



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

LIZANE DA SILVA MELO

Variabilidade espacial em caracteres morfológicos e diversidade genética
de *Dendropsophus walfordi* (Anura: Hylidae) em bancos de
macrófitas na Amazônia

MANAUS-AM
JUNHO/2018

LIZANE DA SILVA MELO

Variabilidade espacial em caracteres morfológicos e diversidade genética
de *Dendropsophus walfordi* (Anura: Hylidae) em bancos de
macrófitas na Amazônia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menin

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Izeni Pires Farias

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do
Amazonas como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Zoologia.

MANAUS-AM
JUNHO/2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M528v Melo, Lizane da Silva
Variabilidade espacial em caracteres morfológicos e diversidade genética de *Dendropsophus walfordi* (Anura: Hylidae) em bancos de macrófitas na Amazônia / Lizane da Silva Melo. 2018
45 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcelo Menin
Coorientadora: Izeni Pires Farias
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. anuros. 2. dispersão. 3. macrófitas. 4. estruturação genética. 5. diversidade genética. I. Menin, Marcelo II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*“O amor por todas as coisas vivas é o mais nobre
atributo de um homem.”*

Charles Darwin

Agradecimentos

Nada do que fazemos é mérito só nosso! Por isso veio expressar minha gratidão a todos aqueles que de alguma forma tiveram parte comigo nesse projeto.

Agradeço a Deus, por me permitir viver mais essa etapa da vida, a minha família aos meus pais e meus irmãos por sempre estarem presente, me incentivando e apoiando em todos os momentos. Aos meus amigos que também estiveram comigo nesse mestrado agradeço cada palavra de apoio e incentivo, (mesmo sem ter ideia do meu trabalho com os *sapinhos*)!

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Marcelo Menin, por todos os ensinamentos, por toda disponibilidade e paciência comigo. Minha gratidão à professora Dr^a. Izeni Farias, que aceitou essa coorientação, me apresentando à genética. Obrigada por abrir as portas do LEGAL para o desenvolvimento dessa pesquisa. Assim também, agradeço a todos do LEGAL, que me ajudaram nesse processo, a Priscila por me ensinar todos os procedimentos no laboratório e que me ensinou tudo o que eu precisava saber para fazer minhas extrações e todas as outras etapas seguintes, aos colegas do laboratório que sempre estavam ali pra me ajudar nas minhas muitas dúvidas e que me ajudaram nesse processo - Vitor, Ingrid, Fábio, Israella, Mário, Luciana, Jéssica, Valéria (obrigada também pela ajuda na coleta), e Rommel. Obrigada!

Aos colegas do programa de Pós Graduação em Zoologia, Andréia, Leandro Siqueira, Edson, Leandro Vidal, Xisto, agradeço por poder compartilhar toda essa trajetória com vocês.

Agradeço também a todos que disponibilizaram seus materiais de coleta para realização desse projeto - Luis Fernando Marin da Fonte, Professor Marcelo Gordo e Alexandre Almeida.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas e aos professores do programa! À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudo.

O meu muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 Áreas de estudos.....	15
2.2 Morfometria.....	14
2.3 Análise Estatística.....	16
2.4 Obtenção dos dados genéticos.....	18
2.5 Análise dos dados genéticos.....	19
3. RESULTADOS.....	20
3.1 Morfometria.....	20
3.2 Variação genética.....	23
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO.....	33
6. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

Variabilidade espacial em caracteres morfológicos e diversidade genética de *Dendropsophus walfordi* (Anura: Hylidae) em bancos de macrófitas na Amazônia

Lizane da Silva Melo¹, Luis Fernando Marin da Fonte², Alexandre Pinheiro Almeida¹, Valéria Machado³, Stefan Lötters², Marcelo Gordo^{1,4}, Marcelo Menin^{1,4}, Izeni Pires Farias^{1,3}

¹*Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos 6200, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brasil.*

²*Universität Trier, Faculty of Geography/Geosciences, Biogeography Department, 54286 Trier, Alemanha.*

³*Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos 6200, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brasil.*

⁴*Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos 6200, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brasil.*

* Autor correspondente: lizane_melo@yahoo.com.br

Manuscrito em preparação para submissão ao periódico Amphibia-Reptilia

RESUMO

A Amazônia abriga uma alta diversidade biológica, que atrai pesquisadores desde o século XIX. Porém, o número real de espécies que ocorrem na Amazônia, e os processos responsáveis pela origem e manutenção dessa grande diversidade, ainda são amplamente debatidos. Muito do que se conhece da herpetofauna amazônica está relacionado às áreas de floresta não inundáveis; pouco se sabe sobre a diversidade nos ambientes sazonalmente alagados. Para os anfíbios um modo de dispersão nas florestas alagadas pode se dar através dos bancos de macrófitas. Essas comunidades de plantas aquáticas são consideradas os habitats mais densamente populosos nos corpos de água da várzea. Geralmente, em anfíbios, os movimentos de dispersão são de curtas distâncias. Dispersões em longa distância não são comuns, porém importantes para a expansão populacional, colonização de novos habitats e fluxo gênico. *Dendropsophus walfordi* ocorre na região central e mais ao norte da Bacia Amazônica no Brasil, em ambientes alagados associados às macrófitas. Nesse trabalho utilizamos dados morfométricos para avaliar se existem diferenças morfológicas significantes entre as populações amostradas, e também dados de sequência do gene mtDNA 16S, para avaliar o padrão de distribuição da variabilidade genética da espécie. Considerando que *Dendropsophus walfordi* ocorre nos bancos de macrófitas nossa hipótese nula é de que as populações são panmíticas ao longo de sua distribuição, uma vez que os deslocamentos dos bancos de macrófitas facilitariam o fluxo gênico. Para verificar padrões de divergência morfológica foi realizada uma PCA. Foi sequenciado o gene mtDNA 16S de 64 indivíduos distribuídos em 10 localidades. Foram utilizadas inferências Bayesianas para investigar o número de populações reais. A estrutura de populações foi obtida por meio da AMOVA e eventos demográficos foram investigados via testes *D* de Tajima e *F_s* de Fu. Também foi calculado o índice de diversidade genética. Adicionalmente, considerando a inexistência das relações filogenéticas para as espécies do grupo *Dendropsophus microcephalus* do qual faz parte *D. walfordi*, incorporamos essa abordagem no presente trabalho usando como estratégia a obtenção de todas as sequências de gene mtDNA 16S depositadas no GenBank para as espécies do grupo, tendo espécies do grupo *Dendropsophus leucophyllatus* como grupo externo. A análise dos componentes principais mostrou que não há diferenças fenotípicas aparentes entre as populações de *D. walfordi*. Os testes de neutralidade mostraram expansão populacional, e a AMOVA revelou níveis altos de estruturação populacional. Apesar de não haver relação entre a distância genética e distância geográfica, algum outro fator como barreiras fluviais podem estar contribuindo para esses níveis de estruturação. Considerando o banco de dados obtidos, também exploramos as relações filogenéticas de *D. walfordi* com as outras espécies do grupo *D. microcephalus*. Os resultados da análise de Máxima Verossimilhança indicaram pouca resolução (baixo suporte) para a confirmação do monofiletismo do grupo *D. microcephalus* e, interessante, as espécies *D. walfordi* e *D. nanus* mostraram-se parafiléticas e grupo irmão de *D. coffea*, o que sugere que *D. walfordi* seja sinônimo de *D. nanus*.

Palavras-chaves: anuros, dispersão, macrófitas, filogenia.

ABSTRACT

The Amazon is home to a high biological diversity, which has attracted researchers since the 19th century. Although, the actual number of species occurring in the Amazon, and the processes responsible for the origin and maintenance of this great diversity, are still widely debated. Much of what is known of the Amazon herpetofauna is related to non-floodable forest areas; little is known about diversity in seasonally flooded environments. For amphibians a mode of dispersion in flooded forests can occur through macrophyte banks. These aquatic plant communities are considered to be the most densely populated habitats in the várzea water bodies. Generally, in amphibians, the dispersion movements are of short distances. Long-distance dispersions are not common, but important for population expansion, colonization of new habitats, and gene flow. *Dendropsophus walfordi* occurs in the central region and further north of the Amazon Basin in Brazil, in flooded environments associated with macrophytes. In this work we used morphometric data to evaluate if there are significant morphological differences between the sampled populations, as well as gene mtDNA 16S sequence data, to evaluate the distribution pattern of the genetic variability of the species. Considering that *Dendropsophus walfordi* occurs in macrophytic banks our null hypothesis is that populations are panmictic throughout their distribution, since the dislocations of the macrophyte banks would facilitate the gene flow. To verify patterns of morphological divergence a PCA was performed. The mtDNA 16S gene was sequenced from 64 individuals distributed in 10 locations. Bayesian inferences were used to investigate the number of real populations. Population structure was obtained through the AMOVA and demographic events were investigated via Tajima D and Fu Fs. The index of genetic diversity was also calculated. In addition, considering the lack of phylogenetic relationships for the species of the group *Dendropsophus microcephalus* of which *D. walfordi* is a part, we incorporated this approach in the present work using as strategy the obtaining of all mtDNA 16S sequences deposited in GenBank for the species of the group, taking species of the group *Dendropsophus leucophyllatus* as an external group. The analysis of the main components showed that there are no apparent phenotypic differences among the populations of *D. walfordi*. Neutrality tests showed population expansion, and AMOVA revealed high levels of population structure. Although there is no relationship between genetic distance and geographic distance, some other factor such as river barriers may be contributing to these levels of structuring. Considering the database obtained, we also explore the phylogenetic relationships of *D. walfordi* with the other species of the group *D. microcephalus*. The results of the maximum likelihood analysis indicated little resolution (low support) for the confirmation of the monophyletic group *D. microcephalus* and, interestingly, the species *D. walfordi* and *D. nanus* showed to be paraphyletic and the brother group of *D. coffea*, the which suggests that *D. walfordi* is synonymous with *D. nanus*.

Keywords: anurans, dispersion, macrophytes, phylogeny.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localização geográfica, número de indivíduos e tecidos de *Dendropsophus walfordi* coletados em cada localidade amostrada.....**16**
- Tabela 2.** Medidas morfométricas (mm) de 60 indivíduos machos de *Dendropsophus walfordi*, coletados em 10 localidades na bacia Amazônica. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão e mínimo e máximo. Variáveis Morfométricas: HW -Largura da cabeça, SVL-Comprimento rosto-cloacal, TL-Comprimento da tíbia, IOD-Distância interorbital, HL-Comprimento da cabeça, ED-Diâmetro do olho, IND-Distância internasal, EN- Distância olho-narina, FL-Comprimento do pé, TD-Diâmetro do tímpano, THL-Comprimento da coxa, SL-Comprimento do focinho, HAL-Comprimento da mão, FLL-Comprimento do antebraço, UEW-Largura da pálpebra superior, Fin4DW-Largura do disco dedo 4.....**21**
- Tabela 3.** Correlação entre as variáveis morfométricas medidas em *Dendropsophus walfordi* os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais os caracteres aplicados na PCA e os eixos gerados.....**22**
- Tabela 4.** Índices de diversidade e teste de neutralidade em cada uma das populações de *Dendropsophus walfordi* amostradas em 10 localidades na bacia Amazônica. N= número de indivíduos, Hp= número de haplótipos, S= número de sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica e DP = desvio padrão, D de Tajima (valor de p), Fs de Fu (valor de p). Para a definição dos grupos, ver texto.....**23**
- Tabela 5.** Matriz dos valores de *Fst* nas comparações par a par entre as populações de *Dendropsophus walfordi* a partir dos dados mitocondriais (16S). Para a definição dos grupos, ver texto.....**24**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Banco de macrófita em deslocamento no rio.....	13
Figura 2. Indivíduo de <i>Dendropsophus walfordi</i> no banco de macrófita.....	14
Figura 3. Locais de amostragem de indivíduos de <i>Dendropsophus walfordi</i> ao longo da Bacia Amazônica, nos estados do Amazonas, Acre e Pará.....	17
Figura 4. Medidas morfométricas de anuros: A) Largura da cabeça, B) Comprimento rosto- cloacal, C) Comprimento da tíbia, D) Distância interorbital, E) Comprimento da cabeça, F) Diâmetro do olho, G) Distância internasal, H) Distância olho-narina, I) Comprimento do pé, J) Diâmetro do tímpano, K) Comprimento da coxa, L) Comprimento do focinho, M) Comprimento da mão, N) Comprimento do antebraço, O) Largura da pálpebra superior, P) Largura do disco dedo 4. Fonte: Modificado de Watters <i>et al.</i> (2016).....	18
Figura 5. Caracterização morfométrica de indivíduos machos para 10 localidades na Amazônia Brasileira de <i>Dendropsophus walfordi</i> baseada nos dois primeiros componentes principais.).....	25
Figura 6. Padrão de distribuição dos grupos biológicos de <i>Dendropsophus walfordi</i> coletados em 10 localidades nos estados do Amazonas, Pará e Acre, gerado no programa BAPS.....	27
Figura 7. Rede de haplótipos gerada no programa HaploViewer e baseada nas sequências de mtDNA, mostrando as relações genealógicas entre os indivíduos de <i>Dendropsophus walfordi</i> . Um haplótipo está representado pelos círculos e o número dentro deles indica quantos indivíduos possuem esse haplótipo. O nó azul representa passos mutacionais.....	28
Figura 08. Distribuição dos grupos biológicos de <i>Dendropsophus walfordi</i> ao longo dos locais de coleta nos estados do Amazonas, Pará Acre.....	29
Figura 09. Árvore filogenética do grupo de <i>Dendropsophus microcephalus</i> baseada em dados do Genbank para 22 espécies, e do presente estudo para <i>Dendropsophus walfordi</i>	31

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, especialmente concentrada na Região Amazônica, que é a maior e mais diversificada entre essas florestas (Silva *et al.*, 2005). Por esta razão, aliada a extensão territorial, diversidade geográfica e climática, o país abriga uma imensa diversidade biológica, o que faz dele o principal entre os países detentores de megadiversidade do planeta (MMA, 2002).

Aliado a alta diversidade de ambientes, a Amazônia possui a maior diversidade de espécies de vários grupos taxonômicos (Hoorn *et al.*, 2010). E várias hipóteses têm sido propostas para explicar essa alta diversidade (Vallinoto, 2009). Na Amazônia, os padrões de diversificação e distribuição de espécies têm sido geralmente associados à presença de grandes rios, como proposto originalmente por Wallace (1852), aos refúgios do Pleistoceno por Haffer (1969), entre outras hipóteses. No geral, essas hipóteses foram moldadas com base na distribuição de primatas e aves de terra firme, os quais tem sua distribuição influenciada pelos grandes rios, regiões conhecidas como áreas de endemismo, que em sua maioria correspondem aos grandes interflúvios da Bacia Amazônica (Wallace, 1852; Ribas *et al.*, 2012). No entanto, para a herpetofauna, ainda há poucos estudos que permitem entender a distribuição das espécies dentro dessas áreas de endemismo (Ron, 2000; Menin *et al.*, 2017).

Apesar de a Amazônia ser considerada um bioma de floresta tropical úmida amplamente conectada, ela possui uma alta complexidade funcional e estrutural (Hoorn *et al.*, 2010). Na planície Amazônica, as florestas de terra firme, localizadas acima do nível máximo de inundação dos rios, e as florestas sazonalmente inundadas (várzea e igapó) que ocorrem nas planícies de sedimentação dos rios, e são sazonalmente submetidas a um pulso de inundação regular, representam as principais diferenças nos tipos de macro-habitat em uma paisagem florestal (Hess *et al.*, 2003; Haugaasen & Peres, 2006; Bayley & Sparks 1989). Essa dinâmica do pulso de inundação, verificado nos grandes rios da Amazônia, é resultante do somatório das chuvas de toda a bacia de drenagem e do degelo anual do verão andino, e é responsável pela complexidade sazonal dos ecossistemas aquáticos da região (Bayley & Sparks 1989).

Nas várzeas amazônicas são encontrados os bancos de capim flutuante (figura 1), ou bancos de macrófitas, os quais são leitos extensos de macrófitas que se desenvolvem sazonalmente e desempenham papel ecológico importante para as

florestas alagadas, disponibilizando abrigo para vertebrados e invertebrados (Melack & Forsberg, 2001).



Figura 1. Banco de macrófita em deslocamento no rio.

São considerados os habitats mais densamente populosos nos corpos de água da várzea (Junk, 1973) constituindo um ambiente peculiar, abrangendo biótopos aquáticos e terrestres podendo transportar assembleias de vertebrados e invertebrados notavelmente diversificados e abundantes (Schiesari, 2003). Os anfíbios anuros também se utilizam dessas macrófitas aquáticas como locais de vocalização e reprodução (Hödl, 1977). Após crescimento explosivo durante o período de aumento dos níveis de água, esses bancos de macrófitas, muitas vezes, ficam fracos e quebram, formando jangadas que ficam à deriva e podem entrar no canal principal do rio e ser levados pelas correntes de vento e água, contribuindo para a homogeneização da biota e agindo contra a especiação (Junk & Piedade, 1997; Schiesari, 2003).

A diversidade de espécies de anfíbios no Brasil é a maior do planeta: atualmente são conhecidas 1.080 espécies, das quais 1.039 pertencem à Ordem Anura (Segalla *et al.*, 2016). Na Amazônia brasileira são conhecidas 309 espécies pertencentes à ordem Anura (Hoogmoed & Galatti, 2017).

O gênero *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 é o maior gênero da subfamília Dendropsophinae com 105 espécies descritas. Distribuído desde o Norte da Argentina e Uruguai, ao longo da área tropical da América do Sul e América Central até o Sul do México (Frost, 2018), esse gênero foi revalidado por Faivovich *et al.* (2005), e inclui espécies com 30 cromossomos e que anteriormente eram pertencentes ao gênero *Hyla* Laurenti, 1768. O gênero *Dendropsophus* é composto por espécies de pequeno porte (algumas espécies com tamanho aproximado de $\pm 20,00\text{mm}$) e está dividido em nove

grupos de espécies (Faivovich *et al.*, 2005). E devido esse pequeno tamanho e semelhança fenotípica entre as espécies do gênero, a identificação é complexa e tem resultado em uma série de problemas taxonômicos, incluindo erros de identificação das amostras (Medeiros *et al.*, 2013). Muitas espécies, por exemplo, foram descritas oriundas de uma ou poucas localidades, os espécimes-tipo estão espalhados em muitas coleções de museus na América do Norte e na Europa e isso dificulta, em parte, as comparações necessárias e consequentemente, várias taxa nominal de pequenos hilídeos já foram confundidos na literatura (Moravec *et al.*, 2008).

A espécie alvo desse trabalho *Dendropsophus walfordi* (figura 2), foi descrita em 1962, tendo como localidade-tipo Forte Príncipe da Beira, em Rondônia, Brasil (Bokermann, 1962). Sua área de distribuição é principalmente a região central e a porção mais ao norte da Bacia Amazônica no Brasil (Frost, 2018). *Dendropsophus walfordi* ocorre em áreas abertas, principalmente ambientes de várzea, associado aos bancos de macrófitas (Upton *et al.*, 2014). Para *D. walfordi*, a descrição do canto de anúncio baseia-se na comparação com o canto de indivíduos de *D. nanus* da Bolívia concluindo assim que são espécies distintas (de La Riva *et al.*, 1997). A espécie já foi alvo de muitas discussões taxonômicas: já foi considerada subespécie, espécie sinônima, até ser validada novamente como espécie (Lutz, 1973; Duellman, 1977; Basso *et al.*, 1985; Langone & Basso, 1987).



Figura 2. Indivíduo de *Dendropsophus walfordi* no banco de macrófita

Nos últimos anos a utilização integrada de diferentes técnicas de identificação de espécies tem aumentado muito a descoberta e caracterização da diversidade biológica global, principalmente para os anfíbios, onde a taxa de descrição de espécies acelerou enormemente nos últimos 20 anos (Gehara *et al.*, 2014). O uso de marcadores

moleculares tem sido bastante útil na sinalização de possíveis novas espécies, avaliação da variabilidade genética inter e intrapopulacional e análise da diversidade em anuros diminuindo, assim, erros na identificação das espécies (Fouquet *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2011) e também elucidando as relações filogenéticas (Rosa & Paiva, 2009). Genes do DNA mitocondrial têm sido os principais marcadores utilizados para estudos das relações evolutivas entre indivíduos e da distribuição da variabilidade genética entre populações de várias espécies de animais, incluindo os anfíbios (Lougheed *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2007).

Faivovich *et al.* (2005), usando morfologia e sequências de genes mitocondriais e nucleares, propuseram uma composição de espécies para o grupo *D. microcephalus*, e a monofilia para o grupo, reportando que *Dendropsophus nanus* e *D. walfordi* são monofiléticas e irmãs. Entretanto, nesse trabalho, os autores utilizaram somente um indivíduo de *D. walfordi*. Jasen *et al.* (2011) em um inventário integrativo de espécies da Bolívia, dentre elas algumas espécies do gênero *Dendropsophus*, sugerem que nova revisão taxonômica seja feita, por possuir uma diversidade complexa de espécies principalmente o grupo *D. microcephalus*, não só pelo fato de ser o maior grupo em número de espécies, mas também, por serem espécies de tamanho bastante reduzido, fazendo com que seja necessária uma análise robusta e sistemática. Fouquet *et al.*, 2011, em uma análise sobre as relações filogenéticas do gênero mostra que as espécies de *Dendropsophus walfordi* e *Dendropsophus nanus* são parafiléticas esse mesmo resultado é encontrado por Medeiros *et al.*, 2013 a partir de comparações citogenéticas e inferências filogenéticas. Análises cariotípica em espécies do gênero *Dendropsophus* tem revelado bons resultados, porém a maioria das espécies do gênero não possui seu cariótipo descrito (Rocha, 2013).

Muitos desses trabalhos realizados têm base em poucos espécimes coletados, com isso não podendo se fazer uma maior conclusão a respeito dessas relações. Essa dificuldade no entendimento das relações filogenéticas inclui principalmente grande parte das espécies do grupo *D. microcephalus* que são tentativamente atribuídos no grupo de espécie pela sua descrição morfológica.

Devido à escassez de informações sobre essa espécie na literatura, incluindo suas relações filogenéticas e estruturação geográfica, o presente estudo visa ampliar o entendimento do conhecimento da taxonomia dessa espécie através de análises morfométricas e moleculares, avaliar a influência dos bancos de macrófitas na dispersão e fluxo gênico para *Dendropsophus walfordi* na Amazônia onde levantamos a hipótese

de panmixia dessa espécie, além disso, propor uma hipótese de relacionamento das espécies do grupo *Dendropsophus microcephalus* usando sequências de rRNA 16S disponíveis no GenBank e acrescentando espécies não incluídas na filogenia de Faivovich *et al.*(2005).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Áreas de estudos

O material utilizado nesse projeto (exemplares testemunhos e tecidos) foi coletado ao longo da Bacia Amazônica, nos seguintes municípios distribuídos em três estados: Iranduba, Itacoatiara, Parintins, Manicoré, Careiro Castanho, Nova Olinda do Norte (Amazonas), Santarém, Monte Alegre e Almeirim (Pará) e Rio Branco (Acre) (Figura 3).

Todo o material foi coletado e depositado por Luis Fernando Marin da Fonte (autorizações de coleta SISBIO/ICMBIO 44897-1, 44897-3, 11323-1; Comitê de Ética no Uso de Animais 039/2015 CEUA-UFAM, em projeto desenvolvido por meio de Acordo de Cooperação Técnico, Científica e Cultural entre a UFAM e a Universidade de Trier, Alemanha), Alexandre Pinheiro de Almeida (SISBIO/ICMBIO 56742/2017) e Marcelo Gordo (SISBIO/ICMBIO 38143-1/2013). Todos os exemplares e tecidos estão disponíveis na seção de anfíbios da Coleção Zoológica Paulo Bührnheim (CZPB-AA) e na Coleção de Tecidos (CTGA), ambas da Universidade Federal do Amazonas.

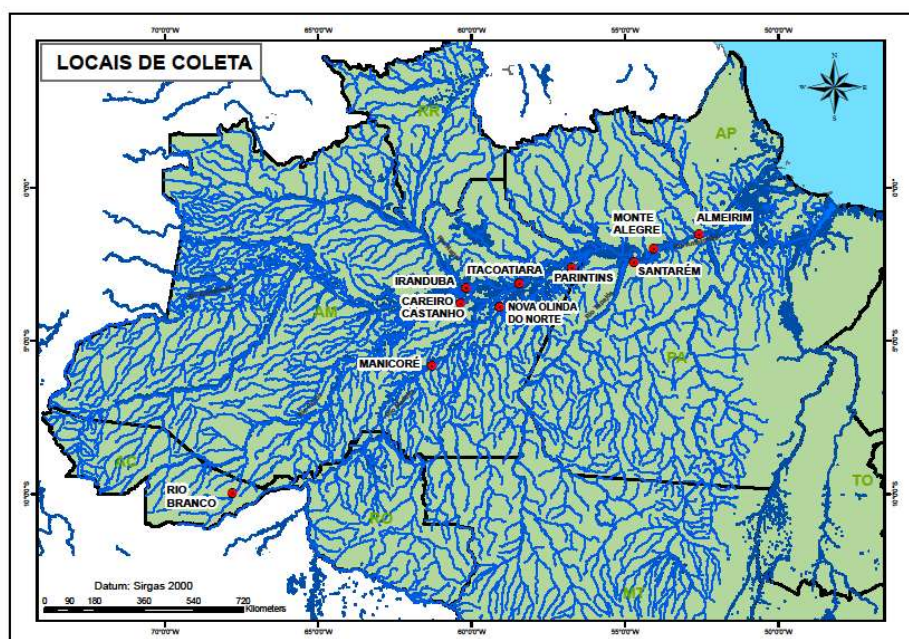


Figura 3. Locais de amostragem de indivíduos de *Dendropsophus walfordi* ao longo da Bacia Amazônica, nos estados do Amazonas, Acre e Pará.

Em cada localidade os espécimes foram coletados nos bancos de macrófitas por meio de busca ativa em período noturno, com a utilização de lanternas e barcos. Para as análises moleculares foram coletados em campo, tecidos do músculo da coxa e quando necessário, uma falange foi amputada. Em laboratório a partir da extração do DNA alguns tecidos não foram utilizados, isso devido sua baixa qualidade, assim em algumas localidades o número de indivíduos foi maior que o total de tecidos, ou ainda em alguns casos foi coletado apenas a falange e esse animal foi liberado no ambiente (Tabela 1).

Tabela 1. Localizações geográficas, número de indivíduos e tecidos de *Dendropsophus walfordi* coletados em cada localidade amostrada.

Localidades	Coordenadas Geográficas	Número de indivíduos	Número de Tecidos
Rio Branco	09°56'44.20"S 67°44'19.40"W	3	3
Iranduba	03°18'44.63"S 60°13'17.57"W	9	5
Careiro Castanho	03°38'08.92"S 59°53'56.38"W	10	10
Nova Olinda do Norte	03°49'38.93"S 59°04'22.67"W	1	1
Manicoré	05°52'27.25"S 61°29'34.47"W	10	8
Itacoatiara	03°10'08.65"S 58°27'28.45"W	8	10
Parintins	02°33'42.12"S 57°06'50.10"W	5	4
Santarém	02°21'16.74"S 54°34'39.37"W	6	7
Monte Alegre	02°01'47.48"S 54°07'32.20"W	5	8
Almeirim	01°37'19.07"S 52°49'25.34"W	3	8
TOTAL		60	64

2.2. Morfometria

Para as análises morfométricas foram utilizados todos os exemplares depositados na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim da UFAM de cada localidade amostrada nesse estudo. As análises morfométricas seguiram os parâmetros definidos por Watters *et al.* (2016), os quais propuseram 16 variáveis morfométricas: HW (head width, largura da cabeça); SVL (snout–vent length, comprimento rostro-cloaca; TL (tibia length,

comprimento da tíbia); IOD (interorbital distance, distância interorbital); HL (head length, comprimento da cabeça); ED (eye diameter, diâmetro do olho); IND (internarial distance, distância internasal); EN (eye–nostril distance, distância olho-narina); FL (foot length, comprimento do pé); TD (tympanum diameter, diâmetro do tímpano); THL (thigh length, comprimento da coxa); SL (snout length, comprimento do focinho); HAL (hand length, comprimento da mão); FLL (forearm length, comprimento do antebraço); UEW (upper eyelid width, largura da pálpebra superior); Fin4DW (finger IV disk width, largura do disco dedo 4) (Figura 4).

As medições foram realizadas utilizando um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm e, para estruturas menores (tímpano, olho, disco do dedo), utilizou-se ocular com escala micrométrica em microscópio estereoscópico.

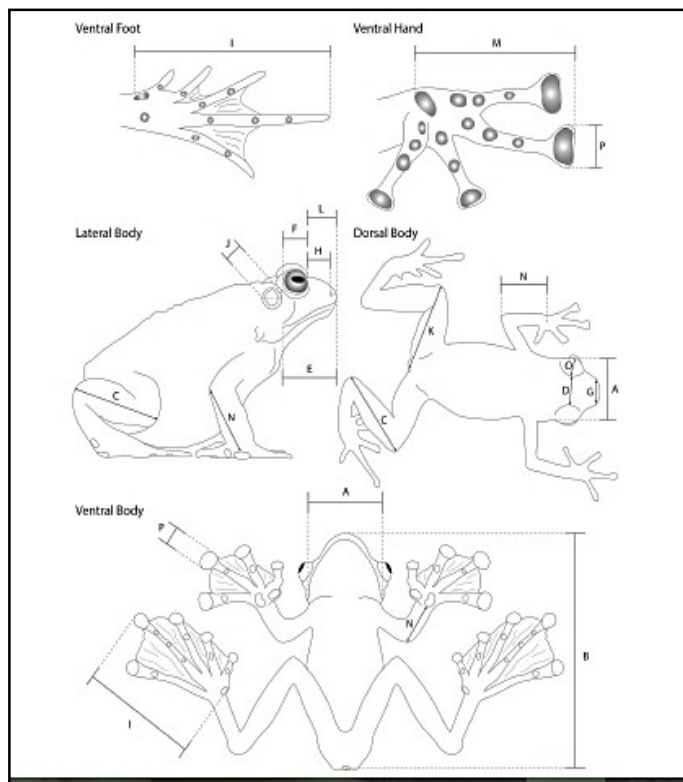


Figura 4. Medidas morfométricas de anuros: **A)** Largura da cabeça, **B)** Comprimento rostro-cloacal, **C)** Comprimento da tíbia, **D)** Distância interorbital, **E)** Comprimento da cabeça, **F)** Diâmetro do olho, **G)** Distância internasal, **H)** Distância olho-narina, **I)** Comprimento do pé, **J)** Diâmetro do tímpano, **K)** Comprimento da coxa, **L)** Comprimento do focinho, **M)** Comprimento da mão, **N)** Comprimento do antebraço, **O)** Largura da pálpebra superior, **P)** Largura do disco dedo 4. **Fonte:** Modificado de Watters *et al.* (2016).

2.3 Análises estatísticas

As variáveis morfométricas medidas foram analisadas por meio de uma Análise de Componentes Principais (PCA), para redução da dimensionalidade dos dados. A PCA é usada amplamente para revelar os padrões de divergências morfológicas (Reis, 1988). Para testar a existência de diferenças significativas no espaço morfológico dos indivíduos de *D. walfordi* foi usada Análise de Variância Multivariada (MANOVA) com os dois primeiros componentes principais obtidos na PCA. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa computacional R (R Development Core Team 2013).

2.4. Obtenção dos dados Genéticos

Extração de DNA

De cada indivíduo capturado (ainda em campo) foi coletado uma amostra de tecido de uma das falanges ou músculo da coxa. Em seguida, o material foi armazenado em tubo de 2,0 ml com álcool 95% e depositados na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA ICB/UFAM (CGEN, Deliberação No. 75, de 26 de agosto de 2004) do Laboratório de Evolução e Genética Animal. O DNA genômico foi extraído utilizando-se protocolo CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987) com adição de proteinase *K*. A qualidade do DNA foi checada através de eletroforese em gel de agarose 1% e, sua concentração quantificada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Amplificação e Sequenciamento do gene mtDNA 16S

O fragmento mitocondrial amplificado foi o gene mtDNA 16S, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os *primers forward* 16S L2508 (5' CTC GGC AAA CAT AAG CCT CGC CTG TTT ACC AAA AA) e *reverse* 16S H SLA (5' TGC ACC ATT RGG ATG TCCTGA TCC AA). O volume final das reações da PCR foi de 16 µL contendo 4.4 µL ddH₂O, 2.3 µL de 25mM MgCl₂, 2.0 µL de 10mM dNTPs, 0.3 de BSA, 1.5 µL de tampão 10X (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1.5 µL da solução de 2 µM de cada primer, 0.5 µL de Taq DNA Polymerase 5 U/µL (Biotools, Espanha) e 2 µL de DNA (cerca de 30 ng/µL). O processo de amplificação: desnaturação inicial a 92°C (1 min), 35 ciclos de desnaturação a 92°C (1 min), anelamento 50°C (35 s), extensão 72°C (1 min), extensão final 72°C (5 min). O produto

da PCR foi visualizado em gel de agarose 1% e purificado com as enzimas Exonuclease (Exo) e Fosfatase Alcalina (SAP) (Sinapse) seguindo as recomendações do fabricante. Nas reações de sequenciamento foi utilizado o *primer forward*, utilizando o kit *Big Dye terminator* seguindo protocolo do fabricante (Life Technologies). O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com etanol 100% e EDTA, e as sequências foram então determinadas pelo sequenciador automático ABI3500.

2.5 Análises Genéticas

O banco das sequências do gene mtDNA 16S de *Dendropsophus walfordi* foi editado e alinhado no programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Versão 6.1.6 (Biomatters), usando a ferramenta ClustalW (Larkin *et al.* 2007).

Sequências do gene mtDNA 16S de todas as espécies do grupo *D. microcephalus* foram baixadas do GenBank e alinhadas com as sequências de *D. walfordi* da Amazônia coletadas no presente trabalho para análise das relações filogenéticas das espécies desse grupo. A lista dos indivíduos pode ser visualizada no material Suplementar 1.

Para a determinação do melhor modelo evolutivo para o banco de dados foi utilizado o programa jModeltest versão 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012).

Grupos biológicos em *Dendropsophus walfordi*

Para estimar as relações genealógicas entre os indivíduos, foi produzida uma rede de haplótipos, com base na topologia de uma árvore filogenética, no programa HAPLOVIEWER (Salzburger *et al.*, 2011). Essa árvore de máxima verossimilhança foi gerada no programa TREEFINDER (Jobb *et al.*, 2004), usando o modelo de substituição mais apropriado, determinado pela ferramenta do jModeltest versão 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012) e posteriormente importada para o HAPLOVIEWER.

A diversidade genética dos grupos de indivíduos de cada localidade foi estimada pelo número de haplótipos, diversidade haplotípica, e diversidade nucleotídica obtidas com o programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Já a demografia histórica foi avaliada através dos testes de neutralidade, D de Tajima (Tajima, 1989) e *F_s* de Fu (Fu, 1997) e de distribuição das diferenças par a par (*mismatch distribution*) também no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A estrutura populacional foi estimada por meio da análise de variância molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) e pelas comparações par a par dos valores de *Fst* entre cada grupo amostral. O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi aplicado para verificar a correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas, e assim verificar se existe algum efeito do isolamento por distância na distribuição da variabilidade genética das populações. Para inferir o número real de grupos biológicos presentes em *Dendropsophus walfordi*, foi utilizado o método Bayesiano desenvolvido por Corander & Tang (2007), com o uso do programa BAPS 4.14 (Bayesian Analysis of Genetic Population Structure) que utiliza um algoritmo de busca estocástica calculando a distribuição posterior dos parâmetros do modelo condicionados pelos dados observados, as frequências nucleotídicas das sequências de DNA.

Relações filogenéticas das espécies do grupo de *Dendropsophus microcephalus*

Para as análises filogenéticas foram obtidas sequências do gene mtDNA 16S das espécies do grupo de *Dendropsophus microcephalus* até o momento depositadas no GenBank (Tabela Suplementar S1). O último trabalho que abordou toda a filogenia do grupo foi Faivovich *et al.* (2005), onde a monofilia do grupo não pode ser confirmada. Usamos como grupo externo as espécies do grupo *Dendropsophus leucophyllatus* que segundo Faivovich *et al.* (2005), são filogeneticamente mais relacionadas ao grupo *D. microcephalus*.

O banco de sequências do gene mtDNA 16S foi analisado no programa jModeltest versão 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012), para se obter o modelo evolutivo que melhor se ajustou ao banco de dados para as análises filogenéticas.

A análise filogenética de Máxima Verossimilhança foi realizada no programa TreeFinder (Jobb *et al.*, 2004), e a árvore filogenética foi gerada com base no modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (1985).

3. RESULTADOS

3.1 Morfometria

As análises morfométricas foram realizadas com um total de sessenta indivíduos de *Dendropsophus walfordi* (Tabela 2), coletados em todas as localidades estudadas (Tabela 1). O primeiro componente principal explicou 47,45% da variação total, e as

variáveis mais importantes foram o comprimento da tíbia, comprimento rostro-cloacal, a largura da cabeça e o comprimento da coxa. O segundo componente principal explicou 12,93% da variação, e as variáveis mais importantes foram o comprimento da cabeça e o comprimento do focinho (Tabela 3). Juntos, os dois primeiros componentes principais explicaram uma variação total de 60,38%.

Tabela 2. Medidas morfométricas (mm) de 60 indivíduos machos de *Dendropsophus walfordi*, coletados em 10 localidades na bacia Amazônica. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão e mínimo e máximo. Variáveis Morfométricas: HW-Largura da cabeça, SVL-Comprimento rosto-cloacal, TL-Comprimento da tíbia, IOD-Distância interorbital, HL-Comprimento da cabeça, ED-Diâmetro do olho, IND-Distância internasal, EN-Distância olho-narina, FL-Comprimento do pé, TD-Diâmetro do tímpano, THL-Comprimento da coxa, SL-Comprimento do focinho, HAL-Comprimento da mão, FLL-Comprimento do antebraço, UEW-Largura da pálpebra superior, Fin4DW-Largura do disco dedo 4.

Variável Morfométrica	Rio Branco (n=3)	Iranduba (n=9)	Careiro Castanho (n=10)	Nova Olinda do Norte (n=1)	Manicoré (n=10)	Itacoatiara (n=8)	Parintins (n=5)	Santarém (n=6)	Monte Alegre (n=5)	Almeirim (n=3)
HW	5,02 $\pm$ 0,06 (4,47-5,72)	4,72 $\pm$ 0,28 (4,19-5,08)	5,29 $\pm$ 0,39 (4,93-6,04)	6,39	5,38 $\pm$ 0,29 (4,96-5,88)	5,51 $\pm$ 0,37 (5,1-6,22)	5,5 $\pm$ 0,41 (5,06-5,93)	5,18 $\pm$ 0,35 (4,77-5,81)	5,15 $\pm$ 0,20 (4,95-5,5)	4,59 $\pm$ 0,55 (4,22-5,23)
SVL	17,99 $\pm$ 0,77 (17,43-18,87)	16,20 $\pm$ 1,34 (13,67-18,3)	17,15 $\pm$ 0,913 (16,07-18,50)	22,01	18,47 $\pm$ 1,02 (17,55-20,75)	19,26 $\pm$ 2,00 (16,63-23,14)	18,89 $\pm$ 1,46 (17,45-20,63)	17,72 $\pm$ 1,85 (15,69-20,05)	18,30 $\pm$ 1,00 (17,21-19,48)	16,01 $\pm$ 1,65 (14,53-17,79)
TL	8,59 $\pm$ 1,02 (7,44-9,41)	7,71 $\pm$ 0,58 (6,87-8,90)	8,36 $\pm$ 0,54 (7,66-9,23)	10,03	8,91 $\pm$ 0,39 (8,50-9,84)	9,76 $\pm$ 1,12 (9,1-12,26)	8,94 $\pm$ 0,67 (7,88-9,74)	8,56 $\pm$ 0,70 (7,59-9,44)	8,76 $\pm$ 0,45 (8,41-9,52)	7,70 $\pm$ 0,73 (7,18-8,54)
IOD	1,38 $\pm$ 0,21 (1,2-1,62)	1,794 $\pm$ 0,11 (1,60-1,96)	1,69 $\pm$ 0,22 (1,30-2,0)	1,93	1,67 $\pm$ 0,12 (1,49-1,94)	2,03 $\pm$ 0,26 (1,68-2,48)	1,71 $\pm$ 0,35 (1,28-2,08)	1,84 $\pm$ 0,13 (1,70-1,97)	1,81 $\pm$ 0,25 (1,43-2,07)	1,74 $\pm$ 0,06 (1,67-1,78)
HL	4,43 $\pm$ 0,38 (4,12-4,86)	3,59 $\pm$ 0,27 (3,20-3,90)	4,91 $\pm$ 0,56 (3,82-5,65)	4,64	4,11 $\pm$ 0,43 (3,21-4,60)	3,93 $\pm$ 0,42 (3,31-4,50)	3,49 $\pm$ 0,30 (3,10-3,85)	3,43 $\pm$ 0,41 (2,82-3,88)	3,43 $\pm$ 0,39 (2,81-3,89)	3,93 $\pm$ 0,41 (3,57-4,38)
ED	1,91 $\pm$ 0,23 (1,65-2,10)	1,81 $\pm$ 0,13 (1,57-1,98)	1,83 $\pm$ 0,14 (1,58-2,02)	2,34	1,87 $\pm$ 0,09 (1,76-2,00)	1,93 $\pm$ 0,20 (1,73-2,34)	1,94 $\pm$ 0,23 (1,71-2,33)	1,85 $\pm$ 0,21 (1,57-2,15)	1,74 $\pm$ 0,19 (1,44-1,92)	1,75 $\pm$ 0,11 (1,63-1,86)
IND	1,30 $\pm$ 0,18 (1,10-1,46)	1,26 $\pm$ 0,08 (1,12-1,38)	1,32 $\pm$ 0,19 (1,03-1,73)	1,75	1,41 $\pm$ 0,05 (1,30-1,48)	1,46 $\pm$ 0,16 (1,18-1,69)	1,45 $\pm$ 0,09 (1,36-1,58)	1,40 $\pm$ 0,11 (1,27-1,56)	1,37 $\pm$ 0,09 (1,27-1,47)	1,22 $\pm$ 0,12 (1,13-1,37)
EN	1,58 $\pm$ 0,20 (1,36-1,76)	1,29 $\pm$ 0,06 (1,20-1,37)	1,40 $\pm$ 0,11 (1,19-1,51)	1,66	1,42 $\pm$ 0,12 (1,23-1,68)	1,49 $\pm$ 0,17 (1,28-1,70)	1,46 $\pm$ 0,08 (1,35-1,55)	1,35 $\pm$ 0,13 (1,23-1,61)	1,28 $\pm$ 0,06 (1,22-1,37)	1,30 $\pm$ 0,30 (1,08-1,65)
FL	7,11 $\pm$ 0,76 (6,46-7,96)	6,45 $\pm$ 0,50 (5,81-7,39)	6,85 $\pm$ 0,62 (5,51-7,80)	8,8	6,75 $\pm$ 0,52 (5,93-7,52)	7,87 $\pm$ 0,92 (7,12-9,80)	6,75 $\pm$ 0,65 (6,20-7,59)	6,64 $\pm$ 0,72 (5,80-7,58)	6,93 $\pm$ 0,40 (6,6-7,44)	6,18 $\pm$ 1,02 (5,0-6,83)
TD	0,84 $\pm$ 0,14 (0,71-1,0)	0,74 $\pm$ 0,14 (0,53-0,89)	0,64 $\pm$ 0,04 (0,59-0,73)	0,91	0,79 $\pm$ 0,15 (0,54-0,98)	0,86 $\pm$ 0,09 (0,73-0,96)	0,85 $\pm$ 0,10 (0,73-1,0)	0,86 $\pm$ 0,17 (0,57-1,07)	0,85 $\pm$ 0,09 (0,73-0,97)	0,65 $\pm$ 0,03 (0,63-0,70)
THL	8,55 $\pm$ 0,32 (8,18-8,78)	7,43 $\pm$ 0,47 (6,69-8,44)	8,25 $\pm$ 0,71 (7,14-9,16)	10,35	8,13 $\pm$ 0,57 (7,32-9,46)	8,81 $\pm$ 1,27 (7,86-11,65)	8,33 $\pm$ 0,57 (7,55-9,17)	7,96 $\pm$ 0,72 (7,23-9,10)	7,96 $\pm$ 0,44 (7,32-8,46)	7,26 $\pm$ 0,96 (6,38-8,3)
SL	1,32 $\pm$ 0,23 (1,11-1,57)	0,96 $\pm$ 0,10 (0,80-1,13)	1,53 $\pm$ 0,16 (1,22-1,75)	1,2	1,09 $\pm$ 0,11 (0,90-1,20)	1,08 $\pm$ 0,08 (0,96-1,22)	1,08 $\pm$ 0,05 (1,04-1,16)	1,06 $\pm$ 0,04 (1,0-1,12)	1,07 $\pm$ 0,04 (1,03-1,12)	0,89 $\pm$ 0,06 (0,82-0,94)
HAL	4,43 $\pm$ 0,01 (4,42-4,44)	3,94 $\pm$ 0,32 (3,45-4,27)	4,30 $\pm$ 0,42 (3,36-5,03)	5,5	4,78 $\pm$ 0,50 (4,17-5,85)	4,76 $\pm$ 0,69 (4,08-6,24)	4,61 $\pm$ 0,31 (4,34-5,0)	1,23 $\pm$ 0,50 (3,64-4,94)	4,53 $\pm$ 0,28 (4,1-4,89)	3,89 $\pm$ 0,43 (3,45-4,32)
FLL	3,82 $\pm$ 0,13 (3,70-3,90)	3,50 $\pm$ 0,34 (2,95-3,90)	3,57 $\pm$ 0,41 (2,88-4,13)	4,0	3,52 $\pm$ 0,28 (3,11-3,97)	3,93 $\pm$ 0,60 (3,07-4,84)	3,62 $\pm$ 0,33 (3,12-3,95)	3,58 $\pm$ 0,36 (3,08-4,0)	3,77 $\pm$ 0,12 (3,62-3,95)	3,16 $\pm$ 0,19 (3,01-3,38)
UEW	1,13 $\pm$ 0,06 (1,08-1,21)	1,19 $\pm$ 0,12 (0,98-1,40)	1,17 $\pm$ 0,08 (1,05-1,32)	1,27	1,04 $\pm$ 0,13 (0,78-1,22)	1,31 $\pm$ 0,13 (1,12-1,54)	1,40 $\pm$ 0,23 (1,0-1,58)	1,24 $\pm$ 0,10 (1,09-1,37)	1,16 $\pm$ 0,21 (0,9-1,41)	1,11 $\pm$ 0,15 (0,96-1,26)
Fin4DW	0,59 $\pm$ 0,05 (0,53-0,64)	0,51 $\pm$ 0,11 (0,35-0,72)	0,60 $\pm$ 0,09 (0,43-0,73)	1,0	0,59 $\pm$ 0,12 (0,35-0,81)	0,63 $\pm$ 0,13 (0,49-0,87)	0,57 $\pm$ 0,11 (0,42-0,72)	0,52 $\pm$ 0,06 (0,46-0,61)	0,55 $\pm$ 0,10 (0,44-0,72)	0,52 $\pm$ 0,07 (0,48-0,61)

Tabela 3. Correlação entre as variáveis morfométricas medidas em indivíduos machos de *Dendropsophus walfordi* com os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais.

Variáveis	Eixo1	Eixo2
Largura da cabeça	0,893	0,080
Comprimento rostro-cloacal	0,909	-0,030
Comprimento da tíbia	0,933	-0,050
Distância interorbital	0,209	-0,357
Comprimento da cabeça	0,258	0,867
Diâmetro do olho	0,543	-0,106
Distância internasal	0,672	-0,296
Distância olho-narina	0,574	0,169
Comprimento do pé	0,865	0,042
Diâmetro do tímpano	0,573	-0,459
Comprimento da coxa	0,893	0,179
Comprimento do focinho	0,204	0,827
Comprimento da mão	0,883	0,009
Comprimento do antebraço	0,734	-0,016
Largura da pálpebra superior	0,351	-0,350
Largura do disco 4 do dedo	0,745	0,051
Autovalor	7,592	2,069
% Variação	47,45	12,93

Não houve diferença significativa entre os indivíduos de *D. walfordi* coletados em diferentes localidades (MANOVA *Pillai trace* = 0,322, $p > 0,5$), apesar do agrupamento dos indivíduos do Careiro Castanho no segundo componente principal (Figura 5).

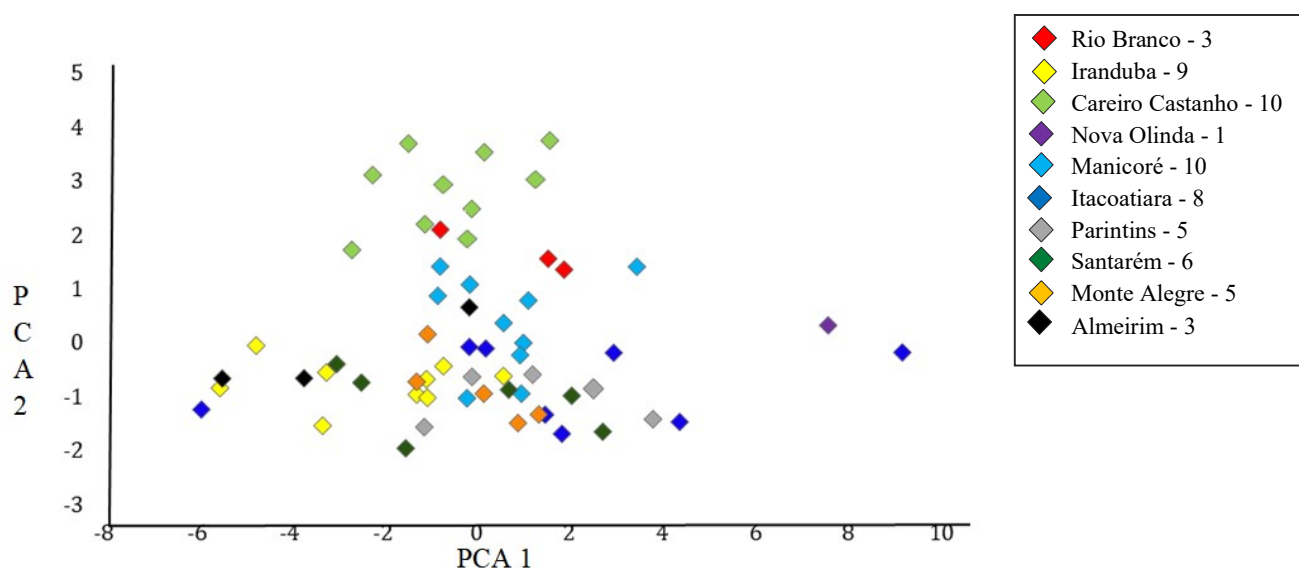


Figura 5. Caracterização morfométrica de indivíduos machos para 10 localidades na Amazônia Brasileira de *Dendropsophus walfordi* baseada nos dois primeiros componentes principais.

3.2 Variação Genética

Diversidade genética intra-populacional

Foram analisadas sessenta e quatro sequências do gene mtDNA 16S, com 483pb. Destes, 12 foram sítios variáveis e seis informativos para parcimônia. As sequências mostraram dezenove sítios polimórficos e um total de doze haplótipos (Tabela 4). O modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (1985) foi o que melhor se ajustou ao banco de dados. A composição média das bases nucleotídicas correspondeu a: 22,80% citosina, 24,66% timina, 32,20% adenina e 20,35% guanina. As populações foram definidas segundo os grupos biológicos sugeridos pelo programa BAPS 4.14 (Bayesian Analysis of Genetic Population Structure). Para determinar o número de populações mais prováveis (K), foi realizada uma análise de mistura de populações. O K é incluído como parâmetro a ser estimado e a melhor partição (número de *clusters*) dos dados é identificada como a de maior probabilidade.

Tabela 4. Índices de diversidade e teste de neutralidade em cada um dos grupos biológicos de *Dendropsophus walfordi* amostradas em 10 localidades na bacia Amazônica. N= número de indivíduos, Hp= número de haplótipos, S= número de sítios polimórficos, π = diversidade nucleotídica e DP = desvio padrão, D de Tajima (valor de p), Fs de Fu (valor de p). Para a definição dos grupos, ver texto.

Pop.	N	S	$\pi \pm DP$	Diversidade Gênica $\pm DP$	Teste D Tajima (p)	Fs de Fu (p)
Grupo 1	12	3	0.001035 $\pm$ 0.001064	0.3182 $\pm$ 0.1637	-1.62929(0.03800)	-0.61396(0.11600)
Grupo 2	34	7	0.001616 $\pm$ 0.001342	0.6078 $\pm$ 0.0918	-1.56094(0.04100)	-4.82792(0.00000)
Grupo 3	8	3	0.002218 $\pm$ 0.001853	0.6786 $\pm$ 0.1220	-0.30441(0.38800)	0.32985(0.48300)
Grupo 4	6	3	0.002484 $\pm$ 0.002111	0.8000 $\pm$ 0.1721	-0.44736(0.37300)	-1.45444(0.05100)
Grupo 5	4	3	0.003106 $\pm$ 0.002771	1.0000 $\pm$ 0.1768	-0.75445(0.24800)	-2.36712(0.00900)

O número de grupos indicados nesta análise foi utilizado em todas as outras análises como o número real de grupos biológicos. Foram identificados um total de cinco grupos biológicos sendo: Grupo 1 - composto por indivíduos de Rio Branco, Careiro Castanho, Iranduba e Itacoatiara; Grupo 2 - Nova Olinda, Careiro Castanho,

Manicoré, Itacoatiara, Santarém, Monte Alegre, Parintins e Almeirim; Grupo 3 - Iranduba, Parintins e Itacoatiara; Grupo 4 - Manicoré, Parintins e Monte Alegre e Grupo 5 - Monte Alegre e Almeirim (Material Suplementar 2).

Níveis elevados de diversidade gênica foram encontrados nos grupos 4 e 5 (0.8000-1.0000); os grupos 2 e 3 mostraram-se com níveis intermediários de diversidade (0.6078 – 0.6786); o grupo 1 mostrou baixo valor de diversidade (0.3182). Da mesma maneira, as diversidades nucleotídicas foram baixas em todas as populações (0.001035-0.003106).

O teste *D* de Tajima foi significativo para os grupos 1 e 2, enquanto que o *F_s* de Fu foi significativo para o grupo 2, 4 e 5 (Tabela 4). Quando analisadas todas as localidades, ambos os testes mostraram valores negativos (*D* = -0,93; *p* < 0,5; *F_s* = -1,78; *p* < 0,5).

Estrutura entre populações

Houve um alto nível de diferenciação genética entre as localidades amostradas (*F_{st}* = 0,52; *p* < 0,0001), onde 52,17% da variação estão distribuídos entre os grupos biológicos, e 47,83% dentro dos grupos biológicos. Para quase todos os grupos biológicos, os valores de *F_{st}* foram relativamente altos, com valores de *F_{st}* acima de 0,5, portanto significativos biologicamente (Tabela 5).

Tabela 5. Matriz dos valores de *F_{st}* nas comparações par a par entre as populações de *Dendropsophus walfordi* a partir dos dados mitocondriais (16S). Para a definição dos grupos, ver texto.

Populações	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Grupo 1	0.00000				
Grupo 2	0.70311	0.00000			
Grupo 3	0.66563	0.16288	0.00000		
Grupo 4	0.74527	0.31417	0.28649	0.00000	
Grupo 5	0.71127	0.04971	0.16906	0.05838	0.00000

As distâncias geográficas entre as localidades amostradas variaram de 60 a 1.122 quilômetros. O teste de correlação entre distância genética e distância geográfica (teste de Mantel) não foi significativo para nenhuma das populações analisadas, indicando que

Genealogia de haplótipos

Dos 12 haplótipos observados, um se mostrou mais comum sendo compartilhado com vinte e sete indivíduos apresentando a maior frequência na distribuição geográfica, e com maior representatividade de indivíduos de Santarém e Almeirim. Esse haplótipo não foi compartilhado com indivíduos de Rio Branco e Iranduba. O segundo haplótipo mais comum é compartilhado por onze indivíduos, incluindo todos os indivíduos de Rio Branco, indivíduos de Careiro Castanho, Iranduba e Itacoatiara. Dessa maneira, a maior parte das populações compartilham haplótipos entre si (Figura 7).

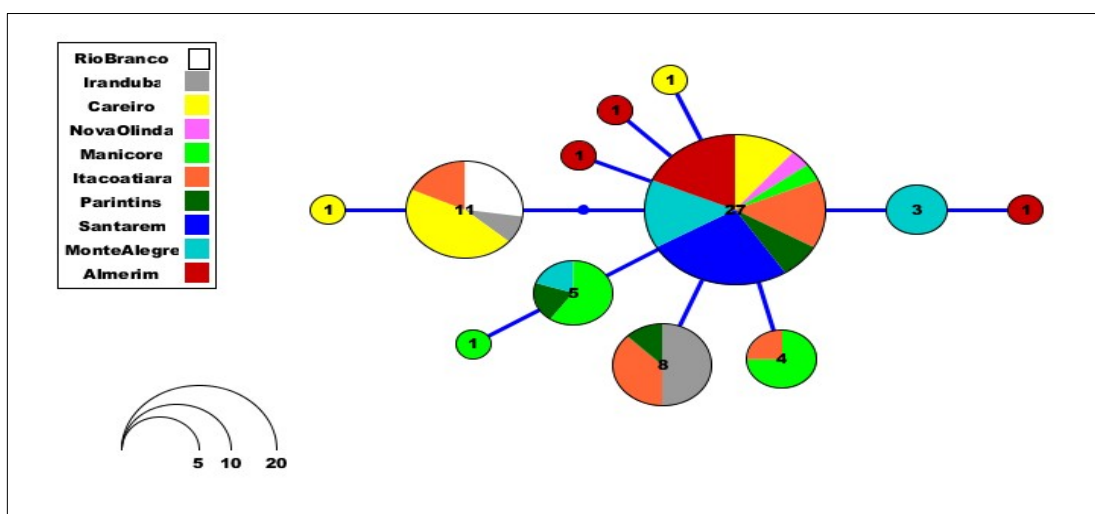


Figura 7. Rede de haplótipos gerada no programa HaploViewer e baseada nas sequências de mtDNA, mostrando as relações genealógicas entre os indivíduos de *Dendropsophus walfordi*. Um haplótipo está representado pelos círculos e o número dentro deles indica quantos indivíduos possuem esse haplótipo. O nó azul representa passos mutacionais.

A distribuição geográfica das populações, segundo os grupos biológicos e rede de Haplótipos, revela que o grupo amarelo é o mais comum, amplamente distribuído e com mais indivíduos compartilhando o mesmo haplótipo, o grupo verde, concentrado na região do baixo rio Amazonas, é o menor grupo compartilhando haplótipos apenas entre Monte Alegre e Almeirim (Figura 8).

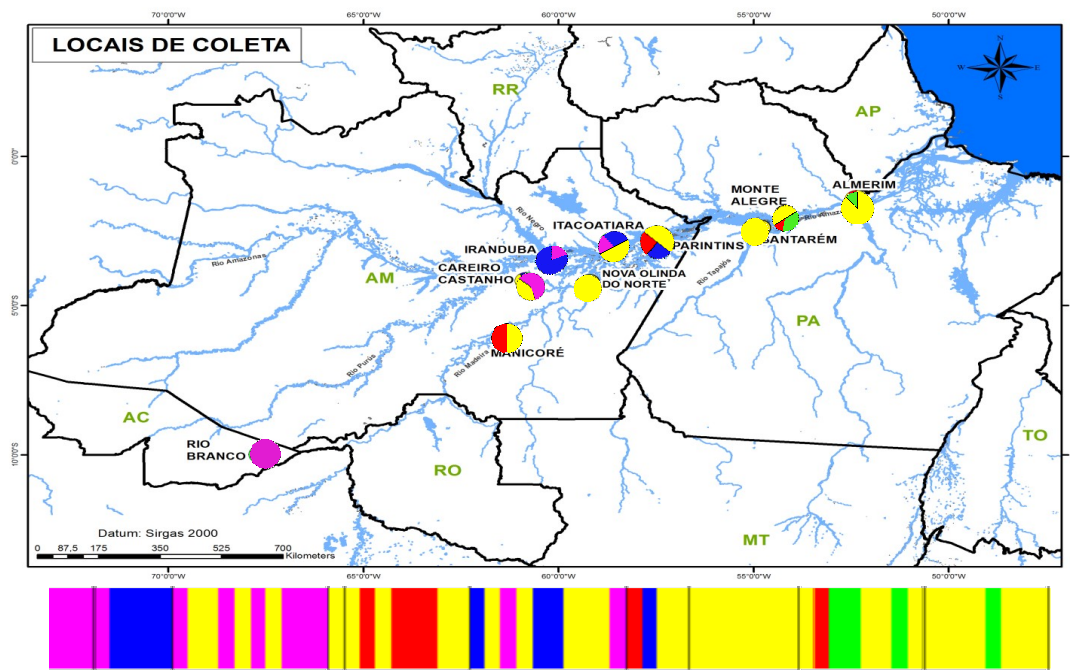


Figura 8. Distribuição dos grupos biológicos de *Dendropsophus walfordi* ao longo dos locais de coleta nos estados do Amazonas, Pará e Acre.

Filogenia das espécies do grupo *Dendropsophus microcephalus*

O banco de dados do gene mtDNA 16S compreendeu 133 sequências (incluindo *ingroup* e *outgroup*) composto por 499 pares de bases, onde 164 foram variáveis e 126 foram informativos para parcimônia. O modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (1985) foi o modelo selecionado pelo programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012).

A análise de máxima verossimilhança para a monofilia do grupo *D. microcephalus* teve um valor de suporte abaixo de 95 (suporte de 88) (Figura 8). Com base em nossos resultados, o grupo *D. microcephalus* é composto de quatro principais grupos de espécies: Grupo 1, mais basal, composto por *D. rhodopeplus*, seguido do Grupo 2 representado por *D. leali*, também com baixo valor de suporte (51). Um maior valor de suporte foi obtido para a relação entre os Grupos 3 e 4, com valor de suporte de 94. O Grupo 3 englobou *D. reichlei*, *Dendropsophus* sp. Bolívia, *D. coffea* e *D. nanus* e *D. walfordi*. Dentro do grupo 4, com menor suporte, encontramos as espécies *D. microcephalus*, *D. rubicundulus*, *D. cachimbo*, *D. sanborni*, *D. tritaeniatus*, *D. juliani*, *D. mathiassoni*, *D. bipunctatus*, *D. berthallutzae* e *D. meridianus*. Com um suporte de 100 *D. berthallutzae* do Rio de Janeiro e *D. meridianus* do Brasil, se apresentam como

grupo irmãos, esse resultado nunca foi inferido para essas espécies necessitando de uma abordagem mais detalhada com um número maior de espécimes.

As espécies *D. cachimbo*, *D. tritaeniatus*, *D. juliani*, *D. mathiassoni* e *D. meridianus*, não entraram na filogenia de Faivovich *et al.* (2005), essas espécies foram incluídas no grupo *D. microcephalus* com base na sua descrição morfológica.

Os resultados também sugerem um parafiletismo das espécies *D. walfordi* e *D. nanus* uma vez que *D. walfordi* está aninhada em *D. nanus* (Figura 9).

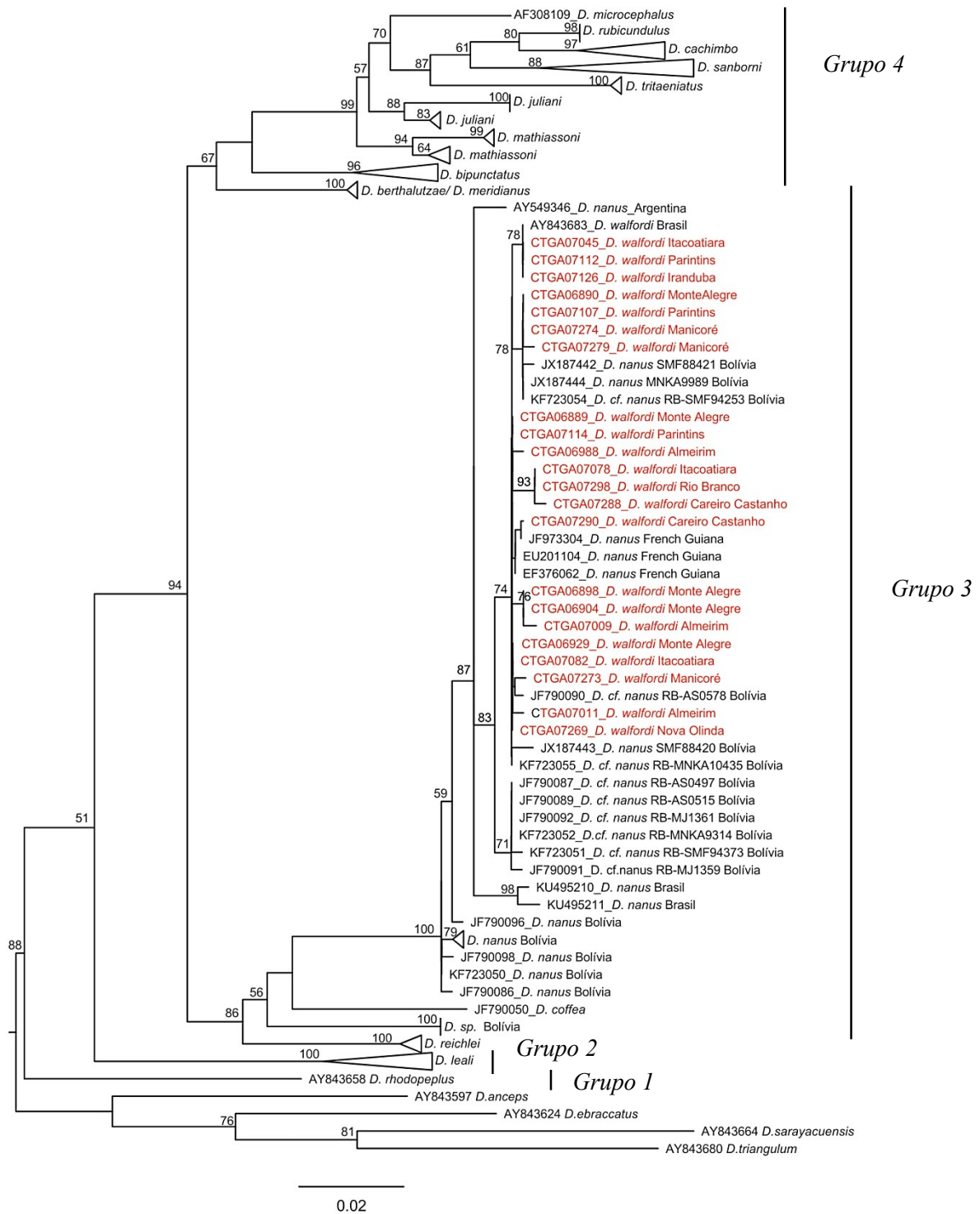


Figura 09. Árvore filogenética do grupo de *Dendropsophus microcephalus* baseada em dados do Genbank para 22 espécies, e do presente estudo para *Dendropsophus walfordi*.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo não foram detectadas diferenças significativas nos dados morfométricos de *Dendropsophus walfordi* distribuídos em 10 localidades ao longo dos rios Amazonas, Madeira e Acre. Isso explica grande sobreposição morfológica entre os indivíduos das localidades amostradas e ausência de variáveis morfométricas que poderiam diagnosticar diferentes populações. As características morfológicas quando comparada as localidades tão distantes quanto Rio Branco, Almeirim e Monte Alegre, revelam a existência de um processo de evolução morfológica conservada.

O uso de métodos morfológicos é uma abordagem eficaz para a identificação de dados enigmáticos da biodiversidade e clarificação das incertezas taxonômicas apesar de desafiador, isso por que a especiação nem sempre pode ser acompanhada de alterações morfológicas, revelando espécies crípticas, porém, é uma ferramenta bastante utilizada para descrição de espécies. (Bickford *et al.*, 2007).

A média das medidas morfométricas realizadas nos indivíduos de *D. walfordi*, como o comprimento rostro-cloacal (SVL), largura da cabeça (HW), diâmetro do olho (ED), diâmetro do tímpano (TD) e distância olho-narina (END) estão de acordo com as medidas do holótipo e parátipos descritas por Bokermann (1962) da localidade tipo em Forte Príncipe da Beira/Rondônia.

Com base nos resultados obtidos através do mtDNA foi observado primeiramente, alta estruturação populacional, apesar de ser uma espécie que vive em bancos de capim flutuante e que sofre o deslocamento pelos grandes rios, esperava-se que essa estruturação fosse baixa, dessa forma contrapondo nossa hipótese de espécie panmítica. Esses altos graus de estruturação genética já são conhecidos na literatura para alguns anfíbios, porém para espécies com baixa vagilidade (Elmer *et al.*, 2007; Zeisset & Beebee, 2008; Kaefer *et al.*, 2013), revelando que as populações, muitas vezes, encontram-se distribuídas de tal forma que os níveis de fluxo gênico entre elas praticamente não existem.

Os resultados nas Análises Bayesianas no programa BAPS sugerem que existam cinco grupos biológicos nas áreas estudadas. As comparações par a par do *Fst* entre cada localidade nos mostram que algumas das comparações apresentaram valores elevados e significativos, valores esses considerados de forte estruturação, acima de 0,25 (Wright 1931).

Encontramos uma alta estruturação genética no grupo 1, nas localidades de Rio Branco (AC) e do médio rio Amazonas, nos municípios de Careiro Castanho, Iranduba e Itacoatiara, em relação a indivíduos da calha do rio Madeira, e baixo rio Amazonas. Altos índices de estruturação genética são conhecidos para muitas espécies de anuros com habitat terrestre, diferentemente de *D. walfordi* que tem seu habitat associado aos bancos de macrófitas, e espécies com pouca vagilidade como no gênero *Allobates* (Prohl 2005; Kaefer *et al.*, 2012), na maioria das vezes esse nível de estruturação se dá ao fato da baixa taxa de dispersão, e sensibilidade ao ambiente.

A capacidade de se dispersar pelos rios também pode variar substancialmente entre espécies, e depende de traços da história de vida, como tamanho corporal, preferência por habitat e modo reprodutivo (Fouquet *et al.* 2012) Espécies como a tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) e o peixe-boi (*Trichechus inunguis*), nos estudos de Cantanhede *et al.*, 2005; Pearse *et al.*, 2006, mostrou que há pouca relação entre a distancia geográfica e diferenciação genética, porém existe uma restrição ao fluxo gênico e/ou dispersão em longa distância. Por tanto, parece que vertebrados aquáticos de grande porte apresentam padrão de livre dispersão na calha principal do rio Amazonas, que atua como um corredor, mas com algumas restrições ao fluxo gênico. Assim a estruturação genética encontrada pode ser característico dessa espécie que possui uma ampla distribuição geográfica, tem seu habitat em macrófitas aquáticas mas, que não possui barreira evidente para ao fluxo gênico.

Os pares grupo 1 (Rio Branco, Careiro Castanho, Iranduba e Itacoatiara) e grupo 4 (Manicoré, Parintins e Monte Alegre) foram as comparações que obtiveram os maiores valores de índices de diferenciação ($F_{st} = 0.74527$), portanto, são fortemente estruturadas entre si, como consequência da baixa taxa de fluxo gênico entre elas, sem barreiras evidentes, indicando diferenciação genética entre esses grupos.

As comparações entre os grupos 3 e 2 não apresentaram valores de F_{st} significativos, os valores foram baixos, e não indicam nenhuma estruturação entre essas localidades. O grupo 5 só teve um valor significativo quando comparado ao grupo 1, para os demais grupos os valores foram baixos e não significativos, podendo indicar a existência de fluxo gênico entre os grupos.

O haplótipo mais comum, é compartilhado com vinte e sete indivíduos, provavelmente é o haplótipo mais ancestral, tendo em vista que a extensão geográfica de um haplótipo está diretamente relacionada com sua idade (Templeton, 1998), sendo as localidades de Santarém e Almeirim mais representativas dentro desse haplótipo.

A maioria das populações de cada localidade compartilham haplótipos e, por isso, podem estar separadas por uma barreira mais permeável, ou seja, que permite a existência de fluxo gênico restrito.

Nas análises, Rio Branco (3 indivíduos coletados , nesta localidade) foi a localidade que teve o menor número de haplótipos, que estão distribuídos em apenas um haplótipo que deriva do haplótipo mais comum, compartilhado com indivíduos de outras localidades. Esse número de haplótipos pode estar relacionado ao baixo número de amostras coletadas na localidade.

De acordo com os testes de neutralidade na forma dos índices D de Tajima e F_s de Fu, verificamos que a população do grupo 2 sofreu expansão populacional, observados nos valores significativamente negativos dos testes.

Os valores de D e F_s significativamente diferentes de zero indicam desvios da neutralidade, resultante de algum evento demográfico. E quando são negativos é devido o excesso de mutações recentes, indicando crescimento populacional, ou atuação de outras forças evolutivas como efeito carona (Fu, 1997). Já os valores positivos indicam possível seleção balanceadora, subdivisão populacional ou gargalo (Tajima, 1989).

A correlação entre distância geográfica e genética não foi significativa, sugerindo que outros fatores podem estar determinando a distribuição da variabilidade genética. Ecologicamente, as diferenças na capacidade de dispersão, tolerâncias fisiológicas limitadas e padrões comportamentais influenciam os padrões de distribuição das espécies de anuros (Duellman, 1988) sendo necessária a realização de novas coletas em outras localidades, bem como o uso de outros marcadores moleculares a fim de prover novas informações que contribuirão para um melhor conhecimento a respeito da distribuição da espécie.

Os bancos de macrófitas exercem um papel fundamental para biota aquática e terrestre, pois é considerado um berçário para espécies de vertebrados aquáticos que utilizam as macrófitas como habitats, particularmente os indivíduos jovens, que podem evitar a predação encontrando abrigo e alimento entre as raízes e folhas (Sanchez-Botero & Araújo Lima, 2001). Schiesari e colaboradores em 2003 encontraram 39 espécies de peixes e nove espécies de anfíbios em bancos de capim flutuantes, sugerindo que a dispersão de vertebrados pelo rio Amazonas parece ser um fenômeno comum, e os bancos de macrófitas flutuantes podem estar atuando como importantes vetores. Böning *et al.*, 2017 em suas análises revelou que pelo menos 35 espécies de

anuros em doze gêneros e quatro famílias estão associadas aos bancos de macrófitas do do rio Amazonas.

Dessa forma, o transporte pelas macrófitas pode representar um vetor de dispersão de longa distância, tanto do ponto de vista espacial (unidirecional) quanto temporal (sazonal) (Schiesari *et al.*, 2003). A disponibilidade de abrigo para os girinos na complexa zona radicular dos bancos de macrófitas e a alta qualidade nutricional dos detritos resultantes da decomposição das plantas tornam os bancos de macrófitas locais de reprodução vantajosos para os anuros (Böning *et al.*, 2017).

Apesar da alta estruturação genética de algumas das populações estudadas como as do Rio Acre e médio rio Amazonas, da calha do rio Madeira e baixo rio Amazonas, os bancos de macrófitas podem atuar de forma mais significativa entre as populações de localidades mais próximas como Manicoré, Parintins, Monte Alegre e Almeirim, onde os níveis de estruturação dessas populações foram baixos. Böning *et al.*, 2017 mostraram que fatores como a quebra dos bancos de macrófitas e a dispersão pelos rios podem contribuir para uma homogeneização das espécies que compõe as comunidades de anuros em um longo prazo, mas que essa homogeneização pode não ser observada em todo o rio Amazonas. Em seus resultados, os autores afirmam que a composição de espécies torna-se mais dissimilar, havendo diferenciação de espécie de acordo com o aumento da distância geográfica.

Os resultados das relações filogenéticas das espécies do grupo de *Dendropsophus microcephalus* obteve um baixo valor de suporte para a monofilia do grupo, como pode ser observado na árvore filogenética (Figura 9).

Após o trabalho de Faivovich *et al.* (2005), novas espécies foram descritas, tais como *D. juliani* Moravec, Apararicio e Köhler, 2006, a qual foi sugerida como parte do grupo *D. microcephalus* a partir apenas de dados da morfológicos. E, de fato, nossos resultados suportam tal inclusão, e em concordância com a filogenia recuperada por Jansen *et al.* (2011), a espécie é proximamente relacionada às espécies *D. microcephalus*, *D. rubicundulus*, *D. cachimbo*, *D. sanborni* e *D. tritaeniatus*. Outra espécie descrita após Faivovich *et al.* (2005), foi *D. reichlei* (Moravec *et al.*, 2008) que também foi sugerida pelos autores a inclusão no grupo *D. microcephalus*, e de fato corroborando com nossos resultados. Com um suporte de 100 *D. berthallutzae* do Rio de Janeiro e *D. meridianus* do Brasil, se apresentaram como espécie irmã, esse resultado tem base nas sequências disponíveis no banco de dados do Genbank, necessitando assim de mais espécimes para confirmação desse resultado.

Outro resultado interessante para o grupo foi em relação à posição filogenética da espécie *D. coffea* (Köhler, Jungfer & Reichle, 2005) a qual foi descrita quando o trabalho de Faivovich *et al.* (2005) estava *in press*, e por esta razão não entrou em suas análises filogenéticas. Em nossos resultados *D. coffea* é a espécie proximamente relacionada ao clado de *D. walfordi* e *D. nanus*, essa relação entre essas espécies nunca foi reportada antes, com o uso de sequências de *D. coffea* do Genbank, foi possível chegar a esse resultado, mas é necessário fazer novas análises com maior número de dados.

Um aspecto importante dos trabalhos citados acima e que realizaram filogenias das espécies do grupo de *D. microcephalus* é o fato de terem utilizado somente um indivíduo de *D. walfordi* (AY843683), o que poderia limitar o entendimento de suas relações filogenéticas. Nosso estudo, usando uma ampla amostragem para esta espécie, propõe que *D. walfordi* não é monofilética, uma vez que vários grupos de nossos indivíduos são relacionados à *D. nanus* (Figura 9) de várias outras localidades, incluindo Guiana Francesa e Bolívia. Tais resultados corroboram o sugerido por Lutz (1973) e Duellman (1977) que a partir de dados morfológicos consideram como espécies sinônimas. O parafiletismo das duas espécies já foi descrito anteriormente por Fouquet *et al.* (2011) em uma análise filogenética do gênero, utilizando genes mitocondriais e nucleares, e incluiu um indivíduo de *D. nanus* da Guiana e um da Argentina e apenas um indivíduo de *D. walfordi* (Brasil), e sugeriu que essas duas espécies provavelmente são sinônimas. Medeiros *et al.* (2013), usando sequenciamento parcial do gene rRNA 12S, sugeriram o parafiletismo novamente, além disso mostraram que os cariótipos dessas espécies são idênticos. Apesar dos interessantes achados citogenéticos relativos à *Dendropsophus*, a maioria das espécies deste gênero ainda não teve o cariótipo descrito, o que dificulta o avanço das análises citogenéticas evolutivas (Rocha, 2013).

Apesar de a filogenia recuperada no presente trabalho ser baseada somente no gene mitocondrial 16S, estes resultados têm implicações para a taxonomia das espécies. Além disso, este gene tem sido usado em inúmeros trabalhos de filogenia e descrição de espécies de anuros (Jansen *et al.*, 2011), e também é considerado como o gene para abordagens de DNA barcode das espécies de anuros (Vences *et al.*, 2005), ou seja, possui sinal filogenético suficiente para recuperar as relações entre as espécies do grupo de *D. microcephalus*.

5. Conclusões

Nossa análise morfológica mostrou que os indivíduos machos de *Dendropsophus walfordi* não apresentaram características que pudéssemos diagnosticar diferentes populações, apresentando sobreposição morfológica característica de um processo de evolução conservada.

Com o uso de marcador para estimativas genéticas, observamos que os bancos de macrófitas, considerados dispersores para vários grupos, podem estar atuando para dispersão da espécie de *Dendropsophus walfordi*, mesmo apresentando estruturação genética entre alguns grupos biológicos. E a diversidade genética foi significativa para alguns grupos biológicos.

Os resultados filogenéticos mostram que *Dendropsophus walfordi* e *Dendropsophus nanus* podem ser espécies sinônimas, corroborando com a hipótese de parafiletismo de *D. walfordi* e *D. nanus*, previamente levantada por Fouquet *et al.* (2011) e Medeiros *et al.* (2013), porém para implicações do *status* taxonômico e de conservação de *Dendropsophus walfordi* é necessário um número maior de dados levando em consideração toda a distribuição geográfica dessa espécie.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

01

Espécie	Acesso Genbank	Localidade	Coordenada geográfica	Referência
<i>Dendropsophus anceps</i>	AY843597	Brasil	-	Faivovich, J. <i>et al.</i> , 2005. Systematic Review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylineae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 294, 1-240.
<i>Dendropsophus berthaltutae</i>	AY843607	Brasil	-	
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	AY843608	Brasil	-	
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	KM390783	Brasil	-	Chaves, A.C.S., <i>et al.</i> Analysis of the 16S rDNA marker for identification of species of anurans in an area of Atlantic forest in Rio de Janeiro. Unpublished.
<i>Dendropsophus cachimbo</i>	JF790047	Bolívia	"16.3596 S 62.0001 W"	Jansen, M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus cachimbo</i>	JF790046	Bolívia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus cachimbo</i>	JF790049	Bolívia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	JF790090	Bolívia	"17.5172 S 63.2900 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	JF790092	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	JF790089	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	JF790087	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	JF790091	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	KF723055	Bolívia	"17.5172 S 63.2900 W"	Schulze, A., <i>et al.</i> Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterization, and ecological assignment. Unpublished.
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	KF723054	Bolívia	17.5172 S 63.2900 W	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	KF723052	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus cf. nanus</i>	KF723051	Bolívia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus coffea</i>	JF790050	Bolívia	15.9167 S 67.5667 W"	Jansen, M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	AY843624	Belize	-	Faivovich, J., <i>et al.</i> , 2005. Systematic Review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylineae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 294, 1-240.
<i>Dendropsophus juliani</i>	JX187447	Bolívia	"14.8131 S 61.1680 W"	Schulze, A. and Jansen, M. Direct Submission Submitted (18-JUN-2012) Herpetology, Senckenberg Research Institute, Senckenberganlage 25, Frankfurt, Hesse 60325, Germany
<i>Dendropsophus juliani</i>	JF790052	Bolívia	"11.5500 S 66.9333 W"	Jansen, M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden
<i>Dendropsophus juliani</i>	JF790051	Bolívia	"11.5500 S 66.9333 W"	
<i>Dendropsophus juliani</i>	JF790053	Bolívia	"14.9121 S 61.0825 W"	

<i>Dendropsophus leali</i>	JF790061	Bolivia	"17.4817 S 63.6849 W"	diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus leali</i>	KF723024	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	Schulze,A., <i>et al.</i> Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterization, and ecological assignment. Unpublished.
<i>Dendropsophus leali</i>	KF723026	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790055	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	Jansen,M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia s lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790054	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790062	Bolivia	"17.4817 S 63.6849 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790057	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790059	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790058	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790056	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus leali</i>	JF790060	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	KP149281	Colômbia	4.773 N 73.037 W	Guarnizo,C.E., <i>et al.</i> , 2015. DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. PLoS ONE 10 (5), E0127312.
<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	KP149305	Colômbia	4.773 N 73.037 W	
<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	KP149310	Colômbia	4.773 N 73.037 W	
<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	KP149298	Colômbia	"3.228 N 73.852 W"	
<i>Dendropsophus meridianus</i>	KM390784	Brasil	-	Chaves,A.C.S., <i>et al.</i> Analysis of the 16S rDNA marker for identification of species of anurans in an area of Atlantic forest in Rio de Janeiro. Unpublished.
<i>Dendropsophus microcephalus</i>	AF308109		-	Chek,A.A., <i>et al.</i> , 2001. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome hyla (anura: hylidae) Mol. Phylogenet. Evol. 18 (3), 370-385.
<i>Dendropsophus minusculus</i>	KR811136	Brasil	-	Fouquet,A., <i>et al.</i> , 2015. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. J. Trop. Ecol. In press.
<i>Dendropsophus minusculus</i>	KR811133	Guiana Francesa	-	
<i>Dendropsophus minusculus</i>	KR811137	Guiana Francesa	-	Fouquet,A., <i>et al.</i> , 2015. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. J. Trop. Ecol. In press.
<i>Dendropsophus nanus</i>	AY549346	Argentina	-	Faivovich,J., <i>et al.</i> , 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the Hyla pulchella species group (Anura, Hylidae). Mol. Phylogenet. Evol. 32 (3), 938-950.
<i>Dendropsophus nanus</i>	JX187444	Bolivia	"17.47 S 63.67 W"	Schulze, A. and Jansen,M. Direct Submission Submitted (18-JUN-2012) Herpetology, Senckenberg Research Institute, Senckenberganlage 25, Frankfurt, Hesse 60325, Germany
<i>Dendropsophus nanus</i>	JX187443	Bolivia	17.47 S 63.67 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JX187442	Bolivia	"17.47 S 63.67 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	KF723050	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JX187445	Bolivia	"15.1746 S 61.0160 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JX187441	Bolivia	"14.80 S 61.17 W"	

<i>Dendropsophus nanus</i>	KF723046	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	Schulze,A., <i>et al.</i> Tadpole diversity of Bolivia`s lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterization, and ecological assignment. Unpublished.
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF790096	Bolivia	"14.9121 S 61.0825 W"	Jansen,M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia s lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF790105	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF790093	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF790086	Bolivia	"17.4817 S 63.6849 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF790098	Bolivia	"16.3596 S 62.0001 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	KU495210	Brasil	"6.35 S 47.406 W"	Lyra,M.L., <i>et al.</i> Meeting the challenge of DNA barcoding amphibians from neotropics: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. Unpublished.
<i>Dendropsophus nanus</i>	KU495211	Brasil	"6.548 S 47.445 W"	
<i>Dendropsophus nanus</i>	EF376062	Guiana Francesa	-	Salducci,M.D., <i>et al.</i> Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana. Unpublished.
<i>Dendropsophus nanus</i>	EU201104	-	-	Fouquet,A., <i>et al.</i> , 2007. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. PLoS ONE 2 (10), E1109 .
<i>Dendropsophus nanus</i>	JF973304	Guiana Francesa	-	Fouquet,A., Noonan,B.P., Blanc,M. and Dill Orrico,V.G. Phylogenetic position of <i>Dendropsophus gaucheri</i> (Anura: Hylidae) (Lescure and Marty, 2000). Zootaxa (2011)
<i>Dendropsophus reichlei</i>	JF790108	Bolivia	"11.4000 S 69.0167 W"	Jansen,M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia s lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus reichlei</i>	JF790109	Bolivia	"11.4000 S 69.0167 W"	
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	AY843658	Peru	-	Faivovich,J., <i>et al</i> , 2005. Systematic Review of the frog family Hylidae, with specia reference to the Hyalinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 294, 1-240.
<i>Dendropsophus rubicundulus</i>	AY843661	Brasil	-	
<i>Dendropsophus sanborni</i>	AY843663	Argentina	-	
<i>Dendropsophus sanborni</i>	KU517293	Brasil	"22.3262 S 47.7126 W"	Vences,M., <i>et al.</i> , 2016. Gut bacterial communities across tadpole ecomorphs in two diverse tropical anuran faunas Naturwissenschaften 103 (3-4), 25.
<i>Dendropsophus sanborni</i>	KU517283	Brasil	-	
<i>Dendropsophus sanborni</i>	KU517284	Brasil	22.3262 S 47.7126 W"	
<i>Dendropsophus sarayacuensis</i>	AY843664	Peru	-	Faivovich,J., <i>et al</i> , 2005. Systematic Review of the frog family Hylidae, with specia reference to the Hyalinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 294, 1-240.
<i>Dendropsophus sp</i>	JX187436	Bolivia	"17.47 S 63.67 W"	Schulze, A. and Jansen,M. Direct Submission Submitted (18-JUN-2012) Herpetology, Senckenberg Research Institute, Senckenberganlage 25, Frankfurt, Hesse 60325, Germany

<i>Dendropsophus sp</i>	JF790111	Bolivia	"17.4817 S 63.6849 W"	Jansen,M., <i>et al.</i> , 2011. Integrative inventory of Bolivia s lowland anurans reveals hidden diversity. Zool. Scr. 40 (6), 567-583.
<i>Dendropsophus sp</i>	JF790110	Bolivia	"17.4817 S 63.6849 W"	
<i>Dendropsophus tritaeniatus</i>	JF790114	Bolivia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus tritaeniatus</i>	JF790115	Bolivia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus tritaeniatus</i>	JF790113	Bolivia	"12.7720 S 65.8109 W"	
<i>Dendropsophus tritaeniatus</i>	JF790112	Bolivia	"14.9121 S 61.0825 W"	Faivovich,J., <i>et al.</i> , 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the Hyla pulchella species group (Anura, Hylidae). Mol. Phylogenet. Evol. 32 (3), 938-950.
<i>Dendropsophus triangulum</i>	AY843680	Brasil	-	
<i>Dendropsophus walfordi</i>	AY843683	Brasil	-	

MATERIAL SUPLEMENTAR

02

<i>N</i>	<i>Espécie</i>	Coleção de Tecidos de Genética Animal	Localidade	Grupo Biológico
1	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07298	Rio Branco - AC	Rosa
2	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07299	Rio Branco - AC	Rosa
4	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07300	Rio Branco - AC	Rosa
4	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07123	Irاندوبا - AM	Rosa
5	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07126	Irاندوبا - AM	Azul
6	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07127	Irاندوبا - AM	Azul
7	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07139	Irاندوبا - AM	Azul
8	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07140	Irاندوبا - AM	Azul
9	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7288	Careiro Castanho – AM	Rosa
10	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7289	Careiro Castanho – AM	Amarelo
11	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7290	Careiro Castanho – AM	Amarelo
12	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7291	Careiro Castanho – AM	Rosa
13	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7292	Careiro Castanho – AM	Amarelo
14	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7293	Careiro Castanho – AM	Rosa
15	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7294	Careiro Castanho – AM	Amarelo
16	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7295	Careiro Castanho – AM	Rosa
17	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7296	Careiro Castanho - AM	Rosa
18	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7297	Careiro Castanho - AM	Rosa
19	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7269	Nova Olinda do Norte - AM	Amarelo
20	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7273	Manicoré– AM	Amarelo
21	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7274	Manicoré – AM	Vermelho
22	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7276	Manicoré – AM	Amarelo
23	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7277	Manicoré – AM	Vermelho
24	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7278	Manicoré – AM	Vermelho
25	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7279	Manicoré – AM	Vermelho

26	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7280	Manicoré – AM	Amarelo
27	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7281	Manicoré – AM	Amarelo
28	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07045	Itacoatiara – AM	Azul
29	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07077	Itacoatiara – AM	Amarelo
30	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07078	Itacoatiara – AM	Rosa
31	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07079	Itacoatiara – AM	Amarelo
32	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07080	Itacoatiara – AM	Azul
33	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07081	Itacoatiara – AM	Azul
34	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07082	Itacoatiara – AM	Amarelo
35	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07084	Itacoatiara – AM	Amarelo
36	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07085	Itacoatiara – AM	Amarelo
37	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7268	Itacoatiara – AM	Rosa
38	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07107	Parintins - AM	Vermelho
39	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07112	Parintins - AM	Azul
40	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07114	Parintins - AM	Amarelo
41	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07115	Parintins - AM	Amarelo
42	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06848	Santarém - PA	Amarelo
43	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06865	Santarém - PA	Amarelo
44	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06866	Santarém - PA	Amarelo
45	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06869	Santarém - PA	Amarelo
46	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06871	Santarém - PA	Amarelo
47	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06873	Santarém - PA	Amarelo
48	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06874	Santarém - PA	Amarelo
49	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06889	Monte Alegre - PA	Amarelo
50	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06890	Monte Alegre - PA	Vermelho
51	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06898	Monte Alegre - PA	Verde
52	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06904	Monte Alegre - PA	Verde
53	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06919	Monte Alegre - PA	Amarelo
54	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06929	Monte Alegre - PA	Amarelo
55	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06941	Monte Alegre - PA	Verde
56	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06943	Monte Alegre - PA	Amarelo
57	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06968	Almeirim – PA	Amarelo

58	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06987	Almeirim – PA	Amarelo
59	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_06988	Almeirim – PA	Amarelo
60	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07006	Almeirim – PA	Amarelo
61	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07009	Almeirim – PA	Amarelo
62	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07010	Almeirim – PA	Amarelo
63	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_07011	Almeirim – PA	Verde
64	<i>Dendropsophus walfordi</i>	CTGA_N_7267	Almeirim – PA	Amarelo

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA-PIRES, T.C.S., HOOGMOED, M.S. & ROCHA, W.A.D. Notes on the vertebrates of northern Pará, Brazil: a forgotten part of the Guianan Region, I. Herpetofauna. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais*, 5(1):13-112, 2010.
- AVISE, J.C. Phylogeography; The history and formation of species. *Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts*. 447 p, 2000.
- BASSO, N.G., PERÍ, S.I. & DI TADA, I.E. Revalidación de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura: Hylidae). *Cuadernos Herpetologia*, 1(3):1-11, 1985.
- BAYLEY, P.B. & SPARKS, R.E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. Pages 110-127 in D.P. Dodge, ed. Proceedings of the International Large River Symposium (LARS). *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 106, 1989.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D. J., SODHI, N. S., NG, P. K., MEIER, R., *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 148-155, 2007.
- BÖNING, P., WOLF, S., UPTON, K., MENIN, M., VENEGAS, P.J. & LÖTTERS, S. Amphibian diversity and is turnover in floating meadows along the Amazon river. *Salamandra*, v. 53, n. 3, p. 379-388, 2017.
- BOKERMANN, W.C.A. Nova espécie de *Hyla* de Rondônia, Brasil (Amphibia, Salientia). *Atas da Sociedade Biológica do Rio de Janeiro*, 6(5): 52-55, 1962.
- CANTANHEDE, A. M., DA SILVA, V. M. F., FARIAS, I. P., HRBEK, T., LAZZARINI, S. M., & ALVES-GOMES, J. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). *Molecular Ecology*, 14(2), 401-413, 2005.
- CORANDER, J. & TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, **205**, 19–31, 2007.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R. & POSADA, D. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8):772-772, 2012.
- DE LA RIVA, I., MÁRQUEZ, R. & BOSCH J. Description of the advertisement calls of some South American Hylidae (Amphibia: Anura): taxonomic and methodological consequences. *Bonner Zoologische Beiträge*, 47(1-2):175-185, 1997.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11-15, 1987
- DUELLMAN, W.E. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien: Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. *Das Tierreich*, 95:1-225, 1997.
- ELMER, K.R., DÁVILA, J.A. & LOUGHEED, S.C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC evolutionary biology*, v. 7, n. 1, p. 247, 2007.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3):564–567, 2010.

- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2):479-491, 1992.
- FAIVOVICH, J., HADDAD, C.F.B., GARCIA, P.C.A., FROST, D.R., CAMPBELL, J.A., WHEELER, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294:240, 2005.
- FITZINGER, L. J. (). *Systema reptilium*. Vol. 1. Braumüller & Seidel. 1843
- FOUQUET, A., GILLES, A., VENCES, M., MARTY, C., BLANC, M. & GEMMELL, N. J. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, 2(10): e1109, 2007.
- FOUQUET, A., NOONAN, B.P., BLANC, M., & ORRICO, V.G.D. Phylogenetic position of *Dendropsophus gaucheri* (Lescure and Marty 2000) highlights the need for an in-depth investigation of the phylogenetic relationships of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae). *Zootaxa*, 3035: 59-67, 2011.
- FROST, D. R. 2018. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Junho, 2016). Acesso: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- FU, Y.X.. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925, 1997.
- FUNK, W.C., CAMINER, M. & RON, S.R. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *The Royal Society*, 279: 1806–1814, 2011.
- GEHARA, M., CRAWFORD, A.J., ORRICO, V.G., RODRÍGUEZ, A., LÖTTERS, S., FOUQUET, A., *et al.* High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the Neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *PloS one*, 9(9): e103958, 2014.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131–137, 1969.
- HAUGAASEN, T., & PERES, C.A. Population abundance and biomass of large bodied birds in Amazonian flooded and unflooded forests. *Bird Conservation International*, 18(2), 87-101, 2008.
- HESS, L.L., MELACK, J.M., NOVO, E.M., BARBOSA, C.C., & GASTIL, M. Dual-season mapping of wetland inundation and vegetation for the central Amazon basin. *Remote sensing of environment*, v. 87, n. 4, p. 404-428, 2003.
- HÖDL, W. Call differences and calling site segregation in anuran species from central amazonian floating meadows. *Oecologia*, 28:351-363, 1977.
- HOOGMOED, M.S., GALATTI, U. Censo da Biodiversidade da Amazônia Brasileira. Grupo: Anura. Acesso: <http://www.museu-goeldi.br/censo/> em 28 de março de 2017.
- HOORN, C., WESSELINGH, F.P., TER STEEGE, H., BERMUDEZ, M.A., MORA, A., SEVINK, J. SANMARTÍN, I., SANCHEZ-MESEGUER, A., ANDERSON, C.L., FIGUEIREDO, J.P., JARAMILLO, C., RIFF, D., NEGRI, F.R., HOOGHMIESTRA, H., LUNDBERG, J., STADLER, T., SÄRKINEN, T. & ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, **330**,927–931, 2010.

JANSEN, M., BLOCH, R. & SCHULZE, A., Pfenninger, M. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica Scripta*. 40 (6), 567-583, 2011.

JOBB, G., HAESELER, A. & STRIMMER, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC evolutionary biology*, 4(1): 1, 2004.

JUNK, W.J. Investigations on the ecology and production-biology of the 'floating meadows' (*Paspalum-Echinochloetum*) on the middle Amazon. Part II: The aquatic fauna in the root zone of floating vegetation. *Amazoniana*, 4:9–102, 1973.

JUNK, W. & PIEDADE, M.T.F. Plant life in the floodplain with special reference to herbaceous plants. In: *The central Amazon floodplain* (pp. 147-185). Springer, Berlin, Heidelberg.

JUNK W, PIEDADE M.T.F., SCHÖNGART J. & WITTMANN F. A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (várzeas). *Wetlands Ecology and Management*, 20(6), 461-475, 2012.

KAEFER, I. L., MONTANARIN, A., COSTA, R. S., & LIMA, A. P. Temporal patterns of reproductive activity and site attachment of the Brilliant-thighed Frog *Allobates femoralis* from Central Amazonia. *Journal of Herpetology*, v. 46, n. 4, p. 549-554, 2012.

KAEFER, I.L., TSUJI-NISHIKIDO, B.M., MOTA, E.P., FARIAS, I.P. & Lima, A.P. The early stages of speciation in Amazonian forest frogs: phenotypic conservatism despite strong genetic structure. *Evolutionary Biology*, 40(2), 228-245, 2013.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MENTJIES, P., DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649, 2012.

KÖHLER, J., JUNGFER, K.H. & REICHLE, S. Another new species of small *Hyla* (Anura, Hylidae) from Amazonian sub-Andean forest of western Bolivia. *Journal of Herpetology*. 39: 43–50, 2005.

LANGONE, J. A. & BASSO N. G. Distribución geográfica y sinonimia de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 11: 1–17, 1987.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, VALENTIN, H., WALLACE, F. I.M., WILM, A., LOPEZ, R., et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics*. Nov 1; 23(21): 2947–2948, 2007.

LOUGHEED, S.C., GASCON, C., JONES, D.A., BOGART, J.P. & BOAG, P.T. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 266, 1829–1835, 1999.

LUTZ, B. Brazilian species of *Hyla*. University of Texas: Austin and London, 1973.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research, Journal Article*, 27(2): 209–220, 1967.

MEDEIROS, L.R., LOURENÇO, L.B., ROSSA-FERES, D.C., LIMA, A.P., ANDRADE, G.V., GIARETTA, A.A., EGITO G.T.B.T. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. *BMC Genetics*, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

- MELACK, J.M., FORSBERG, B.R. The biogeochemistry of Amazon floodplain lakes and associated wetlands. In M.E. McClain, R.L. Victoria, & J.E. Richey (Eds.), *The biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world* (pp. 235–276). *Oxford University Press, Oxford*, 2001.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Biodiversidade brasileira, avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002.
- MORAVEC, J., APARICIO, J., GUERRERO-REINHARD, M., CALDERON, G., & KOEHLER, J. Diversity of small Amazonian *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): another new species from northern Bolivia. *Zootaxa*, 1918: 1-12, 2008.
- MORAVEC, J., APARICIO J. & KÖHLER. J. A new species of tree frog, genus *Dendropsophus* (Anura: Hylidae), from the Amazon of northern Bolivia. *Zootaxa* 1327: 23–40, 2006.
- PEARSE, D. E., ARNDT, A. D., VALENZUELA, N., MILLER, B. A., CANTARELLI, V., & SITES Jr, J. W. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15(4), 985-1006, 2006.
- PRÖHL, H. Territorial behavior in dendrobatid frogs. *Journal of Herpetology*, 39, 354–365, 2005.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2013.
- REIS, S. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. *Revista Brasileira de Zoologia* 5(4): 571-580, 1998.
- RIBAS, C.C., ALEIXO, A., NOGUEIRA, A.C.R., MIYAKI, C.Y. & CRACRAFT, J. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B* 279: 681-689, 2012.
- ROCHA, S.R.T, LÍVIA. Estudo citogenético de espécies de *Dendropsophus* (Anura:Hylidae). Campinas – SP, 2013.
- ROSA, A.J.M. & PAIVA, S. R.Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. *Embrapa Cerrados*, 2009.
- SALZBURGER, W., EWING, G.B. & VON H. A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952-1963, 2011.
- SÁNCHEZ-BOTERO, J.I. & ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. As macrófitas aquáticas como berçário para a ictiofauna da várzea do rio Amazonas. *Acta amazonica*, v. 31, n. 3, p. 437-447, 2001.
- SCHIESARI, L., ZUANON, J., AZEVEDO-RAMOS, C., GARCIA, M., GORDO, M., MESSIAS, M., & VIEIRA, E. M. Macrophyte rafts as dispersal vectors for fishes and amphibians in the Lower Solimoes River, Central Amazon. *Journal of Tropical Ecology*, 19(3), 333-336, 2003.
- SEGALLA, M.V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G., GRANT, T., HADDAD, C.F.B., GARCIA, P.C.A., BERNECK, B.V.M., & LANGONE, J.A. Brazilian amphibians: List of species. *Herpetologia Brasileira*, 5(2):34-46, 2016.

- SILVA J.M.C., RYLANDS A.B. & FONSECA G.A.B. The fate of Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*.19, 689–694, 2005.
- TAJIMA, F.. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595, 1989.
- TEMPLETON, A.R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*. 7:381-397, 1998.
- UPTON, K., THOMAS-WARREN, E. & ROGERS, I. Amphibian Diversity on Floating Meadows in Flooded Forests of the Peruvian Amazon. *Herpetological Review* 45(2): 209-212, 2014.
- VENCES, M., THOMAS, M., VAN DER MEIJDEN, A., CHIARI, Y. & VIEITES, D. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(5), 1–1, 2005.
- VALLINOTO, M., SEQUEIRA, F., SODRÉ, D., BERNARDI, J. A. R., SAMPAIO, I. & SCHNEIDER, H. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoologica Scripta*, 39, 128–140, 2010.
- WALDEZ, F., MENIN, M. & VOGT, R.C. Diversity of amphibians and Squamata reptilians from lower Purus River Basin, Central Amazonia, Brazil. *Biota Neotropica*. 13(1), 2013.
- WALLACE, A.R. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of Zoological Society of London* 20: 107–110, 1852.
- WATTERS, J.L., CUMMINGS, S.T., FLANAGAN R.L. & SILER C.D. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa*, 4072 (4): 477-495, 2016.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, v. 16, n. 2, p. 97-159, 1931.
- ZEISSET, I. & BEEBEE, T.J.C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101: 109-119, 2008.