49.13) CFBH 2984 (N27; T5). **RIO GRANDE DO SUL: Lajeado:** (-30.18; -51.11) CFBH 312 (C28; N31; T5 e T18). **Sapiranga:** (-29.63; -51.03) CFBH 4249 (C23; N33; T23).

Trachycephalus nigromaculatus

BAHIA: Contendas do Sincorá: (-13.76; -41.04) CFBH 11072 (C51; N60; T61), JZ 178 (C53; N62; T61 e T63), JZ 533 (T80 e T81). **Jequié:** (-13.83; -40.17) CFBH 11059 (C51; N59; T51), JZ 314 (N59; T69 e T70), JZ 321 (C54; N63; T61 e T68). **Santa Maria da Vitória:** (-13.37; -44.19) MTR 17961 (C52; N65; T83 e T84). **ESPÍRITO SANTO: Águia Branca:** (-18.47; -40.73) LGA 3925 (C49; N53; T53), LGA 3926 (C48; N58; T58 e T72). **Aracruz:** (-19.84; -40.28) JFT 810 (C49; N53; T56). **Guarapari:** (-18.35; -40.41) CFBH 380 (C47; N57; T58 e T65). **Linhares:** (-19.44; -40.21) CFBH 10880 (C49; N53; T52 e T53), CFBH 10881 (C49; N58), CFBH 10882 (C49; N53; T57 e T58), CFBH 10916 (C49; N58; T57 e T62), CFBH 10917 (C47; N57; T59 e T60), CFBH 10918 (C49; N58; T64), CFBH 10919 (C47; N57; T57 e T58). **São José do Calçado:** (-21.01; -41.71) MTR 1490 (C50;

N68; T55). **Serra:** (-20.17; -40.32) LGA 3923 (C46; N56; T52 e T55). **Vitória:** (-20.26; -40.31) CFBH 6720 (C46; N56; T55), CFBH 6724 (C46; N56; T71), CFBH 6725 (C46; N56; T55 e T57), CFBH 6726 (C46; N56). **MINAS GERAIS: Buritizeiro:** (-17.40; -45.00) CHUNB 43486 (T61 e T67), MZUFV 17113 (C58; N66; T82), MVZUFV 17114 (C45; N61; T79). **Corinto:** (-18.35; -44.47) CHUNB 43212 (C45; N61; T55 e T66). **Januária:** (-15.15; -44.23) MTR 0357 (C55; N64; T55 e T73), MTR 0358 (C52; N64; T74 e T75), MTR 0359 (C52; N65; T52 e T73), MTR 0360 (C56; N64; T55 e T57), MTR 0361 (C52; N64; T54 e T78), MTR 0362 (C52; N64), MTR 0363 (C57; N64; T76 e T77). **Marliéria:** (-19.71; -42.74) MTR 17595 (N58; T85). **RIO DE JANEIRO: Búzios:** (-22.76; -41.90) MNRJ 49888 (C62; N67; T86), **Santa Maria Madalena:** (-22.14; -41.95) CFBH 13043 (C46; N54; T57 e T58). **SÃO PAULO: Atibaia:** (-23.11; -46.58) CFBH 5090 (C45; N55; T54).

Trachycephalus typhonius

AMAZONAS: Rio Purus: (-05.83; -64.30) MTR 18786 (T103 e T104), MTR 18831 (T105 e T106), MTR 18839 (C2; N4; T107). **GOIÁS: Luziânia:** (-16.28; -48.23) MTR 11475 (N2; T81 e T100), MTR 11476 (C8; N2; T81). **MARANHÃO: Carolina:** (-07.77; -47.82) MTR 00080 (C12; N41; T81). **MATO GROSSO: Chapada dos Guimarães:** (-15.01; -55.68) MTR 4965 (N15; T90 e T92), MTR 4967 (C14; N15; T102e T108), MTR 4993 (C15; N15; T81 e T110), MTR 4994 (C16; N15; T90 e T92), MTR 5005 (N15; T91 e T111), MTR 5006 (N15; T90 e T92). **Vila Rica:** (-10.02; -51.15) MTR 978250 (C9; N11; T107), MTR 978081 (T2 E T3). **MATO GROSSO DO SUL: Sonora:** (-17.64; -54.92) MTR 10557 (N1; T2 e T3), MTR 10558 (C7; N1; T98). **RONDÔNIA: Porto Velho:** (-08.63; -64.25) MTR 0096 (N12; T93), MTR 0181 (N13; T87 e T88), MTR 0307 (N14; T97), MTR 0566 (C22; N13; T99). **TOCANTINS: Lagoa da Confusão:** (-10.86; -49.69) CHUNB 58200 (C8; N16; T96). **Paranã:** (-12.61; -47.89) MTR 4006 (C13; N15; T92). **Pium:** (-09.96; -50.11) CHUNB 58214 (C20; T95). **Palmeirante:** (-07.77; -47.82) MTR 1622 (C11; N17; T81). **Peixe:** (-12.00; -48.52) MTR 1992 (C3; N5; T81). **Lajeado:** (-09.75; -48.37) MTR 6835 (C5; N7; T91), MTR 6836 (C5; N7; T91), MTR 8609 (C11; N9; T91 e T116), MTR 8610 (N6; T89 e T108), MTR 8611 (C12; N6; T98), MTR 8612 (C8; N2; T112 e T116), MTR 8613 (C12; N10; T118 e T119), MTR 8656 (C17; N9; T118 e T119), MTR 8660 (C18; N5; T108). **Guaraí:** (-08.81; -48.39) MTR 7453 (N8; T112 e T113), MTR 7482 (C9; N6; T114 e T115), MTR 7502 (C10; N6; T91). **PARÁ: Muaná, Ilha do Marajó:** (-01.40; -49.18) MPEG 18355 (C6; N3; T101). **Oriximiná:** (-01.79; -55.82) MPEG 21908 (N3; T102). **Santana do Araguaia:** (-09.68; -50.15) CHUNB 58206 (C21; T89). **PIAUÍ: Baixa Grande do Ribeiro:** (-07.90; -45.18) MTR 2056 (C4; N6; T81), MTR 2057 (C10; N6; T108), MTR 2841 (T109),

MTR 5215 (T98). **SÃO PAULO: Itapira:** (-22.44; -46.86) CFBH 3623 (T89e T92), CFBH 3624 (N2), CFBH 3625 (N2; T89 e T90). **Presidente Epitácio:** (-21.82; -52.16) MTR 483 (C8), MTR 484 (C19). **Rosana:** (-22.50; -52.96) MTR 466 (C1; N1; T91), MTR 477 (N18; T94).

***Trachycephalus* híbridos**

BAHIA: Jequié: (-13.83; -40.17) CFBH 9156 (C51; N59; T75). **Wenceslau Guimarães:** (-13.68; -39.48) MTR 22113 (N20; T146 e T147). **ESPÍRITO SANTO: Linhares:** (-19.43; -40.22) MTR 12040 (C49; N58; T79 e T90). **Serra:** (-20.17; -40.32) LGA 3924 (C63; N9; T142), JFT 473 (C63; N9; T143), JFT 955 (C63; N9; T145), JFT 757 (C63; N9; T144). **PIAUÍ: Baixa Grande do Ribeiro:** (-07.90; -45.18) MTR 2815 (C60; N64; T136 e T137). **MATO GROSSO: Chapada dos Guimarães:** (-15.01; -55.68) MTR 5003 (C16; N15; T3 e T141). **MINAS GERAIS: Januária** (-15.15; -44.23) MTR 509 (C61; N69; T138 e T139), MTR 510 (C61; N69; T138 e T140).

Grupos Externos

Aparasphenodon brunoi

ESPÍRITO SANTO: Pinheiros: (-18.36; -40.16) LGA 3616

Osteocephalus taurinus

AMAZONAS: Rio Purus: (-05.83; -64.30) MTR 19351, MTR 19352, MTR 19353

APÊNDICE II

Haplótipos dos genes COI (C); ND2 (N) e Tirosinase (T).

Lista de haplótipos do gene COI. Siglas referentes às espécies: Tty (*T. typhonius*), Tni (*T. nigromaculatus*) e Tme (*T. mesophaeus*).

Haplótipo	Identificação	n	Espécime (s)	Localidade (s)	Observações
C1	Tty	1	MTR466	Rosana/SP	
C2	Tty	1	MTR18839	Rio Purus/AM	
C3	Tty	1	MTR1992	Peixe/TO	
C4	Tty	1	MTR2056	B. Grande Ribeiro/PI	
C5	Tty	2	MTR6835, MTR6836	Lageado/TO	
C6	Tty	1	MPEG18355	Marajó/PA	
C7	Tty	1	MTR10558	Sonora/MS	
C8	Tty	4	MTR11476, MTR8612, MTR10558, MTR483,CHUNB5820	Luziania/GO, Lageado/TO, Presidente Epitácio/SP, Lagoa da Confusão/TO	
C9	Tty	2	MTR7482, MTR978250	Guaraí/TO, Vila Rica/MT	
C10	Tty	2	MTR7502, MTR2057	Guaraí/TO, B.Grande Ribeiro/PI	
C11	Tty	2	MTR8609, MTR1622	Lageado/TO, Palmeirante/TO	
C12	Tty	3	MTR8611, MTR8613, MTR00080	Lageado/TO, Carolina/MA	
C13	Tty	1	MTR4006	Paranã/TO	
C14	Tty	1	MTR4967	Chap. Guimarães/MT	
C15	Tty	1	MTR4993	Chap. Guimarães/MT	
C16	Tty e híbrido	1	MTR4994, MTR5003*	Chap. Guimarães/MT	Tni/Tty
C17	Tty	1	MTR8656	Chap. Guimarães/MT	

C18	Tty	1	MTR8660	Lageado/TO
C19	Tty	1	MTR484	Presidente Epitácio/SP
C20	Tty	1	CHUNB58214	Pium/TO
C21	Tty	1	CHUNB58206	Sant. Araguaia/PA
C22	Tty	1	MTR0566	Porto Velho/RO
C23	Tme	3	CFBH10666, CFBH2769, CFBH4249	Ilha do Cardoso/SP, Ubatuba/SP, Sapiranga/RS
C24	Tme	1	MTR143	Iguape/SP
C25	Tme	4	CFBH1967, CFBH6116, CFBH11560, CFBH7848	Cubatão/SP, Ilha Bela/SP, Santos/SP
C26	Tme	6	CFBH2768, CFBH10738, CFBH5858, MTR535, CFBH2489, CFBH349	Ubatuba/SP, Caraguatatuba/SP, Bertioga/SP
C27	Tme	2	CFBH2770, CFBH2490	Ubatuba/SP, Bertioga/SP
C28	Tme	1	CFBH312	Lageado/RS
C29	Tme	17	CFBH13167, JFT775, JFT855,LGA2638, LGA937, LGA2644, LGA3172, MTR12254, MTR12255, MTR12351,MTR12353,MTR12452, MTR17566, MTR17473, MTR17476, MTR17485, MTR17486	Blumenau/SC, St. Teresa/ES, C. Barra/ES, Pinheiros/ES, Linhares/ES, Marliéria/MG
C30	Tme	1	CFBH10704	Ilhéus/BA
C31	Tme	9	CFBH10707, CFBH10708, JZ274, MTR22108, MTR22056, MTR22112, MTR22115, MTR5976, MTR5977	Ilhéus/BA, Acuípe/BA, W. Guimarães/BA, Jussari/BA
C32	Tme	1	MNRJ51717	Ituberá/BA
C33	Tme	3	JZ648, MTR16386, MTR5960	Uruçuca/BA, Arataca/BA, Jussari/BA
C34	Tme	1	MTR16394	Arataca/BA
C35	Tme	1	MTR22109	W. Guimarães/BA
C36	Tme	1	MTR22111	W. Guimarães/BA
C37	Tme	2	JFT936, JFT871	C. Barra/ES

C38	Tme	1	LGA2746	Pinheiros/ES	
C39	Tme	1	CFBH11914	Linhares/ES	
C40	Tme	1	MTR12113	Linhares/ES	
C41	Tme	1	MTR12253	Linhares/ES	
C42	Tme	1	MTR12304	Linhares/ES	
C43	Tme	1	MNRJ70689	Macaé/RJ	
C44	Tme	2	MNRJ76840, MNRJ56169	Cachoeiras de Macacu/RJ, Magé/RJ	
C45	Tni	3	CFBH5090, MZUFV11714, CHUNB43212	Atibaia/SP, Buritizeiro/MG, Corinto/MG	
C46	Tni	6	CFBH6724, CFBH6720, CFBH6725, CFBH6726, LGA3923,CFBH13043	Vitória/ES, Serra/ES, St. M. Madalena/RJ	
C47	Tni	3	CFBH380, CFBH10917, CFBH10919	Guarapari/ES, Linhares/ES	
C48	Tni	1	LGA3926	Águia Branca/ES, Marliéria/MG	
C49	Tni e híbrido	8	LGA3925, JFT810, CFBH10880, CFBH10881,CFBH10882,CFBH10916, CFBH10918, MTR12040*	Águia Branca/ES, Aracruz/ES, Linhares/ES	Tni/Tme
C50	Tni	1	MTR1490	S. José Calçado/ES	
C51	Tni e híbrido	3	CFBH11059, CFBH11072, CFBH9156*	Jequié/BA, Contendas do Sincorá/BA	Tni/Tme
C52	Tni	5	MTR17961, MTR0358, MTJ0359, MTJ0361, MTJ0362	S. M. Vitória/BA, Januária/MG	
C53	Tni	1	JZ178	Contendas do Sincorá/BA	
C54	Tni	1	JZ321	Jequié/BA	
C55	Tni	1	MTR0357	Januária/MG	
C56	Tni	1	MTR0360	Januária/MG	
C57	Tni	1	MTR0363	Januária/MG	
C58	Tni	1	MZUFV11713	Buritizeiro/MG	

C59	Tni	1	MNRJ49888	Buzios/RJ	
C60	Híbrido	1	MTR2815*	B. Grande Ribeiro/PI	Tni/Tty
C61	Híbrido	2	MTR509*, MTR510*	Januária/MG	Tty/Tni
C62	Tni	1	MNRJ60218	Magé/RJ	
C63	Híbrido	4	LGA3924*,JFT473*,JFT757*,JFT955*	Serra/ES	Tty/Tni

Lista de haplótipos do gene ND2. Siglas referentes às espécies: Tty (*T. typhonius*), Tni (*T. nigromaculatus*) e Tme (*T. mesophaeus*).

Haplótipo	**Identificação**	**n**	**Espécime (s)**	**Localidade (s)**	**Observações**
N1	Tty	3	MTR466, MTR10557, MTR10558	Rosana/SP, Sonora/MS	
N2	Tty	5	CFBH3624, MTR11475, MTR11476, MTR8612,CFBH3625	Itapira/SP, Luziânia/GO, Lageado/TO	
N3	Tty	2	MPEG18355, MPEG21908	Marajó/PA, Oriximiná/PA	
N4	Tty	1	MTR18839	Rio Purus/AM	
N5	Tty	2	MTR1992, MTR8660	Peixe/TO, Lageado/TO	
N6	Tty	7	MTR2056, MTR2057, MTR7482, MTR7502, MTR8610, MTR8611, MTR00080	B.Grande Ribeiro/PI, Guaraí/TO, Lageado/TO	
N7	Tty	2	MTR6835, MTR6836	Lageado/TO	
N8	Tty	1	MTR7453	Guaraí/TO	
N9	Tty e híbrido	6	MTR8609, MTR8656, LGA3924*, JFT757*, JFT955*, JFT473*	Lageado/TO, Serra/ES	Tty/Tni
N10	Tty	1	MTR8613	Lageado/TO	
N11	Tty	1	MTR978250	Vila Rica/MT	
N12	Tty	1	MTR096	Porto Velho/RO	
N13	Tty	2	MTR0181, MTR0566	Porto Velho/RO	
N14	Tty	1	MTR307	Porto Velho/RO	

N15	Tty e híbrido	8	MTR4006, MTR4965, MTR4967, MTR4993, MTR4994, MTR5005, MTR5006, MTR5003*	Paranã/TO, Chap. Guimarães/MT,	Tni/Tty
N16	Tty	1	CHUNB5820	Lagoa da Confusão/TO	
N17	Tty	1	MTR1622	Palmeirante/TO	
N18	Tty	1	MTR477	Rosana/SP	
N19	Tme	1	CFBH10666	Ilha do Cardoso/SP	
N20	Tme e híbrido	6	CFBH10704, CFBH10707, MTR22115, MTR5976, CFBH9297, MTR22113*	Ilhéus/BA, W. Guimarães/BA, Jussari/BA, Aurelino Leal/BA	Tme/Tni
N21	Tme	10	LGA937, CFBH11914, CFBH13037, JFT855, MTR12452, MTR17473, MTR17476, MTR17485, LGA2644, LGA3172	St. Teresa/ES, Linhares/ES, St. M. Madalena/RJ, C. Barra/ES, Marliéria/MG	
N22	Tme	1	MNRJ51717	Ituberá/BA	
N23	Tme	1	MNRJ56169	Magé/RJ	
N24	Tme	1	MNRJ70689	Macaé/RJ	
N25	Tme	2	CFBH10738, CFBH2768	Ubatuba/SP	
N26	Tme	1	CFBH11560	Santos/SP	
N27	Tme	3	CFBH13167, CFBH2636, CFBH2984	Blumenau/SC, Eldorado/SP, Botuvera/SC	
N28	Tme	1	CFBH1967	Cubatão/SP	
N29	Tme	3	CFBH2489, CFBH2490, CFBH5858	Bertioga/SP, Caraguatatuba/SP	
N30	Tme	2	CFBH2769, CFBH2770	Ubatuba/SP	
N31	Tme	1	CFBH312	Lageado/RS	
N32	Tme	1	CFBH349	Parati/RJ	
N33	Tme	1	CFBH4249	Sapiranga/RS	
N34	Tme	1	CFBH6116	Ilha Bela/SP	
N35	Tme	1	CFBH7848	Santos/SP	
N36	Tme	1	CFBH8754	Peruíbe/SP	

N37	Tme	1	JFT871	C. Barra/ES	
N38	Tme	1	JFT936	C. Barra/ES	
N39	Tme	1	JZ648	Uruçuca/BA	
N40	Tme	1	MTR12113	Linhares/ES	
N41	Tme	1	MTR12254	Linhares/ES	
N42	Tme	1	MTR12255	Linhares/ES	
N43	Tme	4	MTR12304, MTR17486, MTR17566, LGA2638	Linhares/ES, Marliéria/MG, St. Teresa/ES	
N44	Tme	1	MTR12351	Linhares/ES	
N45	Tme	1	MTR16386	Arataca/BA	
N46	Tme	2	MTR16394, MTR5960	Arataca/BA, Jussari/BA	
N47	Tme	1	MTR10708	Ilhéus/BA	
N48	Tme	1	MTR22109	W. Guimarães/BA	
N49	Tme	1	MTR22111	W. Guimarães/BA	
N50	Tme	1	MTR22112	W. Guimarães/BA	
N51	Tme	1	MTR5977	Jussari/BA	
N52	Tme	1	MTR535	Bertioga/SP	
N53	Tni	4	CFBH10880, JFT810, LGA3925, MTR10882	Linhares/ES, Aracruz/ES, Aguia Branca/ES	
N54	Tni	1	CFBH13043	St.M. Madalena/RJ	
N55	Tni	1	CFBH5090	Atibaia/SP	
N56	Tni	5	CFBH6720, CFBH6724, CFBH6725, CFBH6726, LGA3923	Vitória/ES, Serra/ES	
N57	Tni	3	CFBH380, CFBH10917, CFBH10919	Guarapari/ES, Linhares/ES	
N58	Tni e híbrido	6	CFBH10881, CFBH10916, CFBH10918,LGA3926, MTR17595, MR12040*	Linhares/ES, Águia Branca/ES, Marliéria/MG	Tni/Tme
N59	Tni e híbrido	3	CFBH11059, JZ314, CFBH9156	Jequié/BA	Tni/Tme
N60	Tni	1	CFBH11072	Contendas do Sincorá/BA	

N61	Tni	2	CHUNB43212, MZUFV11714	Corinto/MG, Buritizeiro/MG	
N62	Tni	1	JZ178	Contendas do Sincorá/BA	
N63	Tni	1	JZ321	Jequié/BA	
N64	Tni e híbrido	7	MTJ0357, MTJ0358, TJ0360, MTJ0361_MTJ0362, MTJ0363, MTR2815*	Januária/MG	Tty/Tni
N65	Tni	2	MTJ0359, MTR17961	Januária/MG, St. Maria da Vitória/BA	
N66	Tni	1	MZUFV11713	Buritizeiro/MG	
N67	Tni	2	MNRJ49888, MNRJ60218	Buzios/RJ, Mage/RJ	
N68	Tni	1	MTR1490	S. J. Calçado/ES	
N69	Híbridos	2	MTR509*, MTR510*	Januária/MG	Tni/Tty

Lista de haplótipos do gene Tirosinase. Siglas referentes às espécies: Tty (*T. typhonius*), Tni (*T. nigromaculatus*) e Tme (*T. mesophaeus*).

Haplótipo	**Identificação**	**n**	**Espécime(s)**	**Localidade(s)**	**Observações**
T1	Tty	9	MTR466, MTR7502, MTR8609, MTR6836, MTR6836, MTR6835, MTR6835, MTR307, MTR5005	Rosana/SP, Guaraí/TO, Lageado/TO, Porto Velho/RO, C. Guimarães/MT	
T2	Tty	11	MTR466, MTR7502, MTR8611, MTR0566, MTR11475, MTR11476, MTR5215, MTR10558, MTR10557, MTR978081, MTR978250	Rosana/SP, Guaraí/TO, Lageado/TO, Porto Velho/RO, Luziânia/GO, B. G. Ribeiro/PI, Sonora/MS, Vila Rica/MT	
T3	Tty e híbrido	13	MTR477, MTR1992, MTR1992, MTR1622, MTR1622, MTR11476, MTR0080, MTR00080, MTR2056, MTR2056, MTR10557, MTR978081, MTR5003*	Rosana/SP, Peixe/TO, Palmeirante/TO, Luziânia/GO, Carolina/MA, B. G. Ribeiro/PI, Sonora/MS, C. Guimarães/MT	Tni/Tty
T4	Tty	1	MTR477	Rosana/SP	
T5	Tty	2	CFBH3623, MTR4994	Itapira/SP, C. Guimarães/MT	
T6	Tty	4	CFBH3623, MTR8610, MTR8660, MTR4967	Itapira/SP, C. Guimarães/MT, Lageado/MT	

T7	Tty	3	CFBH3625, MTR4965,MTR5006	Itapira/SP, C. Guimarães/MT
T8	Tty	5	CFBH3625, MTR4006, CHUNB58206, CHUNB58206, MTR2057	Itapira/SP, Paranã/TO, S. Araguaia/PA
T9	Tty	2	MTR7453, MTR8612	Guaraí/TO, Lageado/TO
T10	Tty	3	MTR7453, MTR8609, MTR8612	Guaraí/TO, Lageado/TO
T11	Tty	1	MTR7482	Guaraí/TO
T12	Tty	1	MTR7482	Guaraí/TO
T13	Tty	2	MTR8610, MTR8660	Lageado/TO
T14	Tty	3	MTR8611, MTR5215, MTR10558	Lageado/TO, B. G. Ribeiro/PI, Sonora/MS
T15	Tty	2	MTR8613, MTR8656	Lageado/TO
T16	Tty	2	[MTR8613, MTR8656	Lageado/TO
T17	Tty	2	CHUNB58214, CHUNB58214	Pium/TO
T18	Tty	3	MTR4006, MTR4965, MTR5006	Paranã/TO, C. Guimarães/TO
T19	Tty	2	CHUNB58200, CHUNB58200	Lagoa da Confusão/PA
T20	Tty	2	MTR0096, MTR0096	Porto Velho/RO
T21	Tty	1	MTR0181	Porto Velho/RO
T22	Tty	1	MTR0181	Porto Velho/RO
T23	Tty	2	MTR0307, MTR18831	Porto Velho/RO, Rio Purus/AM
T24	Tty	1	HJ0566	Porto Velho/RO
T25	Tty	2	MPEG21908, MPEG21908	Oriximiná/PA
T26	Tty	2	MPEG18355, MPEG18355	Marajó/PA
T27	Tty	1	MTR11475	Luziâniza/GO
T28	Tty	1	MTR18786	Rio Purus/AM
T29	Tty	1	MTR18786	Rio Purus/AM
T30	Tty	1	MTR18831	Rio Purus/AM
T31	Tty	4	MTR18839, MTR18839, MTR4993, MTR978250	Rio Purus/AM, C. Guimarães/MT,

				Vila Rica/MT
T32	Tty	1	MTR2057	B. G. Ribeiro/PI
T33	Tty	2	MTR2841, MTR2841	B. G. Ribeiro/PI
T34	Tty	1	MTR4967	C. Guimarães/MT
T35	Tty	1	MTR4993	C. Guimarães/MT
T36	Tty	1	MTR4994	C. Guimarães/MT
T37	Tty	1	MTR5005	C. Guimarães/MT
T38	Tme	1	CFBH13037	St. M. Madalena/RJ
T39	Tme	1	CFBH13037	St. M. Madalena/RJ
T40	Tme	2	CFBH10666, CFBH10666	Ilha do Cardoso/SP
T41	Tme	7	MTR143, CFBH2489, CFBH2636, CFBH11560, CFBH7848, CFBH8754, CFBH312	Iguape/SP, Bertioga/SP, Eldorado/SP, Santos/SP, Peruíbe/SP, Lageado/RS
T42	Tme	5	MTR143, CFBH2769, CFBH2769, CFBH10708, CFBH349	Iguape/SP, Ubatuba/SP, Ilhéus/BA, Parati/RJ
T43	Tme	1	CFBH1967	Cubatão/SP
T44	Tme	1	CFBH1967	Cubatão/SP
T45	Tme	1	CFBH2489	Bertioga/SP
T46	Tme	2	CFBH2490, CFBH312	Bertioga/SP, Lageado/RS
T47	Tme	1	CFBH2490	Bertioga/SP
T48	Tme	4	MTR535, CFBH11560, CFBH2984, CFBH2984	Bertioga/SP, Santos/SP, Botuvera/SC
T49	Tme	1	MTR535	Bertioga/SP
T50	Tme	1	CFBH10738	Ubatuba/SP
T51	Tme	1	CFBH10738	Ubatuba/SP
T52	Tme	2	CFBH2768, CFBH2768	Ubatuba/SP
T53	Tme	1	CFBH6116	Ilha Bela/SP

T54	Tme	1	CFBH6116	Ilha Bela/SP	
T55	Tme	2	CFBH2770, CFBH10704	Ubatuba/SP, Ilhéus/BA	
T56	Tme	2	CFBH2770, MNRJ56169	Ubatuba/SP, Magé/RJ	
T57	Tme	1	CFBH2636	Eldorado/SP	
T58	Tme	1	CFBH7848	Santos/SP	
T59	Tme	3	CFBH5858, CFBH5858, MNRJ76840	Caraguatatuba/SP, Cachoeiras de Macacu/RJ	
T60	Tme	1	CFBH8754	Peruíbe/SP	
T61	Tme	1	CFBH13167	Blumenau/SC	
T62	Tme	1	CFBH13167	Blumenau/SC	
T63	Tme	2	CFBH4249, CFBH4249	Sapiranga/RS	
T64	Tme	1	JZ274	Acuípe/BA	
T65	Tme	1	JZ274	Acuípe/BA	
T66	Tme	5	CFBH10703, CFBH10703, CFBH10704, MTR22109, MTR22109	Ilhéus/BA, W. Guimarães/BA	
T67	Tme	2	CFBH10708, Ilheus CFBH10709	Ilhéus/BA	
T68	Tme	2	CFBH10709, MNRJ56169	Ilhéus/BA, Magé/RJ	
T69	Tme	3	CFBH9297,CFBH9297, MTR12254	Aurelino Leal/BA, Linhares/ES	
T70	Tme	12	MNRJ51717, MTR22056, MTR22056, MTR5960, MTR5977, MTR5977, MTR12350, MTR12351, MTR12352, MTR12352, MTR17473, MTR17486	Ituberá/BA, W. Guimarães/BA, Jussari/BA, Linhares/ES, Marliéria/MG	
T71	Tme	1	MNRJ51717	Ituberá/BA	
T72	Tme	2	[MRT22112, MRT22112	W. Guimarães/BA	
T73	Tme	1	MTR22108	W. Guimarães/BA	
T74	Tme	1	MTR22108	W. Guimarães/BA	
T75	Tme e hìbrido	3	MTR22040, CFBH9156*, CFBH9156*	W. Guimarães/BA, Jequié/BA	Tni/Tme
T76	Tme	1	MTR22040	W. Guimarães/BA	

T77	Tme	4	MTR5960, MTR16386, MTR16394, MTR16394	Jussari/BA, Arataca/BA	
T78	Tme	1	MTR5976	Jussari/BA	
T79	Tme e hìbrido	10	MTR5976, MTR12113, MTR12253, MTR12255, MTR12304, MTR12353, MTR17473, MTR17485, MTR17566, MTR12040*	Jussari/BA, Linhares/ES, Marliéria/MG	Tni/Tme
T80	Tme	4	MTR16386, MTR12113, MTR12350, MTR12353	Arataca/BA, Linhares/ES	
T81	Tme	1	JZ648	Uruçuca/BA	
T82	Tme	1	JZ648	Uruçuca/BA	
T83	Tme	1	CFBH349	Parati/RJ	
T84	Tme	1	MNRJ70689	Macaé/RJ	
T85	Tme	1	MNRJ70689	Macaé/RJ	
T86	Tme	1	MNRJ76840	Cachoeiras de Macacu/RJ	
T87	Tme	3	MTR12253, MTR12255,MTR17476	Linhares/ES, Marliéria/MG	
T88	Tme	1	MTR12254	Linhares/ES	
T89	Tme	1	MTR12304	Linhares/ES	
T90	Tme e hìbrido	3	MTR12351, MTR17566, MTR12040*	Linhares/ES	
T91	Tme	1	MTR12452	Linhares/ES	
T92	Tme	1	MTR12452	Linhares/ES	
T93	Tme	3	MTR17476, MTR17485, MTR17486	Marliéria/MG	
T94	Tni	2	MNRJ49888, MNRJ49888	Buzios/RJ	
T95	Tni	2	CFBH13043, CFBH10919	St. M. Madalena/RJ, Linhares/ES	
T96	Tni	3	CFBH13043, CFBH10919, LGA3926	St. M.Madalena/RJ, Linhares/ES, Aguia Branca/ES	
T97	Tni	2	CFBH5090, MTR0361	Atibaia/SP, Januária/MG	
T98	Tni	1	CFBH5090	Atibaia/SP	
T99	Tni	3	CFBH10880	Linhares/ES	
T100	Tni	3	CFBH10880, LGA3925, LGA3925	Linhares/ES, Aguia Branca/ES	

T101	Tni	4	CFBH10882, CFBH10916, CFBH6726, CFBH6726	Linhares/ES, Vitória/ ES
T102	Tni	2	CFBH10882, CFBH380	Linhare/ES, Guarapari/ES
T103	Tni	1	CFBH10916	Linhares/ES
T104	Tni	1	CFBH10917	Linhares/ES
T105	Tni	1	CFBH10917	Linhares/ES
T106	Tni	1	CFBH10918	Linhares/ES
T107	Tni	1	CFBH10918	Linhares/ES
T108	Tni	3	CFBH6725, CFBH6725, CFBH6720	Vitória/ES
T109	Tni	2	CFBH6724, CFBH6724	Vitória/ES
T110	Tni	7	CFBH672, MTR1490, MTR1490, LGA3923, MTJ0360, MTJ0360, CHUNB43212	Vitória/ES, S. J. Calçado/ES, Serra/ES, Januária/MG, Corinto/MG
T111	Tni	2	JFT810, JFT810	Aracruz/ES
T112	Tni	1	CFBH380	Guarapari/ES
T113	Tni	1	LGA3926	Aguia Branca/ES
T114	Tni	1	LGA3923	Serra/ES
T115	Tni	1	MTR17961	St. M. Vitória/BA
T116	Tni	1	MTR17961	Jequié/BA
T117	Tni	2	CFBH11059, CFBH11059	Jequié/BA
T118	Tni	1	JZ314	Jequié/BA
T119	Tni	1	JZ314	Jequié/BA
T120	Tni	6	JZ321, CFBH11072, CFBH11072, JZ178, MTJ0357, CHUNB43486	Jequié/BA, Contendas do Sincorá/BA, Januária/MG, Buritizeiro/MG
T121	Tni	1	JZ321	Jequié/BA
T122	Tni	1	JZ178	Contendas do Sincorá/ES
T123	Tni	2	MTR0358	Januária/MG

T124	Tni	1	MTR0358	Januária/MG	
T125	Tni	1	MTR0359	Januária/MG	
T126	Tni	1	MTR0359	Januária/MG	
T127	Tni	1	MTR0361	Januária/MG	
T128	Tni	1	MTR0363	Januária/MG	
T129	Tni	1	MTR0363	Januária/MG	
T130	Tni	1	MTR17595	Marliéria/MG	
T131	Tni	1	MTR17595	Marliéria/MG	
T132	Tni	1	CHUNB43212	Corinto/MG	
T133	Tni	1	CHUNB43486	Buritizeiro/MG	
T134	Tni	2	MZUFV11713, MZUFV11713	Buritizeiro/MG	
T135	Tni	2	MZUFV11714, MZUFV11714	Buritizeiro/MG	
T136	Híbrido	1	MTR2815*	B. G. Ribeiro/PI	Tty/Tni
T137	Híbrido	1	MTR2815*	B. G. Ribeiro/PI	Tty/Tni
T138	Híbrido	2	MTR509*, MTR510*	Januária/MG	Tni/Tty
T139	Híbrido	1	MTR509*	Januária/MG	Tni/Tty
T140	Híbrido	1	MTR510*	Januária/MG	Tni/Tty
T141	Híbrido	1	MTR5003*	C. Guimarães/MT	Tni/Tty
T142	Híbrido	2	LGA3924*, LGA 3924*	Serra/ES	Tty/Tni
T143	Híbrido	2	JFT473*, JFT 473*	Serra/ES	Tty/Tni
T144	Híbrido	2	JFT757*, JFT757*	Serra/ES	Tty/Tni
T145	Híbrido	2	JFT955,* JFT955*	Serra/ES	Tty/Tni
T146	Híbrido	2	MTR22113*	W. Guimarães/BA	Tme/Tni
T147	Híbrido	1	MTR22113*	W. Guimarães/BA	Tme/Tni
T148	Tni	1	MNRJ60218	Magé/RJ	
T149	Tni	1	MNRJ60218	Magé/RJ	