

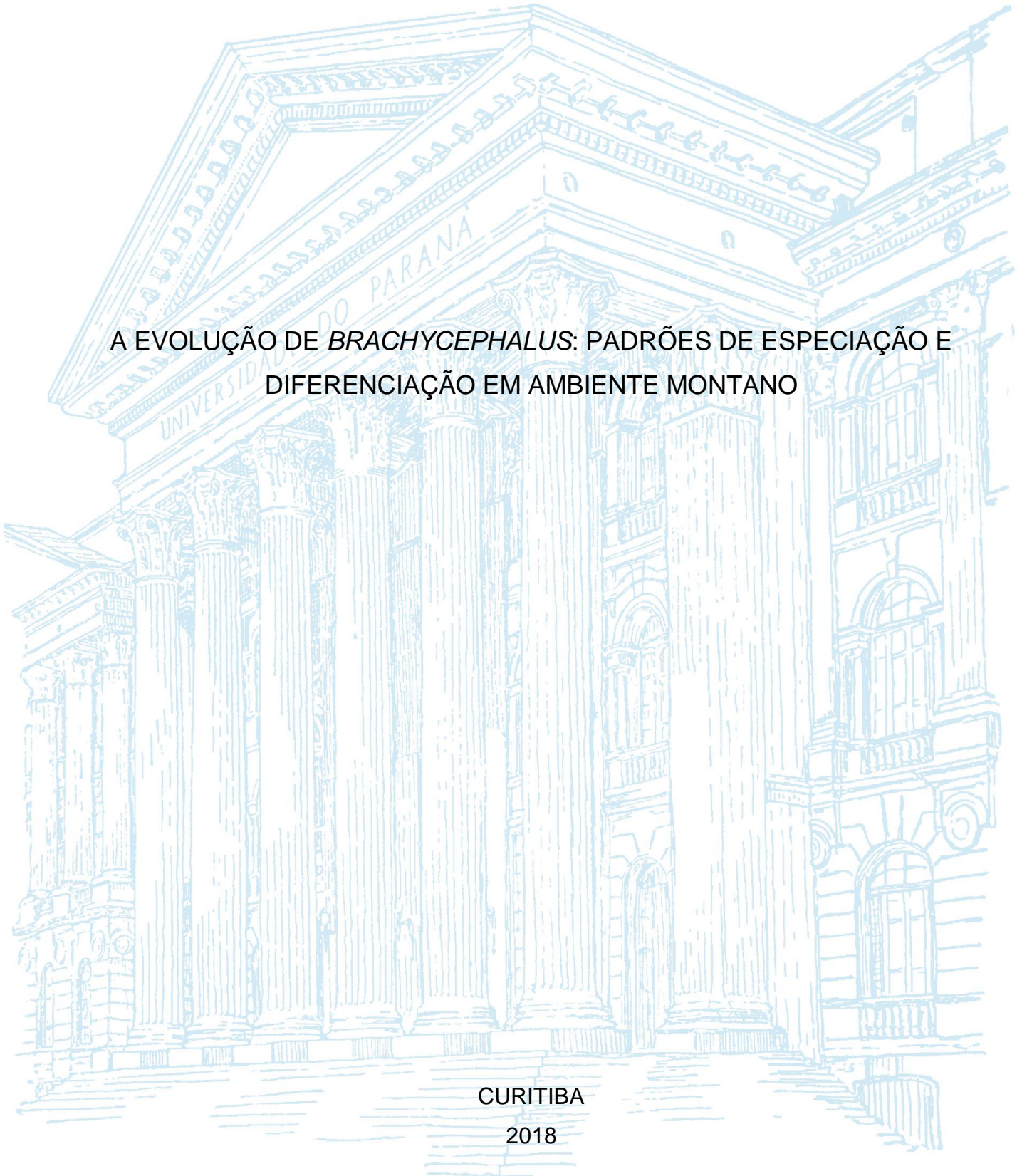
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRIO JÚNIOR NADALINE BARBOSA

A EVOLUÇÃO DE *BRACHYCEPHALUS*: PADRÕES DE ESPECIAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO EM AMBIENTE MONTANO

CURITIBA

2018



MÁRIO JÚNIOR NADALINE BARBOSA

A EVOLUÇÃO DE *BRACHYCEPHALUS*: PADRÕES DE ESPECIAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO EM AMBIENTE MONTANO

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Pie
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ribeiro

CURITIBA

2018

Dedico esta monografia às espécies presentes no Complexo Quiriri, cotidianamente ameaçadas pelas atividades rurais da região. Que este estudo ajude nos esforços de conservação, evitando que desapareçam como tantas outras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Rosemari Nadaline, que sempre me ensinou a amar e respeitar os animais, mesmo em momentos de difíceis (haja momentos que te trouxe problemas em?!) sempre esteve lá com toda sua inocência e amor materno.

Agradeço também a toda família Nadaline, que mesmo distantes do mundo acadêmico, sempre me apoiaram e todos os momentos a seguir meu caminho, em especial meus irmãos Rafael e Cristiano.

A todos os amigos de fora da Biologia, como Lola, Bruna, Melora, Victor, Michael, Prof Julio e a ex-chefe Juliana que desde o cursinho abriram meus olhos para ao ensino superior, me direcionando a optar a um curso por Amor e não por comodidade.

A todos os amigos que a Biologia me trouxe, não posso nomear todos, mas tamo junto! e vocês sabem quem são. Especialmente quero agradecer aos amigos Ananda Neundorf, Juliane Maioli, Mariana Cezimbra, Lorena Metz, Caio, Jaco e Ana, por além de ensinamentos acadêmicos, me ensinarem a um evoluir como ser humano, buscando tornar uma pessoa sempre melhor (juro que to tentando), contem sempre comigo a qualquer momento.

A todas as pessoas da ONG Em Ação, por me permitirem atuar como professor desde meu primeiro ano na faculdade, esse tempo com toda certeza foi imensamente fascinante. A todos meus alunos que lá aguentaram minhas aulas de genética e evolução, que o futuro de vocês seja de acordo com seus sonhos.

Agradeço a Gustavo Souza Santos meu primeiro co-orientador por me abrir os olhos para a Ecologia e ao Marcio Pie e Mauricio Moura (Free) por me mostrar a cada dia o quanto essa área é encantadora.

A todos as pessoas do laboratório de Mutagênese, que sempre me ensinaram muito, mesmo quando era apenas um calouro perdido, em especial a Marta Margarete, por me dar inúmeras oportunidades, das quais espero poder retribuir algum dia e ao Flavio TInceni, Cyntia, Juliana, Jessica, Julio, Fabielle, Annanda, Tati, Toni, Lais, Thaina e Sabrina (Se escrevi o nome errado de vocês foi mal).

Por fim, mas não menos importante agradeço a todos os membros e ex-membros do PieLab, como o Ricardo (Cabelo) que mesmo diante de adversidades pessoais me ensinou o mundo da Ecologia Molecular. A Patricia por ser um exemplo

a ser seguido além de ser uma pessoa fantástica. Ao André por refinarem todo conhecimento de molecular, acreditando mais em minha capacidade do que eu mesmo, e a toda atenção e paciência também, me chame pra causar o caos no mundo. Ao Andreas por me dar meu primeiro contato com o R, ArcGis e modelagem mostrando o quanto a Ecologia é fascinante, e o R é doencinha viciante. A Raquel Divieso pelas ótimas conversas e cuidado, fazendo um excelente papel de amiga no laboratório. A André Confetti pela excelente parceria de campo, filosofia, zuera e tudo mais, com certeza uma das pessoas mais esforçadas e capazes que já conheci. Ao Cristian, com certeza um exemplo de ecólogo, pesquisador e amigo também que mesmo não gostando da maravilha do Cbjr é gente boa. Aos recém-chegados Paula, Daniel e Sofia que sempre alcancem seus objetivos. Ao Luiz Ribeiro por ser um excelente co-orientador, ensinando inúmeras coisas no campo, no laboratório e na vida, que as vezes nem sei como coube tudo na minha cabeça, mas acima de tudo por ser amigo e parceiro do “papa bom” dos campos. Agradeço também a Larissa por ser uma irmã, tu e o Marcão, é sempre uma honra ir a campo e trabalhar com vocês. Ao Marcio R Pie por ser aquele modelo de orientador, ultrapassando muitas expectativas de o que realmente é orientar alguém, também servindo de um exemplo como pessoa e pesquisador. Desde a primeira conversa contigo, que mal sabia quem você era, até hoje sempre aprendi algo fascinante e novo todos os dias. Obrigado por ver em mim potencial que nem eu mesmo sabia que existia (e ainda não sei se existe mesmo), por me dar as melhores oportunidades para crescer como pesquisador, espero um dia poder suprir toda expectativa que espera de mim e retribuir esse tempo de amadurecimento. Da mesma forma que hoje dou aula a meus alunos inspirado pela maneira que os melhores professores que tive, tenha certeza que um dia orientarei inspirado em você, em sua forma de tratar seus alunos, conte comigo como amigo sempre.

A galera da pós pela parceria!

Agradeço também a professora Karla e o Free por disponibilizarem de seu precioso tempo para serem minha banca, tenham certeza que a contribuição e comentários de vocês não se limitaram somente a este trabalho, mas assim para todo meu rumo acadêmico (espero que tenha esse rumo fora facista!).



Calvin e Haroldo, por Bill Watterson

“A relação sociedade e natureza pode ser caótica com seus desastres naturais, extinções e mudanças climáticas, porém são apenas um eco. Se você não gosta do que está recebendo, então observe o que você está emitindo”

Anônimo

RESUMO

A história evolutiva de *Brachycephalus* resultou em espécies isoladas em montanhas. Essas espécies são isoladas por vales de baixas altitudes, levando a uma distribuição em *sky islands*. Todavia, algumas situações biogeográficas não possuem um vale bem definido, ocasionando um potencial contato entre espécies próximas, como na Serra do Quiriri (Santa Catarina, Brasil). As espécies *Brachycephalus quiririensis* e *B. auroguttatus* ocorrem nesta Serra, apresentando uma distância de 7,5 km entre suas localidades. Sendo assim, estas espécies representam um interessante modelo para compreender os processos de isolamento, diferenciação e fluxo gênico entre as espécies. Dessa forma, este estudo utilizou 4 marcadores genéticos em quatro populações ao longo da zona de transição entre as duas espécies, visando a analisar a conectividade e relações filogenéticas. Ainda que ínfimas distâncias de 2,2 km a 10,5 km separem as populações, foram encontrados índices elevados de diversidade genética. As populações *B. auroguttatus*, *B. sp2*, *B. quiririensis* e *B. sp1*, com exceção das duas primeiras, apresentam alguns haplótipos únicos não compartilhados. Já análises filogenéticas suportam cladogramas monofiléticos para *B. quiririensis* e *B. sp1*, inseridos em uma politomia com indivíduos das demais populações. Apesar do fenótipo das populações conduzirem para um cenário de quatro espécies distintas, as análises evolutivas indicam uma possível divergência recente a ponto de não serem refletidas em apenas 4 *loci*. Os resultados indicam que uma única espécie ancestral colonizou o Alto Quiriri e, posteriormente se diferenciou nas espécies *B. quiririensis*, *B. auroguttatus* e *B. sp1*, supostamente fruto de isolamento por distância, em uma hipotética distribuição de *ring species*. Aparentemente os indivíduos de *B. sp2* pertencem à espécie *B. auroguttatus*, dessa forma as diferenças em seus caracteres morfológicos diferem pela seleção natural atuar de maneiras distintas entre as duas localidades, mesmo tão próximas.

Palavras-chave: Isolamento por distância. Especiação. História evolutiva

ABSTRACT

The evolutionary history of *Brachycephalus* has resulted in isolated species in the top of mountains. *Brachycephalus* species are isolated by valleys with low latitudes, leading to a distribution in sky islands. However, some kind of biogeographic situations don't have defined valleys, causing a potential contact between nearby species, such as Serra do Quiriri (Santa Catarina, Brazil). In addition, there are only 7,5 km separating *Brachycephalus auroguttatus* and *B. quiririensis* populations at this plateau. Thus this species is an interesting model to understand the processes of isolation, differentiation and migration of species. Thus, this study used four genetic markers in four populations along the transition zone between the two species, intending to analyze the connectivity, genetic structure and phylogenetic relationships. Although small range distances of 2,2 km to 10,5 km separates the populations, we found high levels of genetic diversity. The populations of *B. auroguttatus*, *B. sp2*, *B. quiririensis* and *B.sp1*, in exception of the first two, present some unique non-shared haplotypes. Phylogenetics analysis supports monophyletic clades for *B. quiririensis* and *B. sp1*, inserted in a polytomy with individuals from the other populations. Despite the population phenotype leads to a scenario of four distinct species, the evolutionary analyzes indicate a possible recent divergence to the point of not being reflected in 4 loci. The results indicate that a single ancestral specie colonized Alto Quiriri and later differentiated into the species *B. quiririensis*, *B. auroguttatus* and *B. sp1*, supposedly the result of isolation by distance in a ring species distribution. Apparently the individuals of *B. sp2* belong to the species *B. auroguttatus*, by this way the differences in their morphological characters differ by the natural selection acting in different ways between the two locates, even locate so close.

Key-words: Evolutionary history. Speciation. Isolation by distance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-- <i>Brachycephalus mariaeterezae</i> em vida	13
Figura 2	-- <i>Brachycephalus verrucosus</i> em vida	13
Figura 3	-- <i>Brachycephalus albolineatus</i> em vida	14
Figura 4	-- <i>Brachycephalus olivaceus</i> em vida	14
Figura 5	-- Localidades no sul da mata atlântica brasileira, na região de garuva (sc) onde foram coletadas as populações de <i>Brachycephalus</i> spp	15
Figura 6	-- Rede de haplótipos, geradas a partir do algoritmo MSN (<i>Minimum Spanning Network</i>) para as 4 populações amostradas	20
Figura 7	-- Arvore dos genes concatenados (<i>16S</i> , <i>Tyr</i> , <i>L3</i> e <i>β-fib</i>)	22
Figura 8	-- Arvore de máxima verossimilhança dos genes concatenados (<i>16S</i> , <i>Tyr</i> , <i>L3</i> e <i>β-fib</i>)	23
Figura 9	-- Imagens em vida dos indivíduos separado por suas respectivas populações	24
Figura 10	-- Fotos em vida dos animais e comparação fenotípica e geográfica encontrada entre as populações amostradas	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-- Relação das populações amostradas com seus respectivos dados de coleta	16
Tabela 2	-- Descrição das condições de amplificação dos <i>loci</i>	17
Tabela 3	--Descrição das sequências de cada <i>locus</i> utilizado no estudo	18
Tabela 4	--Sumario das populações em seus diferentes índices de diversidade genética	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	10
1.2 OBJETIVOS	11
2 REVISÃO BIBLIGRÁFICA	11
2.1 O GÊNERO BRACHYCEPHALUS	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 COLETA DE DADOS	15
3.2 PROCESSAMENTO LABORATORIAL	16
3.3 ANÁLISE DE DADOS.....	17
4 RESULTADOS	19
4.1 CONECTIVIDADE E DIVERSIDADE POPULACIONAL.....	19
4.2 ANALISES FILOGENÉTICAS	21
4.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS POPULACIONAIS	23
5 DISCUSSÃO	25
5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E CONECTIVIDADE POPULACIONAL	25
5.2 ANALISES FILOGENÉTICAS	26
5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS EVOLUTIVOS NO COMPLEXO QUIRIRI	27
6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A Floresta Mata Atlântica (FMA) está entre os 5 biomas com maiores índices de endemismo do mundo (Ministério do Meio Ambiente, 2000; Galindo-Leal; Câmara, 2003). Um total de 8000 espécies endêmicas de répteis, anfíbios, aves, mamíferos e plantas podem ser encontradas ao longo de sua extensão (Myers *et al.*, 2000). Remanescendo apenas 8% de sua extensão original, a FMA é a segunda maior floresta do continente americano, ocorrendo de 4° a 32°S (Ministério do Meio Ambiente, 2000; Galindo-Leal; Câmara, 2003). Sua extensão abriga uma enorme gama de ambientes, cuja composição vegetacional, solo e clima variam, indo de ecossistemas manguezais a montanos.

Montanhas ao longo da Mata Atlântica, apresentam climas amenos e úmidos. Estes poderiam ter sido refúgio para populações remanescentes de diferentes espécies, durante os períodos quentes do quaternário (Carnaval *et al.*, 2009; Bornschein *et al.*, 2016a). Esses abrigos levaram ao isolamento das populações, agindo como importante fator na diversificação de aves e anuros, com baixa dispersão (Mata *et al.*, 2009; Cruz; Feio, 2007; Bornschein *et al.*, 2016a). Estes fenômenos evolutivos ocorrem em *Brachycephalus* (Fitzinger, 1826), um gênero de sapos endêmicos da Serra do Mar, cujo sua história evolutiva é altamente dependente da topografia de seus habitats (Pie *et al.*, 2013).

As espécies de *Brachycephalus* frequentemente apresentam um alto nível de endemismo, com uma ou poucas montanhas adjacentes representando sua distribuição geográfica conhecida (Ribeiro *et al.*, 2015; Bornschein *et al.*, 2016a). Este alto grau de endemismo é provavelmente resultado da especialização a condições de ambientes de altitude elevada, como encontrado em florestas nebulares e campos de altitude (Pie *et al.*, 2013; Bornschein *et al.*, 2016a). A principal hipótese para explicar sua diversificação postula seu isolamento em “ilhas celestes” (*sky islands*) através de uma sinergia entre conservação do nicho e mudanças climáticas ocorridas na Florestas de Mata Atlântica durante o quaternário (Bornschein *et al.*, 2016a; Firkowski *et al.*, 2016).

Frequentemente somente ocorre uma única espécie do gênero *Brachycephalus* por montanha, com as espécies isoladas por vales de baixas

altitudes, que funcionam como barreira de fluxo gênico (Bornschein *et al.*, 2016a; Firkowski *et al.*, 2016). Contudo, algumas situações biogeográficas não possuem um vale bem definido, ocasionando um potencial contato entre espécies próximas. Esse contato entre duas espécies pode acarretar em competição, hibridização e introgressão, importantes fenômenos na evolução das espécies (Freeland, 2005).

1.2 OBJETIVOS

Este cenário é encontrado entre as espécies *Brachycephalus quiririensis* e *Brachycephalus aurogutattus*, as quais estão localizadas na Serra do Quiriri, no estado de Santa Catarina (Pie; Ribeiro, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015). Segundo Pie *et al.*, (2017) estas são espécies irmãs, as quais em conjunto com distância de 7,5 km entre suas localidades levam a um interessante modelo para compreender os processos de isolamento, diferenciação e migração entre as espécies. Assim este estudo utilizou 4 marcadores genéticos em 4 populações ao longo da zona de transição entre as duas espécies, visando os seguintes objetivos:

- Averiguar a conectividade entre as populações
- Ordem de fragmentação
- Estrutura populacional
- Diversidade Genética
- Delimitação das populações e linhagens

2 REVISÃO BIBLIGRÁFICA

2.1 O GÊNERO BRACHYCEPHALUS

O gênero *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 (Anura: Brachycephalidae) é composto por 37 espécies (Frost, D. R. 2018; Pie *et al.*, 2018) restritas a Floresta Atlântica, ocorrendo desde o Estado da Bahia até o Estado de Santa Catarina (Pombal; Gasparini, 2006; Bornschein *et al.*, 2016a).

O gênero é dividido em três grupos taxonômicos de acordo com sua morfologia, conhecidos como grupos *B. ephippium*, *B. didactylus* e *B. pernix* (Ribeiro *et al.*, 2015). O grupo *B. pernix* é restrito a região mais ao sul de sua distribuição (estados do Paraná e Santa Catarina). Os *Brachycephalus* do grupo *B. pernix* tem como as características

principais o corpo bufoniforme e robusto e a ausência de coossificação dérmica (Bornschein *et al.*, 2016a). O grupo *B. pernix* é composto por: *Brachycephalus actaeus*, *B. albolineatus*, *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. coloratus*, *B. curupira*, *B. fuscolineatus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. mirissimus*, *B. olivaceus*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. quiririensis*, *B. tridactylus* e *B. verrucosus* (Ribeiro *et al.*, 2015; Frost, D. R. 2018; Pie *et al.*, 2018). Já as espécies do grupo *B. ephippium* são similares ao do grupo *B. pernix* e se distinguem dos demais *Brachycephalus* por apresentarem ossificação dérmica. Já os animais do grupo *B. didactylus* apresentam corpo leptodactiliforme, além de não apresentarem a mesma ossificação dérmica presente no grupo *B. ephippium*.

Estes grupos apresentam diversos caracteres fascinantes em sua história natural, como o corpo miniaturizado (Pie *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015; Bornschein *et al.*, 2016a), alto endemismo e algumas espécies apresentam uma forte coloração de advertência (aposematismo) (Figura 1 e 2), variando do amarelo ao laranja, associadas com a presença de tetradoxina e análogos, que estão altamente concentrados em seu tegumento (Pires *et al.*, 2002). Algumas outras espécies são crípticas e não se sabe da presença da toxina nessas espécies (Figura 3 e 4). Seu alto endemismo pode provavelmente ser justificado por uma necessidade conspícua de ambientes frios e úmidos específicos de altas altitudes (Bornschein *et al.*, 2016a). Estudos sugerem que o isolamento desse gênero em *sky islands* é resultado das variações climáticas ocorridas no Quaternário, que pelo princípio de conservação de nicho, levou essas espécies a buscarem maiores altitudes com condições climáticas mais apropriadas (Bornschein *et al.*, 2016a; Firkowski *et al.*, 2016)



Figura 1 - *Brachycephalus mariaeterezae* em vida. FONTE: Ribeiro *et al.*, 2015



Figura 2- *Brachycephalus verrucosus* em vida. FONTE: Ribeiro *et al.*, 2015



Figura 3- *Brachycephalus albolineatus* em vida. FONTE: Bornschein *et al.*, 2016b



Figura 4- *Brachycephalus olivaceus* em vida. FONTE: Ribeiro *et al.*, 2015

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE DADOS

As atividades de campo foram realizadas entre janeiro e março de 2018 na Serra do Quiriri, localizada entre os municípios de Garuva e Campo Alegre no estado de Santa Catarina (Figura 5). A Serra do Quiriri apresenta a conformação de platô, o qual teve suas faces oeste e leste amostradas (Figura 5). Os animais foram coletados por busca ativa, totalizando 4 populações distintas contendo de 5 a 16 indivíduos (Tabela 1). Duas populações correspondem às localidades tipo de *Brachycephalus quiririensis* e *B. auroguttatus* (Pie; Ribeiro, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015), as demais populações correspondem a populações ainda não identificadas, fenotipicamente diferente das demais.

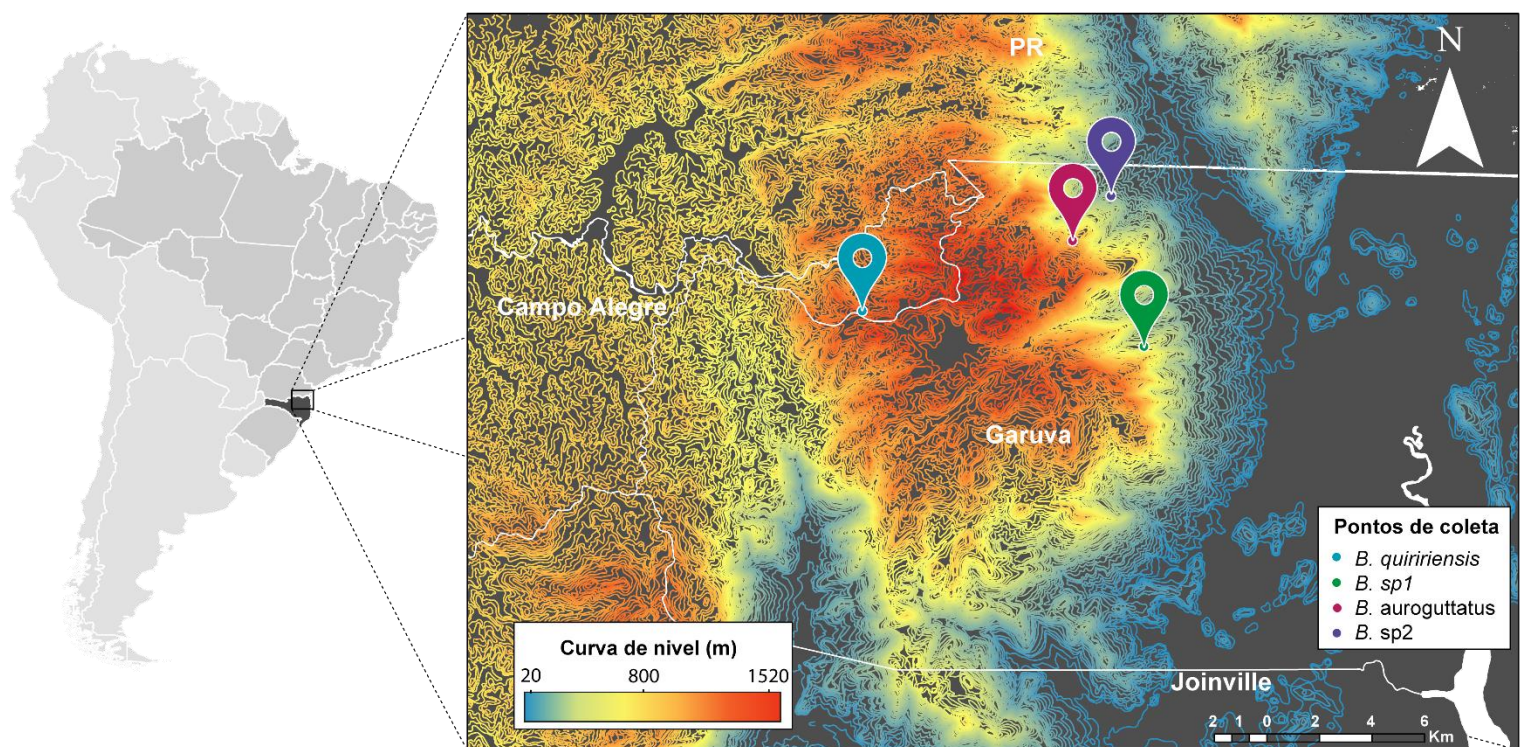


Figura 5- Localidades no sul da Mata atlântica brasileira, na região de Garuva (SC) onde foram coletadas as populações de *Brachycephalus* spp. Em azul os campos do Alto Quiriri, em verde Morro Garuva, e as demais localidades correspondem a Pedra da Tartaruga. Cores quentes representam curvas de níveis em altas altitudes. As abreviações utilizadas foram: PR = estado do Paraná e *B.*= gênero *Brachycephalus*.

Tabela 1- Relação das populações amostradas com seus respectivos dados de coleta.

ID	Indivíduos coletados	Coordenada	Elevação
<i>B. quiririensis</i>	7	26°01'17.4"S , 48°59'47.3"O	1263m
<i>B. auroguttatus</i>	16	26°00'23.3"S , 48°55'25.3"O	1070m
<i>B. sp1</i>	5	26°02'37.5"S , 48°53'42.6"O	745m
<i>B. sp2</i>	6	25°59'42.3"S , 48°54'23.3"O	465m

3.2 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Os espécimes coletados tiveram seu material genético extraído utilizando *SPRI* seguindo o protocolo de adaptado de Olivotto, A. A. (Comunicação pessoal). Este se baseia em uma pré-digestão com proteinase K 20 mg/L em *buffer* ATL, com posterior manipulação da afinidade do *DNA* por carboxila na presença de PEG. Um *locus* mitocondrial (16s rRNA) e três loci nucleares (β - fibrinogênio, proteína ribossomal L3 e tirosinase exon I) foram amplificados a partir da reação em cadeia da *DNA* polimerase (*PCR*). As reações de *PCR* foram realizadas fixando um volume final de 25 μ L, composto de: 1 U Platinum Taq *DNA* polimerase, 1x *PCR buffer*, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dNTPs, 1 μ L de cada primer a 25 pmol (*forward* e *reverse*) e 30 ng de *DNA*. A atividade do termociclador envolveram uma pré-desnaturação a 94 °C por 1 min, seguidos de 35 ciclos à 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* à 46-62 °C por 35-50 s (Tabela 2), extensão a 72°C por 1 min e ao final dos ciclos uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de *PCR* passaram por uma eletroforese em gel de agarose 1.5 % em tampão TBE por 40min a 115 mV. Os *loci* amplificados com sucesso foram purificados usando PEG 8000. O protocolo de sequenciamento seguiu

um valor final de 10 μ L, consistindo de 0.7 μ L de ABI *Prism*^R BigDyeTM v3.1 ,1 μ L de 5x *buffer* e 1 μ L de *primer* (3.2 pmol) e 30ng de DNA da amostra. As condições do termociclador envolveram uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 15 s á 96 °C, 15 s à 50 °C e uma extensão de 4 min a 60 °C. Todos os *loci* tiveram as duas fitas sequenciadas em ambas direções, na plataforma ABI *Prism Genetic Analyzer* da Thermo Fisher.

Tabela 2- Descrição das condições de amplificação dos *loci*.

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	Sequência	Referência	Temperatura e duração de anelamento
rRNA 16S (16S)	16SA-L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Vences <i>et al.</i> , 2000	56 °C, 50 s
	16SB-H	CCCGTCTGAACTCAGATCACGT		
β - fibrinogênio (β -fib)	tmFibF1	CCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTTA	Fitzpatrick <i>et al.</i> , 2009	56 °C, 35 s
	tmFibR1	TTCACAATGGCATGTTCTTCA		
Proteína ribossomal L3 (L3)	RPL35F	AAGAAGTCYCACCTCATGGAGAT	Pinho <i>et al.</i> , 2010	48 °C, 40 s
	RPL3RA	AGTTTCTTTGTGTGCCAACGGCTAG		
Tirosinase exon I (Tyr)	Tyr1C	GGCAGAGGAWCRTGCCAAGATGT	Boussuyt ; Milinkovitch, 2000	62 °C, 35 s
	Tyr1G	TGCTGGGCRTCTCTCCARTCCCA		

3.3 ANÁLISE DE DADOS

As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE v3.8.31 (Edgar, 2004) em configurações padrões e edições manuais posteriores ocorreram no *software* Geneious v11. Os marcadores foram então concatenados, resultando em uma sequência de 1856 bp, os quais tiverem dados de outras espécies do gênero adicionados (Tabela 3).

Tabela 3- Descrição das sequências de cada *locus* utilizado no estudo. Sequências sem número de acesso ao Genbank, são ausentes (NA) ou então adquiridas através da atividade de coleta (CA).

População	Acesso Genbank			
	16s	Bfibr	L3	Tyr
<i>B. quiririensis</i>	KX025317	KX025858	KX026461	KX026163
<i>B. quiririensis</i>	KX025318	KX025859	KX026462	KX026164
<i>B. quiririensis</i>	KX025319	KX025860	KX026463	KX026165
<i>B. quiririensis</i>	KX025320	KX025861	KX026464	KX026166
<i>B. quiririensis</i>	KX025321	KX025862	KX026465	KX026167
<i>B. quiririensis</i>	KX025322	KX025863	KX026466	KX026168
<i>B. quiririensis</i>	CA	CA	NA	CA
<i>B. quiririensis</i>	NA	CA	CA	CA
<i>B. auroguttatus</i>	KX025354	KX025895	KX026492	KX026200
<i>B. auroguttatus</i>	KX025355	KX025896	KX026493	KX026201
<i>B. auroguttatus</i>	KX025356	KX025897	KX026494	KX026202
<i>B. auroguttatus</i>	KX025357	KX025898	KX026495	KX026203
<i>B. auroguttatus</i>	KX025358	KX025899	KX026496	KX026204
<i>B. auroguttatus</i>	KX025359	KX025900	KX026497	KX026205
<i>B. auroguttatus</i>	KX025360	KX025901	KX026498	KX026206
<i>B. auroguttatus</i>	KX025361	KX025902	KX026499	KX026207
<i>B. auroguttatus</i>	KX025362	KX025903	KX026500	KX026208
<i>B. auroguttatus</i>	KX025363	KX025904	KX026501	KX026209
<i>B. auroguttatus</i>	KX025364	KX025905	KX026502	KX026210
<i>B. auroguttatus</i>	KX025365	KX025906	KX026503	KX026211
<i>B. auroguttatus</i>	KX025366	KX025907	KX026504	KX026212
<i>B. auroguttatus</i>	KX025367	KX025908	KX026505	KX026213
<i>B. auroguttatus</i>	KX025368	KX025909	NA	KX026214
<i>B. auroguttatus</i>	KX025369	NA	NA	KX026215
<i>B. sp1</i>	CA	NA	NA	CA
<i>B. sp1</i>	NA	CA	CA	CA
<i>B. sp1</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp1</i>	CA	NA	NA	CA
<i>B. sp1</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	CA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	NA	CA
<i>B. sp2</i>	CA	CA	CA	CA

A delimitação das linhagens se deu por 2 abordagens distintas, a primeira é a inferência filogenética bayesiana usando MrBayes v3.2.6. Uma segunda abordagem

poderia ser a *species tree* usando o *software* *BEAST implementado no BEASTv2.5.0 (Heled; Drummond, 2010), todavia, esse método requer um bom entendimento prévio da delimitação das espécies, o qual não foi encontrado no nosso cenário de 2 populações desconhecidas. Dessa forma partimos para uma abordagem de máxima verossimilhança com RAxML v8 (Stamatakis, 2014). A dinâmica genética populacional foi abordada a partir da rede de haplótipos e de estatísticas de diversidade genética. A rede haplotípica foi confeccionada no *software* PopART v1.7 (*Population Analyses with Reticulate Trees*) a partir do algoritmo *Minimum spanning*. O *software* DNAsp v 6.12.01 foi utilizado para obter os índices: H (número de haplótipos), Hd (diversidade haplotípica), S (número de sítios segregantes), K (diversidade de sequência) e π (diversidade nucleotídica).

As abordagens bayesianas (MrBayes) foram baseadas em corridas de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) de 1×10^7 gerações, amostrando a cada 1000 gerações e descartando 20% das amostras iniciais (*burn-in*). Modelos evolutivos para cada locus foram selecionados usando jModelTest v2.1.10, no qual o modelo evolutivo GTR+ Γ foi selecionado. Avaliamos os tamanhos amostrais efetivos (ESS) para todos os parâmetros utilizando o Tracer v1.6 e a combinação das probabilidades posteriores das árvores geradas pelo TreeAnnotator v2.5. A abordagem de máxima com RAxML (Stamatakis, 2014) se sucedeu na plataforma CIPRES (<http://www.phylo.org>) em conjunto com o teste de *bootstrap* (n=1000), utilizando também o modelo evolutivo GTR+ Γ .

4 RESULTADOS

4.1 CONECTIVIDADE E DIVERSIDADE POPULACIONAL

As análises de conectividade populacional, retomam os quatro *loci* ilustrados na rede de haplótipos (Figura 6). Os *loci* nucleares *Tyr*, *β -fib* e *L3* apresentam uma maior conectividade entre as populações, com maior número de haplótipos compartilhados. Em comparação às demais populações, a população de *B. quiririensis*, foi a com maior número de haplótipos não compartilhados. O *locus* mitocondrial teve o com menor número de haplótipos (H) (Tabela 4). O marcador *16S*, resulta em haplótipos nas populações de *B. quiririensis* e *B. sp1*, já as populações de

B. auroguttatus e *B. sp2* apresentam haplótipos compartilhados (Figura 6). Esses resultados apontam para *B. sp2* sendo uma população de *B. auroguttatus* e direcionam *B. quiririensis* e *B. sp1* como populações divergentes entre si e em relação a *B. auroguttatus* e *B. sp2*.

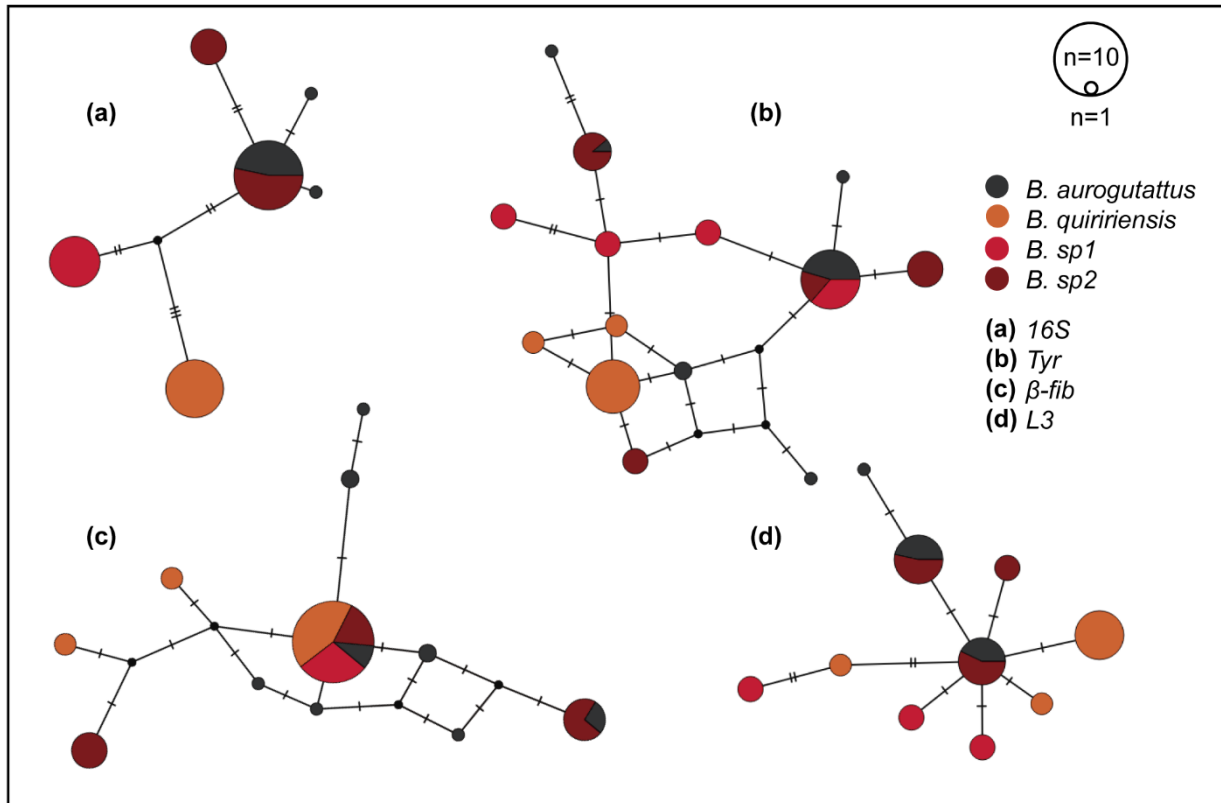


Figura 6- Rede de haplótipos geradas a partir do algoritmo MSN (*Minimum Spanning Network*) para as 4 populações amostradas. Cores representam diferentes populações e letras diferentes marcadores.

Diante de um panorama de curtas distâncias geográfica entre as populações (10,5 km à 2,2 km) os padrões de diversidade genética se mostraram intrigantes. Valores altos de diversidade genética foram encontrados (Tabela 4), indicando que as populações micro-endemicas apresentam uma alta variabilidade genética. Os *loci* nucleares possuem os maiores valores de diversidade haplotípica, sequencial e nucleotídicas, em especial a população de *B. auroguttatus* e *B. quiririensis* tem em média os maiores e menores índices de diversidade, respectivamente.

Tabela 4- Variabilidade genética encontrada nas populações de *B. quiririensis*, *B. auroguttatus*, *B. sp1* e *B. sp2*, em seus diferentes índices de diversidade genética. H, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; S, número de sítios segregantes; K, diversidade de sequência; π , diversidade nucleotídica.

Locus	Espécie/População	H	Hd	S	K	π
16s	<i>B. quiririensis</i>	1	0	0	0	0
	<i>B. auroguttatus</i>	3	0,242	2	0,250	0,00053
	<i>B. sp1</i>	1	0	0	0	0
	<i>B. sp2</i>	2	0,533	2	1,067	0,00255
β -fib	<i>B. quiririensis</i>	3	0,454	4	1,179	0,00304
	<i>B. auroguttatus</i>	8	0,895	7	2,229	0,00838
	<i>B. sp1</i>	2	0,667	1	0,667	0,00168
	<i>B. sp2</i>	3	0,800	5	2,667	0,01034
L3	<i>B. quiririensis</i>	3	0,524	4	1,333	0,00348
	<i>B. auroguttatus</i>	3	0,604	2	0,670	0,00172
	<i>B. sp1</i>	3	1,000	6	4,000	0,01036
	<i>B. sp2</i>	3	0,800	2	1,000	0,00265
Tyr	<i>B. quiririensis</i>	3	0,464	2	0,679	0,00178
	<i>B. auroguttatus</i>	9	0,858	14	3,025	0,00534
	<i>B. sp1</i>	5	1,000	6	3,000	0,00544
	<i>B. sp2</i>	5	0,933	6	2,867	0,00649

4.2 ANALISES FILOGENÉTICAS

A análise filogenética da árvore de genes para *Loci* nucleares e mitocondrial provém suporte para dois clados. Clados consistentes e suportados são identificados considerando a probabilidade posterior dos nós e concordância entre as árvores de gene. A inferência Bayesiana, apresentou valores de ESS altos (Acima de 200) para todos os parâmetros, com base em MCMC, resultou em uma árvore com 35 terminais não enraizada (Figura 7).

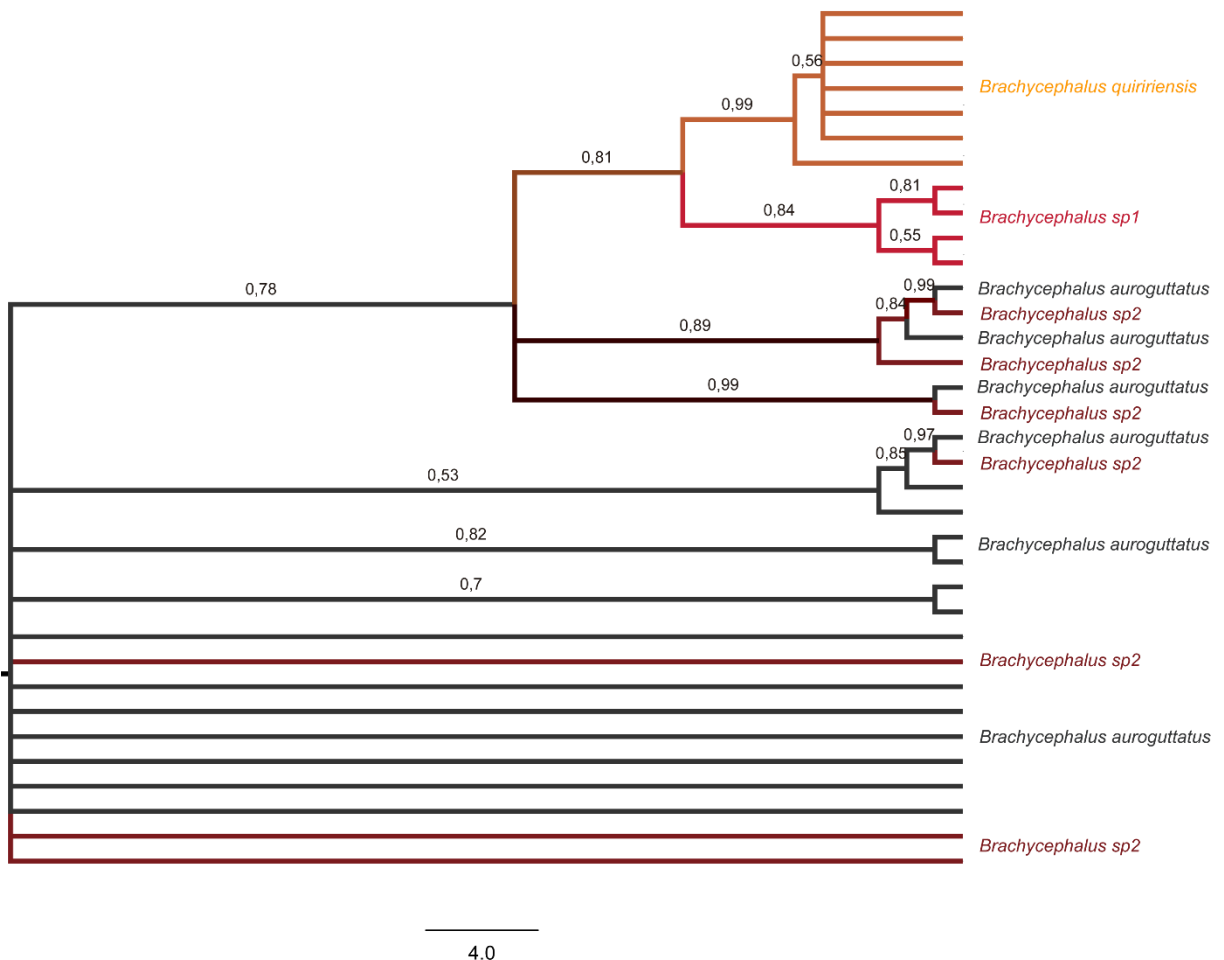


Figura 7- Arvore dos genes concatenados (*16S*, *Tyr*, *L3* e β -*fib*). Os valores de ramo são probabilidades posteriores bayesianas para suporte dos clados e comprimentos de ramo são dados por número de substituições por sítio. Cores representam diferentes populações.

Foram reconhecidos dois clados, a) *B. quiririensis* como grupo irmão de b) *B. sp1*, e a) e b) inseridos em uma politomia com os indivíduos de *B. auroguttatus* e *B. sp2*, não encontrado a relação de parentesco entre seus indivíduos. Os clados a) e b) também foram reconhecidos pela análise de máxima verossimilhança (Figura 8). Todavia, com baixos valores de suporte (<70) e não apresentando a) como grupo irmão de b), mas sim inseridos novamente em uma politomia com os indivíduos de *B. auroguttatus* e *B. sp2*.

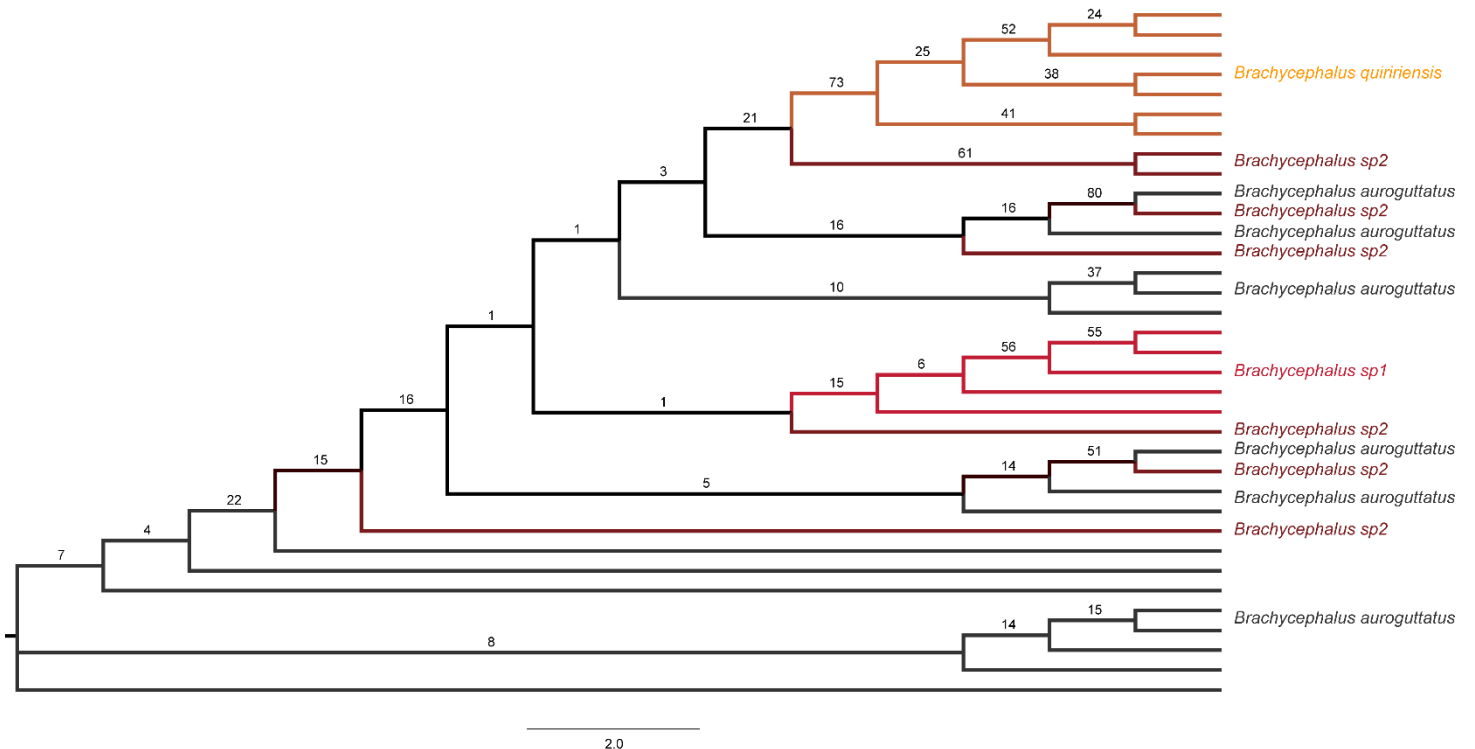


Figura 8- Arvore de máxima verossimilhança dos genes concatenados (16S, Tyr, L3 e β -fib). Valores de *bootstrap* são amostrados sob os ramos e seus comprimentos são dados por número de substituições por sítio. Cores representam diferentes populações.

4.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS POPULACIONAIS

Foram encontradas duas populações com características morfológicas distintas. *Brachycephalus* sp1 apresenta um corpo robusto e bufoniforme, inteiramente alaranjado claro, e alguns indivíduos apresentam algumas manchas em tonalidades de verde claro em sua porção posterior do dorso (Figura 9). Já *B. sp2* também apresenta um corpo robusto e bufoniforme, porém, apresenta uma divergência na coloração corporal sendo essa uma linha laranja escura em que acompanha a coluna vertebral, recobre sua cabeça e a região ventral do corpo (Figura 9). Já em sua porção dorsal e lateral é notável uma mancha com coloração verde escura, similar ao padrão do *B. quiririensis*, porém ocorre em uma área menor e com coloração amarronzada (Figura 9). Em *B. auroguttatus* há a predominância de pontuações dourada ao longo de seu corpo, o qual é tido como sua diagnose (Ribeiro *et al.*, 2015), todas as populações apresentam granulações no dorso (Figura 9).

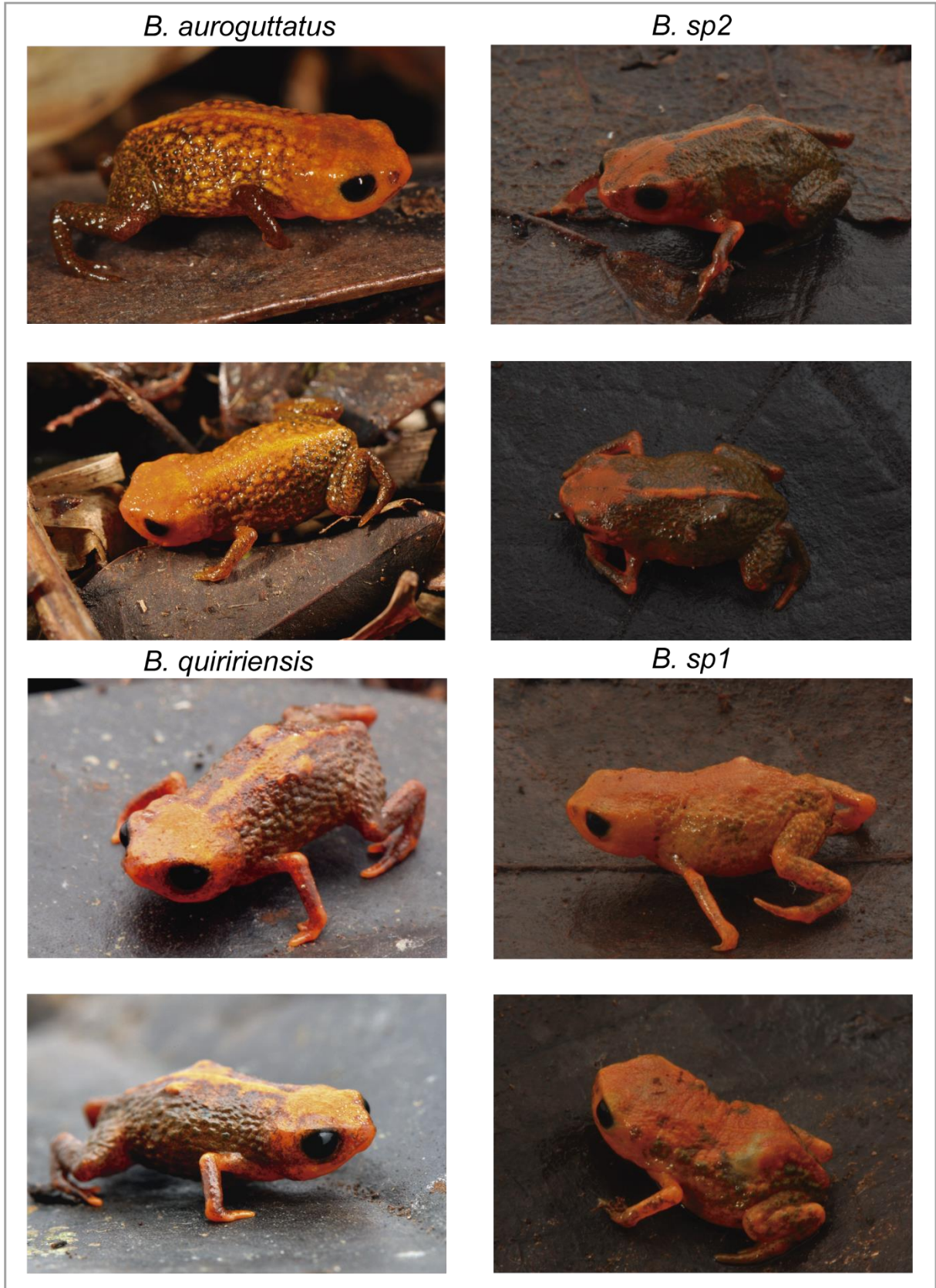


Figura 9- Imagens em vida dos indivíduos separado por suas respectivas populações. FONTE: Luiz Fernando Ribeiro.

5 DISCUSSÃO

5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E CONECTIVIDADE POPULACIONAL

Pela primeira vez no gênero *Brachycephalus* foram encontradas duas populações morfologicamente distintas em uma mesma montanha (Pedra da Tartaruga SC), sem barreira geográfica aparente. Essa distinção se dá entre *B. auroguttatus* com coloração corporal alaranjadas com pontuações douradas, diferentemente de *B. sp2*, cuja coloração de seu corpo varia com o dorso do corpo esverdeado, mas com sua cabeça alaranjada (Figura 9). Esse cenário pode ocorrer por duas possibilidades:

- a) Duas populações haveriam diferenciado e especiado em um primeiro momento. Posteriormente teriam colonizado a Pedra da Tartaruga, em diferentes regiões da montanha.
- b) Uma população ancestral chegou ao local subsequentemente especiando com uma das espécies ocorrendo em altitudes mais elevadas (>1000m) e outra na porção mais baixa da montanha (400-550m).

Assim as populações teriam em a) um ancestral em comum mais antigo em relação a b). Nossos resultados direcionam parcialmente a b), porém aparentemente as duas populações não especiaram. A existência de múltiplos haplótipos compartilhados, indicam alta conectividade populacional, assim as populações de *B. auroguttatus* e *B. sp1* seriam na verdade uma única população, ao menos até um tempo recente. Já as populações de *B. quiririensis* e *B.sp1*, apesar de possuírem alguns haplótipos compartilhados, quando observamos a evolução de um marcador mitocondrial (16S), observa-se a formação de haplótipos únicos dessas duas populações. Devido a mudanças no sistema de reparo de mDNA (genoma mitocondrial), a sua taxa evolutiva é muito alta, até 10x mais rápida quando comparada ao nuDNA (genoma nuclear) (Arias *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1979). Dessa forma, divergências recentes são frequentemente observadas primeiro no genoma mitocondrial, sendo uma possível explicação para os padrões encontrados. Esse mesmo panorama é encontrado por Bell e colaboradores (2015), com duas espécies do gênero *Hyperolius* (Anura: Hyperoliidae) utilizando o *locus* 16S. A

espécie *H. thomensis* ocorre exclusivamente na ilha de São Tome (Golfo da Guiné) e *H. molleri* ocorre na mesma ilha e simultaneamente na Ilha de Príncipe (Adjacente a Ilha de São Tome), porém, seus resultados indicam que as populações de *H. molleri* teriam se diferenciado entre as ilhas, sendo potencialmente espécies diferentes. Coincidentemente, as populações de *B. sp1* apresentam diferenciação haplotípica em relação a *B. quiririensis* e ao conjunto populacional *B. auroguttatus* e *B. sp2*, ocasionados por uma divergência recente.

Curiosamente a diversidade genética mitocondrial foi menor em relação a nuclear, padrão raramente encontrado em populações naturais. Esse fenômeno pode ter sido propiciado pela varredura seletiva (*selective sweep*), que acontece quando um único haplótipo é selecionado, acelerando sua fixação na população, simultaneamente com o desaparecimento dos demais haplótipos (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2015). No entanto, outros estudos são necessários para entender os fatores que determinaram esse cenário. A diversidade genética é advinda de processos evolutivos como mutação, recombinação e isolamento, ou então, ecológicos como movimento de populações e seleção ecológica (Griffiths *et al.*, 2005; Begon *et al.*, 2009). Dessa forma, diante da atual conjuntura com espécies com elevada proximidade geográfica entre as populações é intrigante encontrar uma diversidade genética elevada. Assim, processos evolutivos além dos dependentes de alopatria, poderiam estar regendo essas populações, como especiação por distância (Whright, 1940; Whright, 1943). Simultaneamente, Mayr (1942) introduz o termo de *ring species*, como resultado da especiação pela diminuição do fluxo genético mediante a distância, em populações que apresentam uma barreira geográfica ao centro de sua distribuição. O Complexo Quiriri apresenta a ausência de florestas em seu centro, apresentando apenas manchas descontínuas, podendo agir com uma barreira geográfica, restringido as populações a ocorrerem nas encostas do platô.

5.2 ANALISES FILOGENÉTICAS

Concomitantemente com os resultados encontrados da genética populacional, as análises filogenéticas, particularmente a inferência bayesiana suportam *B. quiririensis* e *B. sp1* como grupos monofiléticos. Isocronamente não pormenorizam as

relações de parentesco com as populações do Pedra da Tartaruga, ou seja, não definem a relação de irmandade entre os grupos. Este resultado é esperado em uma situação de divergência recente, o qual impacta nos valores de suporte de ambas as análises. Assim dois cenários eram possíveis:

- a) Duas ou mais espécies ancestrais teriam chegado ao Complexo Quiriri, em diferentes porções e então sofrido o processo de especiação, resultado nas espécies recentes.
- b) Uma única espécie ancestral colonizou o Complexo Quiriri, e após esse evento se diferenciou ao longo do complexo.

Estudos como Edwards e Beerli (2000) trazem embasamento para distinguir essas duas possibilidades. Os autores revisitaram uma variada gama de modelos evolutivos, em diferentes tempos de divergência. Retornaram no cenário que a maior parte dos modelos elevam sua incerteza da divergência das populações em condições de eventos recentes de divergência, e a quantidade de *loci* amostrados. Assim em um cenário a) as espécies apresentariam ancestrais mais distantes, e suas as delimitações filogenéticas das espécies provavelmente seriam mais facilmente elucidadas. Diferentemente disso, nossos resultados demonstram um elevado grau de incerteza entre a relação das populações, principalmente entre *B. auroguttatus* e *B. sp1*. Dessarte, o cenário b) é o mais suportado para explicar como se sucedeu a colonização primordial no Complexo Quiriri, com uma única espécie chegando ao complexo e então se diferenciando ao longo das encostas do platô. Esta colonização supostamente resultaria em uma distribuição geográfica em anel, visto que até o momento não foram encontradas populações na porção central do platô. A amostragem de populações entre esse gradiente de diferenciação genética, poderiam ter suas relações filogenéticas não facilmente esclarecidas.

5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS EVOLUTIVOS NO COMPLEXO QUIRIRI

A maior parte de anuros apresentam uma alta variação morfológica em suas populações, como as espécies do *Rhinella crucifer* e *Rhinella marina* (Bufonidae), sendo dispendioso a diferenciação entre suas espécies com base em caracteres morfológicos. Ambas as espécies apresentam variações morfológicas, como

coloração e anatomia, contudo alguns estudos com ênfase genética, demonstram que algumas populações de ambas espécies são unidades evolutivas diferentes (Acevedo *et al.*, 2016; Thome *et al.*, 2012). Já *Brachycephalus* apresentam seu fenótipo conservado dentro das espécies, apresentando pouca variação, como por exemplo as 7 espécies descritas em 2015, sendo *Brachycephalus verrucosus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. auroguttatus*, *B. fuscolineatus*, *B. leopardus* e *B. boticário* (Ribeiro *et al.*, 2015). Dessa forma a coloração é uma consistente diagnose entre as espécies. Assim a variação fenotípica encontrada entre as populações no Complexo Quiriri também direciona a processos de divergência populacionais, todavia em uma escala geográfica reduzida (Figura 10).

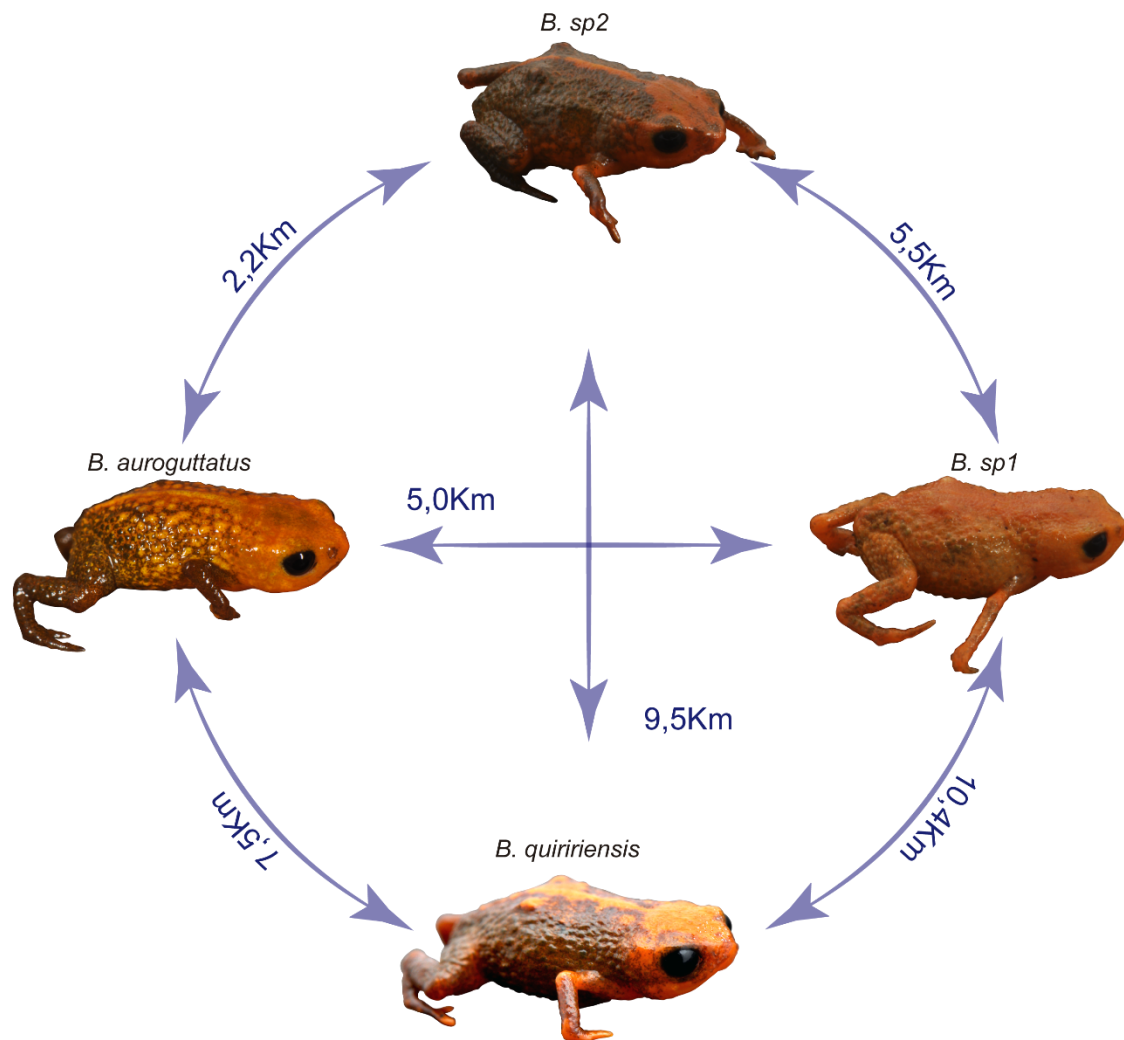


Figura 10- Fotos em vida dos animais e comparação fenotípica e geográfica encontrada entre as populações amostradas. FONTE: o autor, fotografias por Luiz Fernando Ribeiro.

Em especial *Brachycephalus* sp1 é a segunda população mais distante das demais, mas alegadamente com a coloração mais divergente das demais, visivelmente com o maior destaque em um ambiente de serapilheira. Essa variação fenotípica pode estar ligada a um ambiente com maior presença de predadores, acarretando em uma pressão evolutiva à coloração de advertência (Santos *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2002). Entretanto, para haver diferentes pressões de predadores entre as populações, ressaltamos que a população de predadores deveriam ser sensíveis ao gradiente geográfico, ou apresentarem uma eletividade em sua dieta e até uma distribuição agregada em algumas regiões da Serra do Quiriri (Begon *et al.*, 2009). Assim há a uma necessidade de estudos direcionados na história natural em *Brachycephalus*, para preencher essa lacuna. Entretanto, Maan e Cummings (2009) demonstraram em dendrobatídeos a importância da seleção sexual na evolução de sua coloração, sendo essa pressão de seleção maior em relação a pressão de predação. Assim as divergências fenotípicas encontradas nesse estudo, podem ser advindas principalmente dessas duas forças evolutivas. Sendo isso aparente em *B. sp2*, na qual aparentemente sem um evento de especiação ainda difere fenotipicamente das demais. À vista disso, as diferenças morfológicas encontradas entre *B. sp2* e *B. auroguttatus* com uma ínfima distância de 2,2 km seriam justificadas por diferentes pressões entre a região alta do Pico Tartaruga e sua região de baixada. Aparentemente os indivíduos de *B. sp2* são mais crípticos em relação a *B. auroguttatus*, podendo esta estar relacionada a presença de diferentes espécies de predadores nos dois locais. Essa pressão se for demasiada intensa e constante poderiam levar a uma separação entre as populações. Estudos utilizando maior número de *loci* são necessários para avaliar com mais afinco as divergências entre essas duas populações. Porém ressalta-se a importância das comparações fenotípicas, devem sempre levar em conta as percepções da espécie com seu ambiente, não a somente a percepção da espécie humana (Bennett, *et al.*, 1994).

Nossos resultados apresentam congruências, assim alegadamente, as populações do Complexo Quiriri seriam na verdade 3 espécies distintas, sendo elas *B. quiririensis*, *B. auroguttatus* (Em conjunto com *B. sp2*) e *B. sp1*. Já as similaridades fenotípicas e genéticas encontradas podem ser resultado de um sistema de *ring species* (Mayr, 1942).

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As populações de *Brachycephalus* do Complexo Quiriri apresentam populações muito próximas geograficamente, porém de forma discrepante a isso foi encontrado uma alta diversidade genética entre as populações. As populações diferem em seu fenótipo, porém nossas análises filogenéticas não suportam clados monofiléticos para as quatro populações. Nossos resultados indicam que uma única espécie ancestral colonizou o platô, posteriormente se diferenciado nas espécies *B. quiririensis*, *B. auroguttatus* e *B. sp1*, supostamente fruto de isolamento por distância. Aparentemente a *B. sp2* pertenceria a espécie *B. auroguttatus*, diferindo apenas por diferentes pressões evolutivas atuando entre as duas localidades.

Há muitas lacunas (*gap*) sobre o conhecimento do complexo evolutivo encontrado no Quiriri. Assim recomendamos fortemente futuros estudos utilizando um maior volume de dados genéticos e amostragens no complexo, como por exemplo abordagens com RADseq. Em conjunto com estudos de sistema presa-predador para compreender a diferenciação fenotípica que ocorre no complexo.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, A. A. *et al.* The Cane or Marine toad, *Rhinella marina* (anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. **Zootaxa**, v. 4103(6), p. 574-586, 2016.
- ARIAS, M. C. *et al.* O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, p. 305-309, 2003.
- BEGON, M. *et al.* Ecologia: de indivíduos a ecossistemas. **Artmed editora**, 2009.
- BELL, R. C. *et al.* Reed frog diversification in the gulf of guinea: overseas dispersal, the progression rule, and in situ speciation. **Evolution**, 69(4), 904-915, 2015.
- BENNETT, A. T. D. Sexual selection and the mismeasure of color. **The american naturalista**, v. 144(5), p. 848-860, 1994.
- BORNSCHEIN, M. R. *et al.* A new species of brachycephalus (anura: *Brachycephalidae*) from santa catarina, southern Brazil. **Peerj**, v. 4, p. E2629, 2016b.
- BORNSCHEIN, M. R. *et al.* Geographical and altitudinal distribution of *brachycephalus* (anura: *Brachycephalidae*) endemic to the brazilian atlantic rainforest. **Peerj**, v. 4, p. E2490, 2016a.
- BOSSUYT F.; MILINKOVITCH M. C. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 6385-6590, 2000.
- BROWN, W. M. *et al.* Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 76(4), p. 1967-1971, 1979.
- CARNAVAL, A.C. *et al.* Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p.785–789. 2009.
- CRUZ, C.A.G.; FEIO, R.N.. Endemismos em anfíbios em áreas de altitudes na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Em: Nascimento LB, Oliveira ME, eds. **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, p.117–126, 2007.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- EDWARDS, S.; BEERLI, P. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. **Evolution**, v. 54(6), p. 1839-1854, 2000.

FIRKOWSKI, C. R. *et al.* Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern brazilian atlantic forest. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 100, p. 345–360, 2016.

FITZPATRICK S.W. *et al.* Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Mol. Ecol.**, v.18, p. 2877-2896, 2009.

FREELAND, J. R. Molecular ecology. **Chicester: john wiley**, 2005.

FROST, D. R. Amphibian species of the world. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: 4/11/2018.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. The Atlantic Forest of South America: Biodiversity status, threats, and outlook. **Island Press**, Washington, p.3-11, 2003

GRIFFITHS, A. J. *et al.* An introduction to genetic analysis. **Macmillan**, 2005

GUTIÉRREZ-GIL, B. *et al.* An interpretive review of selective sweep studies in *Bos taurus* cattle populations: identification of unique and shared selection signals across breeds. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 167. 2015.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Mol Biol Evol**, v. 27(3), p. 570–80, 2010.

MAAN, M. E.; CUMMINGS, M. E. (2009). Sexual dimorphism and directional sexual selection on aposematic signals in a poison frog. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 106(45), p. 19072-19077, 2009.

MATA, H. *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of the eastern Tapaculos (Aves: Rhinocryptidae: *Scytalopus*, *Eleoscytalopus*): Cryptic diversification in Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 450–462, 2009.

MAYR, E. Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist. **Columbia University Press**, p. 1–68, 1942.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. **MMA/SBF**, Brasília, 2000.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p. 853–845 , 2000.

PIE, M. R *et al.* Phylogenomic species delimitation in microendemic frogs of the brazilian atlantic forest. **BioRxiv** preprint, 2017.

PIE, M. R.; RIBEIRO, L. F. A new species of *Brachycephalus* (anura: Brachycephalidae) from the Quiriri mountain range of southern brazil. **Peerj**, v. 3, p. E1179, 2015.

PIE, M. R.; RIBEIRO, L. F.; CONFETTI, A. E.; NADALINE, M. J.; BORNSCHEIN, M. R. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. **PeerJ**, 6, e5683, 2018.

PIE, M.R.*et al.* Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Ecological Modelling**, v.250, p.165–176, 2013

PINHO C.*et al.* New primers for the amplification and sequencing of nuclear *loci* in a taxonomically wide set of reptiles and amphibians. **Conserv. Genet. Resour.**, v. 2, p. 181-185, 2010.

PIRES, O. R. *et al.* Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (anura: Brachycephalidae). **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 761–766, 2002.

POMBAL, J. P.; GASPARINI, J. L. A new *Brachycephalus* (anura: Brachycephalidae) from the atlantic rainforest of Espírito Santo, southeastern Brazil. **South american journal of herpetology**, v. 1, n. 2, p. 87–93, 2006.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (anura: Brachycephalidae) from southern brazil. **Peerj**, v. 3, p. E1011, 2015.

SANTOS, J. C. *et al.* Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 100(22), p. 12792-12797, 2003.

STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312–1313, 2014.

THOMÉ, M. T. C. *et al.* Delimiting genetic units in neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. **Bmc evolutionary biology**, v. 12(1), p. 242, 2012.

VENCES, M. *et al.* Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, n. 1, p. 34-40, 2000.

WRIGHT, S. Breeding structure of populations in relation to speciation. **The american naturalist**, v.74, p. 232–248, 1940.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, p. 114–138, 1943.

