



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Pós-graduação em Ecologia e
Evolução

Laboratório de Genética e Biodiversidade



**PADRÕES E PROCESSOS ASSOCIADOS À DIVERSIDADE
DA ANUROFAUNA EM ÁREAS ABERTAS DA AMÉRICA
DO SUL: FILOGEOGRAFIA DE *PHYSALAEMUS CUVIERI*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

NÚBIA ESTHER DE OLIVEIRA MIRANDA

ORIENTADORA: Dra. ROSANE GARCIA COLLEVATTI

CO-ORIENTADOR: Dr. NATAN MEDEIROS MACIEL

GOIÂNIA – GO

MARÇO/2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ **Dissertação** ☒ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

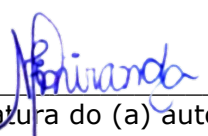
Nome completo do autor: Núbia Esther de Oliveira Miranda

Título do trabalho: Padrões e Processos Associados à Diversidade da Anurofauna em Áreas Abertas da América do Sul: Filogeografia de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 31 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**PADRÕES E PROCESSOS ASSOCIADOS À DIVERSIDADE
DA ANUROFAUNA EM ÁREAS ABERTAS DA AMÉRICA
DO SUL: FILOGEOGRAFIA DE *PHYSALAEMUS CUVIERI*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

NÚBIA ESTHER DE OLIVEIRA MIRANDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Evolução

ORIENTADORA: Dra. ROSANE GARCIA COLLEVATTI

CO-ORIENTADOR: Dr. NATAN MEDEIROS MACIEL

GOIÂNIA – GO

MARÇO/2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Miranda, Núbia Esther de Oliveira

Padrões e Processos Associados à Diversidade da Anurofauna em
Áreas Abertas da América do Sul: Filogeografia de *Physalaemus
cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) [manuscrito] / Núbia Esther de
Oliveira Miranda. - 2014.
cxx, 120 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti; co-orientador Dr.
Natan Medeiros Maciel.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Evolução, Goiânia, 2014.

Bibliografia. Anexos.

Inclui mapas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. genética de populações. 2. biogeografia. 3. Leiuperinae. 4.
Cerrado. 5. anurofauna. I. Collevatti, Rosane Garcia, orient. II. Maciel,
Natan Medeiros, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
Tel/fax: 62 3521 1203
Email: ecoevol@gmail.com

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 23

Ata da reunião da banca examinadora da defesa de tese em nível de doutorado. Em vinte e um de março de dois mil e quatorze, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro II do ICB II, Campus II, UFG, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti – ICB/UFG, Profa. Dra. Fernanda de Pinho Werneck – INPA, Profa. Dra. Renata Cecília Amaro – USP, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva – ICB/UFG e Prof. Dr. Rogério Pereira Bastos – ICB/UFG** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"Padrões e processos associados à diversidade da anurofauna em áreas abertas da América do Sul: filogeografia de *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEIUPERIDAE)"** em nível doutorado, área de concentração em Ecologia e Evolução, de autoria de **Núbia Esther de Oliveira Miranda**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de.....³⁰..... minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu ao examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo em vista o que consta na Resolução nº 0834/2007 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução e procedidas às correções recomendadas, a tese foi.....^{aprovada}....., considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor em Ecologia e Evolução, na área de concentração em Ecologia e Evolução pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do programa da versão definitiva da tese, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
Campus II (Samambaia), ICB IV, segundo piso, Goiânia, Goiás.
Tel/fax: 62 3521 1203
Email: ecoevol@gmail.com

de artigo (s) científico (s) oriundo (s) dessa tese em periódicos de circulação nacional e, ou,
internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de
pauta, às.....11..... horas e45.....minutos encerrou-se a sessão de defesa, e para
constar eu, Lorena Reis Pinho, Assistente em Administração - da Universidade Federal de
Goiás, lavrei a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca
examinadora em três vias de igual teor.


Prof. Dra. Rosane Garcia Collevatti
ICB/UFG


Prof. Dra. Fernanda de Pinho Werneck
INPA


Prof. Dra. Renata Cecília Amaro
USP


Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva
ICB/UFG


Prof. Dr. Rogério Pereira Bastos
ICB/UFG

UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS

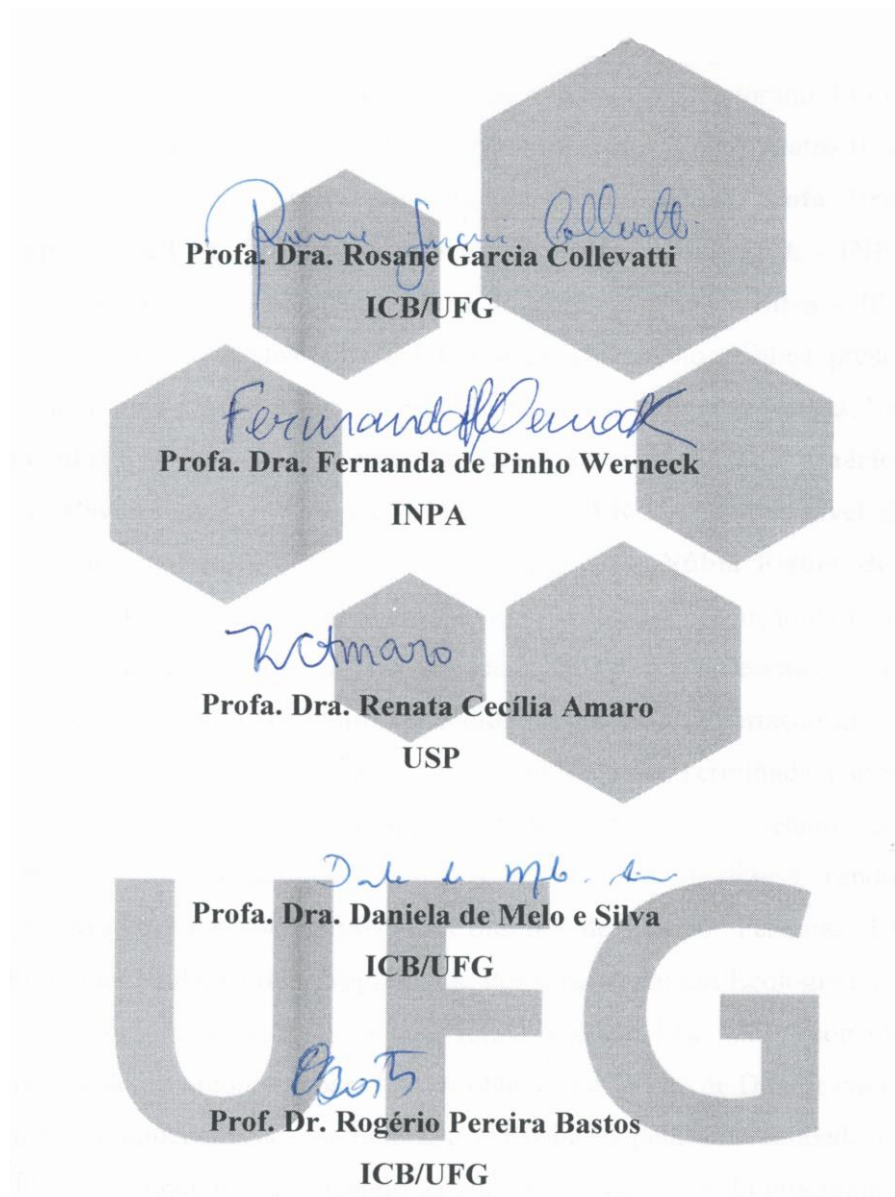
TESE DE DOUTORADO

NÚBIA ESTHER DE OLIVEIRA MIRANDA

TÍTULO:

**PADRÕES E PROCESSOS ASSOCIADOS À DIVERSIDADE DA ANUROFAUNA
EM ÁREAS ABERTAS DA AMÉRICA DO SUL: FILOGEOGRAFIA DE
PHYSALAEMUS CUVIERI (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

COMISSÃO EXAMINADORA:



21 de Março de 2014

“As buds give rise by growth to fresh buds, and these, if vigorous, branch out and overtop on all sides many a feeble branch, so by generation I believe it has been with the great Tree of Life, which fills with its dead and broken branches the crust of the earth, and covers the surface with its ever branching and beautiful ramifications.”

(Charles Darwin)

“A ciência é uma jornada, não um destino. Qualquer pessoa que apresente a ciência como um corpo de fatos fundamentalmente fidedigno e organizado provavelmente estará tentando lhe vender alguma coisa.”

(Idan Ben-Barak)

Agradecimentos

Agradeço à todos que estiveram presentes de alguma forma neste trabalho, de forma efetiva ou não, alguns nem mesmo fazem ideia do quanto me ajudaram.

Aos meus orientadores que foram fundamentais nessa caminhada:

À **Rosane G. Collevatti** por toda orientação e confiança depositada em mim e em meu trabalho. Obrigada por ter aberto às portas para mim quando nem aluna tua eu era ainda e por ter me apresentado o mundo da genética e da filogeografia. Que essa parceria iniciada no doutorado ainda renda muitos frutos.

Ao **Natan Maciel** pela co-orientação e por todo auxílio que nunca me negaste. Já são quase seis anos de parceria, que espero que ainda perdure por muito tempo.

À **minha família**, em especial meus pais (**Ângela Maria de O. Miranda** e **Dilson de O. Miranda**) e minhas irmãs (**Ananda Cristina de O. Miranda** e **Norelly Anne de O. Miranda**), que mesmo não entendendo muito bem o que eu realmente fazia sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu concretizasse mais esta etapa da minha vida acadêmica.

À **Levi Carina Terribile** e ao **Matheus Lima-Ribeiro** pela disponibilidade e por toda paciência para ensinar os fundamentos da modelagem de nicho ecológico.

Aos professores **José Alexandre Diniz Filho** e **Rogério Pereira Bastos** pelas dicas e sugestões na banca de qualificação.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para contribuir para a melhoria deste trabalho: **Daniela de Melo e Silva**, **Fernanda de Pinho Werneck**, **José Alexandre Diniz-Filho**, **Renata Cecília Amaro**, **Rogério Pereira Bastos** e **Thannya Nascimento Soares**.

Aos amigos do **Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio)** da UFG (os presentes e os que já passaram por aqui), que me receberam muito bem, que sempre estiveram ali dispostos a ajudar no que fosse necessário, pelas conversas e os pelos muitos momentos de descontração que tornaram essa caminhada muito mais leve:

Às professoras (**Mariana**, **Rosane** e **Thannya**) por garantirem toda a infraestrutura necessária.

À **Natácia Lima** por toda paciência e amizade e por ter me ensinado todos os macetes para fazer uma boa precipitação de uma reação de sequenciamento.

À **Elisa Barreto** pela amizade, caronas infinitas, companhias nas aventuras noturnas pela Agronomia para colocar placas no sequenciador e em todas as idas à campo, congressos e cursos.

À **Monik Oprea** pela amizade, companheirismo, caronas, cafés, fins de semana e feriados de trabalho e por sempre se preocupar com meu bem-estar.

À **Maria Augusta** pelas incontáveis ajudas envolvendo microtubos e infinitas etiquetas.

Advaldo, **Ana Maria**, **Camila**, **Carol Carvalho**, **Edilene**, **Eduardo**, **Edvaldo**, **Fernanda**, **Giovanna**, **Jac Lima**, **Jaqueline**, **Leciane**, **Luana**, **Lucas**, **Ludmilla**, **Ludy**, **Ramilla**, **Rodrigo**, **Ruan**, **Tatiane**, **Thaís** e **Vivian**.

Aos amigos dos outros laboratórios, pela amizade, cafés, auxílios com softwares e afins: **Danusy**, **Franciele**, **Pedro**, **Poliana** e **Thiago**.

Aos pesquisadores e herpetólogos que de uma forma ou de outra permitiram que este trabalho fosse concretizado:

Adrian A. Garda (Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte), **Célio Fernando B. Haddad** (CFBH - Coleção "Célio F. B. Haddad" da UNESP

e Rio Claro), **Elaine Maria Lucas Gonsales** (CAUC - Coleção de Anfíbios da Universidade Comunitária da Região de Chapecó/UNOCHAPECÓ e EMLG - Coleção Elaine Maria Lucas Gonsales), **Felipe Medeiros** (Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte), **Franco L. Souza** (ZUFMS- Coleção Zoológica de Referência da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), **Glaucia Pontes** (PUCRS – Museu de Ciências e Tecnologia, Setor de Herpetologia), **Guarino Rinaldi Colli** (CHUNB – Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília), **Marcos A. Carvalho** (UFMT- Coleção Zoológica da Universidade Federal de Mato Grosso), **Maria Rita Silvério Pires** (LZVUFOP - Coleção Herpetológica do Laboratório de Zoologia dos Vertebrados da Universidade Federal de Ouro Preto), **Veluma Bastiani** (CAUC - Coleção de Anfíbios da Universidade Comunitária da Região de Chapecó/UNOCHAPECÓ) e **William Vaz-Silva** pelo empréstimo/doação de material biológico.

Daniele Carvalho, Elisa Barreto, Natan Maciel e Rafael F. de Magalhães pela ajuda nas coletas.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)** pelo financiamento concedido na Chamada 07/2009 – PRONEX ao Projeto “Núcleo de Excelência em Genética e Conservação de Espécies do Cerrado – GECER” no qual esta pesquisa está incluída.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelos financiamentos concedidos aos projetos no qual este trabalho está inserido: “Conservação e análise dos padrões e processos associados à diversidade genética da herpetofauna do Cerrado Conservação e análise dos padrões e processos associados à diversidade genética da herpetofauna do Cerrado (GENPAC 15)” e “Padrões e Processos Associados à Diversidade da Herpetofauna em Áreas Abertas da América do Sul: Filogeografia de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)”.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução** da Universidade Federal de Goiás pelas oportunidades concedidas e por todos os auxílios financeiros para participações em congressos, cursos e workshops.

Ao professor **Alexandre Siqueira** do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos/UFG pelo apoio estrutural.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a minha formação, seja através de conselhos, exemplos, críticas, sugestões e amizade.

Sumário

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
INTRODUÇÃO	1
Sistemática e Relações Filogenéticas do Gênero <i>Physalaemus</i>	2
Áreas Abertas da América do Sul	5
Contexto Biogeográfico da anurofauna da América do Sul	12
Contexto Filogeográfico da anurofauna da América do Sul.....	17
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS.....	42
Paleomodelagem.....	42
Dados Moleculares	46
Diversidade Genética e Padrão Filogeográfico	46
Reconstrução Filogenética e Tempos de Divergência.....	61
Dinâmica Evolutiva Espacial	63
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS.....	97

Lista de Figuras

- Figura 1.** Distribuição dos principais biomas de áreas abertas da América do Sul. Legenda: Ca = Caatinga, Ce = Cerrado e Ch = Chaco. No mapa é possível perceber as manchas de cerrado que estão presentes nas Florestas Amazônica e Atlântica. Adaptado de Silva & Bates (2002) 8
- Figura 2.** Distribuição potencial (IUCN Spatial Data) de *Physalaemus cuvieri* na América do Sul. Pontos indicam as localidades amostradas neste estudo, números identificadores das populações conforme Tabela 3. 24
- Figura 3.** Registros de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* utilizados para gerar os modelos de paleodistribuição. 30
- Figura 4.** Gráfico de saturação da terceira posição dos códons da região nuclear rodopsina (A) e da região mitocondrial citocromo b (B) baseados nos indivíduos das 76 populações amostradas de *Physalaemus cuvieri*. Transições (indicadas por triângulos) e transversões (X). 36
- Figura 5.** Estimativas da frequência de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* na América do Sul, baseadas no consenso de 12 ENMs e 4 AOGCMs utilizados para modelar a paleodistribuição em: A) 21 ka, B) 6 ka e C) presente 43
- Figura 6.** Áreas de refúgio para *Physalaemus cuvieri* ao longo do último ciclo glacial. Em destaque a distribuição das populações amostradas neste trabalho, números identificadores das populações conforme Tabela 3 44
- Figura 7.** Mapas de incerteza para cada componente de modelagem (ENMs, AOGCMs, tempo e resíduos – interação ENMs X AOGCMs) utilizado na solução de consenso da paleomodelagem de *Physalaemus cuvieri*. A barra ao lado de cada mapa mostra a proporção da soma dos quadrados obtida pela ANOVA hierárquica calculada para cada célula da gride..... 45
- Figura 8.** Distribuição geográfica das diversidades: I) nucleotídica (II) e II) haplotípica (h) das populações de *Physalaemus cuvieri*. Para valores individuais consultar a Tabela A3. Em cinza, refúgio histórico predito para a espécie..... 48
- Figura 9.** Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada nas regiões mitocondriais dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*. Cada círculo representa um único haplótipo com tamanho relativo à sua frequência (de 1 à 60). Barras ao longo dos ramos conectando os haplótipos representam mutações (quando apenas uma mutação está presente a barra foi suprimida, quando mais de duas mutações estão presentes, o número é indicado junto à barra)..... 52
- Figura 10.** Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada nas regiões mitocondriais dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*, mostrando os haplogrupos e as populações que apresentam arranjo incompleto de linhagens. As setas indicam os haplótipos presentes nessas populações. 53

Figura 11. Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada na região nuclear (rodopsina) dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*..... 56

Figura 12. Distribuição dos haplótipos, obtidos a partir das regiões mitocondriais de *Physalaemus cuvieri*, nas bacias hidrográficas. I – Haplogrupos 1 e 2, II – Haplogrupo 3 (conforme delimitado na Figura 10). Siglas: HR-A (Amazônia), HR-AL (Atlântico Leste), HR-ANO (Atlântico Norte), HR-ANOR (Atlântico Nordeste Ocidental), HR-AS (Atlântico Sul), HR-ASE (Atlântico Sudeste), HR-P (Paraguai), HR-PA (Parnaíba), HR-PR (Paraná), HR-SF (São Francisco), HR-T-A (Araguaia-Tocantins) e HR-U (Uruguai)..... 57

Figura 13. Relação entre distância genética e distância geográfica ($r = 0.163$; $P = 0.039$, com 10000 permutações) entre 34 populações ($n > 8$) de *Physalaemus cuvieri* 59

Figura 14. História demográfica de *Physalaemus cuvieri*. A) Distribuição mismatch. Linha tracejada e círculos representam as frequências observadas das diferenças par-a-par entre os haplótipos. Linha contínua mostra os valores esperados sob o modelo de expansão demográfica histórica. B) Bayesian Skyline Plot. Linha preta representa a mediana das estimativas populacionais e faixas cinza indicam os limites superior e inferior de confiança (95% HPD)..... 60

Figura 15. Relações filogenéticas e tempos de divergência (apenas para nós com probabilidade posterior ≥ 0.9) dos haplótipos de *Physalaemus cuvieri* (*maximum clade credibility tree* baseada em todos os fragmentos). Siglas das populações conforme Tabela 3..... 62

Figura 16. Rotas hipotéticas de difusão histórica das linhagens de *Physalaemus cuvieri*. Linhas vermelhas entre localidades indicam os eventos históricos de difusão (as setas brancas indicam o sentido) e o tamanho dos círculos representa o tamanho histórico da população. A) aprox. 5 Ma; B) aprox. 4,5 Ma; C) aprox. 3,5 Ma; D) aprox. 3 Ma; E) aprox. 2,7 Ma; F) aprox. 2,5 Ma; G) aprox. 2,2 Ma; H) aprox. 1,8 Ma; I) aprox. 1,2 Ma; J) aprox. 0,5 Ma; K) Holoceno – presente..... 64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação biogeográfica da região Neotropical. Adaptada de Morrone (2002, 2006)	6
Tabela 2. Distribuição temporal dos fósseis de anuros pertencentes à família Leptodactylidae (sensu lato). Adaptada de Lynch (1971), Báez & Gasparini (1979) e Gómez e colaboradores (2013).	13
Tabela 3. Características das 76 localidades amostradas para a análise filogeográfica de <i>Physalaemus cuvieri</i> . Tamanho amostral (N) e números tombo de espécimes e tecidos. Acrônimos: AAGARDA (Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte), CAUC (Coleção de Anfíbios da Universidade Comunitária da Região de Chapecó/UNOCHAPECÓ), CFBH (Coleção "Célio F. B. Haddad"), (CHUNB (Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília), EMLG (Coleção Elaine Maria Lucas Gonsales), LZVUFOP (Coleção Herpetológica do Laboratório de Zoologia dos Vertebrados da Universidade Federal de Ouro Preto), UFMT-A (Coleção Zoológica da UFMT- Setor Herpetologia-Amphibia)... ..	25
Tabela 4. Detalhes dos quatro AOGCMs utilizados na paleomodelagem de <i>Physalaemus cuvieri</i>	32
Tabela 5. Primers utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões mitocondriais e nuclear em <i>Physalaemus cuvieri</i>	33
Tabela 6. Composição das reações de PCR para cada um dos fragmentos amplificados (veja Tabela 5) para <i>Physalaemus cuvieri</i>	34
Tabela 7. Programas utilizados nos termocicladores para amplificar cada uma das regiões utilizadas para o estudo filogeográfico de <i>Physalaemus cuvieri</i>	34
Tabela 8. Números de acesso das sequências de <i>Leptodactylus fuscus</i> e <i>Pseudopaludicola falcipes</i> obtidas no GenBank.	35
Tabela 9. Contribuição relativa de cada componente de modelagem (tempo, métodos, AOGCMs e sua interação) para a variabilidade das predições dos ENMs para <i>Physalaemus cuvieri</i> . A coluna adequabilidade mostra a proporção mediana e a amplitude da soma de quadrados a partir da ANOVA hierárquica calculada para cada célula da grade cobrindo a região neotropical	45
Tabela 10. Caracterização das sequências e modelos evolutivos para cada uma das regiões de DNA amplificadas para as populações de <i>Physalaemus cuvieri</i>	46
Tabela 11. Características das 76 populações amostradas para a análise filogeográfica de <i>Physalaemus cuvieri</i> . Indivíduos (N), haplótipos por população (Nh) e relação dos haplótipos por população (em negrito haplótipos exclusivos).....	49

Tabela 12. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações de *Physalaemus cuvieri* separadas por bacias hidrográficas..... 58

Tabela 13. História demográfica das populações de *Physalaemus cuvieri*. Valores baixos e não significativos para SSD ($p > 0,05$) indicam que os dados não desviam do esperado sob o modelo de expansão. Valores baixos e significativos do índice raggedness sugerem populações em expansão. Valores negativos e significativos de D e Fs são esperados em caso de expansão populacional. Em negrito, testes significativos para expansão..... 60

Tabela A1. Classificação das 76 localidades amostradas para as análises filogeográficas de *Physalaemus cuvieri* quantos aos biomas e bacias hidrográficas. Siglas: HR-A (Amazônia), HR-AL (Atlântico Leste), HR-ANO (Atlântico Norte), HR-ANOR (Atlântico Nordeste Ocidental), HR-AS (Atlântico Sul), HR-ASE (Atlântico Sudeste), HR-P (Paraguai), HR-PA (Parnaíba), HR-PR (Paraná), HR-SF (São Francisco), HR-T-A (Araguaia-Tocantins) e HR-U (Uruguai)..... 97

Tabela A2. Pontos de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* utilizados na paleomodelagem..... 100

Tabela A3. Estatística de diversidade para cada população de *Physalaemus cuvieri*. Diversidade nucleotídica (Π) e diversidade haplotípica (h)..... 105

Tabela A4. Valores de F_{ST} par-a-par (abaixo da diagonal) e distância geográfica (km, acima da diagonal) entre as 34 populações de *Physalaemus cuvieri* ($n > 8$). Valores de F_{ST} significativos em negrito ($p \leq 0.05$). Siglas das populações conforme Tabela 3 107

Resumo

Trabalhos filogeográficos têm evidenciando histórias evolutivas complexas na diagonal de áreas abertas sul-americanas que só agora começamos a compreender. Os padrões filogeográficos da biota sul-americana são melhor documentados para os ambientes florestais, sendo ainda incipientes no que diz respeito às paisagens abertas. A rã *Physalaemus cuvieri* foi escolhida neste trabalho por apresentar ampla distribuição e por ser uma espécie típica de áreas abertas, sendo um modelo adequado para testar hipóteses sobre o papel dos eventos do Terciário *versus* Quaternário na diversidade genética e distribuição das linhagens de anurofauna de áreas abertas da região Neotropical. Aqui nós utilizamos uma ampla amostragem de indivíduos de *P. cuvieri* e utilizamos regiões de DNA com diferentes taxas de mutação para investigar os fatores históricos e espaciais que promoveram a diversificação da espécie. Nós integramos a abordagem filogeográfica com a modelagem da paleodistribuição, para compreender como os eventos orogênicos do Mioceno e Plioceno e/ou as oscilações climáticas do Pleistoceno influenciaram em sua diversificação. Foram amostrados 609 indivíduos em 76 localidades. Três fragmentos mitocondriais (12S, 16S e citocromo b) e um gene nuclear (rodopsina) foram sequenciados para todos os indivíduos. Foram identificados 248 haplótipos para a região mitocondrial e seis haplótipos na região nuclear. É possível reconhecer três haplogrupos, amplamente distribuídos, na rede de haplótipos, os quais reúnem haplótipos simpátricos e/ou de populações próximas geograficamente, sendo que há uma clara separação entre os haplótipos evidenciando uma “quebra” em diagonal separando as populações de *P. cuvieri*, com a ligação entre elas ocorrendo à nordeste por meio dos haplótipos da população de São Luiz – MA. A AMOVA hierárquica mostrou uma diferenciação significativa entre as populações presentes nas diferentes bacias hidrográficas (FCT = 0,273). A divergência entre as linhagens de *P. cuvieri* e o grupo externo ocorreu no Mioceno há 16.13 [SD 10.43–20.43] milhões de anos. As principais divergências entre os grandes grupos e os subgrupos que os compõem ocorreram principalmente no Mioceno (entre 16 – 5.7 milhões) e Plioceno (4.92 – 2.69 milhões). As divergências no Pleistoceno ocorreram principalmente dentro de populações ou entre linhagens muito próximas geograficamente. A análise de difusão espacial estimou datas mais recentes para os eventos de dispersão das linhagens de *P. cuvieri*, ainda assim boa parte da diversificação das linhagens continuou sendo registrada no Terciário, ainda que não se possa negar certa influência dos eventos climáticos do Quaternário. A origem das linhagens de *P. cuvieri* foi estimada para a região central do Brasil de onde partiram três principais rotas de colonização: uma em direção ao sul, outra para o norte e uma para noroeste. A distribuição potencial de *P. cuvieri* ao longo do último ciclo glacial pouco mudou, tanto em área quanto em localização geográfica. Nossos resultados revelam uma complexa história de diversificação de *P. cuvieri*, com os eventos orogênicos do Terciário exercendo papel fundamental no início de sua diversificação, que foi contínua e favorecida pelas flutuações climáticas do Quaternário, que contribuiu muito mais com a diversificação das linhagens mais jovens e com estruturação populacional. Em suma, *P. cuvieri* apresenta um padrão de divergências profundas e com forte estruturação regional de suas populações apesar de sua ampla distribuição e hábitos generalistas. Devido a este forte padrão divergente *P. cuvieri* deve ser tratada como um complexo críptico de espécies.

Abstract

Phylogeographic studies are revealing complex evolutionary histories in the South American diagonal of open formations. The phylogeographic patterns of South American biota are better documented for forest-dwelling species but remain insufficient in respect to open vegetation habitats. The frog *Physalaemus cuvieri* presents wide distribution being a typical species of open areas. It represents an ideal model to investigate hypotheses about the role of events of Tertiary *versus* Quaternary in the genetic diversity and diversification of the anurofauna of the Neotropical open areas. Here we used a range-wide sampling of *P. cuvieri* and DNA regions with different mutation rates to investigate historical and spatial process that promoted the species diversification. We integrated the phylogeographic approach with ecological niche models to understand how Miocene/Pliocene orogenic events and/or Pleistocene climatic oscillations have contributed to shape the current diversity and distribution of the species population. We sampled 609 individuals from 76 populations. Three mitochondrial fragments (12S, 16S and cytochrome b) and one nuclear (rhodopsin) were sequenced for all individuals. We identified 248 haplotypes in mitochondrial region and six haplotypes in nuclear region. It is possible to recognize three haplogroups, widely distributed in the network, which assemble sympatric and geographically close populations haplotypes. There is a clear separation between the haplotypes that shows a ‘diagonal break’ of the populations of *P. cuvieri* with their connection occurring in the northeast through the haplotypes of São Luiz - MA population. The hierarchical AMOVA showed significant differentiation among populations of the different river basins (FCT = 0.273). The divergence between the lineages of *P. cuvieri* and outgroups occurred during the Miocene, around 16.13 Ma [SD 10.43 to 20.43]. Divergences between the major groups and subgroups occurred during the Miocene (between 16 and 5.7 Ma). Divergences in the Pleistocene occurred mainly within populations, or among geographically close populations. The analysis of spatial diffusion estimated the most recent dates for the dispersal events of the lineages of *P. cuvieri*. Much of their diversification remained registered in the Tertiary, although we can not neglect the influence of Quaternary climatic fluctuations. Lineages of *P. cuvieri* seems to have an origin at central Brazil, with three main routes of colonization: one towards the south, one to the north and other to the northwest. The potential distribution of *P. cuvieri* appears did not change drastically across the last glacial cycle. Our results revealed a complex history diversification of *P. cuvieri*, with Tertiary orogenic events playing prominent role in the early diversification, by also favored by the climatic fluctuations of the Quaternary. This process contributed to the diversification of younger lineages and also structured populations. Therefore, *P. cuvieri* shows a pattern of deep divergences with strong regional structuring of populations, despite its widespread distribution and generalized ecology. Because of that deep and structured divergence, *Physalaemus cuvieri* populations also should be treated as a species complex.

INTRODUÇÃO

O gênero neotropical *Physalaemus* Fitzinger, 1826 compreende 45 espécies com ocorrência exclusiva na América do Sul (FROST, 2014). As espécies do grupo *Physalaemus cuvieri* são típicas dos biomas abertos (Cerrado, Caatinga, Chaco e Llanos).

Hipóteses filogenéticas mais abrangentes para o gênero estão restritas às espécies do grupo *Physalaemus pustulosus* (*sensu* Lynch, 1970) (CANNATELLA & DUELLMAN, 1984; CANNATELLA *et al.*, 1998; TÁRANO & RYAN, 2002; FUNK *et al.*, 2007). As demais hipóteses filogenéticas disponíveis para Anura amostraram poucas espécies do gênero, não permitindo um maior entendimento das relações de parentesco entre as espécies (DARST & CANNATELLA, 2004; FROST *et al.*, 2006; GRANT *et al.*, 2006; PYRON & WIENS, 2011). O fato é que em meio a tantas controvérsias, a taxonomia e as relações filogenéticas do grupo *P. cuvieri* e mesmo da subfamília Leiuperinae e da família Leptodactylidae permanecem pouco compreendidas, assim como os fatores históricos responsáveis pela distribuição geográfica atual destas espécies. A ocorrência de espécies crípticas, aliada a escassez de dados sobre caracteres morfológicos de adultos e larvas são algumas das dificuldades a serem superadas em estudos filogenéticos e biogeográficos do gênero. Além disso, por se tratar de um grupo exclusivo de áreas abertas, o estabelecimento de uma hipótese biogeográfica que explique a distribuição destas espécies no tempo e no espaço fornecerá indícios sobre quais eventos biogeográficos podem ter influenciado a diversificação da anurofauna de paisagens abertas na América do Sul.

Dentre as espécies do grupo *Physalaemus cuvieri* selecionamos uma espécie para investigar esses padrões evolutivos e espaciais a nível populacional, através de um estudo

filogeográfico. A rã Neotropical *Physalaemus cuvieri* foi escolhida por apresentar uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América Cis-Andina no Brasil, Argentina e Paraguai e por ser uma espécie típica de áreas abertas (MIJARES *et al.*, 2010). Esta espécie é considerada informalmente no meio científico como sendo um complexo de espécies crípticas, porém nenhum estudo de revisão taxonômica foi conduzido para a espécie. Um estudo filogeográfico fornecerá indícios para a corroboração ou não dessa informação. É importante ressaltar que atualmente a espécie é categorizada como pouca preocupação pela IUCN (LC, IUCN, 2013), considerando sua ampla distribuição geográfica e suas presumíveis grandes populações.

Sistemática e Relações Filogenéticas do Gênero *Physalaemus*

A família Leptodactylidae *sensu* Lynch (1971) era conhecida por ser uma das famílias mais diversas de Anura da região Neotropical. O grupo já foi dividido em cinco subfamílias: Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, constituindo um agrupamento bastante heterogêneo e considerado polifilético (RUVINSKY & MAXSON, 1996; DARST & CANNATELLA, 2004; FAIVOVICH *et al.*, 2005; WIENS *et al.*, 2005). Frost e colaboradores (2006) combinando caracteres anatômicos, moleculares e comportamentais, estabeleceram uma nova sistemática para Lissamphibia o que culminou com a reestruturação da família Leptodactylidae que foi subdividida em múltiplas famílias. Grant e colaboradores (2006) analisaram a família mais profundamente e propuseram a elevação taxonômica de Leiuperinae com o restabelecimento da família Leiuperidae, que passou a incluir os gêneros *Edalorhina* Jiménez de La Espada, 1870; *Engystomops* Jiménez de La Espada, 1872; *Eupemphix* Steindachner, 1863; *Physalaemus* Fitzinger, 1826; *Pleurodema*

Tschudi, 1838; *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926; e *Somuncuria* Lynch, 1978. Mais recentemente, uma nova filogenia, baseada em uma ampla amostragem de espécies e de marcadores moleculares, foi proposta para Amphibia (PYRON & WIENS, 2011) e novas reestruturações foram sugeridas. A principal mudança refere-se à reincorporação dos membros da então família Leiuperidae na família Leptodactylidae, que agora passam a constituir novamente a subfamília Leiuperinae. A subfamília Leiuperinae Bonaparte, 1850 tem distribuição estritamente Neotropical, ocorrendo desde o sul do México até o sul da Argentina. É composta atualmente pelos gêneros *Edalorhina* Jiménez de La Espada, 1870; *Engystomops* Jiménez de La Espada, 1872; *Eupemphix* Steindachner, 1863; *Physalaemus* Fitzinger, 1826; *Pleurodema* Tschudi, 1838 e *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (FROST, 2014).

Lynch (1970), durante a realização de seu estudo sobre os gêneros da família Leptodactylidae, percebeu com base em suas análises osteológicas, de morfologia externa e informações sobre história de vida, que quando comparados aos outros gêneros de leptodactilídeos, os gêneros *Eupemphix*, *Engystomops* e *Physalaemus* compreendiam apenas um grupo e propôs sinonimizar o gênero monotípico *Eupemphix* e o gênero *Engystomops* ao gênero *Physalaemus*. Com base em suas análises ele também definiu quatro grupos fenéticos: *P. biligonigerus*, *P. pustulosus*, *P. signiferus* e *P. cuvieri*. O autor também sugeriu que futuras divisões nesses grupos poderiam ser feitas, mas não com os dados analisados naquele momento.

Com a descoberta de novas espécies alguns autores começaram a sugerir a criação de novos grupos fenéticos para o gênero e a questionar os grupos propostos por Lynch em 1970 (HEYER & WOLF, 1989; CARAMASCHI *et al.*, 1991; LOBO, 1992; FEIO *et al.*, 1999; CARAMASCHI *et al.*, 2003). Nascimento e colaboradores (2005) fizeram uma revisão taxonômica do gênero *Physalaemus* e com base em características de

morfometria, morfologia externa, padrões de coloração e osteologia propuseram um novo arranjo de grupos de espécies para o gênero *Physalaemus* e revalidaram os gêneros *Engystomops* (para acomodar as espécies do antigo grupo *P. pustulosus* proposto por Lynch em 1970) e *Eupemphix* (para acomodar *Eupemphix nattereri*). Os autores propuseram sete grupos fenéticos para o gênero *Physalaemus*: *P. albifrons*, *P. cuvieri*, *P. deimaticus*, *P. gracilis*, *P. henselii*, *P. olfersii* e *P. signifer*. Segundo a classificação desses autores o grupo de espécies de *Physalaemus cuvieri* atualmente é composto por nove espécies com distribuição à leste dos Andes, desde a Venezuela até a Argentina: *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* e *P. kroyeri*. Todas as espécies do grupo têm uma distribuição relativamente ampla e são típicas de formações abertas do Cerrado, Caatinga, Chaco e Llanos. Essa nova classificação está sendo utilizada por alguns autores, mas outros sugerem que a revalidação de *Engystomops* foi equivocada (FUNK *et al.*, 2007) e o monofiletismo dos grupos fenéticos de *Physalaemus* deve ser testado, uma vez que nenhuma hipótese filogenética foi apresentada no trabalho de Nascimento *et al.* (2005). Novas evidências cariotípicas tem colocado em cheque o monofiletismo desses grupos (e. g. TOMATIS *et al.*, 2009), porém diferentemente do que sugerido por Funk e colaboradores (2007), a monofilia de *Engystomops* foi corroborada pelas análises de Pyron e Wiens (2011) e constitui um clado-irmão de *Eupemphix* e *Physalaemus*. De fato a única incongruência quanto à revalidação dos gêneros, diz respeito à *Eupemphix*. Pyron e Wiens (2001) sugeriram que o reconhecimento do gênero *Eupemphix* torna *Physalaemus* parafilético com o grupo de espécies de *P. signifer* sendo mais próximo filogeneticamente de *Eupemphix* do que à *Physalaemus* (as espécies também apresentam similaridades cromossômicas; ANANIAS *et al.*, 2007) , contudo os autores não propuseram quaisquer mudanças taxonômicas com base nesses resultados.

O gênero *Physalaemus* foi descrito por Fitzinger em 1826. Inicialmente era um gênero monotípico, proposto para *P. cuvieri* que foi descrita com base em um material procedente do Brasil, porém, sem especificação de localidade (BARRIO, 1965; NASCIMENTO *et al.*, 2005). Uma omissão que até hoje emperra a realização de uma revisão taxonômica em uma espécie que é considerada por muitos como sendo na realidade um complexo de espécies crípticas. O estudo filogeográfico poderá indicar a presença ou não de mais de uma linhagem embebida na espécie, contudo, a falta dessa informação permanecerá como uma dificuldade a ser superada na tomada de futuras decisões taxonômicas.

Áreas Abertas da América do Sul

A região Neotropical constitui uma das seis regiões zoogeográficas do mundo e compreende os trópicos do Novo Mundo, se estendendo desde o Sul do México até o centro da Argentina (não incluindo os Andes) e é dividida em quatro sub-regiões biogeográficas e suas províncias (veja Tabela 1, MORRONE, 2006).

Tabela 1- Classificação biogeográfica da região Neotropical. Adaptada de Morrone (2002, 2006).

Sub-regiões	Províncias
Caribenha	Serra Madre Ocidental
	Serra Madre Oriental
	Eixo Vulcânico Transversal
	Depressão do Balsas
	Serra Madre do Sul
	Costa Pacífica Mexicana
	Golfo do México
	Península de Yucatán
	Chiapas (México)
	Oriente da América Central
	Ocidente do Istmo do Panamá
	Bahamas
	Cuba
	Ilhas Cayman
	Jamaica
	Napo (Equador)
	Imerí (Venezuela)
	Guiana
Amazônica	Guiana Úmida
	Roraima
	Amapá
	Varzea (margens ao longo do rio Amazonas)
	Ucayali (Peru)
	Madeira
	Tapajós-Xingú
	Pará
	Pantanal
	Yungas (Peru)
	Floresta Atlântica
	Floresta Paranaense
	Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucárias)
Paranaense	
Chaquenha	Caatinga
	Cerrado
	Chaco
	Pampas

A sub-região Caribenha é a mais setentrional estendendo-se desde a porção central do México abarcando as florestas centro-americanas e as ilhas do Caribe, até as florestas baixas e sub-montanas do noroeste da América do Sul, e apresenta uma história evolutiva que reflete suas múltiplas relações com outras áreas do Neotrópico, o Neártico e os trópicos do Velho Mundo (e.g. SAVAGE, 1966; 1974; ROSEN, 1975; SAVAGE, 1982; DUELLMANN, 1988). A sub-região Amazônica inclui toda a área sob influência da bacia do rio Amazonas, é a maior sub-região da região Neotropical e considerada umas das mais diversas do Neotrópico (MORRONE, 2000), estendendo-se pela maior parte do Brasil e das Guianas e boa parte da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina. A sub-região do Paraná estende-se do nordeste da Argentina, leste do Paraguai e sul e leste do Brasil, e inclui as formações ombrófilas e estacionais que estão sob influência da costa atlântica. E finalmente, temos a sub-região Chaquenha, que se estende pelas porções norte e central da Argentina, sul da Bolívia, porções oeste e central do Paraguai, Uruguai e pela região central e nordeste do Brasil. Esta sub-região é dividida em quatro províncias biogeográficas (Caatinga, Cerrado, Chaco e Pampas) e inclui a diagonal de formações abertas da América do Sul que inclui os biomas da Caatinga, Cerrado e Chaco (veja Figura 1, PRADO & GIBBS, 1993; PENNINGTON, PRADO & PENDRY, 2000; PENNINGTON, LEWIS & RATTER, 2006).



Figura 1- Distribuição dos principais biomas de áreas abertas da América do Sul. Legenda: Ca = Caatinga, Ce = Cerrado e Ch = Chaco. No mapa é possível perceber as manchas de cerrado que estão presentes nas Florestas Amazônica e Atlântica. Adaptado de Silva & Bates (2002).

A Caatinga ocupa uma área aproximada de 734.478 Km² no semiárido da região Nordeste do Brasil. Ela representa cerca de 70% da área da região Nordeste e 11% do território nacional e inclui partes dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (PRADO, 2003). As

principais características dessa região são: a sua fitofisionomia bastante variável, composta por um mosaico de florestas secas e vegetação arbustiva que comporta desde florestas altas e secas, passando por inúmeras fitofisionomias intermediárias e até mesmo os chamados “*Brejos de Altitude*”, enclaves florestais que são classificados como relictos de uma disjunção da Floresta Atlântica que teriam sua origem atribuída às expansões florestais durante os períodos úmidos do Pleistoceno e do Holoceno e que abrigam espécies endêmicas que apresentam relações próximas com as espécies da Amazônia e da Mata Atlântica (VANZOLINI, 1981; ANDRADE-LIMA, 1982; RODRIGUES, 2003; QUEIROZ, 2006; WERNECK 2011). Além disso, contrário ao que se achava a região considerada pobre em sua fauna, na verdade apresenta altos níveis de diversidade e endemismo (e.g. RODRIGUES, 1988; ZANELLA & MARTINS, 2003). De acordo com Pennington e colaboradores (2000), a biota da Caatinga é testemunho de uma enorme floresta seca que em tempos pretéritos se estendia até o norte da Argentina, através do Brasil Central e hoje em dia representa a maior, mais isolada e uma das mais diversas manchas (‘nuclei’) de florestas secas (*Seasonally Dry Tropical Forest* – SDTF) da América do Sul (QUEIROZ, 2006). O que fica claro é que o conceito de Caatinga enquanto um ambiente de vegetação decídua xerófila sobre solos rasos e pouco permeáveis, com abundância de cactáceas e a típica aridez que confere identidade a essa paisagem, não engloba toda a heterogeneidade ambiental e a complexa história evolutiva da região, constituindo apenas uma ferramenta didática de referência fácil com o objetivo de sistematizar os conhecimentos obtidos para um tipo de paisagem que marcadamente é bem diferenciada quando comparada à maioria das outras paisagens brasileiras (PRADO, 2003; RODRIGUES, 2003).

O Cerrado é um grande bioma savânico confinado principalmente ao Planalto Central do Brasil, mas que também se estende em menor grau no nordeste do Paraguai e leste da Bolívia, cobrindo uma área de aproximadamente 2 milhões de quilômetros quadrados (cerca de 22% do território brasileiro). É a maior mancha de savana tropical e o segundo maior bioma da América do Sul, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica (OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Sua geomorfologia é caracterizada por um mosaico de superfícies velhas e novas, uma paisagem dominada pelos vastos platôs das chapadas e chapadões – unidades mais antigas -, separados por uma rede de depressões periféricas mais jovens (COLE, 1986; RATTER *et al.*, 1997; AB’SABER, 2000). Assim como a Caatinga, o Cerrado também apresenta uma grande variedade de fitofisionomias que incluem matas de galerias, florestas secas, veredas e campos rupestres que conferem à paisagem uma aparência de mosaico (RIBEIRO & WALTER, 1998), mas no geral a fitofisionomia típica do Cerrado (*cerrado strictu sensu*) com a presença de dois estratos, um arbóreo/arbustivo com árvores esparsas e retorcidas e outro herbáceo/gramíneo, é predominante na paisagem porque as características climáticas, topográficas e edáficas que a determinam são predominantes (RATTER *et al.*, 1997; OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Os fatores determinantes para a distribuição da vegetação do Cerrado têm sido alvos de várias controvérsias, mas no geral a sazonalidade da precipitação, a fertilidade e drenagem do solo, as flutuações climáticas do Quaternário (LEDRU, 1993; SALGADO-LABORIAU *et al.*, 1997) e o regime do fogo (RATTER *et al.*, 1997; BEERLING & OSBORNE, 2006) são considerados fatores importantes (PENNINGTON *et al.*, 2000; OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Enclaves de Cerrado ocorrem em outros biomas como relictos de um período no qual sua distribuição foi mais extensa do que hoje (COLE, 1986; AB’SABER, 2000) e enclaves de florestas secas são frequentes em suas regiões periféricas que estão em contato com a

Caatinga e o Chaco (OLIVEIRA FILHO & RATTER, 2002). É uma das savanas de maior diversidade, que apresenta um alto grau de endemismo e está entre as áreas mais ameaçadas do Mundo (MYERS *et al.*, 2000; SILVA & BATES, 2002; KLINK & MACHADO, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O Chaco corresponde a uma distinta unidade biogeográfica com uma complexa biota representando elementos de muitos outros biomas (MORRONE, 2006), é uma das poucas áreas de transição entre a zona tropical e a zona temperada que não forma um deserto, sendo provavelmente um dos poucos lugares do mundo onde se pode seguir o gradiente trópico-temperado (MORELLO, 1967). É caracterizado por ser uma região de planícies aluviais de solos compactos e de difícil drenagem, estendendo-se pelo norte da Argentina, oeste do Paraguai, sudeste da Bolívia e extremo oeste do estado do Mato Grosso do Sul no Brasil, cobrindo uma área aproximada de 840.000 km² (PENNINGTON *et al.*, 2000). Seu clima é distinguido pela forte sazonalidade, com verões atingindo altas temperaturas e um clima severo durante o inverno. Sua flora provavelmente é um relictos do Plioceno ou Pleistoceno que se estabeleceu sobre o solo salino deixado depois que o mar formado pela elevação dos Andes durante o Oligoceno recuou (IRIONDO, 1993; PRADO, 1993a; PENNINGTON *et al.*, 2000; SPICHIGER *et al.*, 2004) e inclui formações xerofíticas, comunidades arbóreas semelhantes às savânicas e pântanos (IRIONDO, 1993). De fato, em sua porção leste, o Chaco é claramente uma região transicional, onde o Cerrado, as Florestas Secas (SDTF) e o Chaco se interdigitam (PRADO, 1993b).

Contexto Biogeográfico da anurofauna da América do Sul

A biogeografia histórica preocupa-se em decifrar a geografia dos processos de diversificação de linhagens e clados (especiação, dispersão e extinção), integrando diversas áreas do conhecimento, tais como: a geologia, a paleontologia, a sistemática filogenética, biologia populacional, ecologia e climatologia. Seu principal objetivo é reconstruir a história das biotas continentais ao longo da história da Terra buscando entender os padrões de organização espacial dos organismos e os processos que resultaram nesses padrões (RIDDLE *et al.*, 2008).

Na América do Sul, os anfíbios anuros são membros antigos da fauna, os fósseis mais antigos datam do Cretáceo e vários grupos de anuros já estavam presentes no continente no início do Terciário. Pípidios, leptodactilídeos, bufonídeos e hilídeos são componentes antigos e os únicos grupos de anuros que possuem registros fósseis no continente sul-americano (BÁEZ & GASPARINI, 1979). Não se tem conhecimento de fósseis para os membros da subfamília Leiuperinae, os fósseis com relação filogenética mais próxima aos membros dessa subfamília estão listados na Tabela 2. Esses registros em sua maioria estão restritos à porção meridional do continente e no geral, tem-se pouco conhecimento acerca da herpetofauna que habitou as porções norte, nordeste e central do continente, não somente nas áreas cratônicas, mas também nas bacias intracratônicas.

Tabela 2 - Distribuição temporal dos fósseis de anuros pertencentes à família Leptodactylidae (sensu lato). Adaptada de Lynch (1971), Báez & Gasparini (1979) e Gómez e colaboradores (2013).

Período	Espécie	Referência
Pleistoceno	<i>Ceratophrys aurita</i>	Lynch (1971)
	<i>C. ornate</i>	Vergnaud-Grazzini (1968)
	<i>Ceratophrys</i> sp.	Vergnaud-Grazzini (1968)
	<i>Leptodactylus</i> sp.	Günther (1859b), Mones (1975)
	<i>L. ocellatus</i>	Günther (1859b), Vergnaud-Grazzini (1968)
Plioceno	<i>L. pentadactylus</i>	Günther (1859b)
	<i>Ceratophrys prisca</i>	Rovereto (1914)
	<i>Ceratophrys ornate</i>	Reig (1958)
	<i>Leptodactylus</i> sp.	Gómez <i>et al.</i> (2013)
Mioceno	<i>Wawelia gerholdi</i>	Casamiquela (1963)
	<i>Caudiverbera caudiverbera</i>	Casamiquela (1963), Lynch (1971)
Oligoceno	<i>C. caudiverbera</i>	Schaeffer (1949), Lynch (1971)
	<i>Eupsophus</i> sp.	Schaeffer (1949)
	<i>Neoprocoela edentate</i>	Schaeffer (1949)
	<i>Caudiverbera</i> sp.	Schaeffer (1949), Báez (1977)
Eoceno	<i>Caudiverbera</i>	Schaeffer (1949), Lynch (1971)
	<i>casamayorensis</i>	
Paleoceno	Leptodactylidae	Estes (1970)

Localidades fossilíferas estão presentes principalmente na Argentina, região andina e nas bordas do Escudo Brasileiro, mas praticamente inexistem no Brasil Central (WEBB, 1978; BÁEZ & GASPARINI, 1979; COLLI, 2005; SCHEFFLER *et al.*, 2010), o que de certa forma favoreceu que os estudos sobre a evolução da herpetofauna de paisagens abertas sul-americanas ficassem restritos basicamente à porção meridional do continente (*e.g.* LYNCH, 1971; WEBB, 1978). Esta situação vem mudando, com a publicação de trabalhos dando enfoque aos cenários evolutivos de grupos existentes na região (*e.g.* GARDA & CANNATELLA, 2007; GIUGLIANO *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2011), permitindo que hipóteses sobre como os mecanismos evolutivos vem atuando na diversificação da herpetofauna de áreas abertas,

em especial à do Cerrado, possam ser levantadas. Werneck (2011) realizou uma extensa revisão sobre a biogeografia dos biomas abertos da América do Sul, localizados à leste e sul dos Andes. A autora aponta que apesar dos estudos evolutivos envolvendo esses biomas terem aumentado, de forma geral, os biomas de áreas abertas permanecem pobremente caracterizados no que diz respeito às relações biogeográficas e estrutura genética de suas biotas. Daí, a importância dos estudos filogenéticos, que são imprescindíveis para que com base neles interpretações confiáveis sobre os fatores históricos que moldaram as distribuições dos organismos possam ser obtidas (COLLI, 2005).

No geral, os pesquisadores têm dado ênfase às flutuações climáticas do Quaternário como sendo responsáveis pelo padrão biogeográfico de alguns grupos de animais como aves, anuros e répteis (*e.g.* HAFFER, 1969; HEYER, 1978, DUELLMAN, 1979), quando os eventos do Terciário possam ter sido mais importantes para a diversificação (*e.g.* BÁEZ & GASPARINI, 1979; HEYER & MAXSON, 1982; GARDA & CANNATELLA, 2007; GAMBLE *et al.*, 2008; ANTONELLI *et al.*, 2009). Mesmo que para muitas famílias de anfíbios e répteis que habitam o Cerrado não se tenha conhecimento sobre registros fósseis, a evidência disponível indica que boa parte da herpetofauna do bioma é originária da Gondwana e já havia divergido no fim da Era Mesozóica (BÁEZ & GASPARINI, 1979). Assim, o impacto dos ciclos climáticos do Quaternário na diversificação da biota sul-americana tem sido superestimado e foi provavelmente no Terciário que o caráter da herpetofauna do Cerrado se definiu com o surgimento de uma biota endêmica, período em que as áreas abertas e climas secos prevaleceram na América do Sul e no qual a herpetofauna de paisagens abertas teve um período longo (provavelmente até o final do Pleistoceno) e favorável à sua diversificação (WEBB, 1978; COLLI, 2005).

A formação de um gradiente latitudinal de temperatura na América do Sul provocado pela orogênese dos Andes no Paleogeno (WEBB, 1978; HOORN *et al.*, 2010), as grandes transgressões marinhas ocorridas durante o Mioceno e o soerguimento do Planalto Central Brasileiro no final do Terciário favoreceram a diversificação por vicariância (RÄSÄNEN *et al.*, 1995; WEBB, 1995; LOVEJOY *et al.*, 1998; COLLI, 2005; WESSELINGH & SALO, 2006; HOORN *et al.*, 2010), que culminando com o intercâmbio de biota com os outros continentes americanos no Plioceno (WEBB, 1978; CODY *et al.*, 2010) criaram complexos cenários que favoreceram a diversificação das espécies como corroborado em recentes estudos de filogenia e biogeografia de táxons do Cerrado (GARDA & CANNATELLA, 2007; GAMBLE *et al.*, 2008; WERNECK *et al.*, 2009; MACIEL *et al.*, 2010). Desviando o interesse da Teoria dos Refúgios Pleistocênicos, que sugere que os ciclos alternados de aridez e umidade, associados com períodos glaciais e interglaciais promoveram a retração e a expansão de florestas durante o Pleistoceno, isolando e reunindo populações e possivelmente criando condições para que repetidos eventos de especiação alopátrica pudessem ocorrer (HAFFER, 1969).

Hipóteses biogeográficas para o gênero *Physalaemus* estão restritas às espécies do grupo de *P. pustulosus* (*sensu* Lynch, 1970), atualmente alocadas no gênero *Engystomops* (*sensu* Nascimento *et al.*, 2005) e somente envolvendo regiões da América Central e norte da América do Sul (WEIGT *et al.*, 2005; FUNK *et al.*, 2007). Weigt e colaboradores (2005) analisaram aloenzimas e DNA mitocondrial de populações de *E. pustulosus* e das espécies pertencentes ao grupo *pustulosus*. Suas análises indicam uma divergência entre as linhagens do norte e sul da América Central e norte da América do Sul, apesar disso, os dados não corroboraram a sugestão de que *E. pustulosus* teria invadido a América Central oriundo da América do Sul como proposto

por Duellman (1966). A datação indicou uma maior diversificação ocorrendo entre a metade e o final do Mioceno, evidenciando a importância dos acontecimentos do Terciário para a evolução do grupo. Funk e colaboradores (2007) utilizaram a espécie *E. petersi* para testar algumas hipóteses biogeográficas sugeridas como principais fatores para a diversificação da biota amazônica. Contudo, como nenhuma datação foi realizada não se tem uma alocação temporal dos eventos cladogenéticos observados.

A avaliação da influência dos fatores geoclimáticos na origem e diversificação da anurofauna Neotropical, incluindo à de áreas abertas sul-americanas requer robustas hipóteses filogenéticas e a compreensão da taxonomia destas linhagens, que na maioria ainda é obscura. Além disso, como evidenciado por Werneck (2011) os estudos biogeográficos dos biomas sul-americanos comumente restringem-se à apenas um bioma, com poucos estudos acessando as relações históricas entre eles, as quais ainda permanecem em debate.

O desenvolvimento das técnicas moleculares tem promovido uma revolução na sistemática e genética populacional. Filogenias baseadas em dados moleculares e estudos de genética de populações tem sido utilizadas por biogeógrafos para reconstruir as conexões causais entre a história evolutiva e os atributos ecológicos dos táxons e as paisagens em que estão presentes (RIDDLE *et al.*, 2008). Análises baseadas em marcadores moleculares (principalmente mitocondriais, mas que incluam também os nucleares) fornecem estimativas mais robustas do tempo em que ocorreu a divergência entre as linhagens. Em anuros, pelo registro fóssil depauperado, taxas de mutação disponíveis para os fragmentos mitocondriais (MACEY *et al.*, 1998; CRAWFORD, 2003) são frequentemente utilizadas nas análises de datação dos eventos de diversificação e podem ajudar a revelar histórias evolutivas complexas entre biomas distintos (RIDDLE *et al.*, 2008; WERNECK, 2011).

Contexto Filogeográfico da anurofauna da América do Sul

A revolução molecular na biogeografia foi fortemente marcada na década de 90 com a criação da filogeografia (AVISE *et al.*, 1987). Como fica evidente pela sua alcunha, a filogeografia lida não apenas com as relações filogenéticas entre populações de uma espécie ou entre espécies próximas (relações evolutivas), mas também com os componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial de suas linhagens (AVISE, 2000). A comparação das relações evolutivas das linhagens genéticas populacionais e suas localidades geográficas nos fornecem uma melhor compreensão de quais fatores têm influenciado a distribuição da variação genética de uma espécie. Assim, entender como eventos históricos influenciaram a atual disposição geográfica de genes, populações e espécies é o maior objetivo dos estudos filogeográficos. Pelo seu caráter multidisciplinar, a filogeografia é uma área da ciência que associa e requer o conhecimento de vários campos do conhecimento como a biogeografia, a genética populacional, a sistemática filogenética, geologia, paleontologia, história natural, entre outros. Como ela lida com relações de ancestralidade a nível populacional e utiliza conceitos e abordagens da genética de populações e da sistemática em suas análises, é considerada como uma ponte entre a micro e a macroevolução (FREELAND, 2005).

Apesar de no início a filogeografia ser considerada como sendo estritamente um estudo dos padrões e processos intraespecíficos, a combinação da abordagem filogeográfica com a genética populacional e a incorporação de sofisticadas análises baseadas na teoria de coalescência (KNOWLES & MADDISON, 2002), tem revelado linhagens crípticas e profundamente divergentes que não estão evidenciadas pela taxonomia atual, sugerindo a presença de espécies distintas embebidas em uma espécie conservada fenotipicamente (*e.g.* ELMER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; THOMÉ

et al., 2010; PRADO *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2012). A descoberta dessas linhagens crípticas aliadas às estimativas dos tempos de divergência também permitem a postulação de eventos geológicos e paleoclimáticos como prováveis agentes causais dos padrões de distribuição e divergência observados (BEHEREGARAY & CACCONE, 2007; RIDDLE *et al.*, 2008). Entender como os arranjos espaciais das linhagens estão distribuídos e como foram estruturados é essencial para identificar áreas de ativa formação de novas linhagens, para compreender o efeito da perda de habitats ao longo do tempo, para avaliar a persistência das espécies e para identificar áreas de importância histórica e evolutiva para o grupo foco em questão (e.g. FOUQUET *et al.*, 2007a; FOUQUET *et al.*, 2007b; RIDDLE *et al.*, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009; THOMÉ *et al.*, 2010; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). De fato, abordagens como a filogeografia comparativa (ARBOGAST & KENAGY, 2001; HICKERSON *et al.*, 2010) aliada à métricas de diversidade (MORITZ & FAITH, 1998) e à modelagem de nicho (CARSTENS & RICHARDS, 2007; HICKERSON *et al.*, 2010; COLLEVATTI *et al.*, 2013a; 2013b) tem sido sugeridas como alternativas para acessar, testar e incorporar informações sobre esses processos históricos e populacionais, além da diversidade genética na identificação de áreas prioritárias para a conservação.

Os primeiros estudos filogeográficos realizados na América do Sul focaram-se principalmente na Amazônia e durante muito tempo ficaram restritos a essa região (e.g. DA SILVA & PATTON, 1998; CHEK *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2003; ALEIXO, 2004; CANTANHEDE *et al.*, 2005; KRONAUER *et al.*, 2005; ALEIXO, 2006; ELMER *et al.*, 2007; FOUQUET *et al.*, 2007b). Com o crescimento da demanda por se conhecer e estudar os padrões de diversidade do que ainda resta da Floresta Atlântica, houve uma mudança do foco dos estudos filogeográficos, que passaram a tratar das espécies desse bioma (e.g. PELLEGRINO *et al.*, 2005; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006;

MARTINS *et al.*, 2007; CARNAVAL *et al.*, 2009; FITZPATRICK *et al.*, 2009; THOMÉ *et al.*, 2010; CABANNE *et al.*, 2011), permanecendo, contudo, o viés para os estudos com espécies florestais. As outras formações vegetais brasileiras, em especial aquelas das áreas abertas e que sofrem com a intensa atividade antrópica como o Cerrado, a Caatinga e o Chaco, ficaram durante muito tempo fora do foco desses estudos, e, apesar de alguns trabalhos pioneiros (*e.g.* COLLEVATTI *et al.*, 2003), só mais recentemente começaram a serem realizados trabalhos em maior fluxo (*e.g.* RAMOS *et al.*, 2007; CARNAVAL & BATES, 2007; COLLEVATTI *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2009; COLLEVATTI *et al.*, 2012a, 2012b, 2012c; PRADO *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014) que têm mostrado padrões de diversificação mais complexos do que anteriormente preditos (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Beheregaray (2008), em uma revisão sobre filogeografia, sugeriu o Cerrado como uma das regiões do hemisfério sul onde os estudos filogeográficos são muito necessários e Werneck (2011) reafirmou essa necessidade para todos os biomas de áreas abertas da América do Sul. De fato, apesar do crescimento dos estudos filogeográficos na América do Sul, considerando-se seus altos níveis de diversidade, ainda precisamos produzir conhecimento que nos permitam a exemplo dos continentes do hemisfério norte, identificar padrões e compará-los não somente em áreas específicas do continente como, por exemplo, a Floresta Atlântica, Amazônia e Patagônia, mas também entre elas proporcionando uma visão geral dos padrões históricos e espaciais envolvidos na diversificação da biota sul-americana (ANTONELLI *et al.*, 2009; MARTINS, 2011; SÉRSIC *et al.*, 2011; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

No geral, os estudos filogeográficos da biota sul-americana tem revelado uma história complexa de diversificação, na qual a combinação dos eventos orogênicos do

Mioceno e Plioceno e as oscilações climáticas do Pleistoceno contribuíram para moldar a presente diversidade e distribuição das linhagens do continente (RULL, 2008, 2011). Às mudanças climáticas do Pleistoceno não cabe mais a hegemonia no que tange à diversificação. Contudo, no que diz respeito às demografias históricas das espécies sul-americanas, as oscilações climáticas do Quaternário permanecem sendo um dos principais mecanismos a promover mudanças demográficas em grande parte dos táxons estudados. Espécies associadas aos ambientes florestais em sua maioria tiveram suas populações reduzidas durante os ciclos glaciais (e.g. FITZPATRICK *et al.*, 2009; THOMÉ *et al.*, 2010; MARTINS, 2011), já as espécies associadas às áreas abertas apresentam respostas variáveis a essas oscilações, podendo manter (e.g. PINHEIRO *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2012), expandir (e.g. CAETANO *et al.*, 2008; COLEVATTI *et al.*, 2012c) ou reduzir (e.g. COLLEVATTI *et al.*, 2012b; LIMA *et al.*, 2014) suas áreas de distribuição durante os ciclos glaciais (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Outro padrão interessante dos estudos sul-americanos levantados por Turchetto-Zolet e colaboradores (2013), diz respeito à prevalência de profundas divergências filogeográficas intraespecíficas, sugerindo a existência de muitas espécies crípticas (BICKFORD *et al.*, 2007) e uma forte estruturação geográfica ao nível populacional.

Há uma série de vantagens em se utilizar anuros em estudos filogeográficos, a saber: geralmente exibem baixa mobilidade individual acompanhada de alta filopatria aos sítios natais (*i.e.* fidelidade espacial). As populações, em consequência disso, tendem a ser altamente estruturadas geneticamente em escalas geográficas (ainda que em escala local possam apresentar pouca ou nenhuma diferenciação genética) e retêm sinais em alta-resolução dos eventos históricos que geraram a atual distribuição da espécie ou linhagens em foco. Os anuros também são relativamente fáceis de amostrar

quando comparados com répteis ou mamíferos, outros dois grupos que demonstram potencial para fortes sinais filogeográficos (ZEISSET & BEEBEE, 2008). No continente sul-americano vários estudos filogeográficos com anuros tem sido conduzidos e apesar do viés para ambientes florestais, alguns estudos em áreas abertas tem despontado no Cerrado (PRADO *et al.*, 2012) e na Caatinga (CARNAVAL & BATES, 2007) evidenciando histórias evolutivas complexas que só agora começamos a descobrir. Os estudos têm concluído que tanto os eventos geológicos do Terciário quanto do Quaternário contribuíram para a diversificação das linhagens das espécies de anuros, frequentemente com ambos os períodos tendo importância nas histórias evolutivas do grupo em questão, principalmente nas espécies que apresentam linhagens crípticas. Com os eventos de especiações, promovidos pela restrição ao fluxo gênico, ocorrendo principalmente no Terciário (frequentemente durante o Mioceno e o Plioceno) e o Quaternário contribuindo principalmente para a diversificação a nível populacional através de alterações demográficas e possíveis migrações sendo mediadas pelas flutuações climáticas do Pleistoceno (WEIGT *et al.*, 2005; CARNAVAL & BATES, 2007; ELMER *et al.*, 2007; PRÖHL *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2012).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A datação dos eventos de especiação e o papel dos ciclos climáticos do Quaternário na biota sul-americana são melhor documentados para os ambientes florestais, sendo ainda incipientes no que diz respeito às paisagens abertas (TURCHETTO-ZOLET *et. al.*, 2013). *Physalaemus cuvieri*, a “rã-cachorro”, é uma espécie típica de áreas abertas e apresenta uma ampla distribuição geográfica estendendo-se pelo Cerrado, Caatinga, Chaco e Pampas (MIJARES *et al.*, 2010), sendo um modelo adequado para testar hipóteses sobre o papel dos eventos do Terciário e/ou do Quaternário na diversidade genética e distribuição das linhagens de anurofauna de áreas abertas da região Neotropical.

Neste trabalho nós utilizamos uma ampla amostragem de indivíduos de *P. cuvieri* ao longo de toda a distribuição da espécie e utilizamos regiões de DNA com diferentes taxas de mutação para investigar os fatores históricos e espaciais que promoveram a diversificação de uma espécie típica de áreas abertas. Nós integramos a abordagem filogeográfica (análises coalescentes e de genética de populações) com a modelagem da paleodistribuição (*ecological niche models* – ENM), para compreender como os eventos orogênicos do Mioceno e Plioceno e/ou as oscilações climáticas do Pleistoceno (Terciário *versus* Quaternário) influenciaram a diversificação de *P. cuvieri*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram amostrados 609 indivíduos de *Physalaemus cuvieri* em 76 localidades. Nossa amostragem representa grande parte da distribuição geográfica da espécie (Figura 2, Tabela 3). Na média, oito indivíduos ($n_{\min} = 1$; $n_{\max} = 22$) foram amostrados em cada local (Tabela A1 nos anexos traz a classificação das localidades quanto aos domínios e bacias hidrográficas).



Figura 2 – Distribuição potencial (IUCN Spatial Data) de *Physalaemus cuvieri* na América do Sul. Pontos indicam as localidades amostradas neste estudo, números identificadores das populações conforme Tabela 3

Tabela 3 – Características das 76 localidades amostradas para a análise filogeográfica de *Physalaemus cuvieri*. Tamanho amostral (N) e números tombo de espécimes e tecidos. Acrônimos: AAGARDA (Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte), CAUC (Coleção de Anfíbios da Universidade Comunitária da Região de Chapecó/UNOCHAPECÓ), CFBH (Coleção "Célio F. B. Haddad"), (CHUNB (Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília), EMLG (Coleção Elaine Maria Lucas Gonsales), LZVUFOP (Coleção Herpetológica do Laboratório de Zoologia dos Vertebrados da Universidade Federal de Ouro Preto), UFMT-A (Coleção Zoológica da UFMT- Setor Herpetologia-Amphibia).

	Localidades	Siglas	Coordenadas Geográficas		N	Vouchers
			Longitude	Latitude		
1	Água Doce – SC	PCR	-51.578	-26.6005	3	EMLG (165, 178, 181)
2	Alvorada do Norte – GO	PCD	-46.4919	-14.4808	7	CHUNB (37880, 37995, 37943, 37949, 37967, 39994, 37897)
3	Andradas – MG	PCF	-46.5689	-22.0678	13	*
4	Aparecida do Rio Doce – GO	PCA	-51.145	-18.2989	15	*
5	Aragarças – GO	PC(A)	-52.2508	-15.8978	4	*
6	Araguapaz – GO	PCA(AR)	-50.6319	-15.0908	10	*
7	Araputanga – MT	PCU	-58.3528	-15.4708	1	UFMT-A (MHO58)
8	Areia – PB	PCAD	-35.6919	-6.9627	9	AAGARDA (3853–3855, 3935, 4012–4016)
9	Arês – RN	PCAF	-35.1991	-6.1856	4	AAGARDA (2949, 3123, 3129, 3130)
10	Assis – SP	PCAG	-50.4119	-22.6619	6	CFBH (7604, 7618, 7620, 7621, 7780, 7793)
11	Bauru – SP	PCAH	-49.0608	-22.315	4	CFBH (7708, 7716, 7721, 7722)
12	Blumenau – SC	PCX	-49.0722	-26.9088	1	AAGARDA 3340
13	Caetité – BA	PCAI	-42.475	-14.0689	4	CFBH (11038, 11048, 11090, 11092)
14	Caguaretama – RN	PCZ	-35.1288	-6.38	16	AAGARDA (2566, 2567, 2578, 2579, 2600, 2601, 2653, 2659, 2668, 2670, 2671, 2922, 3122, 3125, 3127, 3128)
15	Caiapônia – GO	PC(C)	-51.81	-16.9569	5	*
16	Capão Bonito – SP	PCAE	-48.3488	-24.0058	4	AAGARDA (110–113)

17	Caseara – TO	PCN	-49.9558	-9.2778	6	CHUNB (46004, 46010, 46012, 46013, 46016, 46017)
18	Caxambu do Sul – SC	PCV	-52.8788	-27.1608	3	EMLG (270, 282, 290)
19	Cerro Largo – RS	PCAJ	-54.7378	-28.1489	3	CFBH (9517, 9558, 9559)
20	Chapada Diamantina (Lençóis) – BA	PCAZ	-41.505	-12.533	20	AAGARDA (6594, 6608, 6609, 6698, 6701, 6703, 6706, 6737, 6739, 6746, 6749, 6750, 6755, 6756, 6773, 6817–6820, 6838)
21	Chapadão do Sul – MS	PCAW	-52.718	-18.69	18	*
22	Chapecó – SC	PCQ	-52.7192	-27.1439	15	CAUC (0997, 0999, 1000, 1010, 1015, 1018, 1020–1025, 1029, 1031, 1032)
23	Chavantes – SP	PCAK	-49.7089	-23.0389	5	CFBH (5595, 5598–5601)
24	Cocalzinho de Goiás – GO	PC(CO)	-48.7758	-15.7939	11	*
25	Concórdia (PE Fritz Plaumann) – SC	PCP	-52.1106	-27.2933	2	CAUC (0899, 0967)
26	Crato – CE	PCAC	-39.4088	-7.2338	2	AAGARDA (2752, 2753)
27	Cristalina – GO	PC(CR)	-47.6139	-16.7689	8	*
28	Goianinha – RN	PCY	-35.1926	-6.3419	16	AAGARDA (2539–2542, 2809, 2824, 2835, 2836, 2940, 2969, 3036, 3037, 3072, 3073, 3124, 3155)
29	Goianésia – GO	PC(G)	-49.1169	-15.3169	6	*
30	Goiatuba – GO	PC(Gt)	-49.3569	-18.0128	3	*
31	Goiânia – GO	PC(Gu)	-49.2539	-16.6789	2	*
32	Icém – SP	PCAL	-49.195	-20.3419	4	CFBH (1563, 1565, 1571, 1573)
33	Ipuaçu – SC	PCAM	-52.455	-26.6308	2	CFBH (247, 248)
34	Itaberaí – GO	PC(I)	-49.81	-16.02	4	*
35	Itirapina (EE de Itirapina) – SP	PCAN	-47.8228	-22.2528	20	CFBH (496, 497, 499–501, 532–534, 555, 559, 592, 602–604, 697, 698, 702, 704, 714, 723)
36	Jacarezinho – PR	PCAO	-49.9689	-23.1608	9	CFBH (5597, 5602–5607, 11241, 11249)
37	Lauro Müller – SC	PCAP	-49.3969	-28.3928	2	CFBH (14969, 14994)

38	Lucas do Rio Verde – MT	LRV	-55.9108	-13.05	3	UFMT-A (LH172, LH188, LH174)
39	Macaíba – RN	PCAB	-35.3538	-5.8577	4	AAGARDA (1320, 3792, 3794, 4018)
40	Mambaí – GO	PC(Ma)	-46.1128	-14.4878	8	*
41	Mara Rosa – GO	PC(MR)	-49.1778	-14.0169	4	*
42	Marabá – PA	PCAQ	-49.1178	-5.3689	8	CFBH (12078, 12117, 12152, 12160, 12163, 12164, 12168, 12228)
43	Mateiros – TO	PCL	-46.4208	-10.5478	17	CHUNB (27197, 27213, 27461, 27486, 27497, 27550, 27572, 27598, 27604, 41684, 42055, 42061, 42069, 42099, 42103, 42105, 42109)
44	Mineiros – GO	PC(M)	-52.5508	-17.5689	8	*
45	Morrinhos – GO	PC(Mo)	-49.1008	-17.7319	5	*
46	Niquelândia – GO	PC(N)	-48.46	-14.4739	11	*
47	Nova Crixás – GO	PC(NC)	-50.3269	-14.0989	11	*
48	Nova Lacerda – MT	NVL	-59.6089	-14.4758	2	UFMT -A (LTJV101, LTJV103)
49	Nova Ubiratã – MT	PCG	-55.255	-12.9908	4	UFMT-A (8892, 8969, 8979, 8980)
50	Ouro Preto – MG	PCJ	-43.5078	-20.2878	4	LZVUFOP (1906 A, 1925 A, 1906 A), CFBH 11794
51	Palmas – TO	PCC	-48.3328	-10.1669	12	CHUNB (12531, 12533, 12534, 12536–12539, 14779, 14800, 14816, 14817, 15375)
52	Paracatu – MG	PCK	-46.875	-17.2219	20	CHUNB (26671–26673, 26685, 26690, 26693, 26694, 26699, 26701, 26705, 26713, 26714, 26717, 26718, 26725, 26730, 26732, 26744, 26748, 26755)
53	Paranã – GO	PCE	-47.8828	-12.615	9	CHUNB (16063–16065, 15973, 15887–15889, 16078, 16124)
54	Paraúna – GO	PC(Pa)	-50.4489	-16.9478	3	*
55	Piracanjuba – GO	PC(Pi)	-49.0178	-17.3028	4	*
56	Pirenópolis – GO	PC(PR)	-48.9589	-15.8519	19	*

57	Pontalina – GO	PC(PT)	-49.4489	-17.5258	16	*
58	Ponte Serrada e Passos Maia (PARNA das Araucárias) – SC	PCS	-51.9858	-26.8207	2	EMLG (405, 477)
59	Porangatu – GO	PC(P)	-49.1489	-13.4408	3	*
60	Porto Franco – MA	PCAR	-47.3989	-6.3378	3	CFBH (1998, 2009, 2125)
61	Quatro Barras – PR	PCAS	-49.0769	-25.3658	5	CFBH (8145, 8154–8157)
62	Quirinópolis – GO	PC(Q)	-50.4519	-18.4478	22	*
63	Rio Claro – SP	PCAT	-47.5608	-22.4108	8	CFBH (471–474, 614, 854–856)
64	Santa Isabel – SP	PCAU	-46.2208	-23.3158	10	CFBH (7964–7966, 7969, 7982, 7990, 7998–8000, 8010)
65	Silvânia – GO	PC(S)	-48.6078	-16.6589	7	*
66	Santa Terezinha – MT	PCO	-50.5028	-10.47	1	CHUNB 10533
67	São Domingos – GO	PCB	-46.3178	-13.3978	19	
68	São Gabriel do Oeste – MS	PCAY	-54.5244	-18.458	20	*
69	São João da Aliança – GO	PC(SJ)	-47.525	-14.7058	13	*
70	São Luiz – MA	PCAV	-44.3028	-2.53	3	CFBH (7472, 7494, 7533)
71	São Miguel do Araguaia – GO	PC(SM)	-50.1628	-13.275	12	*
72	Tailândia – PA	PCW	-48.9527	-2.9469	3	AAGARDA (2008, 2009, 2061)
73	Teodoro Sampaio (PE Morro do Diabo) – SP	PCAX	-52.1678	-22.5328	12	CFBH (2447, 2448, 2451, 7900, 7901, 7905–7909, 9500, 9529)
74	Uberlândia – MG	PC(Ub)	-48.2769	-18.9189	8	*
75	Uruaçu – GO	PC(U)	-49.1408	-14.525	4	*
76	Vilhena – RO	PCM	-60.1458	-12.7408	15	CHUNB (12016, 12046, 12048, 12049, 12054, 12056, 12077, 12078, 12084, 12116, 12121, 12123, 12137, 12201, 12203)
* Material a ser incorporado à Coleção Herpetológica UFG			TOTAL		609	

Paleomodelagem

Para estimar a área de distribuição potencial de *Physalaemus cuvieri* ao longo do Quaternário (Pleistoceno/início do Holoceno) e identificar as regiões que permaneceram estáveis durante este período, nós produzimos mapas de distribuição presente e passada utilizando modelos de nicho ecológico (ENMs) acoplados à simulações paleoclimáticas.

A modelagem da paleodistribuição foi obtida a partir de 202 registros da ocorrência de *P. cuvieri* (Figura 3, Tabela A2) obtidos a partir de banco de dados de coleções e museus disponibilizados online tais como o Species Link (<http://splink.cria.org.br/>) e o GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*, <http://www.gbif.org/>). As ocorrências foram mapeadas em um grid de células de 0,5° X 0,5° (longitude X latitude) cobrindo toda a região Neotropical para gerar uma matriz de presenças utilizada para calibrar os ENMs.

As condições climáticas do período pré-industrial (representando as condições climáticas atuais), Holoceno médio (6ka) e Último Máximo Glacial (LGM, 21ka), foram obtidas a partir de quatro AOGCMs (*atmosphere– ocean general circulation models*): CCSM4, CNRM-CM5, MIROC-ESM e MRI-CGCM3 (Tabela 4). Estes modelos foram obtidos do *Coupled Model Intercomparison Project Phase 5* (CMIP5: <http://cmip-pcmdi.llnl.gov/>) e do *Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase 3* (PMIP3: <http://pmip3.lsce.ipsl.fr/>). Como a resolução espacial dos dados climáticos variam de 0,9° x 0,9° à 2,8° x 2,8° (longitude X latitude) eles foram interpolados para a resolução de 0,5° x 0,5° (longitude x latitude) conforme descrito em Collevatti e colaboradores (2013). Nós utilizamos cinco variáveis bioclimáticas obtidas a partir dos AOGCMs como preditoras para calibrar os ENMs: temperatura média

anual, amplitude anual da temperatura, precipitação dos meses mais secos e úmidos e precipitação do trimestre mais quente. A distribuição potencial de *P. cuvieri* foi modelada primeiro para o cenário pré-industrial e em subsequência projetada para os cenários do Holoceno médio e do Último Máximo Glacial.



Figura 3 - Registros de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* utilizados para gerar os modelos de paleodistribuição.

Nós utilizamos ENMs baseados apenas em presenças, em presença e pseudo-ausência e em presença e ausência, são eles: Envelopes Bioclimáticos (Bioclim), *Ecological Niche Factor Analysis* (ENFA), Distância Euclidiana, *Flexible Discriminant Analysis* (FDA), Modelos Aditivos Generalizados (GAM), Modelos Lineares Generalizados (GLM), Distância de Gower, Distância Mahalanobis, *Multivariate Adaptive Regression Splines* (MARS), Entropia Máxima (Maxent), *Neural Networks* (NNET) e *Random Forest* (RNDFOR). As análises foram implementadas na plataforma computacional BIOENSEMBLES (DINIZ-FILHO *et al.*, 2009).

O procedimento de modelagem da paleodistribuição segue a abordagem de mapas de consenso (*ensemble solutions*) detalhada por Diniz-Filho em colaboradores (2009) e Collevatti e colaboradores (2012c). A combinação de todos os ENMs e AOGCMs resultou em 48 mapas preditivos independentes (12 ENMs x 4 AOGCMs) para cada período (pré-industrial, 6ka e 21ka). Uma ANOVA hierárquica foi utilizada como preditora da adequabilidade de todos os modelos (12 ENMs x 4 AOGCMs x 3 Períodos) para identificar e mapear as incertezas devido aos componentes da modelagem (veja TERRIBILE *et al.*, 2012 para mais detalhes sobre o desenho hierárquico da análise). Para gerar o mapa do refúgio histórico (áreas estáveis ao longo do tempo) de *Physalaemus cuvieri*, os mapas preditivos de todos os períodos foram combinados e nós consideramos células com valores de adequabilidade $\geq 0,5$ nos três períodos de tempo como refúgio.

Tabela 4 - Detalhes dos quatro AOGCMs utilizados na paleomodelagem de *Physalaemus cuvieri*.

Modelo – ID	Centro de Pesquisa	Resolução*	Fonte	Ano
CCSM4	University of Miami – RSMAS, USA	0.9° × 1.25°	CMIP5/PMIP3	2012
CNRM-CM5	Centre National de Recherches Meteorologiques / Centre Europeen de Recherche et Formation Avancees en Calcul Scientifique, France	1.4° x 1.4°	CMIP5/PMIP3	2012
MIROC-ESM	Atmosphere and Ocean Research Institute (University of Tokyo), National Institute for Environmental Studies, and Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Japan	2.8° × 2.8°	CMIP5/PMIP3	2012
MRI-CGCM3	Meteorological Research Institute, Japan	1.1° x 1.1°	CMIP5/PMIP3	2012

*longitude X latitude

Dados Moleculares

As amostras de fígado e/ou músculo tiveram seu DNA extraído com DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, InR., Chatsworth, CA). Três fragmentos mitocondriais e um gene nuclear foram amplificados e sequenciados para todos os indivíduos: (i) regiões mitocondriais 12S e 16S (*primers* 12Sa, 12Sb, 16Sar e 16Sd; REEDER, 1995), (ii) citocromo b (cytB) utilizando os *primers* MVZ-15L (MORITZ *et al.*, 1992) e H15149 (KOCHER *et al.*, 1989) e (iii) éxon 1 da região nuclear rodopsina (Rhod) utilizando os *primers* Rhod1A e Rhod 1C (BOSSUYT & MILINKOVITCH, 2000) (Tabela 5).

Tabela 5 - Primers utilizados na amplificação e sequenciamento das regiões mitocondriais e nuclear em *Physalaemus cuvieri*.

Primers	Fragmentos	Sequência (5'-3')
12Sa	12S	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT
12Sb		GAGGGTGACGGGCGGTGTGT
16Sar	16S	CGCCTGTTTACCAAAAACAT
16Sd		CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG
MVZ-15L	Citocromo b	GAACTAATGGCCCACACWWTACGNAA
H15149	Rodopsina	AAACTGCAGCCCCTCAGAAATGATATTTGTCCTCA
Rhod1A		ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC
Rhod1C		CCAAGGGTAGCGAAGAARCCTTC

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 20µl (veja Tabelas 6 e 7 para reagentes e quantidades utilizadas nas reações e programas utilizados no termociclador). As enzimas exonuclease I (10 unidades) e SAP - “*shrimp alkaline phosphatase*” (1 unidade) foram utilizadas para purificar as amostras. Os produtos purificados dos fragmentos 12S e 16S foram sequenciados em ambas as direções no sequenciador automático AB1 PRISM® 3100 (Applied Biosystems, CA) utilizando o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET terminator (GE HealthCare, Sweden) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos fragmentos citocromo b e rodopsina foram obtidas pelo serviço de sequenciamento da Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul).

Tabela 6 - Composição das reações de PCR para cada um dos fragmentos amplificados (veja Tabela 5) para *Physalaemus cuvieri*.

Reagente	12S, 16S, Cyt b	Rodopsina
Água deionizada	8,5	4,2
DNA (2,5ng/μl)	2,0	3,0
Foward Primer (2mM)	2,0	3,0
Reverse Primer (2mM)	3,0	3,0
Tampão 1X*	3,0	2,5
DNTPs (2,5 mM)	1,2	2,0
DMSO**	-	2,0
Taq polimerase (5u/μl)	0,3	0,3

*Tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)

**DMSO (Dimetilsulfóxido)

Tabela 7 - Programas utilizados nos termocicladores para amplificar cada uma das regiões utilizadas para o estudo filogeográfico de *Physalaemus cuvieri*.

Fragmento	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
16S 12S, Cytb e Rodopsina	94°C (2 min)	35 ciclos			72°C (6 min) 72°C (6 min)
		94°C (60s)	58°C (60s)	72° (90s)	
		94°C (60s)	61°C, 55°C, 56°C (60s)	72°C (60s)	

As espécies *Leptodactylus fuscus*, *Eupemphix nattereri* e *Pseudopaludicola falcipes* foram escolhidas como grupo externo com base nas relações filogenéticas propostas para a família Leptodactylidae (GRANT *et al.*, 2006; FROST *et al.*, 2006; PYRON & WIENS, 2011). A maioria das sequências utilizadas foram obtidas neste trabalho, apenas as sequências de *L. fuscus* e *P. falcipes* foram obtidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, veja Tabela 8).

Tabela 8 - Números de acesso das sequências de *Leptodactylus fuscus* e *Pseudopaludicola falcipes* obtidas no GenBank.

Espécie	Números de Acesso			
	16S	12S	Citocromo b	Rodopsina 1
<i>Leptodactylus fuscus</i>	JQ627208.1	AY341631.1	KF548074	AY323746.1
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	AY843741.1	AY843741.1	AY843987	AY844728

As sequências obtidas foram analisadas e as fitas consenso montadas e editadas utilizando o software SeqScape 2.1 (Applied Biosystems, CA). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o módulo MUSCLE (EDGAR, 2004) implementado pelo programa MEGA v.5 (TAMURA *et al.*, 2011). Foram realizados vários alinhamentos, e as regiões que apresentaram ambiguidade (gerando múltiplos alinhamentos) foram excluídas (72pb no 12S e 65pb no 16S). O nível de saturação das sequências codificantes foi analisado pelo teste de saturação de substituições (transições e transversões X distância de Tamura & Nei, 1993) implementado no programa DAMBE 5 (XIA, 2013). Como os terceiros códons dos fragmentos citocromo b e rodopsina apresentaram níveis altos de saturação (Figura 4), eles foram excluídos do alinhamento final. Para as análises estatísticas as sequências de todas as regiões foram concatenadas.

Nas reconstruções filogenéticas e análises baseadas em coalescência, foi utilizado o modelo de evolução mais apropriado para o conjunto de dados inferido pelos testes de razão hierárquica de verossimilhança (*hierarchical likelihood ratio tests* – hLRT) e pelo Critério de Informação de Akaike (AIC) implementado pelo programa jMODELTEST (POSADA, 2008).

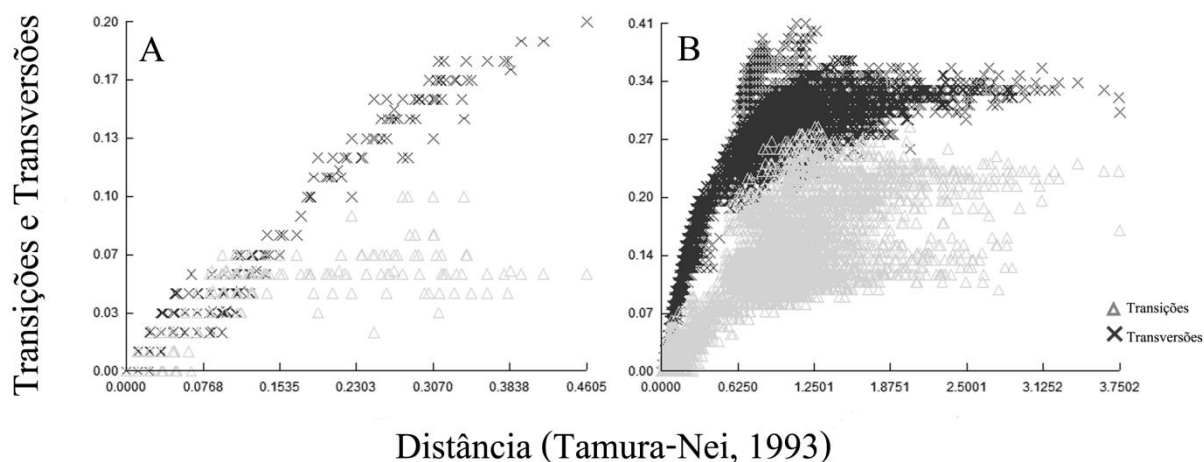


Figura 4 - Gráfico de saturação da terceira posição dos códons da região nuclear rodopsina (A) e da região mitocondrial citocromo b (B) baseados nos indivíduos das 76 populações amostradas de *Physalaemus cuvieri*. Transições (indicadas por triângulos) e transversões (X).

Diversidade Genética e Padrão Filogeográfico

As relações entre os haplótipos obtidos foram inferidas por meio de uma análise de rede utilizando o método *median-joining network* implementada no programa Network 4.6.1.2 (www.fluxus-engineering.com, BANDELT *et al.*, 1999). Nesta análise, redes do tipo *minimum spanning* são construídas baseadas na união de árvores com o menor número de mudanças entre nós ou haplótipos e que contenham todas as sequências de entrada, sem criar círculos ou inferir nós ancestrais adicionais. Esse método combina características do algoritmo de Kruskal, que encontra a melhor árvore por favorecer conexões curtas, com o algoritmo heurístico de máxima parcimônia de Farris e adiciona vértices chamados *median vectors*, que seriam haplótipos extintos ou não amostrados na população (BANDELT *et al.*, 1999). Foram inferidas redes de

haplótipos independentes para as regiões mitocondriais e para a região nuclear. Inicialmente foram utilizados os parâmetros padrões do programa, porém, como o conjunto das regiões mitocondriais apresentava alguns caracteres hipervariáveis (N=13), estes tiveram seu peso diminuído pela metade. O mesmo tratamento não foi necessário para a região nuclear.

A diversidade haplotípica (h) e a diversidade nucleotídica (π) foi estimada, utilizando o programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2006), para cada população e para o conjunto de populações. Os índices de diversidade de cada população foram analisados considerando todas as populações, estimativas globais e análises estatísticas foram realizadas apenas com populações compostas por oito ou mais indivíduos (N=34). Para determinar se há diferenças significativas nas diversidades nucleotídica e haplotípica de populações localizadas em áreas estáveis/instáveis e/ou centrais/periféricas (efeito da adequabilidade e da estabilidade ao longo do último ciclo glacial), nós utilizamos o mapa do refúgio histórico e realizamos análises de regressão linear no programa SAM v.4.0 (RANGEL *et al.*, 2010), considerando a distância de cada população da borda do refúgio e do centroide do refúgio.

Para testar a hipótese de diferenciação entre populações de diferentes bacias, foi realizada uma análise de variância molecular hierárquica (AMOVA, EXCOFFIER *et al.*, 1992) utilizando o programa Arlequin 3.1. A AMOVA usa frequências genotípicas e quantidade de mutações entre diferentes haplótipos para testar a significância dos componentes de variância associados a níveis hierárquicos de estrutura genética populacional, a saber: (1) diversidade entre indivíduos dentro de uma população, (2) diversidade entre populações de um mesmo grupo e (3) diversidade entre grupos de populações. O índice de fixação (F_{ST}) foi elaborado para caracterizar o grau de

diferenciação genética entre subpopulações e é igual à redução do número de heterozigotos esperados em um cruzamento ao acaso.

Para determinar se a diferenciação genética é um efeito do isolamento por distância, a distância genética (F_{ST} par-a-par linearizado) foi correlacionada com a distância geográfica (logaritmizada) entre os pares de população usando o Teste de Mantel. Distâncias genéticas foram obtidas no Arlequin 3.11 e as distâncias geográficas no Geographic Distance Matrix Generator (ERSTS, 2014). O teste de Mantel foi implementado no programa SAM v.4.0 (RANGEL *et al.*, 2010) com 10000 permutações.

A hipótese de que o presente padrão de diversidade haplotípica das populações de *Physalaemus cuvieri* é um reflexo de uma contração de uma população histórica amplamente distribuída foi testada sob o pressuposto de um efeito gargalo (*bottleneck*) seguido de uma expansão súbita. Para isso, foi realizada uma análise da distribuição da frequência das diferenças de bases entre os pares de haplótipos (*mismatch distribution*, ROGERS & HARPENDING, 1992). Os parâmetros foram estimados com base no índice *raggedness* da distribuição observada como definido por Harpending (1994) e na abordagem linear dos mínimos quadrados (*non-linear least-squares*, SCHNEIDER & EXCOFFIER, 1999). Esta análise distingue populações que passaram por expansões demográficas daquelas que tem uma história demográfica de estabilidade. Distribuições *mismatch* unimodais sugerem populações que passaram por expansões demográficas recentes, possivelmente após um efeito gargalo, ao passo que populações com demografia historicamente estáveis apresentam distribuições multimodais (ROGERS & HARPENDING, 1992). Adicionalmente, foram realizados os testes de neutralidade utilizando as estatísticas de Tajima (1989) e Fu (1997) que predizem valores significativamente negativos para populações em expansão. Todas essas análises foram

realizadas no programa Arlequin 3.11 e o intervalo de confiança foi obtido pela abordagem de *bootstrap* com 10000 permutações.

Como a distribuição *mismatch* e os testes de neutralidade se baseiam apenas na distribuição dos haplótipos e no número de sítios segregantes, são análises que falham em captar todo o sinal histórico das sequências de DNA. Com o objetivo de acessar essas informações, nós utilizamos a análise baseada em coalescência Bayesian Skyline Plot (BSP, DRUMMOND *et al.*, 2005) implementada no programa BEAST v.1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2013). O BSP utiliza o procedimento de amostragem bayesiano e estima a distribuição posterior para o tamanho efetivo ao longo do tempo diretamente das sequências de DNA, incorporando as incertezas filogenéticas e coalescentes (DRUMMOND *et al.*, 2005). Nós utilizamos todos os fragmentos concatenados nesta análise e as configurações padrões do programa (tree prior: *Coalescent: Bayesian Skyline*; number of groups: 10; skyline model: *Piecewise-constant*). Foram realizadas duas corridas independentes com 50 milhões de gerações cada e a estabilização da verossimilhança e convergência das corridas (valores de ESS > 200). As corridas foram combinadas utilizando o LogCombiner 1.8, e o gráfico visualizado utilizando o programa Tracer 1.5 (RAMBAUT *et al.*, 2013).

Reconstrução Filogenética e Tempos de Divergência

As relações históricas entre os haplótipos (todos os fragmentos concatenados – *multiple unlinked loci*) e os tempos de divergência entre as linhagens foram estimados por meio de análise bayesiana implementada no programa BEAST v.1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2013), assumindo relógio molecular relaxado (*uncorrelated*

lognormal) para permitir taxas heterogêneas entre as linhagens, calibração por fóssil e o prior de Yule para a obtenção da árvore de espécies.

Não existem fósseis do gênero *Physalaemus*, contudo há fósseis bem documentados para o gênero *Leptodactylus* (4,3 [SD = 0,7] milhões de anos, GÓMEZ *et al.*, 2013), o qual foi utilizado como grupo externo nesta análise. Para o grupo interno, devido à ausência de fósseis, nós utilizamos as taxas de mutação previamente estimadas para as regiões que sequenciamos (Citocromo b – média de 0.0069 substituições/milhão de anos, SD = 0.0010, MACEY *et al.*, 1998; 12S e 16 S – média de 0.0026 substituições/milhão de anos, SD = 0.0001, EVANS *et al.*, 2004; LEMMON *et al.*, 2007; Rodopsina – média de 0.4×10^{-9} substituições/milhão de anos, SD = 0.1×10^{-9} , YOKOYAMA & TADA, 2010).

Foram realizadas duas corridas independentes com 30 milhões de gerações cada e a estabilização da verossimilhança e convergência das corridas (valores de ESS > 200) foram analisadas no programa Tracer 1.5 (RAMBAUT *et al.*, 2013). As corridas foram combinadas utilizando o LogCombiner 1.8.

Dinâmica Evolutiva Espacial

Com o objetivo de inferir a dinâmica espacial das populações de *Physalaemus cuvieri* através do tempo, nós aplicamos o método desenvolvido por Lemey e colaboradores (2009). A análise de difusão espacial discreta (*discretized spatial diffusion model*) é um método coalescente implementado no programa BEAST, e permite estimar conjuntamente as taxas de substituição dos nucleotídeos, os tempos de divergência, a difusão espacial, e a história demográfica ao mesmo tempo em que incorpora a incerteza filogenética.

As localidades (K=76) foram incorporadas à análise como caracteres discretos e as análises foram realizadas incorporando os mesmos parâmetros da análise de estimativa dos tempos de divergência, exceto o calibrador fóssil. Uma vez que além da incorporação dos dados geográficos, outra diferença entre esta análise e a da estimativa dos tempos de divergência, é que nesta não são acrescentados os grupos externos já que um dos objetivos da análise é inferir posições prováveis da raiz do grupo interno (LEMEY *et al.*, 2009). Além disso, como sugerido por Lemey e colaboradores (2009), para garantir a eficiência estatística, nós também aplicamos o procedimento do BSSVS (*Bayesian Stochastic Search Variable Selection*). Também utilizamos o prior *Coalescent: GMRF Bayesian Skyride* para a reconstrução da árvore (MININ *et al.*, 2008) e para as taxas das localidades (*location.clock.rate*) nós utilizamos o prior *CTMC Rate Reference* (FERREIRA & SUCHARD, 2008). Foram realizadas duas corridas independentes com 30 milhões de gerações cada e a estabilização da verossimilhança e convergência das corridas (valores de ESS > 200) foram analisadas no programa Tracer 1.5 (RAMBAUT *et al.*, 2013). As corridas foram combinadas utilizando o LogCombiner 1.8. A análise e a visualização da reconstrução foi realizada no programa SPREAD 1.0.6 (BIELEJEC *et al.*, 2011). Em todas as análises realizadas no BEAST, nós utilizamos o BEAGLE 2.1 (AYRES *et al.*, 2012) para acelerar as análises.

RESULTADOS

Paleomodelagem

Os mapas de consenso da distribuição de *Physalaemus cuvieri* ao longo do último ciclo glacial (combinação entre 48 mapas preditivos independentes; 12 ENMs x 4 AOGCMs) indicam que a distribuição potencial da espécie pouco mudou ao longo do tempo, tanto em área quanto em localização geográfica (Figura 5) sendo condizente com a ampla distribuição da espécie atualmente. De fato, a distribuição geográfica mostra-se praticamente estável e contínua entre o Holoceno Médio e atualmente, quando comparada com sua distribuição mais ampla no Último Glacial Máximo (LGM). A área prevista como refúgio histórico é amplamente distribuída e estende-se pelas porções central, noroeste e sul do Cerrado, porção sul da Caatinga (estado da Bahia) e porções sudeste e sul da Floresta Atlântica (Figura 6). Pelo delineamento da ANOVA hierárquica, a variância no componente “tempo” pode ser interpretada como o tamanho do efeito das mudanças climáticas sobre a espécie analisada, enquanto a variância dos componentes “ENM (método)” e “AOGCM” indicam as incertezas decorrentes da metodologia empregada nas predições (Tabela 9). A ANOVA hierárquica revelou que o componente tempo é responsável pela maior parte da variância média, sendo que as maiores incertezas ocorrem ao longo da distribuição atual de *P. cuvieri*, mostrando que o efeito do clima foi predito para ocorrer (em sua maior parte) justamente na região ocupada pela espécie. Incertezas devido aos AOGCMs localizaram principalmente na borda cis dos Andes, onde foi predita a ocorrência da espécie ao longo do Holoceno Médio e atualmente (Figura 7).

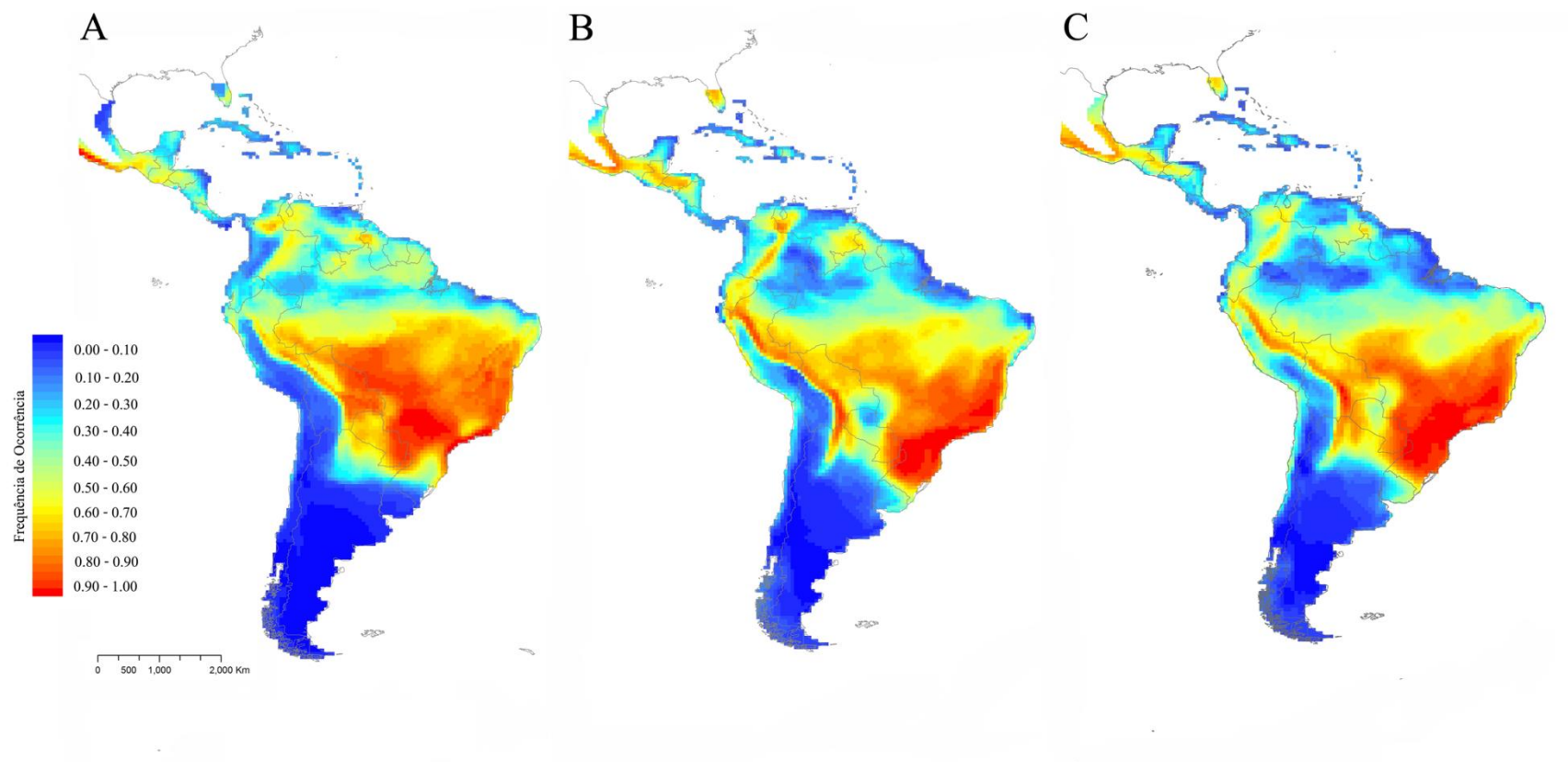


Figura 5 – Estimativas da frequência de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* na América do Sul, baseadas no consenso de 12 ENMs e 4 AOGCMs utilizados para modelar a paleodistribuição em: A) 21 ka, B) 6 ka e C) presente.

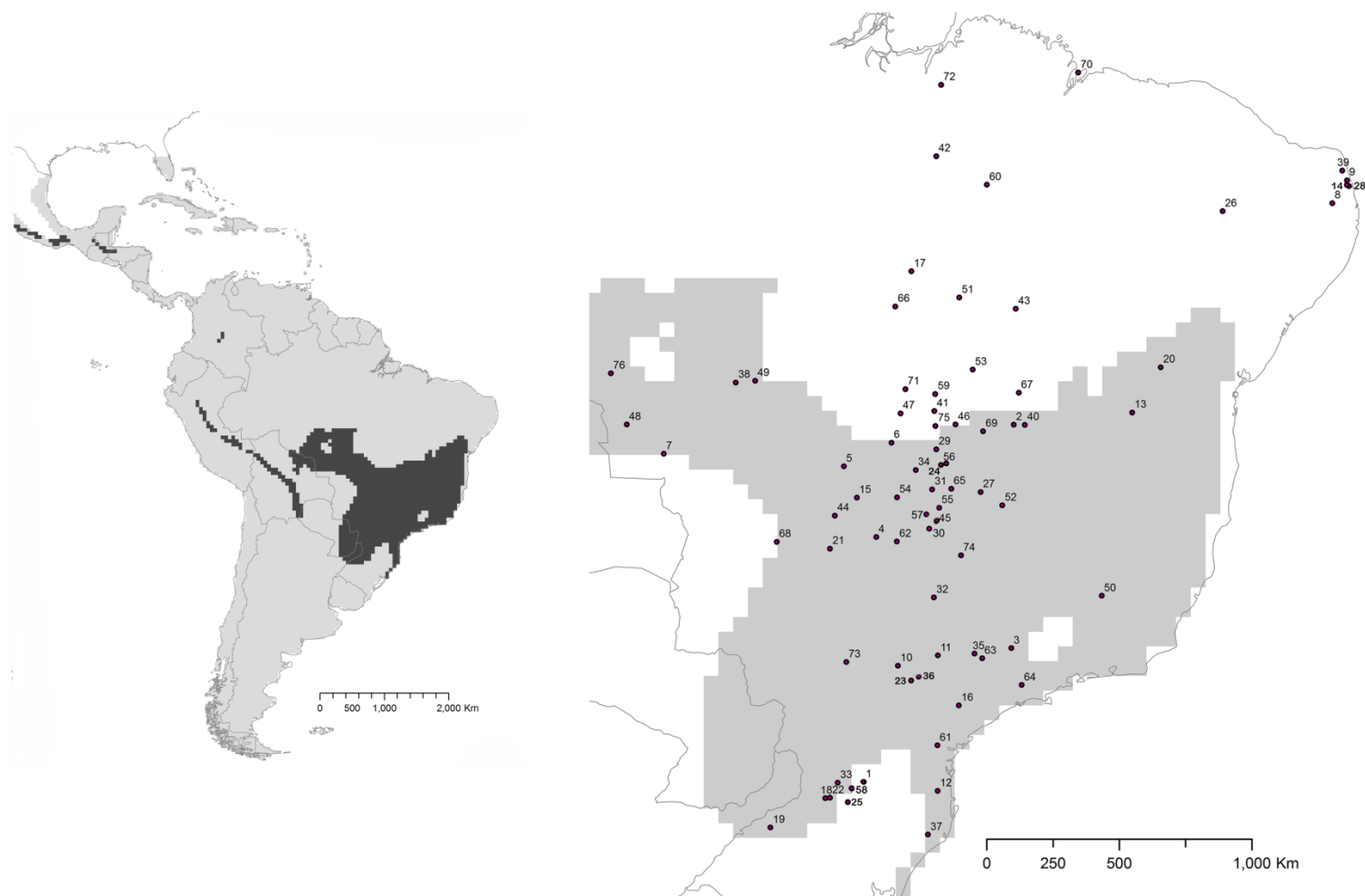


Figura 6 - Áreas de refúgio para *Physalaemus cuvieri* ao longo do último ciclo glacial. Em destaque a distribuição das populações amostradas neste trabalho, números identificadores das populações conforme Tabela 3.

Tabela 9 – Contribuição relativa de cada componente de modelagem (tempo, métodos, AOGCMs e sua interação) para a variabilidade das previsões dos ENMs para *Physalaemus cuvieri*. A coluna adequabilidade mostra a proporção mediana e a amplitude da soma de quadrados a partir da ANOVA hierárquica calculada para cada célula da gride cobrindo a região neotropical.

Componente	Adequabilidade		
	Mediana SS	Mínimo	Máximo
Tempo	0.5558	0.0010	0.9551
Método	0.1131	0.0142	0.8279
AOGCM	0.2104	0.0134	0.8806
Resíduos	0.0444	0.0047	0.3208

SS = soma dos quadrados

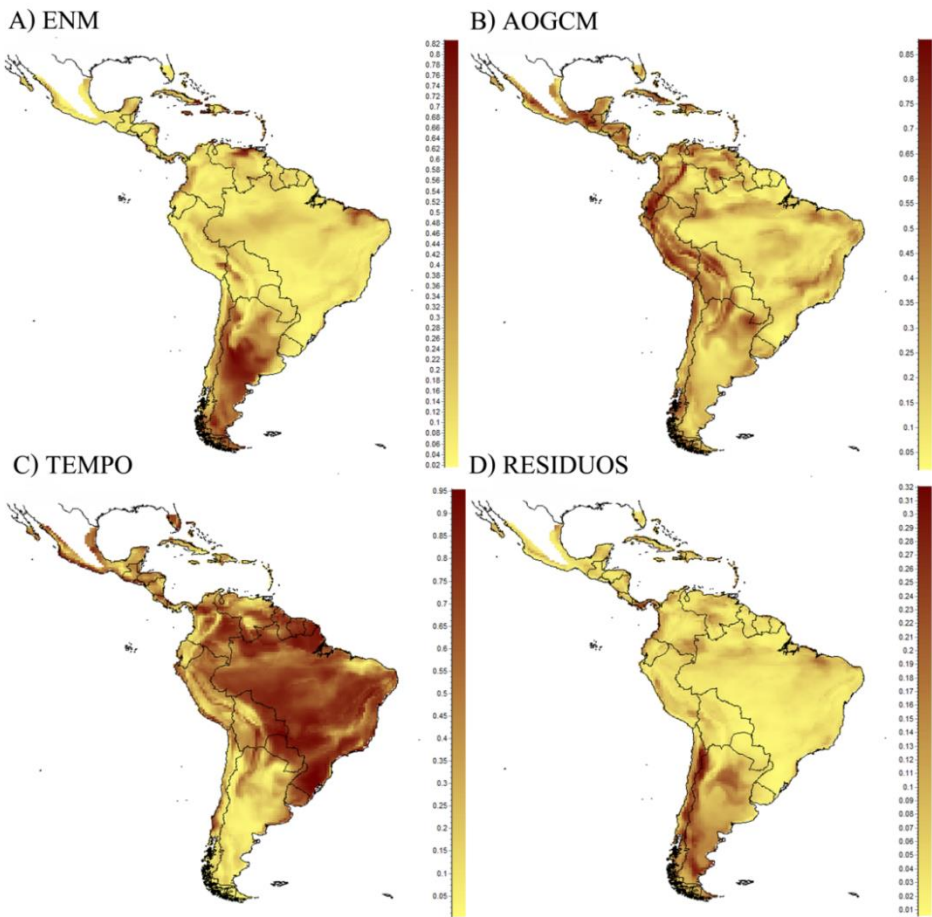


Figura 7 - Mapas de incerteza para cada componente de modelagem (ENMs, AOGCMs, tempo e resíduos – interação ENMs X AOGCMs) utilizado na solução de consenso da paleomodelagem de *Physalaemus cuvieri*. A barra ao lado de cada mapa mostra a proporção da soma dos quadrados obtida pela ANOVA hierárquica calculada para cada célula da gride.

Dados Moleculares

Após a edição e alinhamento das sequências obtivemos um alinhamento concatenado (regiões mitocondriais + região nuclear) de 1155pb (Tabela 10). Destes, 896 sítios apresentaram-se invariáveis (monomórficos) e 259 sítios variáveis (polimórficos). Os sítios polimórficos apresentaram 65 sítios com mutações em um único indivíduo (*singleton variable sites*) e 194 sítios informativos segundo o critério de parcimônia.

Tabela 10 - Caracterização das sequências e modelos evolutivos para cada uma das regiões de DNA amplificadas para as populações de *Physalaemus cuvieri*.

	12S	16S	Citocromo B	Rodopsina
Comprimento Original (pb)	416	464	348	272
Comprimento Final (pb)	344	399	230	182
Frequência de Bases				
%A	0.3048	0.346	0.2066	0.2359
%C	0.2519	0.192	0.1924	0.3178
%G	0.1812	0.1865	0.224	0.1812
%T	0.2621	0.2755	0.377	0.2651
Modelo Evolutivo	GTR+I+G	GTR+I+G	TIM2+I+G	TrN+I+G
Verossimilhança do Modelo	2746.2695	3037.9033	862.6996	1000.9766

Diversidade Genética e Padrão Filogeográfico

A maioria das populações mostraram-se polimórficas. A diversidade nucleotídica (π) total foi igual a 0.0203 +/- 0.00987 e a diversidade haplotípica (h) total foi igual a 0.97588 +/- 0.32453, caracterizando valores altos de diversidade para as regiões analisadas. O nível de diversidade nucleotídica em cada população (ver Tabela A3 nos Anexos) variou de 0.0003 em Chapecó – SC (22) à 0,0482 em Santa Isabel – SP

(64). A população de Chapecó também apresentou a menor diversidade haplotípica ($h = 0,37$). As populações de Caseara – TO (17), Porangatu – GO (59), Santa Isabel – SP (64) e São Luiz – MA (70), apresentaram diversidades nucleotídica e haplotípica altas. As diversidades nucleotídica e haplotípica não estão relacionadas com a distância das populações ao centro do refúgio histórico ($P > 0.05$), contudo há uma leve correlação entre a diversidade nucleotídica ($R^2 = 0.05$, $P = 0.045$) e haplotípica ($R^2 = 0.075$, $P = 0.017$) com a distância das populações da borda do refúgio. Esse resultado indica haver uma leve influência da estabilidade ao longo do último ciclo glacial na diversidade genética da espécie, mas não há um padrão espacial claro na distribuição desses índices (Figura 8).

A partir dos sítios polimórficos foram identificados 248 haplótipos para a região mitocondrial e seis haplótipos na região nuclear. A tabela 11 resume as informações sobre as populações e os haplótipos e as figuras 9, 10 e 11 mostram as relações entre os haplótipos obtidos para cada região. Dentre os 248 haplótipos encontrados para a região mitocondrial, 27 foram compartilhados entre indivíduos de diferentes populações e 221 foram exclusivos. Sessenta e cinco populações apresentaram haplótipos exclusivos, sendo que as populações de Araputanga – MT (7), Blumenau – SC (12), Caetité – BA (13), Caseara – TO (17), Chapada Diamantina (Lençóis) – BA (20), Crato – CE (26), Lucas do Rio Verde – MT (38), Marabá – PA (42), Nova Lacerda – MT (48), Nova Uiratã – MT (49), Ouro Preto – MG (50), Porto Franco – MA (60), São Luiz – MA (70), Tailândia – PA (72), Santa Isabel – SP (64), São Gabriel do Oeste – MS (68) e Vilhena – RO (76) não compartilham nenhum de seus haplótipos. Além disso, Caguaré – RN (), Pontalina – GO (), Santa Isabel – SP (64) e Vilhena – RO () foram as populações que apresentaram o maior número de haplótipos exclusivos (10

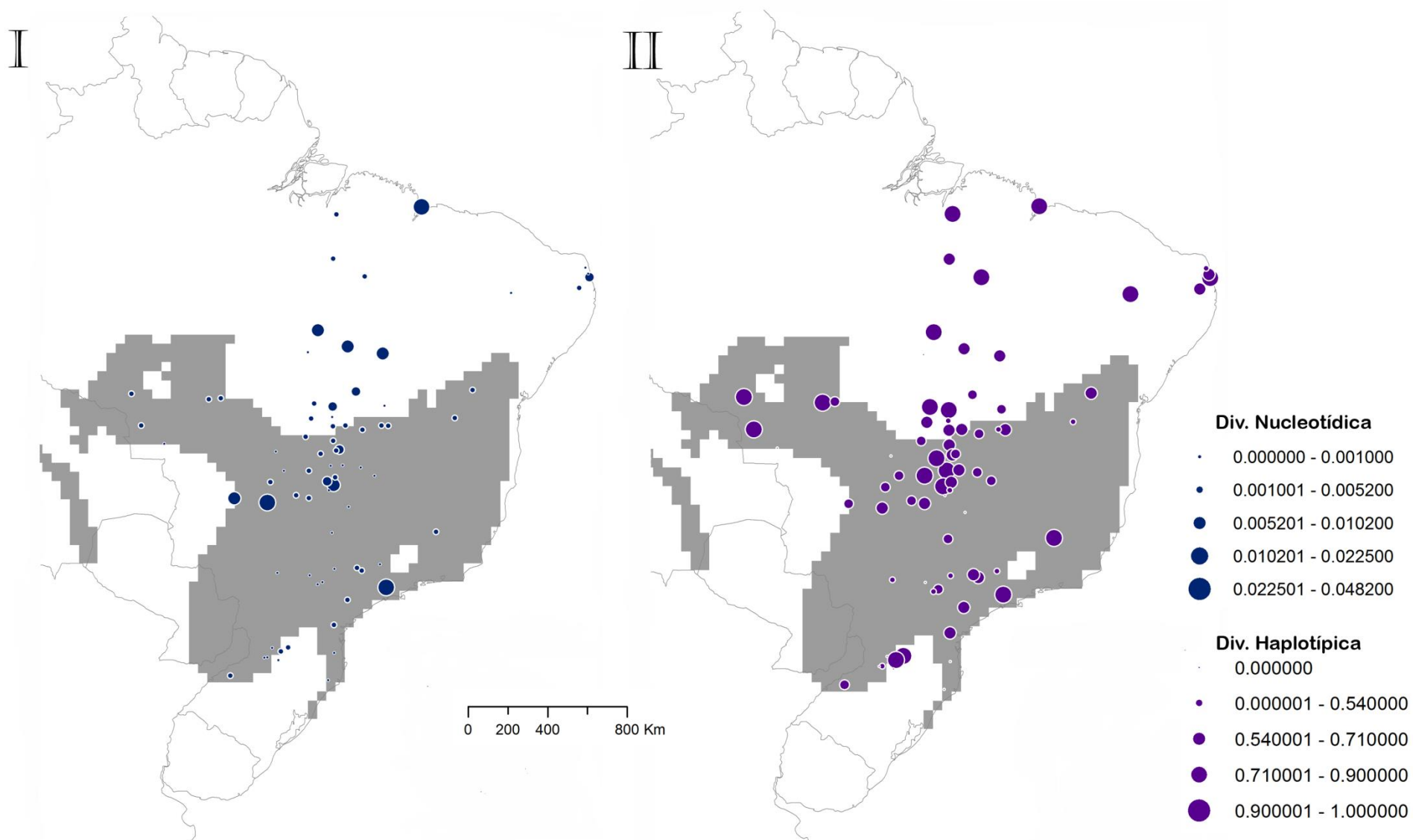


Figura 8 – Distribuição geográfica das diversidades: I) nucleotídica (II) e II) haplotípica (h) das populações de *Physalaemus cuvieri*. Para valores individuais consultar a Tabela A3. Em cinza, refúgio histórico predito para a espécie.

Tabela 11 - Características das 76 populações amostradas para a análise filogeográfica de *Physalaemus cuvieri*. Indivíduos (N), haplótipos por população (Nh) e relação dos haplótipos por população (em negrito haplótipos exclusivos).

	Populações	Siglas	N	Fragmentos mitocondriais		Fragmento nuclear	
				Nh	Haplótipos	Nh	haplótipos
1	Água Doce – SC	PCR	3	3	h1 , h2, h3	1	h1
2	Alvorada do Norte – GO	PCD	7	3	h4, h5 , h6	1	h1
3	Andradas – MG	PCF	13	2	h7 , h8	2	h1, h2
4	Aparecida do Rio Doce – GO	PCA	15	5	h9 , h10, h11 , h12 , h13	1	h1
5	Aragarças – GO	PC(A)	4	1	h14	1	h1
6	Araguapaz – GO	PCA(AR)	10	4	h10, h15, h16 , h17	1	h1
7	Araputanga – MT	PCU	1	1	h18	1	h1
8	Areia – PB	PCAD	9	6	h19 , h20 , h21 , h22 , h23 , h24	1	h1
9	Arês – RN	PCAF	4		h25, h26, h27	1	h1
10	Assis – SP	PCAG	6	1	h8	1	h1
11	Bauru – SP	PCAH	4	2	h8, h28	1	h1
12	Blumenau – SC	PCX	1	1	h29	1	h1
13	Caetité – BA	PCAI	4	2	h30 , h31	1	h1
14	Caguaretama – RN	PCZ	16	10	h25, h32 , h33, h34 , h35 , h36 , h37 , h38 , h39 , h40	1	h1
15	Caiapônia – GO	PC(C)	5	3	h14, h41 , h42	1	h1
16	Capão Bonito – SP	PCAE	4	3	h8, h43 , h44	1	h1
17	Caseara – TO	PCN	6	6	h45 , h46 , h47 , h48 , h49 , h50	1	h1
18	Caxambu do Sul – SC	PCV	3	1	h2	1	h1
19	Cerro Largo – RS	PCAJ	3	2	h51 , h52	1	h1
20	Chapada Diamantina (Lençóis) – BA	PCAZ	20	7	h53 , h54 , h55 , h56 , h57 , h58 , h59	2	h1, h3
21	Chapadão do Sul – MS	PCAW	18	8	h10, h60 , h61 , h62 , h63 , h64 , h65 , h66	1	h1
22	Chapecó – SC	PCQ	15	4	h2, h67 , h68 , h69	1	h1
23	Chavantes – SP	PCAK	5	2	h70 , h71	1	h1
24	Cocalzinho de Goiás – GO	PC(CO)	11	5	h72, h73 , h74 , h75 , h76	1	h1
25	Concórdia (Parque Estadual Fritz Plaumann) – SC	PCP	2	1	h2	1	h1
26	Crato – CE	PCAC	2	2	h77 , h78	1	h1
27	Cristalina – GO	PC(CR)	8	4	h72, h79 , h80, h81	1	h1

28	Goianinha – RN	PCY	16	11	h25, h26, h33, h82, h83, h84, h85, h86, h87, h88, h89	1	h1
29	Goianésia – GO	PC(G)	6	2	h90 , h91, h92, h93	1	h1
30	Goiatuba – GO	PC(Gt)	3	1	h94	1	h1
31	Goiânia – GO	PC(Gu)	2	2	h10, h94	1	h1
32	Icém – SP	PCAL	4	2	h95 , h96	1	h1
33	Ipuacu – SC	PCAM	2	1	h2	1	h1
34	Itaberaí – GO	PC(I)	4	4	h10, h97, h98, h99	1	h1
35	Itirapina – SP	PCAN	20	8	h8, h96, h100, h101, h102, h103, h104, h105	1	h1
36	Jacarezinho – PR	PCAO	9	3	h8, h10, h106	1	h1
37	Lauro Müller – SC	PCAP	2	1	h107	1	h1
38	Lucas do Rio Verde – MT	LRV	3	3	h108, h109, h110	1	h1
39	Macaíba – RN	PCAB	4	2	h25, h111	1	h1
40	Mambaí – GO	PC(Ma)	8	4	h112, h113, h114, h115	1	h1
41	Mara Rosa – GO	PC(MR)	4	2	h92, h116	1	h1
42	Marabá – PA	PCAQ	8	4	h117, h118, h119, h120	1	h1
43	Mateiros – TO	PCL	17	9	h4, h121, h122, h123, h124, h125, h126, h127, h128	1	h1
44	Mineiros – GO	PC(M)	8	4	h10, h129, h130, h131	1	h1
45	Morrinhos – GO	PC(Mo)	5	2	h10, h132	1	h1
46	Niquelândia – GO	PC(N)	11	6	h92, h133, h134, h135, h136, h137	1	h1
47	Nova Crixás – GO	PC(NC)	11	6	h138, h139, h140, h141, h142, h143	2	h1, h2
48	Nova Lacerda – MT	NVL	2	2	h144, h145	1	h1
49	Nova Ubiratã – MT	PCG	4	2	h146, h147	1	h1
50	Ouro Preto – MG	PCJ	4	3	h148, h149, h150	2	h1, h4
51	Palmas – TO	PCC	12	6	h4, h151, h152, h153, h154, h155	1	h1
52	Paracatu – MG	PCK	20	9	h72, h80, h156, h157, h158, h159, h160, h161, h162	1	h1
53	Paranã – GO	PCE	9	4	h151, h155, h163, h164	1	h1
54	Paraúna – GO	PC(Pa)	3	2	h72, h165	2	h1, h2
55	Piracanjuba – GO	PC(Pi)	4	3	h10, h72, h166	1	h1
56	Pirenópolis – GO	PC(PR)	19	8	h10, h15, h72, h167, h168, h169,	1	h1

h170, h171						
57	Pontalina – GO	PC(PT)	16	11	h132, h172, h173, h174, h175, h176, h177, h178, h179, h180, h181	1 h1
58	Ponte Serrada e Passos Maia (Parque Nacional das Araucárias) – SC	PCS	2	2	h2, h10	1 h1
59	Porangatu – GO	PC(P)	3	3	h141, h167, h182	1 h1
60	Porto Franco – MA	PCAR	3	3	h183, h184, h185	1 h1
61	Quatro Barras – PR	PCAS	5	4	h8, h186, h187, h188	1 h1
62	Quirinópolis – GO	PC(Q)	22	9	h10, h189, h190, h191, h192, h193, h194, h195, h196	1 h1
63	Rio Claro – SP	PCAT	8	4	h8, h96, h105, h197	1 h1
64	Santa Isabel – SP	PCAU	10	10	h198, h199, h200, h201, h202, h203, h204, h205, h206, h207	3 h1, h2, h5
65	Silvânia – GO	PC(S)	7	5	h72, h208, h209, h210, h211	1 h1
66	Santa Terezinha – MT	PCO	1	1	h166	1 h1
67	São Domingos – GO	PCB	19	5	h155, h164, h212, h213, h214	1 h1
68	São Gabriel do Oeste – MS	PCAY	20	8	h215, h216, h217, h218, h219, h220, h221, h222	1 h1
69	São João da Aliança – GO	PC(SJ)	13	4	h72, h112, h113, h223	1 h1
70	São Luiz – MA	PCAV	3	3	h224, h225, h226	1 h1
71	São Miguel do Araguaia – GO	PC(SM)	12	8	h138, h167, h227, h228, h229, h230, h231, h232	2 h1, h6
72	Tailândia – PA	PCW	3	3	h233, h234, h235	1 h1
73	Teodoro Sampaio – SP	PCAX	12	3	h8, h236, h237	1 h1
74	Uberlândia – MG	PC(Ub)	8	1	h8	1 h1
75	Uruaçu – GO	PC(U)	4	3	h91, h92, h238	1 h1
76	Vilhena – RO	PCM	15	10	h239, h240, h241, h242, h243, h244, h245, h246, h247, h248	1 h1

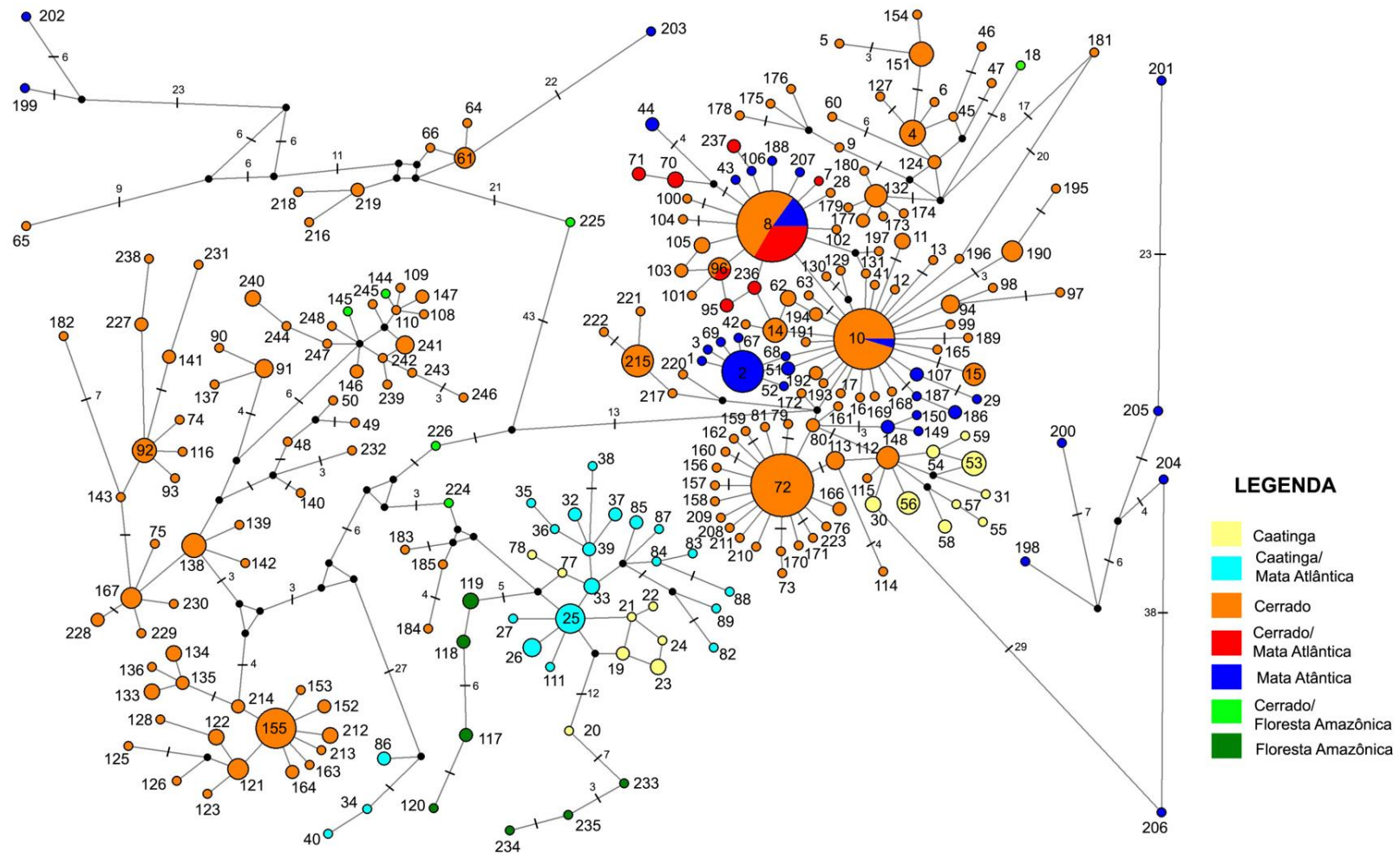


Figura 9 - Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada nas regiões mitocondriais dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*. Cada círculo representa um único haplótipo com tamanho relativo à sua frequência (de 1 à 60). Barras ao longo dos ramos conectando os haplótipos representam mutações (quando apenas uma mutação está presente a barra foi suprimida, quando mais de duas mutações estão presentes, o número é indicado junto à barra).

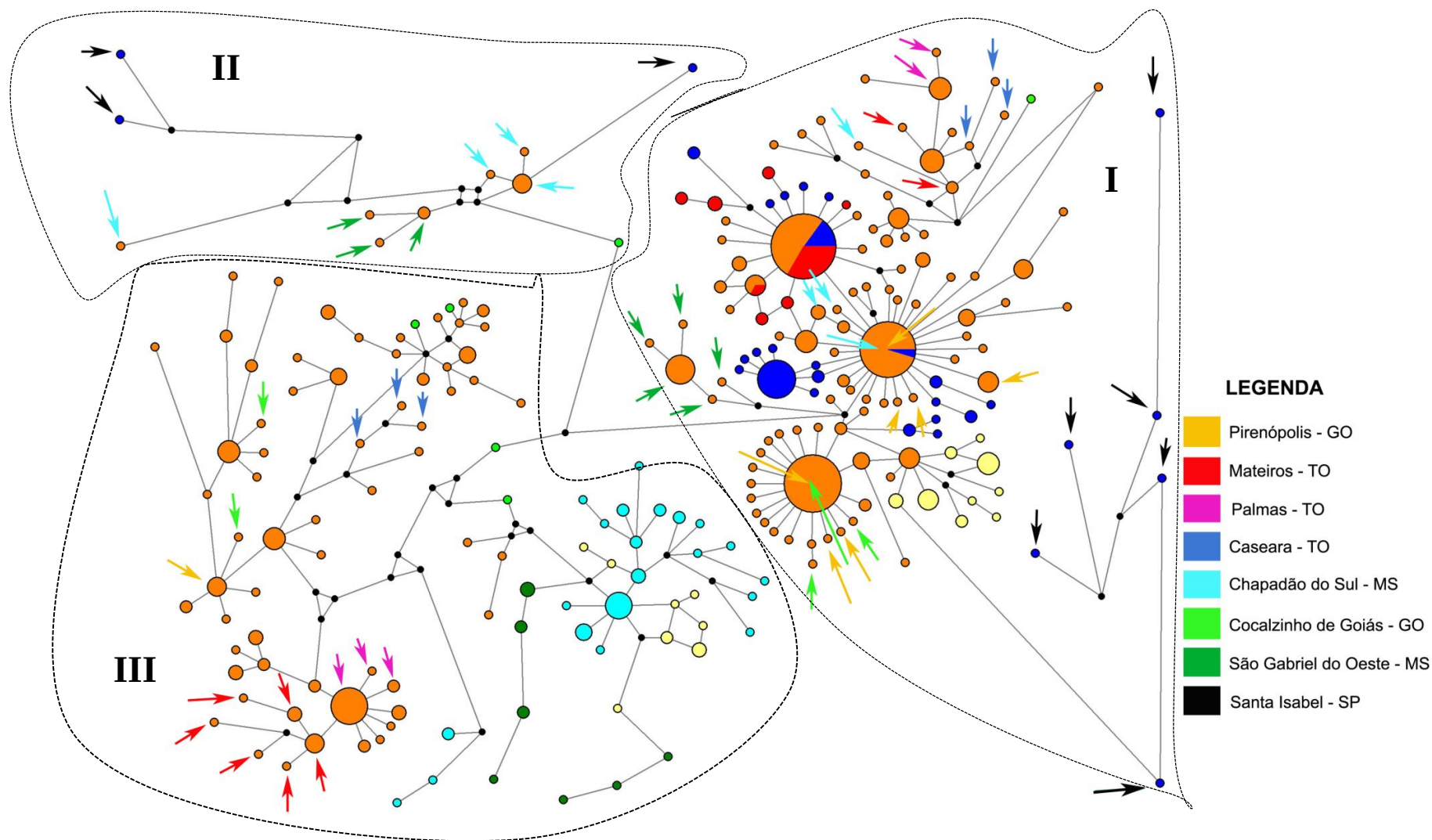


Figura 10 - Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada nas regiões mitocondriais dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*, mostrando os haplogrupos e as populações que apresentam arranjo incompleto de linhagens. As setas indicam os haplótipos presentes nessas populações.

haplótipos). Os haplótipos h8, h10 e h72 foram bastante frequentes e compartilhados por um grande número de indivíduos e populações (60 indivíduos e 10 populações, 44 indivíduos e 12 populações e 47 indivíduos e 8 populações respectivamente).

As populações de Aragarças – GO (5) (n=4), Assis – SP (10) (n=6), Caxambu do Sul – SC (18) (n=3), Goiatuba – GO (30) (n=3) e Uberlândia – MG (74) (n=8) apresentaram-se monomórficas. Destas, a população de Aragarças compartilha seu único haplótipo (h14) com a população de Caiapônia – GO (15); Goiatuba compartilha seu único haplótipo (h94) com a população de Goiânia – GO (31); Caxambu do Sul apresenta um haplótipo (h2) bastante frequente e restrito à porção sul do Brasil (21 indivíduos em 6 populações no estado de Santa Catarina); e Assis e Uberlândia compartilham o haplótipo 8, o de maior frequência e que está distribuído na porção sul do Cerrado e em ambientes transicionais entre o Cerrado e a Floresta Atlântica (estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo).

Em uma abordagem conservadora é possível reconhecer três haplogrupos, amplamente distribuídos, na rede de haplótipos (Figuras 9 e 10), os quais reúnem haplótipos simpátricos e/ou de populações próximas geograficamente. O primeiro grupo (I) inclui haplótipos amplamente distribuídos pelo Cerrado (porção central e sul), sul e sudeste da Floresta Atlântica e regiões da Caatinga mais próximas ao Cerrado (Caetité (13) e Lençóis – BA (20)). O segundo grupo inclui haplótipos bastante divergentes (separados por 77 passos mutacionais) de populações alocadas no grupo I (Chapadão do Sul – MS (21), São Gabriel do Oeste – MS (68) e Santa Isabel – SP (64)). É importante ressaltar que mesmo os haplótipos de Santa Isabel – SP que estão alocados no grupo I encontram-se separados dos demais haplótipos por muitos passos mutacionais, evidenciando a grande diferenciação desses indivíduos. E finalmente, temos o grupo III que aloca haplótipos da porção norte e noroeste do Cerrado,

Amazônia, distribuição nordeste da Floresta Atlântica e regiões da Caatinga mais próxima à ela. Apesar de oito populações apresentarem haplótipos alocados em mais de um grupo (Figura 10), o que pode indicar prováveis zonas de contato entre as linhagens dos haplogrupos (p. ex. as populações de Caseara (17), Mateiros (43) e Palmas (51) no Tocantins), ou ainda arranjo incompleto de linhagens (p. ex. Pirenópolis (56) e Cocalzinho de Goiás (24) em Goiás), há uma clara separação entre os haplótipos evidenciando uma “quebra” na diagonal separando as populações de *Physalaemus cuvieri*, com a ligação entre elas ocorrendo à nordeste por meio dos haplótipos da população de São Luiz – MA (70). Apesar do grande número de haplótipos exclusivos, as populações do norte e noroeste (haplogrupo III) apresentam-se ligeiramente mais estruturadas que as da porção central e sul, com haplótipos sendo compartilhados por poucas populações e um grande número de haplótipos exclusivos.

O fragmento nuclear rodopsina foi menos informativo que os fragmentos mitocondriais. A partir dos sítios polimórficos foram identificados seis haplótipos (Figura 11), um (h1) central e amplamente distribuído, presente em todas as populações, outro (h2) presente em populações do Cerrado (Nova Crixás – GO (47) e Paraúna – GO (54)), da Floresta Atlântica (Santa Isabel – SP (64)) e em ambiente de transição entre os dois biomas (Andradas – MG (3)), e quatro haplótipos restritos a uma única localidade no Cerrado, Caatinga e Floresta Atlântica. Os haplótipos estão separados entre si por apenas um passo mutacional, exceto o haplótipos 5 (Santa Isabel – SP (64)) que encontra-se separado do haplótipos central por seis passos mutacionais. Apesar de concordante com a geografia e com os haplótipos obtidos a partir dos fragmentos mitocondriais, sua resolução não é suficiente para inferir padrões.

Quando plotamos os haplótipos no mapa com as bacias hidrográficas é possível perceber algumas compartimentalizações devido às barreiras representadas por algumas

bacias (Figura 12). Como por exemplo, a separação dos haplótipos localizados no Nordeste em dois grupos: um situado na bacia do Atlântico Norte e outro no Atlântico Leste; ou ainda, excetuando-se algumas misturas de linhagens das bacias Araguaia-Tocantins e Paraná, a tendência à uma separação das bacias Amazônica e do Araguaia-Tocantins das bacias situados à sul e sudeste (Paraguai, Paraná, Atlântico Sudeste, Atlântico Sul e Uruguai). A AMOVA hierárquica mostrou uma diferenciação significativa entre as diferentes bacias hidrográficas (FCT = 0,273), embora a diferenciação devido à variação entre populações dentro das bacias tenha sido maior (FST = 0,72) (Tabela 12).

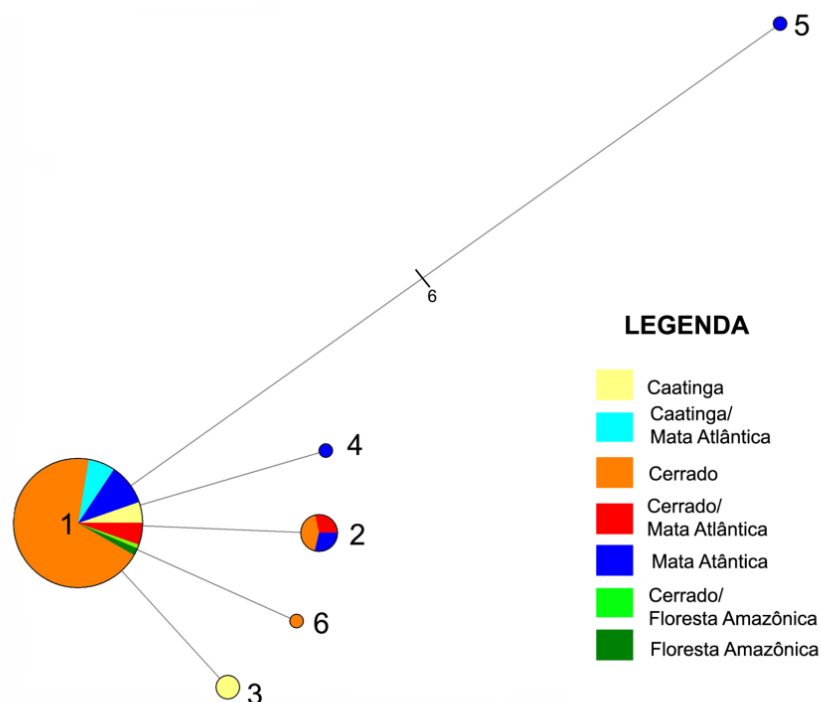


Figura 11 - Rede de haplótipos (*median-joining network*) baseada na região nuclear (rodopsina) dos 609 indivíduos e 76 populações de *Physalaemus cuvieri*.

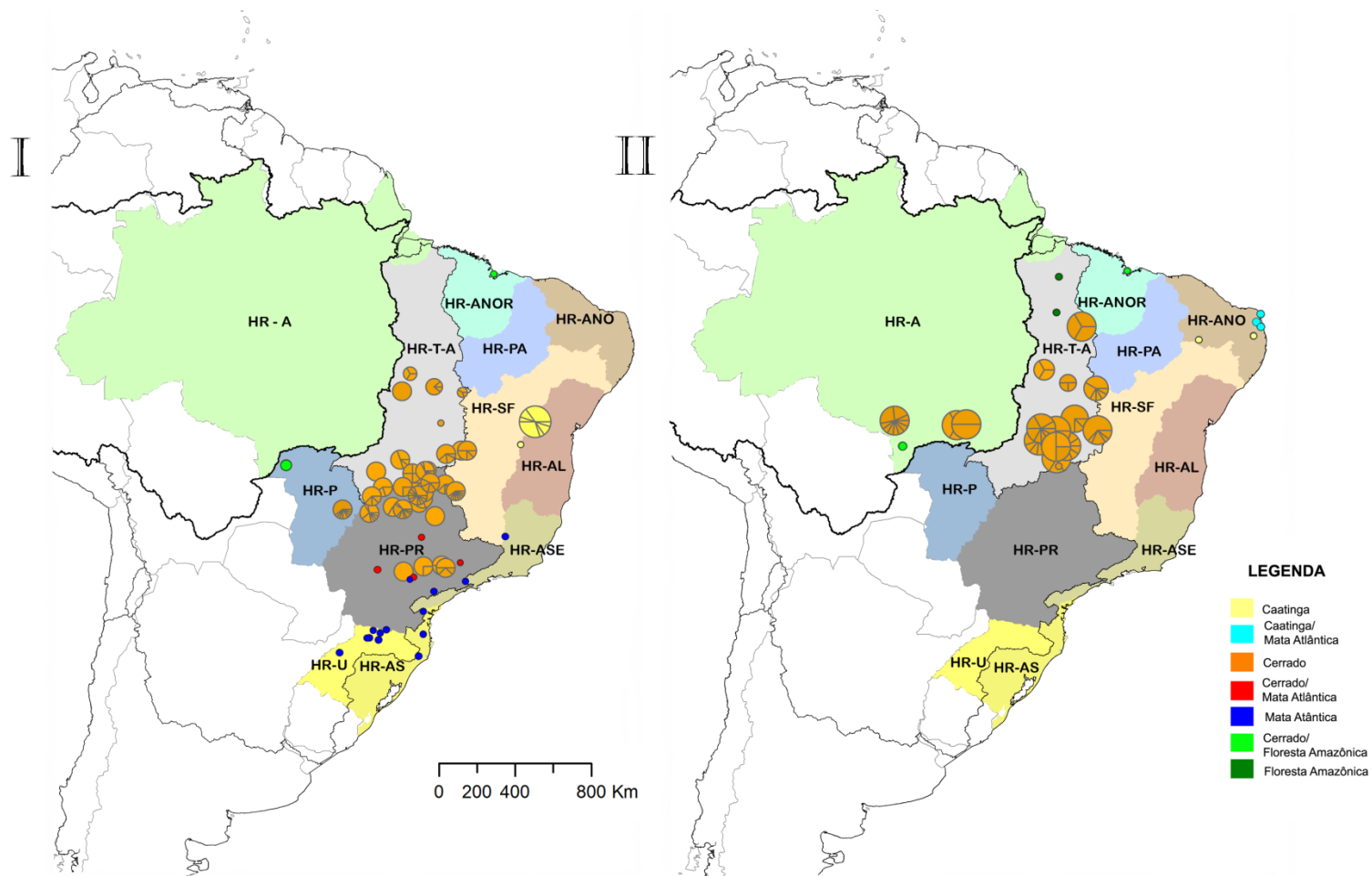


Figura 12 - Distribuição dos haplótipos, obtidos a partir das regiões mitocondriais de *Physalaemus cuvieri*, nas bacias hidrográficas. I – Haplogrupos 1 e 2, II – Haplogrupo 3 (conforme delimitado na Figura 10). Siglas: HR-A (Amazônia), HR-AL (Atlântico Leste), HR-ANO (Atlântico Norte), HR-ANOR (Atlântico Nordeste Ocidental), HR-AS (Atlântico Sul), HR-ASE (Atlântico Sudeste), HR-P (Paraguai), HR-PA (Parnaíba), HR-PR (Paraná), HR-SF (São Francisco), HR-T-A (Araguaia-Tocantins) e HR-U (Uruguai).

Tabela 12 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações de *Physalaemus cuvieri* separadas por bacias hidrográficas.

Fonte de Variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes da Variação	% Variação
Entre bacias	9	2143.122	3.37861 Va	27.32
Entre populações dentro das bacias	66	2938.912	5.54280 Vb	44.82
Dentro das populações	533	1835.659	3.44401 Vc	27.85
Total	608	6917.693	12.36543	
Índices de Fixação				
FCT = 0.27323				
FSC = 0.61677				
FST = 0.72148				
Teste de significância (10100 permutações): $p < 0,000$				

O valor do FST para os pares de populações, variou entre 0,083 (Andradas, MG (3) – Teodoro Sampaio, SP (73)) à 0,98 (São Domingos, GO (67) – Uberlândia, MG (74)) (veja Tabela A4 nos anexos com todos os valores do FST par-a-par). A maior parte dos valores de FST par-a-par foram significativos indicando uma alta diversidade genética interpopulacional. Considerando a abrangência geográfica da nossa amostragem (maior distância entre populações de 2828 km), mesmo populações próximas geograficamente já apresentam considerável divergência genética (p. ex. Andradas, MG (3) – Santa Isabel, SP (64) [FST = 0,58; 143 km]; Niquelândia, GO (46) – São João da Aliança, GO (69) [FST = 0,87; 104 km]; Pontalina, GO (57) – Quirinópolis, GO (62) [FST = 0,85; 148 km]; São Domingos, GO (67) – São João da Aliança, GO (69) [FST = 0,96; 195 km]). Mas, o contrário também foi observado, como populações próximas e pouco divergentes (p. ex. Aparecida do Rio Doce, GO (4) – Quirinópolis, GO (62) [FST = 0,06; 75 km]; Andradas, MG (3) – Rio Claro, SP (63) [FST = 0,08; 109 km]; Nova Crixás, GO (47) – São Miguel do Araguaia, GO (71) [FST = 0,08; 93 km]) e populações distantes e poucos divergentes (p. ex. Andradas, MG (3) –

Teodoro Sampaio, SP (73) [$F_{ST} = 0,08$; 579 km]; Itirapina, SP (35) – Teodoro Sampaio, SP (73) [$F_{ST} = 0,10$; 448 km]). Indicando não haver um único padrão espacial que explique a estruturação da variabilidade genética encontrada, o que também é evidenciado pelo Teste de Mantel que mostrou haver pouco efeito do isolamento por distância na diferenciação genética das populações ($r = 0.163$, $P = 0.039$) (Figura 13).

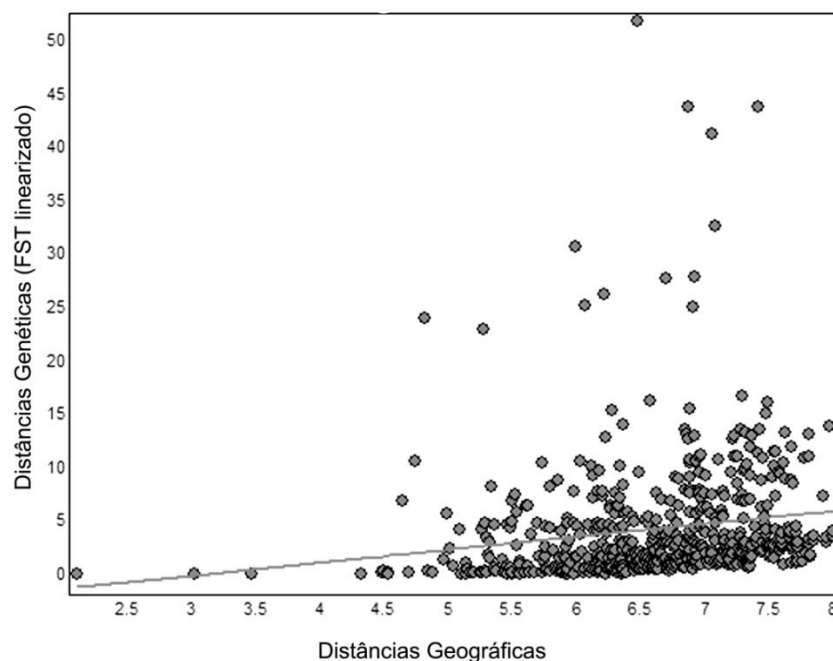


Figura 13 - Relação entre distância genética e distância geográfica ($r = 0.163$; $P = 0.039$, com 10000 permutações) entre 34 populações ($n > 8$) de *Physalaemus cuvieri*.

A análise da distribuição *mismatch* não suporta a hipótese de que as populações de *Physalaemus cuvieri* passaram por uma expansão demográfica recente. Apesar dos valores obtidos para a soma dos desvios dos quadrados (SSD) e para o teste de Fu (F_s) terem sido significativos, os obtidos no teste D de Tajima e o índice *raggedness* não foram significativos (Tabela 13). Além disso, o gráfico da distribuição *mismatch* apresenta uma distribuição multimodal, uma assinatura de uma história demográfica

estável. A análise do BSP também retrata a mesma história de estabilidade demográfica (Figura 14).

Tabela 13 – Histórica demográfica das populações de *Physalaemus cuvieri*. Valores baixos e não significativos para SSD ($p > 0,05$) indicam que os dados não desviam do esperado sob o modelo de expansão. Valores baixos e significativos do índice *raggedness* sugerem populações em expansão. Valores negativos e significativos de D e Fs são esperados em caso de expansão populacional. Em negrito, testes significativos para expansão.

Testes de expansão demográfica		P (10000 simulações)
Goodness-of-fit test	SSD = 0.01547049	0.1901
Harpending's Raggedness index	$r = 0.00412049$	0.6482
Tajima's D	$D = -0.99305$	0.1486
Fu's Fs test	Fs = -23.40940	0.0182

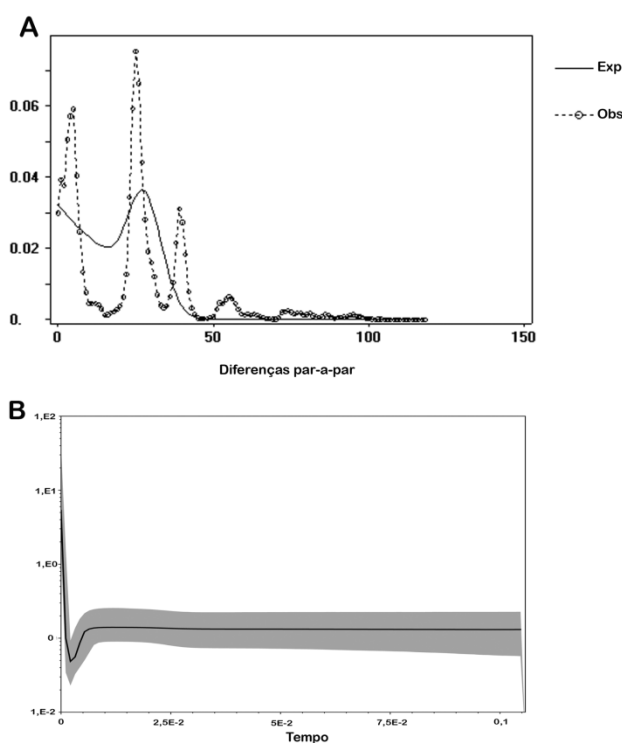


Figure 14 – História demográfica de *Physalaemus cuvieri*. A) Distribuição mismatch. Linha tracejada e círculos representam as frequências observadas das diferenças par-a-par entre os haplótipos. Linha contínua mostra os valores esperados sob o modelo de expansão demográfica histórica. B) Bayesian Skyline Plot. Linha preta representa a mediana das estimativas populacionais e faixas cinza indicam os limites superior e inferior de confiança (95% HPD).

Reconstrução Filogenética e Tempos de Divergência

A principal característica da filogenia obtida foi a separação das populações de *Physalaemus cuvieri* em dois grandes grupos geralmente bem concordantes com a geografia e com os haplogrupos obtidos na rede de haplótipos (Figura 15). As principais diferenças entre a filogenia e a rede de haplótipos estão na reunião dos haplogrupos I e II e de um pequeno subgrupo do haplogrupo III e no fato de seis indivíduos da população de Santa Isabel – SP (64) não estarem incluídos no grupo interno, podendo na realidade serem representantes de outra espécie (isso será investigado futuramente por meio de análises morfológicas). Algumas populações continuaram apresentando haplótipos alocados em grupos diferentes (Caseara – GO (17), Cocalzinho de Goiás – GO (24), Mateiros – TO (43), Palmas – TO (51), Paranã – GO (53) e Pirenópolis – GO (56)).

A linhagem mais basal (haplogrupo III) inclui populações das porções Norte e Noroeste do Cerrado, suas transições com a Floresta Amazônica e Floresta Amazônica. Três haplótipos (2 haplótipos de Cagaretama – RN (14) e 1 haplótipo de Goianinha – RN (28)) ocupam a posição mais basal na filogenia e são irmãos de todas as outras linhagens de *P. cuvieri*, não sendo incluídos em nenhum dos subgrupos identificados na Figura 15. O segundo grupo é também o mais distribuído, incluindo um pequeno subgrupo de populações da Caatinga e suas transições com a Floresta Atlântica no extremo leste do Nordeste (populações incluídas originalmente no haplogrupo III e que mostraram-se mais proximamente relacionadas às dos haplogrupos I e II, sendo contudo importante frisar que as relações desse subgrupo com os outros não são bem suportadas), e um grande subgrupo que inclui populações da Caatinga (no estado da Bahia), porções central e sul do Cerrado e porções sudeste e sul da Floresta Atlântica.

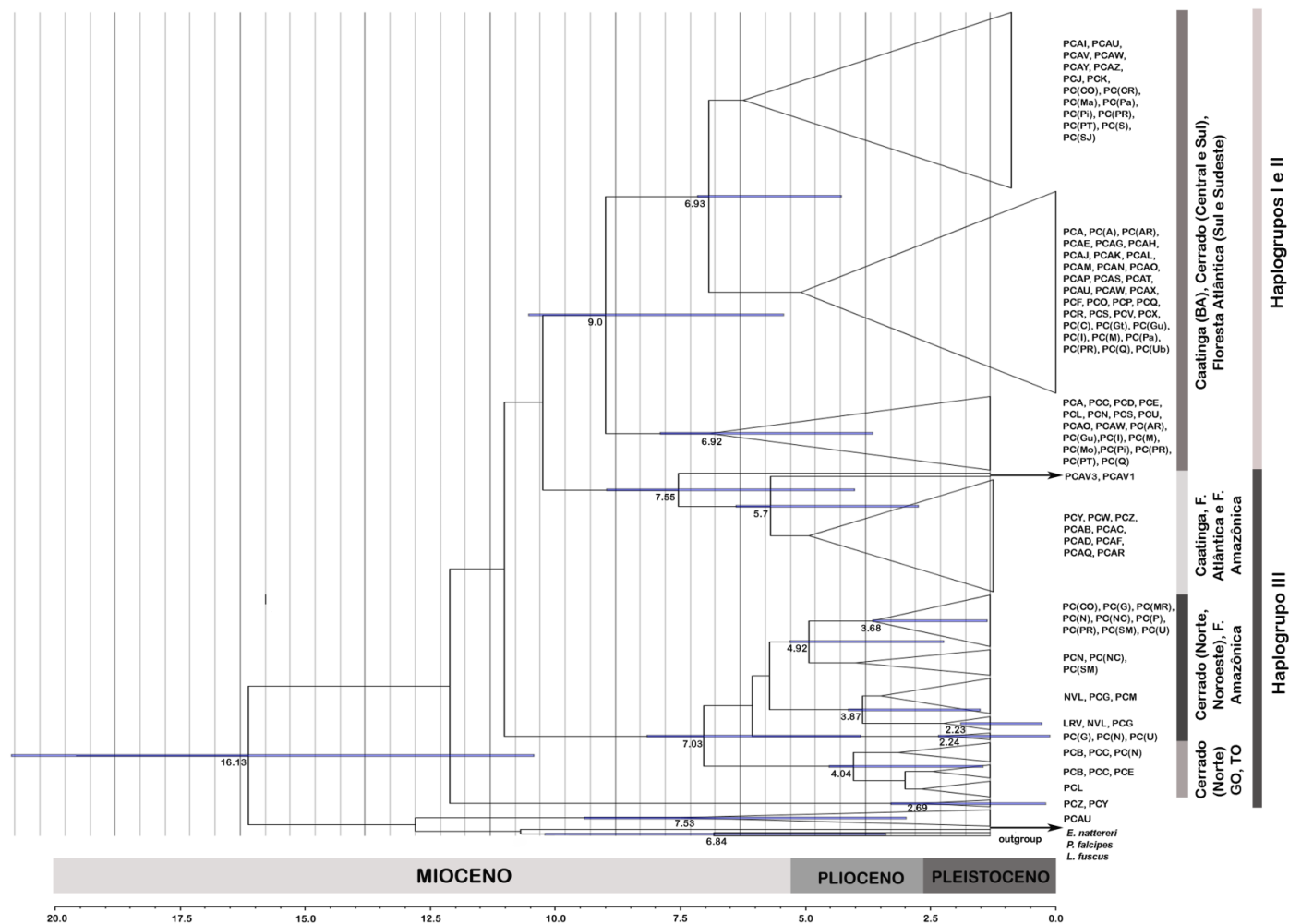


Figura 15 – Relações filogenéticas e tempos de divergência (apenas para nós com probabilidade posterior ≥ 0.9) dos haplótipos de *Physalaemus cuvieri* (*maximum clade credibility tree* baseada em todos os fragmentos). Siglas das populações conforme Tabela 3.

Os tempos de divergência foram estimados apenas para os nós com probabilidade posterior maior ou igual a 0.9 de forma a prover uma estimativa conservadora. A divergência entre as linhagens de *P. cuvieri* e o grupo externo ocorreu no Mioceno 16.13 [SD 10.43 – 20.43] milhões de anos. A divergência entre os dois principais grupos é profunda ocorrendo no Mioceno Médio e Tardio, contudo o suporte desse nó é baixo (0.61). As principais divergências entre os grandes grupos e os subgrupos que os compõe ocorreram principalmente no Mioceno (entre 16 – 5.7 milhões) e Plioceno (4.92 – 2.69 milhões), as divergências no Pleistoceno, ocorreram principalmente dentro de populações ou entre linhagens muito próximas geograficamente.

Dinâmica Evolutiva Espacial

A análise de difusão espacial estimou datas mais recentes para os eventos de dispersão das linhagens de *P. cuvieri*. A ausência de um calibrador fóssil pode ter influenciado neste resultado, já que só as taxas de mutação dos fragmentos foram utilizadas. Ainda assim (e principalmente se levarmos em consideração os desvios) boa parte da diversificação das linhagens continuou sendo registrada no Terciário, ainda que não se possa negar certa influência dos eventos climáticos do Quaternário, principalmente no estabelecimento das populações situadas nos extremos norte e sul do Brasil (Figura 16). A origem das linhagens de *P. cuvieri* foi estimada para a região nordeste do estado de Goiás (Alvorada do Norte (2), Figura 16A) de onde partiram três principais rotas de difusão das linhagens: uma em direção ao sul, outra para o norte e uma para noroeste (Figura 16B).





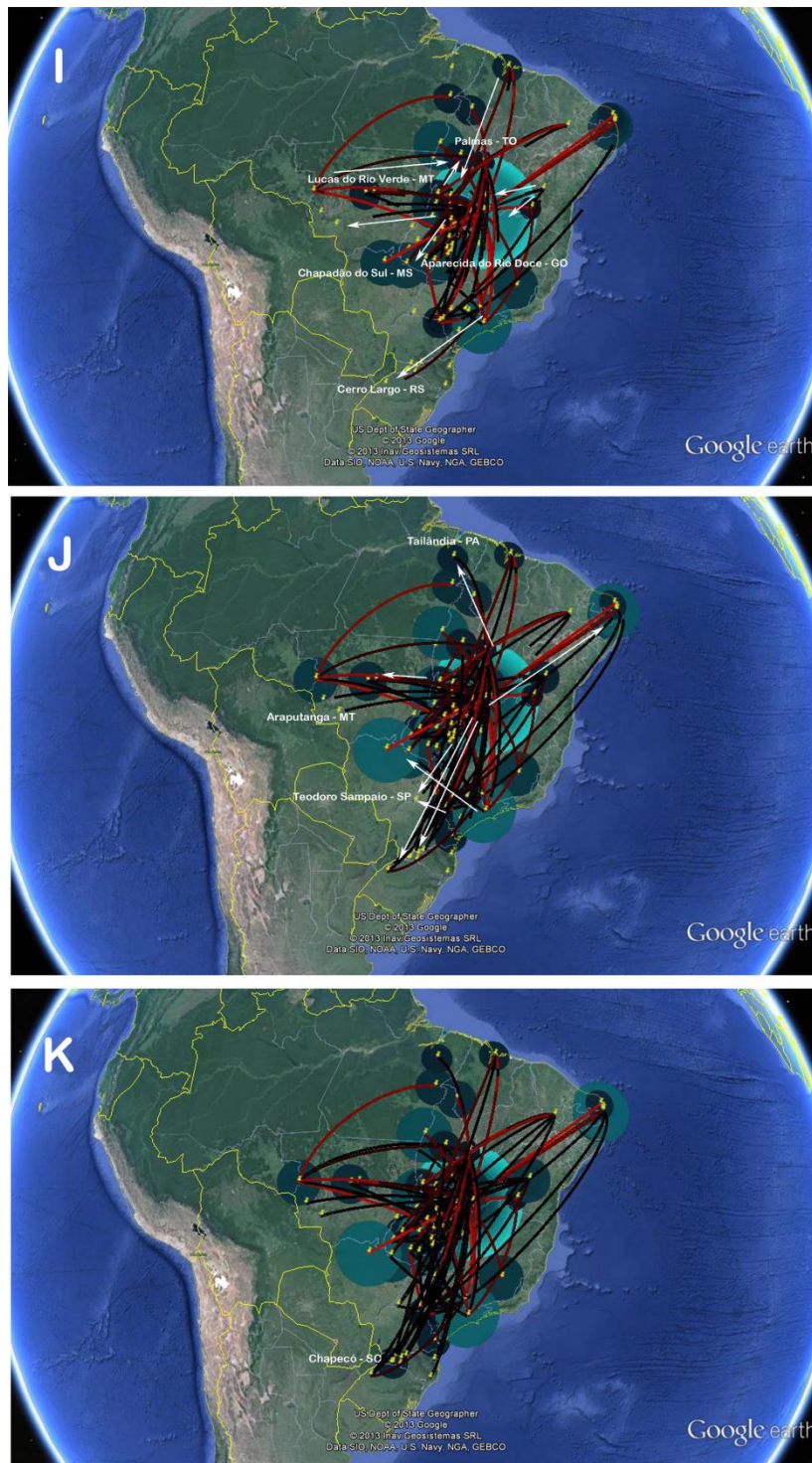


Figura 16 – Rotas hipotéticas de difusão histórica das linhagens de *Physalaemus cuvieri*. Linhas vermelhas entre localidades indicam os eventos históricos de difusão (as setas brancas indicam o sentido) e o tamanho dos círculos representa o tamanho histórico da população. A) aprox. 5 Ma; B) aprox. 4,5 Ma; C) aprox. 3,5 Ma; D) aprox. 3 Ma; E) aprox. 2,7 Ma; F) aprox. 2,5 Ma; G) aprox. 2,2 Ma; H) aprox. 1,8 Ma; I) aprox. 1,2 Ma; J) aprox. 0,5 Ma; K) Holoceno – presente.

Entre aproximadamente 4 Ma e 2,5 Ma, as populações localizadas na região central já estavam bem estabelecidas, e inúmeras rotas de migração formavam uma complexa rota de difusão das linhagens em múltiplas direções. Contudo, já estava bem evidente o padrão de “quebra em diagonal” entre as principais linhagens de *P. cuvieri*. O que fica evidente pela falta de contato entre as populações estabelecidas à noroeste e norte e as do sul (Figuras 16A-F), com uma certa mistura ocorrendo nas proximidades da região de origem. Em algumas localidades as origens de colonização são diversas. Por exemplo, as populações mais à nordeste (Arês (9), Cagaretama (14) e Macaíba – RN (39) e Areia – PB (8)) foram colonizadas em distintos períodos por linhagens oriundas da região central e da região sudeste. Vilhena - RO (76) foi colonizada por duas linhagens, uma advinda da região central de Goiás e outra situada mais ao norte. E a partir dela (Vilhena) duas outras rotas se dirigiram ao norte (Marabá – PA (42) e Palmas – TO (51)).

O período compreendido entre o Pleistoceno e Holoceno é caracterizado principalmente pelo estabelecimento de populações nas porções mais ao norte (Porto Franco (60) e São Luiz – MA (70), Tailândia (72) e Marabá – PA (42)) e sul (Chapecó – SC (22)) do Brasil (Figura 16G-K).

DISCUSSÃO

Os modelos de paleodistribuição para *Physalaemus cuvieri* sugerem uma limitada influência das flutuações climáticas do Quaternário na história filogeográfica da espécie, sua distribuição mostra-se praticamente estável e contínua desde o Último Máximo Glacial (LGM), e ainda que as predições de alguns métodos e AOGCMs tenham sugerido uma leve retração a partir do Holoceno Médio, no geral o refúgio histórico predito para espécie é amplo e contínuo. Isto condiz com a hipótese da presença de um grande refúgio de cerrado nos “chapadões” do Brasil Central envolto por um cinturão predominantemente composto por vegetação típica das caatingas durante todo o Pleistoceno (AB’ SABER, 2000) e com o fato de que os limites desse domínio estendiam-se formando enclaves por grande parte das regiões florestais sul-americanas durante os períodos mais secos, ao passo que sofreu pouca retração durante os períodos mais úmidos, de fato é considerado um dos domínios que menos foi afetado pelas oscilações climáticas do Pleistoceno (AB’SABER, 1977; COLE, 1986; AB’SABER, 2000). É válido supor que uma espécie intimamente relacionada às paisagens abertas contou ao longo de todo esse período com condições favoráveis para sua diversificação (WEBB, 1978; COLLI, 2005).

Nossas análises indicam a presença de profundas divergências entre três grupos estruturados geograficamente (Norte/Noroeste, Central/Nordeste/Sudeste/Sul e Nordeste). Esses resultados corroboram o padrão recorrente nos estudos filogeográficos sul-americanos, como bem evidenciado por Turchetto-Zolet e colaboradores (2013), que diz respeito à prevalência de profundas divergências filogeográficas intraespecíficas. Além disso, os valores altos e significativos do FST par-a-par sugerem um fluxo gênico reduzido entre a maioria das populações analisadas. Valores altos de

FST e variabilidades genéticas interpopulacionais significativas foram observadas para outras espécies de anuros consideradas complexos crípticos (*Leptodactylus fuscus*, CAMARGO *et al.*, 2006; *Thoropa miliaris*, FITZPATRICK *et al.*, 2009) e também para espécies com requerimentos específicos de habitats (*Hypsiboas albomarginatus*, *Proceratophrys boiei* e *Scinax nebulosus*, CARNAVAL, 2002). Neste mesmo trabalho, Carnaval (2002) observou valores baixos de FST e maior variabilidade genética intrapopulacional nas populações da espécie *Dendropsophus branneri*, uma espécie considerada como tendo hábitos generalistas. *Physalaemus cuvieri* também é uma espécie considerada generalista (MIJARES *et al.*, 2010), sendo assim os valores altos de diferenciação genética entre suas populações, além de indicarem altos níveis de estruturação geográfica, sugerem uma restrição ao fluxo gênico e é condizente com a premissa da ocorrência de um complexo de espécies crípticas dentro de *P. cuvieri*.

Algumas populações de *Physalaemus cuvieri* apresentam baixos níveis de diversidade nucleotídica e altos níveis de diversidade haplotípica, uma assinatura genética de expansão depois de um período de baixo tamanho populacional efetivo (GRANT & BOWEN, 1998). Contudo nenhum padrão geográfico foi observado, as populações que apresentam essa característica são pontuais e esparsas, estando presentes tanto na porção marginal da distribuição da espécie, quanto no refúgio histórico predito pelo ENM, e o sinal de expansão acabou não sendo capturado pelos testes demográficos. No geral, as populações de *P. cuvieri* apresentam altos níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica. Grant & Bowen (1998) sugerem que valores de diversidade haplotípica maiores que 0,5 e de diversidade nucleotídica maiores que 0,005 indicam altos valores de diversidade genética que são característicos de populações com grandes tamanhos populacionais, demograficamente estáveis, com histórias evolutivas antigas e provável contato secundário entre linhagens diferenciadas,

esta última característica foi observada em várias populações localizadas principalmente na porção mais central da distribuição da espécie. Em geral, o valor de corte para a diversidade haplotípica é amplamente utilizado, no que diz respeito à diversidade nucleotídica, é importante levar em consideração o grupo estudado. Em anuros neotropicais os seguintes valores (máximos) já foram observados: 0,007 em *Eleutherodactylus* spp. (ND2; CRAWFORD, 2003); 0,02 em *Epipedobates bassleri* (12S, 16S, citocromo b; ROBERTS *et al.*, 2007); 0,10 em *Eleutherodactylus ockendeni* (citocromo b; ELMER *et al.*, 2007); 0,01 em *Engystomops petersii* (12S, 16S, tRNAVal; FUNK *et al.*, 2007) e 0,04 em *Hypsiboas albopunctatus* (região controle, ND1 e ND2; PRADO *et al.*, 2011). Comparado a eles, os valores de diversidade nucleotídica observados para *P. cuvieri* estão entre os mais altos. Pabijan e colaboradores (2012) sugerem que um alto nível de polimorfismo de nucleotídeos dentro de populações de anuros, pode estar associado com espécies que apresentam comportamento reprodutivo explosivo, posturas numerosas e rápido desenvolvimento larvário, por causa do seu menor tamanho efetivo. *Physalaemus cuvieri* apresenta um comportamento reprodutivo explosivo, mediado pela ocorrência de chuvas e a disponibilidade de sítios de oviposição frequentemente temporários e apresenta uma fase larval usualmente inferior a dois meses (BOKERMANN, 1962).

Colli (2005) apresentou um cenário biogeográfico para a diversificação do Cerrado, no qual frisa que o impacto dos ciclos climáticos do Quaternário na diversificação da biota sul-americana tem sido superestimado e que foi provavelmente no Terciário que o caráter da herpetofauna do Cerrado se definiu com o surgimento de uma biota endêmica. Os tempos de divergência obtidos para os clados das linhagens de *P. cuvieri* reflete o maior papel dos eventos orogênicos do Terciário (especialmente do Mioceno) na origem/divergência dos principais grupos, com poucas mudanças

demográficas drásticas durante as flutuações climáticas do Quaternário que contribuíram muito mais com diversificação nos ramos terminais e em nível populacional, padrão já observado em outros estudos com herpetofauna de áreas abertas (e.g. WÜSTER *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2011; WERNECK *et al.* 2012; SANTOS *et al.*, 2014). Apesar disso, não podemos excluir a hipótese de que ainda que seja em menor grau, as flutuações climáticas do Quaternário tenham desempenhado um papel relevante na diversificação das linhagens mais recentes de *P. cuvieri* como sugerido por Rull (2008; 2011) em um cenário de diversificação dirigida tanto pelos eventos do Terciário quanto do Quaternário.

Nossas análises filogenéticas e de difusão espacial indicam uma origem na região central do Brasil, com profundas divergências entre os principais grupos, seguidas por colonizações mais recentes em localidades adjacentes à Floresta Atlântica e à Floresta Amazônica. Padrão semelhante foi observado por Prado e colaboradores (2011) para o anuro *Hypsiboas albopunctatus*, e uma origem na região central também foi sugerida por Werneck e colaboradores (2012) para o lagarto *Phyllopezus pollicaris*. Aliás, Werneck e colaboradores (2012) hipotetizaram com base no padrão filogeográfico observado para *P. pollicaris*, que a porção central da América do Sul parece ter servido como centro de diversificação importante ao longo dos últimos milhões de anos, como resposta aos rearranjos geomorfológicos da paisagem. Esta hipótese é reforçada pelos padrões observados para *P. cuvieri*, para a qual ambas as árvores (de datação e difusão) recuperaram os três principais grupos profundamente divergentes e evidenciaram a complexa história das populações do Cerrado.

Os ciclos de transgressões marinhas nas bacias Amazônica e do Paraná durante o Mioceno Médio e Tardio, aliados ao soerguimento do Planalto Central Brasileiro no final do Terciário devem ter favorecido a diversificação por vicariância (RÄSÄNEN *et*

al., 1995; WEBB, 1995; LOVEJOY *et al.*, 1998; NORES, 2004; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005; WESSELINGH & SALO, 2006; LATRUBESSE *et al.*, 2007; HOORN *et al.*, 2010) entre as populações do haplogrupo III dos demais haplogrupos. Esses eventos devem ter dirigido a divergência mais antiga entre as linhagens de *Physalaemus cuvieri* no Cerrado (a principal divergência e o estabelecimento das primeiras populações se deram no Escudo Brasileiro) e impedido durante um longo período o estabelecimento de populações nas terras mais baixas (WEBB, 1995; ROSSETTI *et al.*, 2005), especificamente as populações das terras baixas à sudoeste e norte que são mais recentes (Figura 16).

As bacias hidrográficas também devem ter tido um efeito importante no padrão espacial da diversidade genética de *P. cuvieri*, ainda que a separação das linhagens não coincida totalmente com os limites geográficos das bacias, nossos resultados indicam haver uma diferenciação significativa entre populações de diferentes bacias hidrográficas, como por exemplo, a separação dos haplótipos localizados no nordeste em dois grupos: um situado na bacia do Atlântico Norte e outro no Atlântico Leste; ou ainda, a tendência à uma separação das bacias Amazônica e do Araguaia-Tocantins das bacias situados à sul e sudeste (Paraguai, Paraná, Atlântico Sudeste, Atlântico Sul e Uruguai). A formação das principais bacias de drenagem no Plioceno e a intensa atividade eólica no Quaternário com a formação dos leques aluviais e depósitos sedimentares que delimitaram o atual formato das bacias (STEVAUX, 1994; ASSINE & SOARES, 2004; ROSSETTI *et al.*, 2005), além de explicar a manutenção da separação dos três principais grupos de *P. cuvieri*, também podem explicar as misturas de linhagens observadas entre populações das bacias Araguaia-Tocantins e Paraná. É bem provável que as recentes reconexões das redes anastomóticas entre essas duas bacias promovidas pelos depósitos sedimentares holocênicos e/ou a pouca distância

entre as regiões limítrofes entre ambas (STEVAUX, 1994; STEVAUX & SOUZA, 2004) aliadas à ainda que baixa, mas ainda assim bem documentada vagilidade dos anuros (HEYER, 1988; GASCON *et al.*, 1998; AZEVEDO-RAMOS & GALATTI, 2002; GARDA & CANNATELLA, 2007) possa ter contribuído para manter um fluxo gênico entre estas duas bacias. Além disso, a expansão das pastagens promovendo o surgimento de novas paisagens abertas (SILVA & BATES, 2002; KLINK & MACHADO, 2005) além dos processos de erosão e assoreamento nas planícies aluviais (AQUINO *et al.*, 2009; LATRUBESSE *et al.*, 2009; LATRUBESSE & STEVAUX, 2009) podem estar favorecendo um contato secundário entre essas linhagens mais antigas. Análises envolvendo marcadores moleculares com taxas de mutação mais rápidas em uma abordagem de genética da paisagem podem ajudar a clarificar os padrões de diversificação nesta região.

A diagonal de formações abertas da América do Sul tem sofrido com a perda de habitat ao longo das últimas décadas, sobretudo devido às políticas de expansão das fronteiras agrícolas. O Cerrado especificamente está entre as savanas com alto grau de endemismo e de maior diversidade do mundo, contudo, figura também entre as áreas mais ameaçadas (MYERS *et al.*, 2000; SILVA & BATES, 2002; KLINK & MACHADO, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2011). Estudo sobre a diversidade genética nessa paisagem cada vez mais fragmentada são cruciais para a elaboração de planos de conservação e priorização, pois ajudam a revelar regiões com histórias evolutivas independentes e de grande potencial evolutivo que devem ser mantidas. Nossos resultados demonstram que as três principais linhagens observadas em *P. cuvieri* devem ser preservadas. A região central da América do Sul, em especial, deve ser foco de políticas de conservação por ser uma região na qual os processos evolutivos parecem ter promovido divergências em outros táxons também (PRADO *et al.*, 2011;

WERNECK *et al.*, 2012). O fato de nesta região também estarem presentes zonas de mistura de linhagens é mais um fator que corrobora sua importância enquanto local com grande potencial evolutivo (MORITZ *et al.*, 2009). Futuras análises levando em consideração a viabilidade populacional à longo prazo da espécie, acoplando ENM's sob respostas à futuras mudanças climáticas e análises da efetividade atual e futura das Áreas de Proteção Ambiental nessa região, podem indicar quanto da diversidade genética de *P. cuvieri* está e continuará sendo protegida e onde a atual rede de reservas brasileiras falha, fornecendo assim mais subsídios para planejamentos de conservação mais eficientes (*e.g.* COLLEVATTI *et al.*, 2013a).

CONCLUSÕES

Nossos resultados revelam uma complexa história de diversificação de *Physalaemus cuvieri*, uma espécie típica de áreas abertas da América do Sul. Os eventos orogênicos do Terciário exerceram papel fundamental no início de sua diversificação, que foi contínua e favorecida pelas flutuações climáticas do Quaternário, que contribuiu muito mais com a diversificação das linhagens mais jovens e com a estruturação populacional. Ainda que a separação das linhagens de *P. cuvieri* não coincida totalmente com os limites geográficos das bacias hidrográficas, elas devem ter tido um efeito importante no padrão espacial da diversidade genética da espécie, e podem estar diretamente relacionadas com o contato secundário entre as duas linhagens do Cerrado.

Estes resultados reforçam a perda da primazia dos eventos do Quaternário enquanto principais eventos geradores da diversidade da biota sul-americana. Ainda que eles sejam largamente empregados para explicar (e no geral explicuem) a diversidade dos ambientes florestais, no que diz respeito aos biomas de áreas abertas do continente sul-americano, os eventos geológicos mais antigos tiveram maior influência nos eventos de especiação e devem ter contribuído mais substancialmente na geração da diversidade da anurofauna desta região e, como no caso de *P. cuvieri*, das espécies amplamente distribuídas no continente.

Nossos resultados também evidenciam a região central da América do Sul como local de grande potencial evolutivo, tendo suma importância para a origem, especiação e manutenção da diversidade de *P. cuvieri*, e também para outros táxons da herpetofauna. Sendo de suma importância sua conservação, ainda mais premente dada as fortes pressões antropogênicas na região.

Em suma, *P. cuvieri* apresenta um padrão de divergências profundas e com forte estruturação regional de suas populações apesar de sua ampla distribuição e hábitos generalistas. A espécie deve ser claramente tratada como um complexo críptico de espécies e futuras revisões taxonômicas, levando-se em consideração os três grupos observados neste trabalho (um envolvendo as regiões Norte e Noroeste do Cerrado, outro as regiões Central, Sudeste, Sul e a porção do Nordeste mais próxima aos limites do Cerrado e o terceiro envolvendo as porções mais à nordeste da Caatinga e suas transições com a Floresta Atlântica) são necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A.N. Os domínios morfo-climáticos na América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia. São Paulo: Instituto de Geografia/USP, vol. 52.** 1977.
- AB'SABER, A.N. Spaces occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary ice ages. **Revista do Instituto Geológico**, 21(1-2), 71-78. 2000.
- ALEIXO, A. Historical diversification of a *Terra-Firme* forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. **Evolution**, 58(6), 1303-1317. 2004.
- ALEIXO, A. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: a case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 89, 383-395. 2006.
- ANANIAS, F.; BOMBEIRO, A.L.; SILVA, C.D.B.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. **Acta Zoologica Sinica**, 53(2), 285-293. 2007.
- ANDRADE-LIMA, D. Present-day refuges in Northeastern Brazil. In: **Biological diversification in the tropics**, Edited by G.T. Prance. Columbia University Press, New York. Pp. 245-251. 1982.
- ANTONELLI, A.; QUIJADA-MASCAREÑAS, A.; CRAWFORD, A.J.; BATES, J.M.; VELAZCO, P.M.; WÜSTER, W. Molecular studies and phylogeography of Amazonia tetrapods and their relation to geological and climate models. In: **Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past**. Edited by C. Hoorn & P. Wesselingh. Wiley-Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 2009.
- AQUINO, S.; LATRUBESSE, E.M.; BAYER, M. Assessment of wash load transport in the Araguaia River (Aruanã Gauge Station), Central Brazil. **Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis**, 16(2), 119-128. 2009.
- ARBOGAST, B.S.; KENAGY, G.J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography**, 28, 819-825. 2001.

- ASSINE, M.L.; SOARES, P.C. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. **Quaternary International**, 114, 13-34. 2004.
- AVISE, J.C. **Phylogeography**. Harvard University Press, London. 2000.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography – the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18, 489-522. 1987.
- AYRES, D.L.; DARLING, A.; ZWICKL, D.J.; BEERLI, P.; HOLDER, M.T.; LEWIS, P.O.; HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; SWOFFORD, D.L.; CUMMINGS, M.P.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A. BEAGLE: An Application Programming Interface and High-Performance Computation Library for Statistical Phylogenetics. **Systematic Biology**, 61(1): 170-173. 2012.
- AZEVEDO-RAMOS, C.; GALATTI, U. Patterns of amphibian diversity in Brazilian Amazonia: conservation implications. **Biological Conservation**, 103, 103-111. 2002.
- BÁEZ, A.M.; GASPARINI, Z.B. The South American Herpetofauna: an Evaluation of the Fossil Record. In: **The South American Herpetofauna: its Origin, Evolution, and Dispersal**. Edited by W. E. Duellman. The Museum of Natural History, The University of Kansas, Lawrence, Kansas, pp. 29-54. 1979.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16, 37-48. 1999.
- BARRIO, A. El genero *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. **Physis**, Tomo XXV, 70, 421-448. 1965.
- BEERLING, D.J.; OSBORNE, C.P. The origin of the savanna biome. **Global Change Biology**, 12, 2023-2031. 2006.
- BEHEREGARAY, L.B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, 17, 3754-3774. 2008.
- BEHEREGARAY, L.B.; CACCONE, A. Cryptic biodiversity in a changing world. **Journal of Biology**, 6:9. 2007.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22(3), 149-155. 2007.

- BIELEJEC, F.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A.; LEMEY, P. SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. **Bioinformatics**, 27(20), 2910-2912. 2011.
- BOKERMANN, W.C.A. Observações biológicas sobre “*Physalaemus cuvieri*” Fitz., 1926 (Amphibia, Salientia). **Revista Brasileira de Biologia**, 22(4), 391-399. 1962.
- BOSSUYT, F.; MILINKOVITCH, M.C. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 97, 6585-6590. 2000.
- CABANNE, G.S.; D'HORTA, F.M.; MEYER, D.; SILVA, J.M.C.; MIYAKI, C.Y. Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 103, 801-820. 2011.
- CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R.T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHIGER, R.; NACIRI, Y. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, 17, 3147-3159. 2008.
- CAMARGO, A.; DE SÁ, R.O.; HEYER, W.R. Phylogenetic analyses of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Anura, Leptodactylidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 87, 325-341. 2006.
- CANNATELA, D.C.; DUELLMAN, W.E. Leptodactylid frogs of the *Physalaemus pustulosus* group. **Copeia**, 1984(4), 902-921. 1984.
- CANNATELLA, D.C.; HILLIS, D.M.; CHIPPINDALE, P.T.; WEIGT, L.; STANLEY RAND, A. RYAN, M.J. Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with an examination of data incongruence. **Systematic Biology**, 47(2), 311-335. 1998.
- CANTANHEDE, A.M.; SILVA, V.M.F.; FARIAS, I.P.; HRBEK, T.; LAZZARINI, S.T.; ALVES-GOMES, J. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). **Molecular Ecology**, 14, 401-413. 2005.

- CARAMASCHI, U.; CARCERELLI, L.C.; FEIO, R.N. A new species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil. **Herpetologica**, 47(2), 148-151. 1991.
- CARAMASCHI, U.; FFEIO, R.N.; GUIMARÃES NETO, A.S. A new brightly colored species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil. **Herpetologica**, 59(4), 519-524. 2003.
- CARNAVAL, A.C. Phylogeography of four frogs species in forest fragments of northeastern Brazil - a preliminary study. **Integr. Comp. Biol.**, 42, 913-921. 2002.
- CARNAVAL, A.C.; BATES, J.M. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climatic change in northeastern Brazil. **Evolution**, 61(12), 2942-2957. 2007.
- CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, 323, 785-789. 2009.
- CARSTENS, B.C.; RICHARDS, C.L. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. **Evolution**, 61, 1439-1454. 2007.
- CHEK, A.A.; LOUGHEED, S.C.; BOGART, J.P.; BOAG, P.T. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 18(3), 370-385. 2001.
- CODY, S.; RICHARDSON, J.E.; RULL, V.; ELLIS, C.; TOBY PENNINGTON, R. The Great American Biotic Interchange revisited. **Ecography**, 33, 326-332. 2010.
- COLE, M. **The Savannas: Biogeography and Geobotany**. Academic Press, London. 1986.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, 12, 105-115. 2003.
- COLLEVATTI, R.G.; RABELO, S.G.; VIEIRA, R.F. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), and endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, 104, 655-664. 2009.
- COLLEVATTI, R.G.; CASTRO, T.G.; LIMA, J.S.; TELLES, M.P.C. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree

- species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. **Ecology and Evolution**, 2(5), 1024-1035. 2012a.
- COLLEVATTI, R.G.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; SOUZA-NETO, A.C.; FRANCO, A.A.; OLIVEIRA, G.; TERRIBILE, L.C. Recovering the demographical history of a Brazilian Cerrado tree species *Caryocar brasiliense*: coupling ecological niche modeling and coalescent analyses. **Natureza & conservação**, 10(2), 169-176. 2012b.
- COLLEVATTI, R.G.; TERRIBILE, L.C.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; NABOUT, J.C.; OLIVEIRA, G.; RANGEL, T.F.; RABELO, S.G.; DINIZ-FILHO, J.A.F. A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a neotropical seasonally dry forest tree species. **Molecular Ecology**, 21, 5845-5863. 2012c.
- COLLEVATTI, R.G.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; OLIVEIRA, G.; DOBROVOLSKI, R.; TERRIBILE, L.C. Stability of Brazilian Seasonally Dry Forests under climate change; inferences for long-term conservation. **American Journal of Plant Sciences**, 4, 792-805. 2013a.
- COLLEVATTI, R.G.; TERRIBILE, L.C.; OLIVEIRA, G.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; NABOUT, J.C.; RANGEL, T.F.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Drawbacks to palaeodistribution modelling: the case of South American seasonally dry forests. **Journal of Biogeography**, 40, 345-358. 2013b.
- COLLI, G. R. 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. In J. C. Souza-Silva e J. M. Felfili, editors. **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. pp. 247-264. 2005.
- CRAWFORD, A.J. Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Ecology**, 12, 2525-2540. 2003.
- DA SILVA, M.N.F.; PATTON, J.L. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. **Molecular Ecology**, 7, 475-486. 1998.
- DARST, C.R.; CANNATELLA, D.C. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 31, 462-475. 2004.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; BINI, L.M.; RANGEL, T.F.; LOYOLA, R.D.; HOF, C.; NOGUÉS-BRAVO, D.; ARAÚJO, M.B. Partitioning and mapping uncertainties in

- ensembles of forecasts of species turnover under climate change. **Ecography**, 32(6), 897-906. 2009.
- DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 22, 1185–1192. 2005.
- DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. **BEASTv1.8.0**. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>, 2013.
- DUELLMAN, W.E. The Central American Herpetofauna: an Ecological Perspective. **Copeia**, 1966(4), 700-719. 1966.
- DUELLMAN, W.E. (Ed) **The South American Herpetofauna: its origin, evolution and dispersal**. Lawrence, Kansas, The Museum of Natural History, The University of Kansas. 7, 1-485. 1979.
- DUELLMAN, W.E. Patterns of Species Diversity in Anuran Amphibians in the American Tropics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 75(1), 79-104. 1988.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32(5), 1752-1797. 2004.
- 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**, 7, 247. 2007.
- ERSTS, P.J. [Internet] **Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3)**. American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Acessado em fevereiro de 2014.
- EVANS, B.J.; KELLEY, D.B.; TINSLEY, R.C.; MELNICK, D.J.; CANNATELLA, D.C. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33, 197-213. 2004.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. **Arlequin ver 3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data**, 1995-2006.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P., QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, 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, 1-240. 2005.
- FEIO, R.N.; POMBAL JR., J.P.; CARAMASCHI, U. A new *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of Minas Gerais, Brazil. **Copeia**, 1999(1), 141-145. 1999.
- FERREIRA, M.A.R.; SUCHARD, M.A. Bayesian analysis of elapsed times in continuous-time Markov chains. **Canadian Journal of statistics**, 26, 355-368. 2008.
- FITZPATRICK, S.W.; BRASILEIRO, C.A.; HADDAD, C.F.B.; ZAMUDIO, K.R. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, 18, 2877-2896, 2009.
- 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**, 10, 1-10. 2007a.
- FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M-D.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 43, 567-582. 2007b.
- FREELAND, J. Phylogeography. In: **Molecular Ecology**. John Wiley and Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England. 2005.
- FROST, D.R. **Amphibians Species of the World: an Online Reference. Version 6.0.** (22 January, 2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; de SÁ, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. The

- Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 297, 1-370. 2006.
- FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147, 915-925. 1997.
- FUNK, W.C.; CALDWELL, J.P.; PEDEN, C.E.; PADIAL, J.M.; DE LA RIVA, I.; CANNATELLA, D.C. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian Forest frog, *Physalaemus petersi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 44, 825-837. 2007.
- GAMBLE, T.; SIMONS, A.M.; COLLI, G.R.; VITT, L.J. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 46, 269-277. 2008.
- GARDA, A.A.; CANNATELLA, D.C. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 44, 104-114. 2007.
- GASCON, C.; LOUGHEED, S.C.; BOGART, J.P. Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: a test of the riverine barrier hypothesis. **Biotropica**, 30(1), 104-119. 1998.
- GIUGLIANO, L.G.; COLLEVATTI, R.G.; COLLI, G.R. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, 45, 168-179. 2007.
- GÓMEZ, R.O.; PÉREZ BEN, C.M.; IGNACIO STEFANINI, M. Oldest record of *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura, Leptodactylidae), from the early Pliocene of the South American Pampas. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 33(6), 1321-1327. 2013.
- GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; BRUCEMEANS, D.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E.; WHEELER, W.C. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 299, 1-262. 2006.
- GRANT, W.S.; BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, 89(5), 415-426. 1998.

- GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, 15, 3969-3982. 2006.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian birds. **Science**, 165, 131-137. 1969.
- HARPENDING, R. C., Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Hum. Biol.** 66, 591-600. 1994.
- HERNÁNDEZ, R.M.; JORDAN, T.E.; DALENZ FARJAT, A.; ECHAVARRÍA, L.; IDLEMAN, B.D.; REYNOLDS, J.H. Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in southern Bolivia and Argentina. **Journal of South American Earth Sciences**, 19, 495-512. 2005.
- HEYER, W.R. Systematics of the fuscus group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County**, 29, 1-85. 1978.
- HEYER, W.R. On frog distribution patterns east of the Andes. In: **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns**, Edited by P.E. Vanzolini & W.R. Heyer. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1988.
- HEYER, W.R.; MAXSON, L.R. Distributions, relationships, and zoogeography of lowland frogs – the *Leptodactylus* complex in South America, with special reference to Amazonia. In G.T. Prance (Ed.). **Biological Differentiation in the Tropics**, p. 375-388. Columbia University Press, New York. 1982.
- HEYER, W.R.; WOLF, A.J. *Physalaemus crombiei* (Amphibia: Leptodactylidae): a new frog species from Espírito Santo, Brazil with comments on the *P. signifier* group. **Proceedings of Biological Society of Washington**, 102, 500-506. 1989.
- HICKERSON, M.J.; CARSTENS, B.C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K.A.; GRAHAM, C.H.; JOHNSON, J.B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P.F.; YODER, A.D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54, 291-301. 2010.
- 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.; HOOGHMISTRA, 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.
- IRIONDO, M. Geomorphology and late Quaternary of the Chaco (South America). **Geomorphology**, 7, 289-303. 1993.
- IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.2. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 22 January 2014.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, 19(3), 707-713. 2005.
- KNOWLES, L.L.; MADDISON, W.P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, 11, 2623-2635. 2002.
- KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** 86, 6196-6200. 1989.
- KRONAUER, D.J.C.; BERGMANN, P.J.; MERCER, J.M.; RUSSELL, A.P. A phylogeographically distinct and deep divergence in the widespread Neotropical turnip-tailed gecko, *Thecadactylus rapicauda*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 34, 431-437. 2005.
- LATRUBESSE, E.M.; SILVA, S.A.F.; COZZUOL, M.; ABSY, M.L. Late Miocene continental sedimentation in southwestern Amazonia and its regional significance: biotic and geological evidence. **Journal of South American Earth Sciences**, 23, 61-80. 2007.
- LATRUBESSE, E.M.; AMSLER, M.L.; MORAIS, R.P.; AQUINO, S. The geomorphologic response of a large pristine alluvial river to tremendous deforestation in South American tropics: the case of the Araguaia River. **Geomorphology**, 113, 239-252. 2009.
- LATRUBESSE, E.M.; STEVAUX, J.C. Hydro-geomorphology, sediment transport and human impact in large South American Rivers: Preface. **Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis**, 16(2), 77-78. 2009.
- LEDRU, M-P. Late Quaternary environmental and climatic changes in Central Brazil. **Quaternary Research**, 39, 90-98. 1993.
- LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. **PLOS Computational Biology**, 5(9). 2009.

- LEMMON, E.M.; LEMMON, A.R.; CANNATELLA, D.C. Geological and climatic forces driving speciation in the continentally distributed trilling chorus frogs (*Pseudacris*). **Evolution**, 61-9, 2086-2103. 2007.
- LIMA, N.E.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; TINOCO, C.F.; TERRIBILE, L.C.; COLLEVATTI, R.G. Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. **Journal of Biogeography**, DOI: 10.1111/jbi.12269. 2014.
- LOBO, F. Descripción osteológica de *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leptodactylidae) y comparación com otras espécies del gênero. **Acta Zoologica Lilloana**, 42(1), 51-56. 1992.
- LOVEJOY, N.R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A.P. Marine incursion into South America. **Nature**, 396, 421-422. 1998.
- LYNCH, J.D. Systematic status of the American leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. **Copeia**, 1970(3), 488-496. 1970.
- LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Miscellaneous Publication, Museum of Natural History, University of Kansas**, 53, 1-238. 1971.
- MACEY, J.R.; SCHULTE, J.A.; LARSON, A.; FANG, Z.L.; WANG, Y.Z.; TUNIYEV, B.S.; PAPENFUSS, T.J. Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: a case of vicariance and dispersal. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 9, 80-87. 1998.
- MACIEL, N.M.; COLLEVATTI, R.G.; COLLI, G.R.; SCHWARTZ, E.F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 57(2), 787-797. 2010.
- MARTINS, F.M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, 104, 499-509. 2011.
- MARTINS, F.M.; DITCHFIELD, A.D.; MEYER, D.; MORGANTE, J.S. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, 45(4), 372-378. 2007.

- MIJARES, A.; RODRIGUES, M.T.; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. 2010.
- MININ, V.N.; BLOOMQUIST, E.W.; SUCHARD, M.A. Smooth Skyride through a Rough Skyline: Bayesian Coalescent-Based Inference of Populations Dynamics. **Molecular Biology and Evolution**, 25(7), 1459-1471. 2008.
- MONTEIRO, F.A.; BARRETT, T.V.; FITZPATRICK, S.; CORDON-ROSALES, C.; FELICIANGELI, D.; BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology**, 12, 997-1006. 2003.
- MORAES, E.M.; YOTOKO, K.S.C.; MANFRIN, M.H.; SOLFERINI, V.N.; SENE, F.M. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, 36, 2136-2147. 2009.
- MORELLO, J. Bases para el estudio fitoecológico de los grandes espacios (el Chaco argentino). **Ciencia e Investigación (Buenos Aires)**, 23(6), 252-257. 1967.
- MORITZ, C.; FAITH, D.P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, 7, 419-429. 1998.
- MORITZ, C.; SCHNEIDER, C.; WAKE, D. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. **Systematic Biology**, 41, 273-291. 1992.
- MORITZ, C.; HOSKIN, C.J.; MACKENZIE, J.B.; PHILLIPS, B.L.; TONIONE, M.; SILVA, N.; VANDERWAL, J.; WILLIAMS, S.E.; GRAHAM, C.H. Identification and dynamics of a cryptic suture zone in tropical rainforest. **Proceedings of the Royal Society B**, 276, 1235-1244. 2009.
- MORRONE, J.J. A new regional biogeography of the Amazonian subregion mainly based on animal taxa. **Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología**, 71(2), 99-123. 2000.
- MORRONE, J.J. Presentación sintética de un Nuevo esquema biogeográfico de América Latina y el Caribe. In: **Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática PrIBES**. Edited by C. Costa, S.A. Vanin, J.M. Lobo & A. Melic. Monografías Tercer Milenio. 2002.

- MORRONE, J.J. Biogeography areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeography and cladistics analyses of the entomofauna. **Annual Review of Entomology**, 51, 467-494. 2006.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403, 853-858. 2000.
- NASCIMENTO, F.F.; LAZAR, A.; MENEZES, A.N.; DURANS, A.M.; MOREIRA, J.C.; SALAZAR-BRAVO, J.; D'ANDREA, P.S.; BONVICINO, C.R. The role of historical barriers in the diversification processes in open vegetation formations during the Miocene/Pliocene using an ancient rodent lineage as a model. **PLoS One**, 8, 1-13. 2013.
- NASCIMENTO, L.B.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, 63(2), 297-320. 2005.
- NOGUEIRA, C.; RIBEIRO, S.; COSTA, G.C.; COLLI, G.R. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot: distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. **Journal of Biogeography**, 38, 1907-1922.
- NORES, M. The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. **Global Ecology and Biogeography**, 13, 149-161. 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; RATTER, J.A. Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. In: **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. Edited by P.S. Oliveira & R.J. Marquis. Columbia University Press, New York, pp. 91-120. 2002.
- PABIJAN, K.; WOLLENBERG, C.; VENCES, M. Small body size increases the regional differentiation of populations of tropical mantellid frogs (Anura: Mantellidae). **Journal of Evolutionary Biology**, 25(1), 2310-2324. 2012.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES JR., J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure

- coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 85, 13-26. 2005.
- PENNINGTON, R.T.; PRADO, D.E.; PENDRY, C.A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, 27, 261-273. 2000.
- PENNINGTON, R.T.; LEWIS, G.P.; RATTER, J.A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests. In: **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation**. Edited by R.T. Pennington, G.P. Lewis & J.A. Ratter. CRC Press, London, pp. 1-29, 2006.
- PINHEIRO, F.; DE BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M.F.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, 38, 1923-1935. 2011.
- POSADA, D. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25:1253-1256, 2008.
- PRADO, C.P.A.; HADDAD, C.F.B.; ZAMUDIO, K.R. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. **Molecular Ecology**, 21, 921-941. 2012.
- PRADO, D.E. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I. A review. Contribution to the study of the flora and vegetation of the Chaco. V. **Candollea**, 48 (1), 145-172. 1993a.
- PRADO, D.E. What is the Gran Chaco vegetation in South America? II. A redefinition. Contribution to the study of the flora and vegetation of the Chaco. VII. **Candollea**, 48 (2), 615-629. 1993b.
- PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editado por J.R. Leal, M. Tabarelli, J.M.C. Silva. Editora Universitária UFPE, Recife, pp. 3-73. 2003.
- PRADO, D.E.; GIBBS, P.E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 80, 902-927. 1993.

- PRÖHL, H.; RON, S.R.; RYAN, M.J. Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American túngara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. **BMC Evolutionary Biology**, 20, 146. 2010.
- PYRON, R.A.; WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61, 543–583. 2011.
- QUEIROZ, L.P. The Brazilian Caatinga: Phytogeographical Patterns Inferred from Distribution Data of the Leguminoase. In: **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation**. Edited by R.T. Pennington, G.P. Lewis & J.A. Ratter. CRC Press, London, pp. 121-157, 2006.
- RAMBAUT, A.; SUCHARD, .M.A.; XIE, D.; DRUMMOND, A.J. **Tracer v1.5**, Disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2013.
- RAMOS, A.C.S.; LEMOS-FILHO, J.P.; RIBEIRO, R.A.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. **Annals of Botany**, 100(6), 1219-1228. 2007.
- RANGEL, T.F.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; BINI, L.M. SAM: a comprehensive application for Spatial Analysis in Macroecology. **Ecography**, 33, 1-15. 2010.
- RÄSÄNEN, M.E.; LINNA, A.M.; SANTOS, J.C.R.; NEGRI, F.R. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian Foreland Basin. **Science**, 269, 386-390. 1995.
- RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80, 223-230. 1997.
- REEDER, T.W. Phylogenetic relationships among Phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 4(2), 203-222. 1995.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma do Cerrado: os biomas do Brasil. In: Cerrado: ambiente e flora. EMBRAPA, Planaltina, DF, pp. 89-116. 1998.
- RIDDLE, B.R.; DAWSON, M.N.; HADLY, E.A.; HAFNER, D.J.; HICKERSON, M.J.; MANTOOTH, S.J.; YODER, A.D. The role of molecular genetics in sculpting the future of biogeography. **Progress in Physical Geography**, 32(2), 173-202. 2008.

- ROBERTS, J.L.; BROWN, J.L.; SCHULTE, R.; ARIZABAL, W.; SUMMERS, K. Rapid diversification of colouration among populations of a poison frog isolated on sky peninsulas in the central cordilleras of Peru. **Journal of Biogeography**, 34(3), 417-426. 2007.
- RODRIGUES, M.T. Distribution of lizards of the genus *Tropidurus* in Brazil (Sauria, Iguanidae). In: **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Edited by W.R. Heyer & P.E. Vanzolini. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp 305-315. 1988.
- RODRIGUES, M.T. Herpetofauna da Caatinga. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editado por J.R. Leal, M. Tabarelli, J.M.C. Silva. Editora Universitária UFPE, Recife, pp. 181-236. 2003.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. **Molecular Biology and Evolution**, 9(3), 552-569, 1992.
- ROSEN, D.E. A Vicariance Model of Caribbean Biogeography. **Systematic Biology**, 24(4), 431-464, 1975.
- ROSSETTI, D.F.; TOLEDO, P.M.; GÓES, A.M. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implication for biogeography and evolution. **Quaternary Research**, 63, 78-89. 2005.
- RULL, V. Speciation timing and Neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, 17, 2722-2729. 2008.
- RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, 26(10), 508-513. 2011.
- RUVINSKY, I.; MAXSON, L.R. Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 5(3), 533-547, 1996.
- SALGADO-LABORIAU, M.L.; CASSETI, V.; FERRAZ-VICENTINI, K.R.; MARTIN, L.; SOUBIÈS, F.; SUGUIO, K.; TURCQ, B. Late Quaternary vegetational and climatic changes in cerrado and palm swamp from Central Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 128, 215-226. 1997.
- SANTOS, M.G.; NOGUEIRA, C.; GIUGLIANO, L.G.; COLLI, G.R. Landscape evolution and phylogeography of *Micrablepharus atticolus* (Squamata,

- Gymnophthalmidae), and endemic lizard of the Brazilian Cerrado. **Journal of Biogeography**, DOI: 10.1111/jbi.12291. 2014.
- SANTOS, U.; VÖLCKER, C.M.; BELEI, F.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, 75, 2326-2343. 2009.
- SAVAGE, J.M. The Origins and History of the Central American Herpetofauna. **Copeias** 1966(4), 719-766. 1966.
- SAVAGE, J.M. The Isthmian Link and the evolution of neotropical mammals. **Los Angeles County Museum Contributions in Science**. 260, 1-51. 1974.
- SAVAGE, J.M. The enigma of the Central American Herpetofauna: Dispersal or Vicariance? **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 69(3), 464-547. 1982.
- SCHEFFLER, S.M.; MARTINS, G.R.; KASHIMOTO, E.M.; OLIVEIRA, A.M. Revisão sobre a paleontologia no estado do Mato Grosso do Sul: fósseis e afloramentos descritos. **Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium**, 1, 65-99. 2010
- SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. **Genetics**, 152, 1079-1089, 1999.
- SÉRSIC, A.N.; COSACOV, A.; COCUCCI, A.A.; JOHNSON, L.A.; POZNER, R.; AVILLA, L.J.; SITES JR., J.W.; MORANDO, M. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. **Biological Journal of the Linnean Society**, 103, 475-494. 2011.
- SILVA, J.M.C.; BATES, J.M. Biogeography patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, 52(3), 225-234. 2002.
- SPICHIGER, R.; CALENGE, C.; BISE, B. Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Paraná Basin. **Journal of Biogeography**, 31, 1489-1501. 2004.
- STEVAUX, J.C. The upper Paraná river (Brazil): geomorphology, sedimentology and paleoclimatology. **Quaternary International**, 21, 143-161. 1994.
- STEVAUX, J.C.; SOUZA, I.A. Floodplain construction in an anastomosed river. **Quaternary International**, 114, 55-65. 2004.

- TAJIMA, F. Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123, 585-595, 1989.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10, 512-526. 1993.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28, 2371-2379. 2011.
- TERRIBILE, L.C.; LIMA-RIBEIRO, M.S.; ARAÚJO, M.B.; BIZÃO, N.; COLLEVATTI, R.G.; DROBOVOLSKI, R.; FRANCO, A.A.; GUILHAUMON, F.; LIMA, J.S.; MURAKAMI, D.M.; NABOUT, J.C.; OLIVEIRA, G.; OLIVEIRA, L.K.; RABELO, S.G.; RANGEL, T.F.; SIMON, L.M.; SOARES, T.N.; TELLES, M.P.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Areas of Climate Stability of Species ranges in the Brazilian Cerrado: Disentangling Uncertainties Through Time. **Natureza & Conservação**, 10(2), 152-159. 2012.
- TÁRANO, Z.; RYAN, M.J. No pre-existing biases for heterospecific call traits in the frog *Physalaemus enesefae*. **Animal Behaviour**, 64, 599-607. 2002.
- THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA JR., F.A.; ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55, 1018-1031. 2010.
- TOMATIS, C.; BALDO, D.; KOLENC, F.; BORTEIRO, C. Chromosomal variation in the species of the *Physalaemus henselii* group (Anura: Leiuperidae). **Journal of Herpetology**, 43, 555-560. 2009.
- TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, 22, 1193-1213. 2013.
- VANZOLINI, P.E. A quasi-historical approach to the natural history of the differentiation of reptiles in tropical geographic isolates. **Papéis Avulsos de Zoologia, S. Paulo**, 39, 189-204. 1981.
- WEBB, S.D. A history of savanna vertebrates in the New World. Part II: South America and the great interchange. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 9, 393-426. 1978.

- WEBB, S.D. Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. **Science**, 269, 361-362. 1995.
- WEIGT, L.A.; CRAWFORD, A.J.; RAND, A.S.; RYAN, M.J. Biogeography of the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. **Molecular Ecology**, 14, 3857-3876. 2005.
- WESSELINGH, F.P.; SALO, J.A. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. **Scripta Geologica**, 133, 439-458. 2006.
- WERNECK, F.P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, 30 (13-14), 1630-1648. 2011.
- WERNECK, F.P.; GAMBLE, T.; COLLI, G.R.; RODRIGUES, M.T.; SITES JR., J.W. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'Dry Diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of Geckos. **Evolution**, 66, 3014-3034. 2012.
- WERNECK, F.P.; GIUGLIANO, L.G.; COLLEVATTI, R.G.; COLLI, G. Phylogeny, biogeography, and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). **Molecular Ecology**, 18, 262-278. 2009.
- WIENS, J.J.; FETZNER, JR., J.W.; PARKINSON, C.L.; REEDER, T.W. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. **Systematic Biology**, 54, 719-748, 2005.
- WÜSTER, W.; FERGUSON, J.E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A.; POOK, C.E.; SALOMÃO, M.G.; THORPE, R.S. Tracing and invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, 14, 1095-1108. 2005.
- XIA, X. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 30(7), 1720-1728. 2013.
- YOKOYAMA, S.; TADA, T. Evolutionary Dynamics of Rhodopsin Type 2 Opsins in Vertebrates. **Molecular Biology and Evolution**, 27(1), 133-141. 2010.
- ZANELLA, F.C.V.; MARTINS, C.F. Abelhas da Caatinga: Biogeografia, Ecologia e Conservação. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editado por J.R. Leal, M. Tabarelli, J.M.C. Silva. Editora Universitária UFPE, Recife, pp. 75-134. 2003.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T.J.C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, 101, 109-119. 2008.

ANEXOS

Tabela A1 – Classificação das 76 localidades amostradas para as análises filogeográficas de *Physalaemus cuvieri* quantos aos domínios e bacias hidrográficas. Siglas: HR-A (Amazônia), HR-AL (Atlântico Leste), HR-ANO (Atlântico Norte), HR-ANOR (Atlântico Nordeste Ocidental), HR-AS (Atlântico Sul), HR-ASE (Atlântico Sudeste), HR-P (Paraguai), HR-PA (Parnaíba), HR-PR (Paraná), HR-SF (São Francisco), HR-T-A (Araguaia-Tocantins) e HR-U (Uruguai).

	Populações	Siglas	Classificação Domínios	Classificação Bacias
1	Água Doce - SC	PCR	Floresta Atlântica	HR-PR
2	Alvorada do Norte - GO	PCD	Cerrado	HR-T-A
3	Andradas - MG	PCF	Cerrado/Floresta Atlântica	HR-PR
4	Aparecida do Rio Doce - GO	PCA	Cerrado	HR-T-A
5	Aragarças - GO	PC(A)	Cerrado	HR-T-A
6	Araguapaz - GO	PCA(AR)	Cerrado	HR-T-A
7	Araputanga - MT	PCU	Cerrado/Floresta Amazônica	HR-P
8	Areia – PB	PCAD	Caatinga Caatinga/Floresta	HR-ANO
9	Arês – RN	PCAF	Atlântica	HR-ANO
10	Assis – SP	PCAG	Cerrado	HR-PR
11	Bauru – SP	PCAH	Cerrado	HR-PR
12	Blumenau – SC	PCX	Floresta Atlântica	HR-AS
13	Caetité – BA	PCAI	Caatinga Caatinga/Floresta	HR-AL
14	Cagaretama - RN	PCZ	Atlântica	HR-ANO
15	Caiapônia - GO	PC(C)	Cerrado	HR-T-A
16	Capão Bonito - SP	PCAE	Floresta Atlântica	HR-PR
17	Caseara – TO	PCN	Cerrado	HR-T-A
18	Caxambu do Sul - SC	PCV	Floresta Atlântica	HR-U
19	Cerro Largo - RS	PCAJ	Floresta Atlântica	HR-U
20	Chapada Diamantina (Lençóis) - BA	PCAZ	Caatinga	HR-AL
21	Chapadão do Sul - MS	PCAW	Cerrado	HR-PR
22	Chapécó – SC	PCQ	Floresta Atlântica	HR-U
23	Chavantes – SP	PCAK	Cerrado/Floresta Atlântica	HR-PR
24	Cocalzinho de Goiás - GO	PC(CO)	Cerrado	HR-T-A
25	Concórdia (Parque Estadual Fritz Plaumann) - SC	PCP	Floresta Atlântica	HR-U

26	Crato – CE	PCAC	Caatinga	HR-ANO
27	Cristalina – GO	PC(CR)	Cerrado Caatinga/Floresta	HR-PR
28	Goianinha - RN	PCY	Atlântica	HR-ANO
29	Goianésia - GO	PC(G)	Cerrado	HR-T-A
30	Goiatuba – GO	PC(Gt)	Cerrado	HR-PR
31	Goiânia – GO	PC(Gu)	Cerrado	HR-PR
32	Icém – SP	PCAL	Cerrado/Floresta Atlântica	HR-PR
33	Ipuaçu – SC	PCAM	Floresta Atlântica	HR-PR
34	Itaberaí – GO	PC(I)	Cerrado	HR-T-A
35	Itirapina – SP	PCAN	Cerrado	HR-PR
36	Jacarezinho - PR	PCAO	Floresta Atlântica	HR-PR
37	Lauro Müller - SC	PCAP	Floresta Atlântica	HR-AS
38	Lucas do Rio Verde - MT	LRV	Cerrado Caatinga/Floresta	HR-A
39	Macaíba – RN	PCAB	Atlântica	HR-ANO
40	Mambaí – GO	PC(Ma)	Cerrado	HR-T-A
41	Mara Rosa - GO	PC(MR)	Cerrado	HR-T-A
42	Marabá – PA	PCAQ	Floresta Amazônica	HR-T-A
43	Mateiros – TO	PCL	Cerrado	HR-T-A
44	Mineiros – GO	PC(M)	Cerrado	HR-PR
45	Morrinhos - GO	PC(Mo)	Cerrado	HR-PR
46	Niquelândia - GO	PC(N)	Cerrado	HR-T-A
47	Nova Crixás - GO	PC(NC)	Cerrado Cerrado/Floresta	HR-T-A
48	Nova Lacerda - MT	NVL	Amazônica	HR-A
49	Nova Ubiratã - MT	PCG	Cerrado	HR-A
50	Ouro Preto - MG	PCJ	Floresta Atlântica	HR-ASE
51	Palmas – TO	PCC	Cerrado	HR-T-A
52	Paracatu – MG	PCK	Cerrado	HR-SF
53	Paranã – GO	PCE	Cerrado	HR-T-A
54	Paraúna – GO	PC(Pa)	Cerrado	HR-PR
55	Piracanjuba - GO	PC(Pi)	Cerrado	HR-PR
56	Pirenópolis - GO	PC(PR)	Cerrado	HR-T-A
57	Pontalina – GO	PC(PT)	Cerrado	HR-PR
	Ponte Serrada e Passos Maia (Parque Nacional das			
58	Araucárias) - SC	PCS	Floresta Atlântica	HR-U
59	Porangatu - GO	PC(P)	Cerrado	HR-T-A
60	Porto Franco - MA	PCAR	Cerrado	HR-T-A
61	Quatro Barras - PR	PCAS	Floresta Atlântica	HR-ASE
62	Quirinópolis - GO	PC(Q)	Cerrado	HR-PR
63	Rio Claro – SP	PCAT	Cerrado	HR-PR
64	Santa Isabel - SP	PCAU	Floresta Atlântica	HR-PR
65	Silvânia – GO	PC(S)	Cerrado	HR-PR
66	Santa Terezinha - MT	PCO	Cerrado	HR-T-A

67	São Domingos - GO	PCB	Cerrado	HR-T-A
68	São Gabriel do Oeste - MS	PCAY	Cerrado	HR-P
69	São João da Aliança - GO	PC(SJ)	Cerrado	HR-T-A
			Cerrado/Floresta	
70	São Luiz – MA	PCAV	Amazônica	HR-ANOR
71	São Miguel do Araguaia - GO	PC(SM)	Cerrado	HR-T-A
72	Tailândia – PA	PCW	Floresta Amazônica	HR-T-A
73	Teodoro Sampaio - SP	PCAX	Cerrado/Floresta Atlântica	HR-PR
74	Uberlândia - MG	PC(Ub)	Cerrado	HR-PR
75	Uruaçu – GO	PC(U)	Cerrado	HR-T-A
76	Vilhena – RO	PCM	Cerrado	HR-A

Tabela A2 – Pontos de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* utilizados na paleomodelagem.

Município	Estado	País	Long	Lat	Código Coleção
Campo Alegre	AL	Brasil	-36.3508	-9.78194	CFBH
Ipiaú	BA	Brasil	-39.7342	-14.1381	MBML-Anfibios
Itabela	BA	Brasil	-39.5533	-16.575	MBML-Anfibios
Palmeiras	BA	Brasil	-41.5589	-12.5292	ZUEC-AMP
Vitória da Conquista	BA	Brasil	-40.8394	-14.8661	ZUEC-AMP
Irecê	BA	Brasil	-41.8556	-11.3044	ZUEC-AMP
Maracás	BA	Brasil	-40.4306	-13.4411	ZUEC-AMP
Fortaleza	CE	Brasil	-38.5	-3.7166	LACM
Ubajara	CE	Brasil	-40.9211	-3.85444	CFBH
Brasília	DF	Brasil	-47.9297	-15.7797	DZSJRP
Castelo	ES	Brasil	-41.1847	-20.6036	MBML-Anfibios
Fundão	ES	Brasil	-40.4067	-19.9325	MBML-Anfibios
Marechal Floriano	ES	Brasil	-40.6831	-20.4128	MBML-Anfibios
Santa Teresa	ES	Brasil	-40.6003	-19.9364	MBML-Anfibios
Alfredo Chaves	ES	Brasil	-40.7497	-20.635	MBML-Anfibios
Baliza	GO	Brasil	-52.545	-16.1961	CFBH
Piranhas	GO	Brasil	-51.8222	-16.4269	MCP-Anfibios
Açailândia	MA	Brasil	-47.5047	-4.94667	CFBH
Balsas	MA	Brasil	-46.0356	-7.5325	ZUEC-AMP
Vargem Grande	MA	Brasil	-43.9156	-3.54333	ZUEC-AMP
Grão Mogol	MG	Brasil	-42.8897	-16.5594	CFBH
Poços de Caldas	MG	Brasil	-46.5614	-21.7878	CFBH
Presidente Olegário	MG	Brasil	-46.4181	-18.4178	CFBH
Santana do Riacho	MG	Brasil	-43.7144	-19.1689	CFBH
Viçosa	MG	Brasil	-42.8817	-20.7542	ZUEC-AMP
Alpinópolis	MG	Brasil	-46.3881	-20.8636	ZUEC-AMP
Camanducaia	MG	Brasil	-46.1444	-22.7556	ZUEC-AMP
Jaboticatubas	MG	Brasil	-43.745	-19.5136	ZUEC-AMP
Conselheiro Lafaiete	MG	Brasil	-43.7858	-20.6606	ZUEC-AMP
Munhoz	MG	Brasil	-45.1653	-22.6133	ZUEC-AMP
Congonhas	MG	Brasil	-43.8578	-20.4997	ZUEC-AMP
São Roque de Minas	MG	Brasil	-46.3656	-20.2456	ZUEC-AMP
Aquidauana	MS	Brasil	-55.7872	-20.4711	CFBH
Jardim	MS	Brasil	-56.1381	-21.4803	CFBH
Aquidauana	MS	Brasil	-55.7872	-20.4711	MCP-Anfibios
Campo Grande	MS	Brasil	-54.6464	-20.4428	CFBH
Três Lagoas	MS	Brasil	-51.6783	-20.7511	ZUEC-AMP
Rio Brillhante	MT	Brasil	-54.5464	-21.8019	DZSJRP
Costa Rica	MT	Brasil	-53.1292	-18.5439	DZSJRP
Brasnorte	MT	Brasil	-57.995	-12.4251	UFMT-A

Itiquira	MT	Brasil	-54.606	-17.3359	UFMT-A
Barra do Bugres	MT	Brasil	-57.6918	-15.0433	UFMT-A
Chapada dos Guimarães	MT	Brasil	-55.5396	-15.1071	UFMT-A
Vila Bela da Santíssima Trindade	MT	Brasil	-59.983	-15.1875	UFMT-A
Guarantã do Norte	MT	Brasil	-54.9605	-9.6808	UFMT-A
Nossa Senhora do Livramento	MT	Brasil	-60.2631	-9.8603	UFMT-A
Santo Antônio do Leverger	MT	Brasil	-55.4364	-16.4825	UFMT-A
Rondonópolis	MT	Brasil	-54.668	-16.5198	UFMT-A
Cláudia	MT	Brasil	-55.0494	-11.4462	UFMT-A
Cuiabá	MT	Brasil	-55.8894	-15.48	UFMT-A
Poconé	MT	Brasil	-56.9485	-16.7845	UFMT-A
Alta Floresta	MT	Brasil	-56.3661	-10.055	UFMT-A
Lambari D'Oeste	MT	Brasil	-58.0036	-15.3233	ZUEC-AMP
Barra do Bugres	MT	Brasil	-57.1808	-15.0728	ZUEC-AMP
Matureia	PB	Brasil	-37.3514	-7.26694	ZUEC-AMP
Igarassu	PE	Brasil	-34.9064	-7.83417	CFBH
Piracuruca	PI	Brasil	-41.7092	-3.92833	ZUEC-AMP
São Raimundo Nonato	PI	Brasil	-42.6992	-9.01556	ZUEC-AMP
Fênix	PR	Brasil	-51.9792	-23.9161	DZSJRP
Ribeirão Claro	PR	Brasil	-49.7581	-23.1942	DZSJRP
General Carneiro	PR	Brasil	-51.3156	-26.4275	DZSJRP
Irati	PR	Brasil	-50.6511	-25.4672	DZSJRP
Palmas	PR	Brasil	-51.9906	-26.4842	DZSJRP
Figueira	PR	Brasil	-50.4031	-23.8492	DZSJRP
São José dos Pinhais	PR	Brasil	-49.2064	-25.5347	DZSJRP
Tijucas do Sul	PR	Brasil	-49.1989	-25.9281	DZSJRP
Boa Vista da Aparecida	PR	Brasil	-53.4081	-25.4356	MCP-Anfibios
Três Barras do Paraná	PR	Brasil	-53.1808	-25.4189	MCP-Anfibios
União da Vitória	PR	Brasil	-51.0864	-26.23	MCP-Anfibios
Maringá	PR	Brasil	-51.9386	-23.4253	CFBH
Engenheiro Beltrão	PR	Brasil	-52.2692	-23.7972	ZUEC-AMP
Assaí	PR	Brasil	-50.8414	-23.3733	ZUEC-AMP
Ibaiti	PR	Brasil	-50.1878	-23.8486	ZUEC-AMP
São Sepé	RS	Brasil	-53.5653	-30.1606	CFBH
Santa Maria	RS	Brasil	-53.8069	-29.6842	CFBH
Maximiliano de Almeida	RS	Brasil	-51.8033	-27.6322	CFBH
Dom Feliciano	RS	Brasil	-52.1867	-30.6086	UFMT-A
Cristal	RS	Brasil	-52.0483	-30.9997	MCP-Anfibios
Dom Pedro de Alcântara	RS	Brasil	-49.8497	-29.3694	MCP-Anfibios
Arroio do Sal	RS	Brasil	-49.8889	-29.5514	MCP-Anfibios
Canela	RS	Brasil	-50.8156	-29.3656	MCP-Anfibios
Torres	RS	Brasil	-49.7269	-29.3353	MCP-Anfibios
Porto Alegre	RS	Brasil	-51.23	-30.0331	MCP-Anfibios

Barracão	RS	Brasil	-51.4606	-27.6717	MCP-Anfibios
Terra de Areia	RS	Brasil	-50.0708	-29.5853	MCP-Anfibios
Capão da Canoa	RS	Brasil	-50.0097	-29.7456	MCP-Anfibios
Nova Prata	RS	Brasil	-51.61	-28.7839	MCP-Anfibios
Bagé	RS	Brasil	-54.1069	-31.3314	MCP-Anfibios
Cidreira	RS	Brasil	-50.2056	-30.1811	MCP-Anfibios
Santo Ângelo	RS	Brasil	-54.2631	-28.2992	MCP-Anfibios
Tenente Portela	RS	Brasil	-53.7583	-27.3711	MCP-Anfibios
Vacaria	RS	Brasil	-50.9339	-28.5122	MCP-Anfibios
Campestre da Serra	RS	Brasil	-51.0928	-28.7947	MCP-Anfibios
General Câmara	RS	Brasil	-51.7603	-29.905	MCP-Anfibios
Agudo	RS	Brasil	-53.24	-29.6453	MCP-Anfibios
Mata	RS	Brasil	-54.4603	-29.5656	MCP-Anfibios
Santa Cruz do Sul	RS	Brasil	-52.4258	-29.7175	MCP-Anfibios
Feliz	RS	Brasil	-51.3064	-29.4508	MCP-Anfibios
Triunfo	RS	Brasil	-51.7181	-29.9433	MCP-Anfibios
São Borja	RS	Brasil	-56.0044	-28.6606	MCP-Anfibios
Bento Gonçalves	RS	Brasil	-51.5192	-29.1714	MCP-Anfibios
Sananduva	RS	Brasil	-51.8067	-27.9497	MCP-Anfibios
Nova Bassano	RS	Brasil	-51.7047	-28.7236	MCP-Anfibios
Frederico Westphalen	RS	Brasil	-53.3944	-27.3592	MCP-Anfibios
Herveiras	RS	Brasil	-52.6525	-29.4067	MCP-Anfibios
Nonoai	RS	Brasil	-52.7714	-27.3617	MCP-Anfibios
Roca Sales	RS	Brasil	-51.8675	-29.2842	MCP-Anfibios
Novo Hamburgo	RS	Brasil	-51.1306	-29.6783	MCP-Anfibios
Pirapó	RS	Brasil	-55.1989	-28.0447	MCP-Anfibios
São Nicolau	RS	Brasil	-55.2672	-28.1825	MCP-Anfibios
Veranópolis	RS	Brasil	-51.5494	-28.9361	MCP-Anfibios
São Bento do Sul	SC	Brasil	-49.3786	-26.2503	CFBH
Urussanga	SC	Brasil	-49.3208	-28.5178	CFBH
Campos Novos	SC	Brasil	-51.225	-27.4017	CFBH
São Domingos	SC	Brasil	-52.5317	-26.5581	CFBH
Angelina	SC	Brasil	-48.9853	-27.5686	CFBH
Anitápolis	SC	Brasil	-49.1286	-27.9019	CFBH
Curitibanos	SC	Brasil	-50.5844	-27.2828	MCP-Anfibios
Porto Belo	SC	Brasil	-48.5531	-27.1578	MCP-Anfibios
Campo Belo do Sul	SC	Brasil	-50.7608	-27.8992	MCP-Anfibios
Jaraguá do Sul	SC	Brasil	-49.0667	-26.4861	MCP-Anfibios
Florianópolis	SC	Brasil	-48.5492	-27.5967	MCP-Anfibios
Canoinhas	SC	Brasil	-50.39	-26.1772	MCP-Anfibios
Campos Novos	SC	Brasil	-51.225	-27.4017	MCP-Anfibios
Bombinhas	SC	Brasil	-48.517	-27.138	MCP-Anfibios
Ita	SC	Brasil	-52.3231	-27.2906	MCP-Anfibios
Caçador	SC	Brasil	-51.015	-26.7753	MCP-Anfibios
Anita Garibaldi	SC	Brasil	-51.13	-27.6892	MCP-Anfibios

Joinville	SC	Brasil	-48.8456	-26.3044	MCP-Anfibios
Lebon Regis	SC	Brasil	-50.6953	-26.9289	MCP-Anfibios
Xaxim	SC	Brasil	-52.5347	-26.9617	MCP-Anfibios
Vargem Bonita	SC	Brasil	-51.74	-27.0067	DZSJRP
Itapema	SC	Brasil	-48.6114	-27.0906	ZUEC-AMP
São Luis do Paraitinga	SP	Brasil	-45.31	-23.22	CFBH
São Paulo	SP	Brasil	-46.63	-23.54	CFBH
Cubatão	SP	Brasil	-46.42	-23.89	CFBH
Paranapanema	SP	Brasil	-48.72	-23.38	CFBH
São José do Rio Pardo	SP	Brasil	-46.88	-21.59	CFBH
Santa Rita do Passa	SP	Brasil	-47.47	-21.71	CFBH
Quatro					
Embú	SP	Brasil	-46.85	-23.64	CFBH
Pedregulho	SP	Brasil	-47.47	-20.25	CFBH
Guapiara	SP	Brasil	-48.53	-24.18	CFBH
Ourinhos	SP	Brasil	-49.87	-22.97	CFBH
Ribeirão Branco	SP	Brasil	-48.76	-24.22	CFBH
Descalvado	SP	Brasil	-47.61	-21.9	CFBH
Americana	SP	Brasil	-47.33	-22.73	CFBH
Brotas	SP	Brasil	-48.12	-22.28	CFBH
Corumbataí	SP	Brasil	-47.62	-22.22	CFBH
Ribeirão Preto	SP	Brasil	-47.81	-21.17	CFBH
Itú	SP	Brasil	-47.29	-23.26	CFBH
Taubaté	SP	Brasil	-45.55	-23.02	CFBH
Suzano	SP	Brasil	-46.31	-23.54	CFBH
Pilar do Sul	SP	Brasil	-47.71	-23.81	CFBH
São José do Rio Preto	SP	Brasil	-49.37	-20.82	CFBH
Mauá	SP	Brasil	-46.46	-23.66	CFBH
Palestina	SP	Brasil	-49.4331	-20.39	DZSJRP
Vitória Brasil	SP	Brasil	-49.4331	-20.39	DZSJRP
Planalto	SP	Brasil	-48.979	-20.992	DZSJRP
Santo Antonio do	SP	Brasil	-50.357	-20.925	DZSJRP
Aracanguá					
Nova Granada	SP	Brasil	-49.277	-20.38	DZSJRP
Votuporanga	SP	Brasil	-49.9728	-20.4228	DZSJRP
União Paulista	SP	Brasil	-49.921	-20.908	DZSJRP
Macaubal	SP	Brasil	-49.937	-20.74	DZSJRP
Nova Aliança	SP	Brasil	-49.5431	-21.0761	DZSJRP
Barretos	SP	Brasil	-48.7516	-20.6372	DZSJRP
Turmalina	SP	Brasil	-50.4338	-20.0036	DZSJRP
Matão	SP	Brasil	-48.5372	-21.6205	DZSJRP
Onda Verde	SP	Brasil	-49.244	-20.5507	DZSJRP
Taquaritinga	SP	Brasil	-48.6872	-21.4022	DZSJRP
Pindorama	SP	Brasil	-48.9173	-21.2196	DZSJRP
Magda	SP	Brasil	-50.2933	-20.4736	DZSJRP
São José do Barreiro	SP	Brasil	-44.57	-22.64	DZSJRP

Vicentinópolis	SP	Brasil	-50.3486	-20.9261	DZSJRP
Gália	SP	Brasil	-49.55	-22.29	DZSJRP
Piratininga	SP	Brasil	-49.13	-22.41	DZSJRP
Garça	SP	Brasil	-49.65	-22.21	DZSJRP
Lupércio	SP	Brasil	-49.81	-22.41	DZSJRP
Marília	SP	Brasil	-49.9458	-22.2139	DZSJRP
Presidente Prudente	SP	Brasil	-51.3889	-22.1256	DZSJRP
Mirassol	SP	Brasil	-49.5211	-20.8192	DZSJRP
Analândia	SP	Brasil	-47.6631	-22.1264	DZSJRP
Botucatu	SP	Brasil	-48.445	-22.8858	DZSJRP
Santa Fé do Sul	SP	Brasil	-50.8923	-20.1782	DZSJRP
Jaboticabal	SP	Brasil	-48.3222	-21.2547	DZSJRP
Guaíra	SP	Brasil	-48.3106	-20.3183	DZSJRP
Atibaia	SP	Brasil	-46.5503	-23.1169	DZSJRP
Álvares Florence	SP	Brasil	-49.9106	-20.3208	DZSJRP
General Salgado	SP	Brasil	-50.3606	-20.6483	DZSJRP
Nhandeara	SP	Brasil	-50.0383	-20.6942	DZSJRP
Cerqueira César	SP	Brasil	-49.16	-23.03	MBML-Anfibios
Campinas	SP	Brasil	-47.06	-22.9	MBML-Anfibios
Mogi das Cruzes	SP	Brasil	-46.1881	-23.5231	ZUEC-AMP
Salesópolis	SP	Brasil	-45.84	-23.5303	ZUEC-AMP
Caieiras	SP	Brasil	-46.74	-23.36	ZUEC-AMP
Araguacema	TO	Brasil	-49.5564	-8.80361	CFBH
Babaçulândia	TO	Brasil	-47.7569	-7.20472	CFBH
Araguaína	TO	Brasil	-48.2072	-7.19111	CFBH
Lizarda	TO	Brasil	-46.6731	-9.59417	CFBH
Aguiarnópolis	TO	Brasil	-47.4664	-6.5625	CFBH
Porto Nacional	TO	Brasil	-48.4169	-10.7083	ZUEC-AMP
Reserva San Rafael, 17 km E of Karonay	Itapua	Paraguai	-55.8739	-26.7639	KU
Estancia Paicuara, 45 km W Capitan Bado, vicinity of headquarters, Arroyo Sapallo	Amambay	Paraguai	-55.9464	-23.2239	USNM
Parque Nacional Ybycui, Arroyo Corrientes, 2 km NW of Saltos Mbocarusu	Paraguari	Paraguai	-57.05	-26.02	USNM

Tabela A3 - Estatística de diversidade para cada população de *Physalaemus cuvieri*. Diversidade nucleotídica (II) e diversidade haplotípica (h).

	Populações	Siglas	II		H
1	Água Doce – SC	PCR	0.0012 +/-	0.0012	1
2	Alvorada do Norte – GO	PCD	0.0015 +/-	0.0011	0.52
3	Andradas – MG	PCF	0.0004 +/-	0.0004	0.41
4	Aparecida do Rio Doce – GO	PCA	0.0052 +/-	0.0027	0.63
5	Aragarças - GO*	PC(A)	—	—	—
6	Araguapaz – GO	PCA(AR)	0.0013 +/-	0.0010	0.71
7	Araputanga - MT*	PCU	—	—	—
8	Areia – PB	PCAD	0.0036 +/-	0.0022	0.89
9	Arês – RN	PCAF	0.0009 +/-	0.0009	0.83
10	Assis - SP*	PCAG	—	—	—
11	Bauru – SP	PCAH	0.0004 +/-	0.0005	0.5
12	Blumenau - SC*	PCX	—	—	—
13	Caetité – BA	PCAI	0.0013 +/-	0.0012	0.5
14	Caguaretama – RN	PCZ	0.0089 +/-	0.0048	0.94
15	Caiapônia – GO	PC(C)	0.0010 +/-	0.0009	0.7
16	Capão Bonito – SP	PCAE	0.0039 +/-	0.0029	0.83
17	Caseara – TO	PCN	0.0225 +/-	0.0133	1
18	Caxambu do Sul - SC*	PCV	—	—	—
19	Cerro Largo – RS	PCAJ	0.0012 +/-	0.0012	0.67
20	Chapada Diamantina (Lençóis) - BA	PCAZ	0.0022 +/-	0.0014	0.83
21	Chapadão do Sul – MS	PCAW	0.0300 +/-	0.0153	0.85
22	Chapecó – SC	PCQ	0.0003 +/-	0.0004	0.37
23	Chavantes – SP	PCAK	0.0005 +/-	0.0006	0.6
24	Cocalzinho de Goiás – GO	PC(CO)	0.0076 +/-	0.0043	0.62
25	Concórdia (Parque Estadual Fritz Plauemann) - SC*	PCP	—	—	—
26	Crato – CE	PCAC	0.0009 +/-	0.0012	1
27	Cristalina – GO	PC(CR)	0.0009 +/-	0.0007	0.64
28	Goianinha – RN	PCY	0.0102 +/-	0.0054	0.95
29	Goianésia – GO	PC(G)	0.0052 +/-	0.0033	0.8
30	Goiatuba - GO*	PC(Gt)	—	—	—
31	Goiânia – GO	PC(Gu)	0.0009 +/-	0.0012	1
32	Icém – SP	PCAL	0.0006 +/-	0.0006	0.67
33	Ipuacu - SC*	PCAM	—	—	—
34	Itaberaí – GO	PC(I)	0.0023 +/-	0.0018	1
35	Itirapina – SP	PCAN	0.0011 +/-	0.0008	0.74
36	Jacarezinho – PR	PCAO	0.0004 +/-	0.0004	0.42
37	Lauro Müller - SC*	PCAP	—	—	—
38	Lucas do Rio Verde – MT	LRV	0.0012 +/-	0.0012	1
39	Macaíba – RN	PCAB	0.0004 +/-	0.0005	0.5
40	Mambaí – GO	PC(Ma)	0.0015 +/-	0.0011	0.75

41	Mara Rosa – GO	PC(MR)	0.0004 +/-	0.0005	0.5
42	Marabá – PA	PCAQ	0.0037 +/-	0.0023	0.82
43	Mateiros – TO	PCL	0.0152 +/-	0.0079	0.89
44	Mineiros – GO	PC(M)	0.0012 +/-	0.0010	0.64
45	Morrinhos – GO	PC(Mo)	0.0132 +/-	0.0083	0.4
46	Niquelândia – GO	PC(N)	0.0048 +/-	0.0028	0.87
47	Nova Crixás – GO	PC(NC)	0.0027 +/-	0.0017	0.82
48	Nova Lacerda – MT	NVL	0.0035 +/-	0.0039	1
49	Nova Ubiratã – MT	PCG	0.0023 +/-	0.0018	0.67
50	Ouro Preto – MG	PCJ	0.0013 +/-	0.0012	1
51	Palmas – TO	PCC	0.0171 +/-	0.0092	0.76
52	Paracatu – MG	PCK	0.0010 +/-	0.0008	0.65
53	Paranã – GO	PCE	0.0079 +/-	0.0045	0.58
54	Paraúna – GO	PC(Pa)	0.0029 +/-	0.0025	1
55	Piracanjuba – GO	PC(Pi)	0.0017 +/-	0.0015	0.83
56	Pirenópolis – GO	PC(PR)	0.0042 +/-	0.0024	0.78
57	Pontalina – GO	PC(PT)	0.0083 +/-	0.0045	0.91
58	Ponte Serrada e Passos Maia (Parque Nacional das Araucárias) – SC	PCS	0.0017 +/-	0.0021	1
59	Porangatu – GO	PC(P)	0.0069 +/-	0.0055	1
60	Porto Franco – MA	PCAR	0.0040 +/-	0.0034	1
61	Quatro Barras – PR	PCAS	0.0024 +/-	0.0018	0.9
62	Quirinópolis – GO	PC(Q)	0.0019 +/-	0.0012	0.83
63	Rio Claro – SP	PCAT	0.0012 +/-	0.0010	0.75
64	Santa Isabel – SP	PCAU	0.0482 +/-	0.0258	1
65	Silvânia – GO	PC(S)	0.0010 +/-	0.0008	0.86
66	Santa Terezinha - MT*	PCO	—	—	—
67	São Domingos – GO	PCB	0.0006 +/-	0.0005	0.59
68	São Gabriel do Oeste – MS	PCAY	0.0154 +/-	0.0080	0.65
69	São João da Aliança – GO	PC(SJ)	0.0013 +/-	0.0009	0.61
70	São Luiz – MA	PCAV	0.0295 +/-	0.0224	1
71	São Miguel do Araguaia – GO	PC(SM)	0.0038 +/-	0.0023	0.94
72	Tailândia – PA	PCW	0.0029 +/-	0.0025	1
73	Teodoro Sampaio – SP	PCAX	0.0008 +/-	0.0007	0.54
74	Uberlândia - MG*	PC(Ub)	—	—	—
75	Uruaçu – GO	PC(U)	0.0052 +/-	0.0037	0.83
76	Vilhena – RO	PCM	0.0028 +/-	0.0017	0.91

*Ausência de polimorfismo

Tabela A4 – Valores de FST par-a-par (abaixo da diagonal) e distância geográfica (km, acima da diagonal) entre as 34 populações de *Physalaemus cuvieri* (n>8). Valores de FST significativos em negrito ($p \leq 0.05$). Siglas das populações conforme Tabela 3.

	PCF	PCA	PC(AR)	PCAD	PCZ	PCAZ	PCAW	PCQ	PC(CO)	PC(CR)	PCY	PCAN	PCAO	PC(Ma)	PCAQ	PCL	PC(M)	PC(N)	PC(NC)	PCC	PCK	PCE	PC(PR)	PC(PT)	PC(Q)	PCAT	PCAU	PCB	PCAY	PC(SJ)	PC(SM)	PCAX	PC(Ub)	PCM	
PCF	*****	636	887	2047	2136	1190	744	840	736	600	2135	131	370	845	1879	1283	802	869	972	1338	540	1061	736	589	572	109	143	966	923	826	1050	579	393	1775	
PCA	0.23	*****	361	2097	2186	1217	172	998	376	412	2184	560	555	685	1456	1002	170	513	476	955	468	723	358	199	75	591	758	751	357	556	569	483	310	1146	
PC(AR)	0.62	0.09	*****	1865	1952	1027	458	1359	214	373	1948	850	901	491	1095	682	344	244	115	602	466	405	198	299	374	877	1026	502	559	337	208	844	494	1061	
PCAD	0.93	0.81	0.90	*****	90	889	2259	2878	1732	1695	88	2143	2364	1414	1496	1246	2178	1627	1787	1436	1668	1477	1752	1901	2048	2140	2141	1366	2409	1554	1734	2475	1905	2756	
PCZ	0.80	0.71	0.76	0.24	*****	979	2348	2968	1821	1785	8	2232	2453	1503	1553	1327	2266	1714	1872	1514	1758	1562	1841	1991	2137	2229	2228	1454	2497	1642	1818	2565	1995	2834	
PCAZ	0.76	0.52	0.69	0.90	0.80	*****	1383	2003	865	809	977	1273	1484	544	1156	580	1313	783	971	790	778	693	885	1019	1163	1273	1300	531	1544	695	943	1586	1015	2025	
PCAW	0.34	0.30	0.29	0.55	0.55	0.43	*****	941	529	582	2345	646	574	846	1534	1132	126	653	571	1060	640	852	509	369	241	679	849	903	192	709	662	432	469	1035	
PCQ	0.87	0.37	0.74	0.93	0.80	0.79	0.37	*****	1328	1269	2967	736	523	1567	2454	1962	1066	1478	1473	1945	1258	1694	1316	1122	996	741	781	1669	984	1486	1567	516	1022	1780	
PC(CO)	0.50	0.28	0.40	0.74	0.64	0.44	0.31	0.56	*****	165	1817	726	830	321	1161	637	448	151	252	628	258	367	21	206	345	748	879	376	680	181	318	831	352	1273	
PC(CR)	0.85	0.37	0.71	0.90	0.74	0.60	0.31	0.89	0.05	*****	1782	611	753	301	1280	704	533	271	416	739	93	463	176	213	354	628	743	400	757	230	476	800	249	1421	
PCY	0.77	0.69	0.74	0.18	-0.01	0.78	0.54	0.78	0.62	0.72	*****	2231	2452	1500	1546	1322	2263	1710	1868	1509	1756	1558	1837	1988	2135	2228	2228	1450	2493	1639	1813	2563	1993	2828	
PCAN	0.09	0.26	0.53	0.92	0.82	0.74	0.39	0.76	0.53	0.76	0.80	*****	242	883	1885	1312	719	869	945	1347	569	1073	722	553	505	32	203	999	817	841	1030	448	374	1681	
PCAO	0.03	0.15	0.55	0.92	0.77	0.73	0.29	0.86	0.43	0.83	0.74	0.06	*****	1047	1983	1454	678	980	1009	1457	736	1195	820	630	527	261	384	1153	706	976	1101	236	504	1582	
PC(Ma)	0.85	0.46	0.74	0.89	0.75	0.20	0.32	0.87	0.28	0.61	0.72	0.78	0.82	*****	1067	440	769	253	457	1538	315	283	341	492	639	895	983	123	1001	154	458	1100	545	1530	
PCAQ	0.92	0.77	0.88	0.62	0.42	0.88	0.50	0.93	0.69	0.88	0.38	0.91	0.90	0.88	*****	649	1409	1016	981	541	1342	818	1167	1354	1463	1904	2022	945	1571	1054	888	1939	1511	1463	
PCL	0.67	0.59	0.63	0.59	0.53	0.69	0.48	0.68	0.49	0.61	0.51	0.71	0.63	0.61	0.57	*****	1024	490	580	214	745	280	651	843	981	1326	1421	317	1240	478	508	1468	953	1516	
PC(M)	0.57	-0.01	0.25	0.89	0.75	0.67	0.25	0.72	0.34	0.70	0.72	0.46	0.48	0.72	0.88	0.61	*****	557	454	942	604	745	428	329	243	750	919	814	231	625	542	554	476	977	
PC(N)	0.90	0.79	0.87	0.82	0.70	0.87	0.55	0.91	0.70	0.86	0.67	0.90	0.88	0.85	0.81	0.26	0.86	*****	206	480	350	216	162	356	491	889	1012	261	785	104	227	979	495	1279	
PC(NC)	0.94	0.82	0.91	0.86	0.73	0.90	0.56	0.94	0.73	0.91	0.70	0.93	0.93	0.90	0.85	0.42	0.91	0.59	*****	489	508	312	244	393	484	970	1113	440	661	310	93	959	579	1074	
PCC	0.72	0.63	0.68	0.63	0.57	0.74	0.48	0.74	0.57	0.65	0.55	0.75	0.67	0.66	0.61	0.19	0.65	0.54	0.62	*****	801	277	636	828	950	1365	1481	421	1139	513	399	1436	974	1320	
PCK	0.81	0.46	0.72	0.92	0.81	0.64	0.42	0.85	0.14	-0.02	0.79	0.76	0.79	0.62	0.90	0.70	0.69	0.90	0.93	0.75	*****	524	270	276	403	582	682	430	822	289	564	810	240	1511	
PCE	0.86	0.74	0.82	0.75	0.63	0.84	0.50	0.86	0.62	0.80	0.60	0.86	0.83	0.79	0.75	0.07	0.80	0.19	0.53	0.41	0.86	*****	379	572	705	1091	1204	191	964	236	258	1194	703	1332	
PC(PR)	0.38	0.13	0.24	0.83	0.73	0.46	0.35	0.48	0.06	0.07	0.71	0.40	0.31	0.35	0.79	0.62	0.18	0.80	0.83	0.68	0.14	0.76	*****	194	330	745	879	394	659	200	315	817	349	1255	
PC(PT)	0.85	0.77	0.83	0.81	0.73	0.85	0.59	0.86	0.75	0.82	0.72	0.86	0.83	0.82	0.78	0.53	0.81	0.80	0.82	0.26	0.87	0.73	0.81	*****	148	579	727	569	547	375	479	626	199	1266	
PC(Q)	0.43	0.06	0.24	0.90	0.80	0.66	0.37	0.58	0.43	0.59	0.78	0.42	0.35	0.66	0.88	0.69	0.09	0.88	0.91	0.74	0.63	0.84	0.24	0.85	*****	534	698	715	430	521	577	489	235	1218	
PCAT	0.08	0.17	0.50	0.90	0.75	0.71	0.28	0.80	0.40	0.75	0.73	-0.01	0.05	0.76	0.88	0.61	0.42	0.86	0.91	0.65	0.74	0.80	0.30	0.82	0.37	*****	170	1012	849	858	1054	474	396	1714	
PCAU	0.58	0.55	0.53	0.51	0.52	0.64	0.35	0.61	0.48	0.50	0.51	0.64	0.52	0.51	0.46	0.48	0.49	0.53	0.54	0.45	0.64	0.48	0.59	0.58	0.65	0.50	*****	1104	1019	968	1193	616	534	1884	
PCB	0.98	0.88	0.96	0.93	0.80	0.94	0.64	0.98	0.83	0.97	0.77	0.96	0.98	0.96	0.93	0.31	0.97	0.47	0.82	0.68	0.96	0.07	0.89	0.88	0.94	0.97	0.66	*****	1043	195	417	1190	649	1501	
PCAY	0.35	0.27	0.29	0.67	0.63	0.42	0.16	0.40	0.29	0.29	0.62	0.40	0.30	0.33	0.61	0.55	0.25	0.66	0.68	0.56	0.39	0.61	0.30	0.69	0.35	0.29	0.48	0.74	*****	855	742	516	661	876	
PC(SJ)	0.80	0.41	0.69	0.90	0.77	0.50	0.36	0.84	0.10	0.08	0.75	0.74	0.77	0.41	0.88	0.64	0.66	0.87	0.91	0.70	0.10	0.82	0.13	0.84	0.60	0.71	0.57	0.96	0.34	*****	326	999	476	1382	
PC(SM)	0.92	0.81	0.89	0.84	0.72	0.89	0.57	0.92	0.71	0.89	0.70	0.91	0.90	0.88	0.83	0.43	0.88	0.58	0.08	0.62	0.91	0.53	0.82	0.82	0.89	0.89	0.55	0.79	0.68	0.89	*****	1052	660	1084	
PCAX	0.08	0.22	0.56	0.92	0.78	0.73	0.32	0.82	0.47	0.80	0.76	0.10	0.00	0.79	0.90	0.66	0.50	0.89	0.93	0.70	0.78	0.84	0.36	0.84	0.41	0.08	0.57	0.97	0.34	0.76	0.90	*****	571	1379	
PC(Ub)	0.01	0.18	0.63	0.92	0.77	0.74	0.28	0.91	0.43	0.88	0.74	0.04	-0.01	0.85	0.91	0.63	0.59	0.89	0.93	0.67	0.81	0.83	0.33	0.83	0.40	0.05	0.51	0.98	0.30	0.80	0.91	0.04	*****	1444	
PCM	0.94	0.85	0.92	0.88	0.77	0.91	0.62	0.94	0.79	0.92	0.75	0.93	0.93	0.91	0.87	0.51	0.91	0.75	0.72	0.68	0.93	0.68	0.86	0.86	0.84	0.91	0.92	0.59	0.87	0.73	0.92	0.71	0.93	0.93	*****