



UFAM

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

JULIANA VIEIRA CAMPOS

Distribuição espacial da variabilidade genética de *Leptodactylus pentadactylus*
(Anura, Leptodactylidae): Uma abordagem baseada em modelos filogeográficos
e de nicho ecológico

MANAUS-AM
JANEIRO/2016

JULIANA VIEIRA CAMPOS

Distribuição espacial da variabilidade genética de *Leptodactylus pentadactylus*
(Anura, Leptodactylidae): Uma abordagem baseada em modelos filogeográficos
e de nicho ecológico

Orientador: Prof. Dr. Tomas Hrbek

Dissertação apresentada a
Universidade Federal do Amazonas
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em
Diversidade Biológica.

Financiamento: CNPq-SISBIOTA/FAPEAM-SISBIOTA

MANAUS-AM
JANEIRO/2016

Ficha Catalográfica

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

C198d Campos, Juliana Vieira
Distribuição espacial da variabilidade genética de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae): Uma abordagem baseada em modelos filogeográficos e de nicho ecológico / Juliana Vieira Campos. 2016
42 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Tomas Hrbek
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) – Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazônia. 2. Isolamento por ambiente. 3. Isolamento por distância. 4. Barreira fluvial. 5. Modelagem de Nicho. I. Hrbek, Tomas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

São investigados os fatores ecológicos e geográficos que influenciam na distribuição espacial da variabilidade genética de *Leptodactylus pentadactylus*. A partir de análises de modelagem de nicho ecológico e de filogeografia constatou-se que fatores diferentes, conjunta e individualmente, estão envolvidos nos processos de diferenciação genética. É discutido a importância de analisar e integrar o efeito conjunto ssde diferentes fatores para explicar a variabilidade genética das espécies.

Palavras-chave: Amazônia, Isolamento por ambiente, Isolamento por distância, Barreira fluvial, Fluxo gênico.

AGRADECIMENTOS

Eu não cheguei sozinha ao final dessa jornada. É graças a colaboração de muitas pessoas e ao apoio de tantas outras, que mais uma etapa na minha carreira acadêmica se conclui.

Sou grata a minha mãe, por tão bravamente suportar a distância e me amar incondicionalmente. Por ser a luz que me guia e me ajuda a seguir.

Ao Nando, pelo amor, aconchego, parceria e principalmente pelo olhar de carinho nas horas de “surto”. Os mais lindos motivos jamais caberiam aqui.

A Izeni P. Farias por me aceitar no LEGAL e propiciar a realização do meu maior sonho de bióloga, viajar pela Amazônia. Sem seu apoio inicial, nada disso teria começado.

Ao Tomas Hrbek por me orientar em uns momentos e me “desorientar” em outros. Pelos encontros com onças, pelos choros, por me instigar a buscar sempre mais. Sou extremamente grata por todo aprendizado, científico e pessoal, que obtive nesses últimos anos.

Ao Igor Kaefer pelo apoio e disposição. Por me incentivar, me manter centrada em meus objetivos e principalmente por ter-me “adotado”. Seu apoio foi fundamental para que eu conseguisse chegar ao final dessa etapa.

Aos companheiros e amigos de jornada, que fizeram meus dias mais felizes em “Manacaos” – Nando, Abib, Rafa, Pedro, Thiago, Thuane, Karina, Bruno, Carol, Paca, Julia, Dudu, Bia, Carlos e Adriana. Não menos importantes, aos meus amigos que ficaram em Aracaju. Que souberam respeitar os momentos de reclusão social e ainda assim continuaram a emanar vibrações positivas e um “calma, vai dar certo!”.

Ao Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) pelo apoio material e logístico para o desenvolvimento das análises. Aos amigos e colegas que o LEGAL me presenteou, Mario, Arielli, Wal, Valeria, Gabi, Canton, Rupert, Priscila, Fabinho, Joice, Aline, Victor, Sandra, José, Gabriel, Ingrid, Jessica, Vinicius, Luceia, Robertinha, Bruna, Rejane, Luciana, Zamora, Fabricio, Guta, Sara, Israela, Roberta. Obrigada gente, pelas longas horas de discussão sobre diversos conceitos, pelos cafés e risadas.

Obrigada a “equipe da herpeto”, por todo conhecimento, experiência e alegria em campo. Ok, muitas vezes nem tão alegre assim. Alexandre Almeida, Luciana Frazão, Roberto Rojas, Marcelo Gordo, Marcelo Menin, Elciomar Araújo, Ermelinda Oliveira, Vinicius Carvalho, Priscila Azarak, Sergio Bogão e Deyla Oliveira.

Ao Antoine Fouquet, Miguel Trefaut, Iury Valente, Marcelo Gordo e Vinicius Carvalho pela disponibilidade de amostras para a realização desse estudo.

Aos professores e pesquisadores Fernando Figueiredo, Marcelo Santos, Marina Anciães, Fernanda Werneck, Rafael Leite, Arley Camargo, Fabrício Domingos, Fabricio Baccaro, Marcelo Menin e a tantos outros que contribuíram cientificamente na minha formação e pelo conhecimento tão claramente transmitido.

Ao programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, em especial à coordenadora Maria Gracimar Pacheco, pelo apoio, incentivo e amizade. E a FAPEAM pela concessão da bolsa de mestrado.

E por fim, ao CNPq e à FAPEAM pelo financiamento do projeto “Rede de pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira” (CNPq-FAPEAM 563348/2010-0) que financiou esse trabalho.

A todos vocês, minha sincera gratidão!

*“Eu sou
um universo de átomos,
e ainda assim,
um átomo no universo.”*

- Richard P. Feynman

SUMÁRIO

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1 Área de estudo e amostras	10
2.2 Obtenção de dados genéticos	10
2.3 Análise de dados genéticos.....	11
2.4 Modelagem de nicho ecológico	12
2.5 Importância relativa de isolamento por distância geográfica, isolamento por ambiente e isolamento por barreira fluvial.....	14
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
7. Material Suplementar.....	38

RESUMO

Fatores biogeográficos e ecológicos desempenham papéis importantes na distribuição geográfica e genética das espécies. O fluxo gênico entre as populações que estão em habitats diferentes pode ser reduzido pela distância geográfica ou por adaptações locais (isolamento por ambiente). No entanto, a associação entre esses fatores tem sido pouco incorporada em estudos para a fauna amazônica, uma região onde há uma elevada diversidade de habitats, os quais poderiam exercer um efeito direto na estrutura genética populacional da espécie. Aqui, nós combinamos filogeografia e modelos de nicho ecológico para avaliar: (1) quais eventos teriam moldado a distribuição espacial e genética em *Leptodactylus pentadactylus*, (2) se há diferenciação ecológica entre as áreas de ocorrência das populações de *L. pentadactylus* e (3) quantificar o efeito de fatores ambientais e geográficos no padrão de diferenciação genética. Nós encontramos três linhagens, onde duas delas é delimitada pelo rio Amazonas e a outra é restrita aos escudos das Guianas. Nossos resultados revelaram um papel importante do rio Amazonas na diferenciação genética de *L. pentadactylus*, no qual este rio atua como fator limitante ao fluxo gênico, em duas das três linhagens encontradas. Além do efeito do rio como barreira na distribuição da variabilidade genética de *L. pentadactylus*, foi detectado que outra grande parcela da variabilidade genética esta associada a fatores geográficos (isolamento por distância), ambientais (isolamento ambiental) e históricos (oscilações climáticas do Quaternário). Dessa forma, fica evidente a necessidade de incorporar, quantitativa e qualitativamente, a associação entre diferentes fatores para explicar a variabilidade genética de espécies amazônicas.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é o maior hotspot para endemismos e diversidade de espécies terrestres do planeta (Silva et al., 2005). Apesar de poucas generalizações empiricamente apoiadas terem surgido, a especiação alopátrica é reconhecida como o principal mecanismo por trás dessa alta diversidade. No entanto, nenhum padrão geográfico ou força paleoambiental emergiu como uma explicação geral, apesar de já estar claro que processos biogeográficos ocorrem num contexto ecológico, evidenciando que ambos os fatores representam um importante papel na distribuição geográfica e genética das espécies (Wiens & Donoghue, 2004; Ricklefs, 2007).

Historicamente, o teste de duas hipóteses alopátricas é recorrente em estudos sobre a diversificação na biota amazônica afim de explicar a distribuição das espécies: (1) rios como barreiras, que propõe que grandes rios amazônicos atuam como barreiras para o movimento de espécies animais, podendo restringir o fluxo gênico e a expansão da distribuição das espécies a partir de seus centros de origem (Wallace, 1876); e (2) teoria de refúgios, que identifica as influências dos ciclos glaciais e interglaciais como causadores de isolamento e diferenciação, entre as populações, devido às contrações e expansões florestais (Haffer, 1969)

Adicionalmente, fatores bióticos e abióticos podem influenciar na distribuição das espécies. Diversos estudos para a Amazônia demonstraram que existe relação entre a distribuição de espécies e características edáficas e topográficas (Duellman, 1995; Duellman, 1999; Kinupp & Magnusson, 2005; Menin et al., 2008) e que a estrutura da vegetação pode influenciar na ocorrência e na abundância das espécies (Duellman, 1995). Sendo assim, as espécies ocupam faixas ambientais adequadas às suas exigências mínimas (Hutchinson, 1957) e podem se deslocar acompanhando as variações espaço-temporais (Avice, 2000; Pulliam, 2000; Davis & Shaw, 2001). Frequentemente, esses deslocamentos são acompanhados por marcas genéticas que podem estar associadas, além do clima, com a complexidade topográfica e capacidade de dispersão de cada espécie (Turchetto-Zolet et al., 2013).

A distribuição espacial e temporal da variabilidade genética de uma espécie é influenciada por eventos aleatórios como, por exemplo, a deriva genética, a seleção natural, fluxo gênico e mutação (Avice, 2000; Avice et al., 2009), além de eventos históricos como a expansão da área de ocorrência, que podem afetar diretamente as

frequências gênicas numa população, levando a divisão populacional por adaptação local (Orsini et al., 2013).

A estrutura populacional tem sido muito estudada principalmente num contexto geográfico em que a divergência inicial entre as populações depende do nível de migração entre elas (Hutchison & Templeton, 1999; Shafer & Wolf, 2013). Segundo Wright (1943), a dispersão diminui com a distância, de modo que o fluxo gênico é geralmente mais baixo entre populações geograficamente distantes provocando um padrão de isolamento por distância. No entanto, populações geograficamente próximas podem também divergir por causa da diferença ecológica entre elas, nesse caso, o nível do fluxo gênico diminuiria entre as populações de ambientes diferentes causando um padrão de isolamento por ambiente (Shafer & Wolf 2013). Assim, sabendo que a correlação entre divergência genética e distância geográfica é esperada sob isolamento por distância, enquanto que uma correlação entre divergência genética e dissimilaridade ambiental é esperada sob isolamento por ambiente, fatores geográficos e ambientais não são mutuamente exclusivos e podem atuar em conjunto para reduzir o fluxo gênico entre as populações. Portanto, é de suma importância estudos que investiguem a importância relativa e a interação entre esses processos a fim de acrescentar no conhecimento sobre a diversificação na Amazônia.

Atualmente, a filogeografia é considerada uma das ferramentas mais importantes para o entendimento dos componentes históricos da distribuição espacial da variabilidade genética aos níveis intra ou interespecífico (Avice, 2009). Isso se atribui ao fato dessa ferramenta ser útil em decifrar os componentes temporais e espaciais da estruturação de linhagem em nível populacional, interpretar os processos evolutivos e ecológicos envolvidos (Beheregaray, 2008) e entender como os padrões de divergência se relacionam ou coincidem com fatores geográficos e geológicos atuais e históricos (Chan et al., 2011).

A integração entre genealogias, modelos de nicho ecológico e de paleodistribuição, devido a complementaridade entre as análises, têm proporcionado um incremento da confiança nas inferências filogeográficas sobre a importância dos eventos históricos para a estruturação genética populacional (Carstens & Richards 2007; Carnaval et al., 2009; Werneck et al., 2012; Camargo et al., 2013). Dessa forma, estudos filogeográficos com aplicação de modelagem de nicho ecológico, têm representado uma fonte importante de informação sobre assinaturas genéticas históricas (Hickerson et al., 2010; Chan et al., 2011), possibilitando a identificação de zonas de

contato secundário, refúgios Pleistocênicos e rotas de dispersão (Kidd & Ritchie, 2006; Stewart et al., 2010).

Anuros são organismos especialmente vulneráveis a variações ambientais, devido principalmente a características como ciclos de vida associados a meios aquáticos e terrestres, e pele permeável (Heyer et al., 1994; Souza et al., 2008). Suas distribuições geográficas são variadas, podendo estar relacionadas a aspectos do relevo, clima e vegetação que são fortemente influenciados por fatores históricos e biogeográficos (Duellman, 1999).

Leptodactylus pentadactylus (Laurenti, 1768) é uma espécie de anuro amazônico pertencente ao grupo de espécies que recebe o mesmo nome: grupo *Leptodactylus pentadactylus* (*sensu* Heyer, 2005, de Sá et al., 2014). A princípio, *L. pentadactylus* era considerada uma única espécie com ampla distribuição nas Américas do Sul e Central, inclusive em ambos os lados da cordilheira dos Andes. Somente após uma revisão de toda variação morfológica e acústica, foram definidos quatro agrupamentos populacionais diferenciados, correspondente a: (1) América Central e norte da Colômbia, (2) Costa Oeste da Colômbia; (3) Costa Oeste do Equador, e (4) Amazônia, onde cada um desses agrupamentos corresponderia a uma espécie distinta (Heyer, 2005). Seguindo esses dados, a espécie *L. pentadactylus* se restringe ao agrupamento da Amazônia. Apesar de Heyer (2005) ter apontado uma deficiência amostral em seu trabalho, principalmente para a Amazônia central, ele sugeriu que um componente geográfico estaria influenciando na variação intraespecífica da espécie.

Diversos trabalhos com *L. pentadactylus* relataram características taxonômicas e/ou acústicas incongruentes (Duellman, 1978; Hero & Galatti, 1990; Galatti, 1992; Rodríguez & Duellman, 1994; Duellman, 1994; Savage, 2002; Heyer, 2005; Lima et al., 2012). Assim, diversas incertezas taxonômicas envolvem *L. pentadactylus* (Heyer, 2005). Portanto, são importantes estudos que visem esclarecer a problemática envolvida na variação intraespecífica em *L. pentadactylus*, e quais componentes geográficos e ecológicos estariam associados a essa variação.

Aqui, combinamos modelos de nicho ecológico do presente e de dois períodos do Quaternário com análises filogeográficas baseadas em dados mitocondriais para avaliar o efeito de fatores ecológicos e biogeográficos na estrutura genética populacional de *Leptodactylus pentadactylus*. De maneira mais específica, visamos investigar: (1) quais eventos teriam moldado a distribuição espacial e genética em *L. pentadactylus*, (2) se há diferenciação ecológica entre as áreas de ocorrência das

populações de *L. pentadactylus* e (3) quantificar o efeito de fatores ambientais e geográficos no padrão de diferenciação genética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e amostras

O bioma amazônico abrange vários países da América do Sul, como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela (Sioli, 1967; Lundberg et al., 1998). A composição da floresta na área de estudo varia de Floresta Ombrófila Densa Submontana a Floresta Ombrófila de Terras Baixas (IBGE, 2004). A pluviosidade anual média varia de 2.200 mm a 1000 mm (Sombroek, 2001).

Nós obtivemos um total de 100 amostras de *Leptodactylus pentadactylus* que representam boa parte da distribuição atual da espécie proposta pela IUCN (2015). Todas as amostras foram obtidas a partir de coletas feitas especificamente para este estudo, da Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA); da Coleção de Recursos Genéticos – INPA; do Museu de Zoologia – USP e do Centre National de la recherche scientifique – Guiana Francesa (Tabela 1, Material Suplementar).

2.2 Obtenção de dados genéticos

O DNA genômico (gDNA) total foi extraído usando o protocolo de CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987). A extração do DNA foi analisada, quanto à sua qualidade, através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando um marcador de DNA de tamanho e quantidade conhecida (Lambda/Hind III). Os DNAs genômicos foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para verificar a concentração e qualidade das amostras.

Amplificação de DNA

Todas as amostras foram sequenciadas bidirecionalmente para os genes mitocondriais 12S e 16S, incluindo a região tRNA valina, através da reação em cadeia de polimerase (PCR) usando os primers 16Sa, 16Sb (Palumbi et al., 1991) e 12Sa e 16Sr3 (Hrbek & Larson, 1999). As reações de PCR foram feitas para um volume final

de 15 μL , contendo 6.5 μL de ddH₂O, 1.5 μL de tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.5 de MgCl₂ 25mM, 1.25 μL de dNTP 2.5 mM; 1,5 μL de cada primer 2 μM , 0.3 de Taq 1U/ μL e 1.0 μL de DNA. As condições da reação no termociclador foram: preaquecimento a 92°C por 60 segundos, desnaturação a 92°C por 50 seg., anelamento a 50°C por 60 seg. e extensão a 72°C por 40 seg. Esses últimos três passos foram repetidos 35 vezes, seguidos de uma extensão final a 72°C por cinco minutos. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1%.

Sequenciamento

O produto de PCR foi purificado com ExoSAP seguindo o protocolo do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas contendo: 1.0 μL do produto de PCR purificado, 2.0 μL do primer de sequenciamento (o mesmo de amplificação), 0.3 μL do BigDye Terminator v3.1, 1.45 μL do tampão do BigDye e 5.5 μL de ddH₂O. As condições da reação foram as sugeridas no protocolo do fabricante do Kit BigDye. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com etanol e EDTA, e posteriormente ressuspensionado em 10 μL de formamida deionizada para ser injetados e analisados no sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

2.3 Análise de dados genéticos

Preparação de sequências

Após a leitura das sequências pelo sequenciador, estas foram alinhadas com a aplicação da ferramenta Clustal W (Thompson et al., 1996) e posteriormente analisadas, comparadas e editadas usando o programa *Geneious* (Rambaut et al., 2012). No programa DAMBE 5.2.57 (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>) foram verificados os níveis de saturação das sequências através do teste de saturação de substituições (Xia et al., 2003).

Estrutura populacional e reconstrução filogeográfica

Nós utilizamos o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) (Corander et al., 2008), para inferir a estrutura genética das populações. Esse

programa se baseia no cálculo da distribuição posterior da frequência dos nucleotídeos para determinar o número de populações genéticas (k) mais provável. Adicionalmente, calculamos as distâncias genéticas (*p distance*) entre os grupos identificados pelos BAPS no programa MEGA 6.06 com 1000 réplicas de *bootstrap* (Tamura et al., 2011).

Para as reconstruções filogenéticas, o jModeltest (Posada et al., 2008) foi utilizado para selecionar o modelo evolutivo que melhor se ajusta para explicar a evolução das sequências no banco de dados. O programa BEAST 1.8.2 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond & Rambaut, 2007) foi utilizado para estimar as relações filogenéticas e o tempo de divergência, o qual foi calibrado utilizando registro fóssil de *Eleutherodactylus* e os parâmetros conforme Roelants et al., (2007) para Leptodactylinae. O número de gerações de MCMC foi de 100 milhões, amostradas a cada 1000 interações onde 10% de *burn-in* foram descartadas. As interações (convergência e estabilidade) foram analisadas no programa TRACER 1.6.

2.4 Modelagem de nicho ecológico

Dados de ocorrência e variáveis ambientais

Tendo em vista a problemática envolvida na delimitação de *L. pentadactylus*, se tratando, portanto, de um complexo de espécies, optamos por não utilizar dados de ocorrência depositados em portais públicos, como GBIF, sites de museus e etc.. Assim, somente os indivíduos que foram previamente conferidos (genética e morfologicamente) foram utilizados para a construção dos modelos de nicho ecológico, ou seja, os mesmos 100 indivíduos citados na seção anterior (Tabela 1 – Material Suplementar). Os registros de ocorrência das espécies normalmente se encontram agrupados em regiões que apresentam maior esforço amostral resultando em localidades que são espacialmente dependentes. Isso faz com que o modelo se ajuste aos dados de calibração (*overfitting*) e, devido a isso, não consiga prever de forma independente a acurácia dos dados (Radosavljevic & Anderson, 2013). Esse efeito pode ser minimizado realizando uma filtragem espacial aleatória através da exclusão de localidades que estão muito próximas umas das outras (Pearson et al., 2007; Radosavljevic & Anderson, 2013). Para os nossos dados, aplicamos um filtro espacial considerando um raio de 25km², a fim de diminuir a agregação espacial e

consequentemente autocorrelação espacial dos registros de ocorrência (Boria et al., 2014).

Foram utilizadas variáveis ambientais climáticas e não climáticas (Tabela 1). Para avaliar a distribuição espacial das áreas adequadas para ocorrência de *L. pendadactylus* em épocas passadas, utilizamos variáveis climáticas estimadas para períodos como o Holoceno (~6 mil anos atrás) e Último Máximo Glacial (LGM, ~22 mil anos atrás) construídos a partir de modelos de circulação climática global, *Community Climate System Model* (CCSM4).

Testamos a correlação entre as variáveis através do Fator de Inflação da Variância (VIF). VIF pode ser usado para detectar colinearidade, ou seja, forte correlação entre duas ou mais variáveis preditoras. Dessa forma excluímos variáveis altamente correlacionadas, aplicando um limiar de 0.7 usando o pacote *usdm* implementado do programa R (R Development Core Team, 2014).

Modelos de nicho ecológico para o presente e o passado

Para construir os modelos, nós utilizamos o algoritmo de máxima entropia (MaxEnt) a partir do pacote *dismo* no programa R. MaxEnt é um algoritmo que realiza previsões das preferências das espécies para determinado ambiente a partir da razão entre presença (uso do habitat) e *background* (disponibilidade do habitat) (Philips et al., 2006). A Amazônia *sensu latu* (Eva & Huber, 2005) foi definida como área de *background*, ou seja, a área geográfica onde os modelos de nicho foram calibrados, avaliados e projetados, adotando uma resolução espacial de 2,5km². Os modelos foram gerados utilizando 10.000 pontos de *background*. Foram construídos 30 modelos combinando 3 diferentes curvas de resposta (Linear + Quadrática, Linear + Quadrática + Produto, Linear + Quadrática + Hinge) com 10 valores de beta regularizador (de 0.5 a 5, a cada 0.5). Usamos o Critério de Informação de Akaike (AIC) para selecionar o melhor modelo (Warren & Seifert, 2011). Esse critério foi adotado em detrimento dos outros, pois foi demonstrado que oferece vantagens significativas sobre os métodos comumente utilizados (Warren & Seifert, 2011). O desempenho dos modelos selecionados foi avaliado através da estimativa da área abaixo da curva ROC (AUC), considerando adequados apenas os modelos com AUC > 0.7 (Warren & Seifert, 2011). Dois grupos de modelos foram avaliados: um usando todas as variáveis e outro usando apenas as variáveis climáticas.

Para avaliar a distribuição geográfica de áreas adequadas à ocorrência de *L. pentadactylus* em dois períodos do Quaternário, nós projetamos para o Holoceno e LGM os modelos do Maxent calibrados no presente apenas com as variáveis climáticas. A exclusão de variáveis não climáticas para projeção do passado é recomendada uma vez que não temos projeções acuradas de como seriam a paleodistribuição de variáveis como solo e topografia, por exemplo.

2.5 Importância relativa de isolamento por distância geográfica, isolamento por ambiente e isolamento por barreira fluvial

Para calcular a importância relativa de isolamento por distância, isolamento por ambiente e isolamento por barreira fluvial sobre a variabilidade genética de *L. pentadactylus*, utilizamos teste de Mantel simples. Este teste é apropriado quando a hipótese em estudo pode ser formulada em termos de distâncias (Legendre & Fortin, 2010), e tem sido bastante usado quando nichos multidimensionais são analisados para identificar influência de fatores ecológicos na variação genética populacional (Legendre & Fortin, 2010; Orsini et al., 2013). O teste de Mantel consiste em estimar a correlação entre duas matrizes através do coeficiente r de correlação de Pearson. A significância dos valores de r foi estimada através de 999 permutações. Adicionalmente, realizamos a análise de partição de variância a partir de regressão múltipla de matrizes de distância (Borcard et al., 1992; Lichstein, 2007) para quantificar o efeito puro e compartilhado do isolamento por distância geográfica, isolamento por ambiente e barreira fluvial.

Matriz de distância de ambiental (Nicho) – Para cada linhagem identificada pela árvore Bayesiana (Figura 1) executamos o MaxEnt e projetamos no espaço geográfico os valores de adequabilidade ambiental. Os valores de adequabilidade ambiental foram obtidos a partir do output *raw* do MaxEnt, transformados em \log_{10} para aproximar a distribuição dos dados a uma distribuição normal. Aqui foi usado o mesmo procedimento de seleção de modelos descrito na seção anterior. Por exemplo, considerando duas linhagens, A e B, associamos os pontos de ocorrência da linhagem A com os valores de célula dos mapas de projeção de adequabilidade ambiental. Em seguida o mesmo é feito para a linhagem B. A distância ambiental entre indivíduos de duas linhagens foi então estimada pela distância euclidiana no espaço bidimensional de nicho (nicho de A versus nicho de B, por exemplo).

Matriz de distância geográfica e genética – Para o mesmo conjunto de dados foi estimado também a distância geográfica e a distância genética entre seus indivíduos.

Matriz de distância do rio – Considerando os indivíduos que estão em margens opostas do rio Amazonas, codificamos os indivíduos da margem esquerda com valores 0 e da margem direita com valores 1. Portanto a distância absoluta entre indivíduos localizados na mesma margem será 0 (onde $0 - 0 = 0$, ou $1 - 1 = 0$) e a distância absoluta entre indivíduos de margens oposta será 1 (onde, $1 - 0 = 1$, ou $0 - 1 = 1$).

Todas as análises aqui descritas foram realizadas utilizando os pacotes *vegan*, *raster*, *ape*, e *ecodist* no programa R.

3. RESULTADOS

Estrutura populacional e reconstrução filogeográfica

As análises Bayesianas de estrutura populacional genética baseada nos genes mitocondriais 12S e 16S concatenados, indicaram com maior probabilidade a existência de quatro grupos genéticos ($k = 4$). De acordo com a distribuição espacial desses indivíduos, nós atribuímos nomes a esses grupos os quais correspondem a: grupo Norte, abrangendo em sua maioria indivíduos localizados ao norte do rio Amazonas; grupo Sul I e Sul II, com predominância dos indivíduos localizados ao sul do rio Amazonas; e por fim, grupo Guiana que incorpora todos os indivíduos da Guiana Francesa e do Amapá (Figura 1).

O modelo proposto pelo jModeltest a partir do critério de Akaike foi o HKY+G, o qual foi usado para reconstrução filogenética. Foram considerados como clados, os ramos com probabilidade posterior >0.95 . A árvore Bayesiana de *L. pentadactylus*, indica dois principais eventos de divergência. O primeiro com a separação da maioria dos indivíduos que estão em ambas às margens do rio Amazonas (Norte x Sul), e uma segunda divisão separando em dois clados (Norte x Guiana), os indivíduos que estão ao norte do rio Amazonas. De maneira geral, as distâncias genéticas p entre os grupos foram baixas (Tabela 1). Trabalhos anteriores com anuros assumem que distâncias maiores que 2% indicam variação intraespecífica (Vences et al., 2005; Fouquet et al., 2007; Crawford et al., 2010), dessa forma temos três linhagens (Figura 2) altamente suportadas: os clados Guiana, Norte e Sul (Sul I + Sul II).

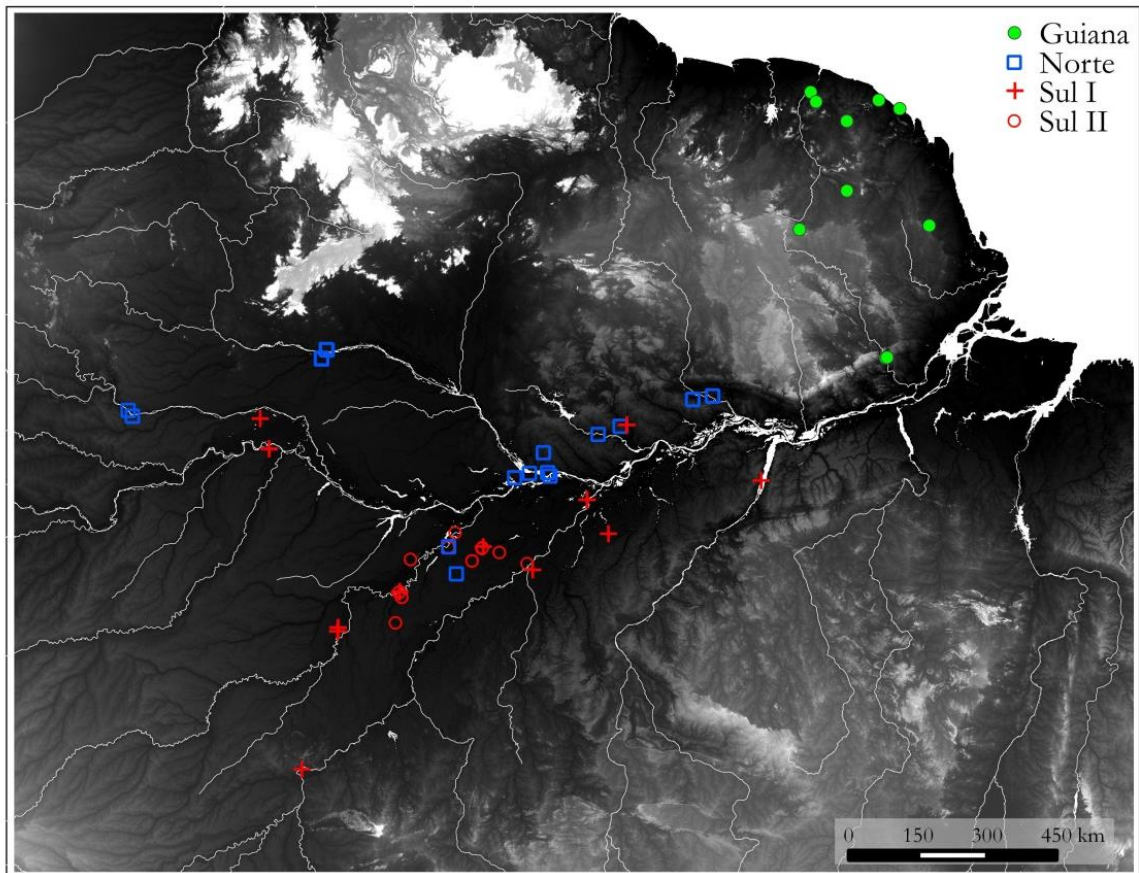


Figura 1. Mapa com a distribuição espacial dos grupos genéticos encontrados pelo BAPS ($k=4$). Círculos verdes representam o grupo Guiana; quadrados azuis grupo Norte; e cruzes e círculos vermelhos, respectivamente, grupo Sul I e Sul II.

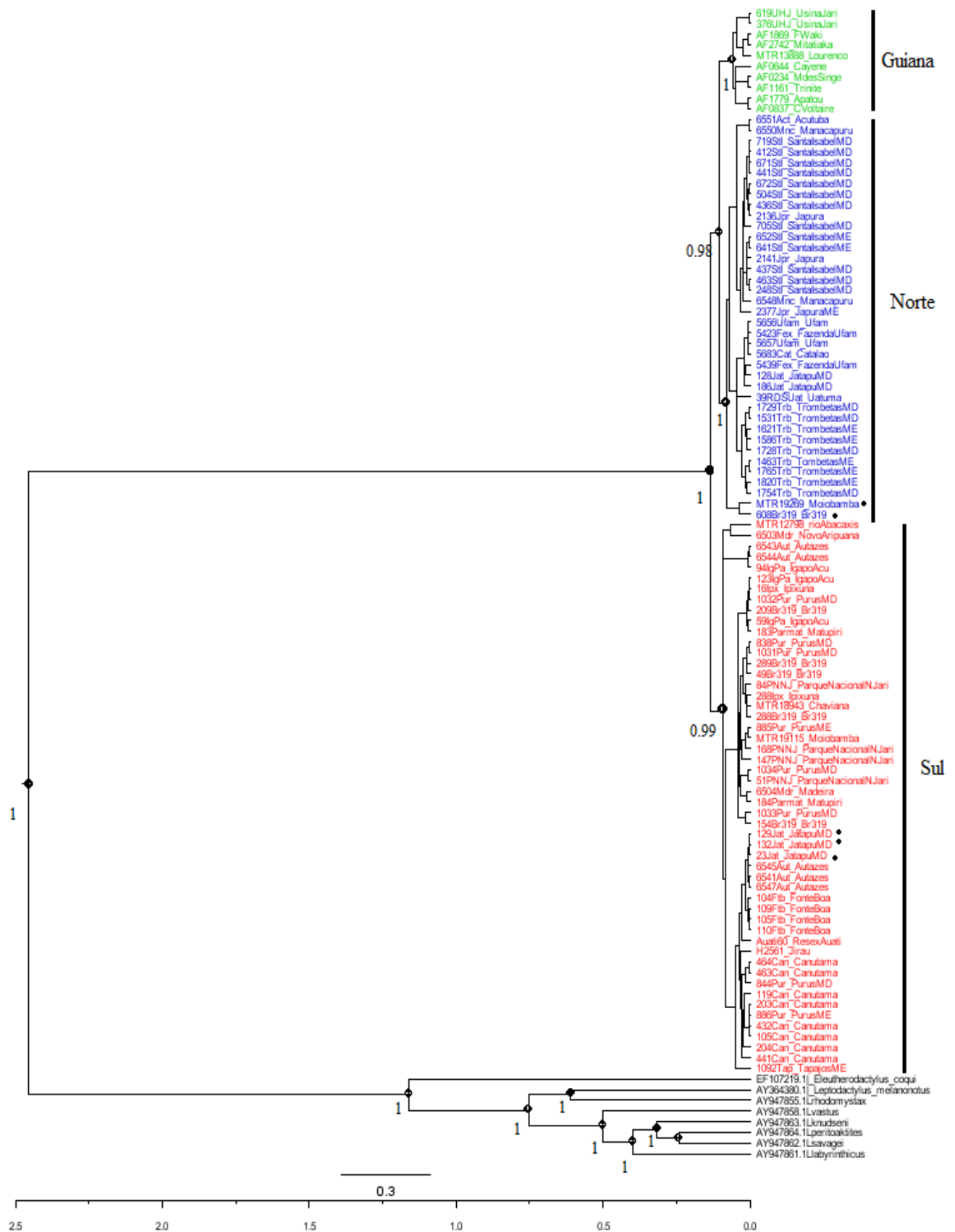


Figura 2. Inferência Bayesiana baseada em fragmentos dos genes mitocondriais 12S e 16S concatenados (1171 pb). Valores abaixo dos nós indicam a *probabilidade posterior*. Eixo representa a escala de tempo variando de 0 (presente) até 2,5 milhões de

anos atrás (Ma), com intervalos de tempo de 500 mil anos. Círculos pretos nos cladogramas Norte e Sul indicam os indivíduos que compartilham haplótipos. Os agrupamentos indicados pelos BAPS (Figura 1) estão representados pelas cores dos cladogramas na árvore.

Tabela 1. Valores em porcentagem de distância genética p corrigida entre os grupos encontrados pelo BAPS.

	Guiana	Norte	Sul I	Sul II
Guiana				
Norte	2.1%			
Sul I	3.2%	2.5%		
Sul II	3.2%	2.1%	0.5%	-

Modelagem de nicho ecológico

Os modelos de nicho apresentaram alto desempenho, tanto considerando todos os pontos de ocorrência de *L. pentadactylus* quanto considerando as três linhagens separadamente (Tabela 2). Em todos os modelos a média da variação diária de temperatura (Bio2) figurou como a variável mais importante, mostrando uma preferência de *L. pentadactylus* a regiões com baixa variação diária de temperatura. Variáveis edáficas estiveram entre as três mais importantes nos modelos das linhagens Norte (Argila) e Guiana (CEC e pH). Para a linhagem Sul, as três variáveis importantes estiveram relacionadas com condições de temperatura (Tabela 2).

A projeção espacial do modelo de nicho para *L. pentadactylus* para o presente revelou uma extensa área geográfica não favorável a nordeste da linhagem Norte e sudoeste da linhagem Guiana (Figura 2a). Esta área desfavorável esteve presente também nas projeções espaciais dos modelos de cada linhagem, sendo mais extensa e mais inadequada para as linhagens Norte e Sul que para a linhagem Guiana. Os modelos para as linhagens Norte e Sul previram pouca ou nenhuma área favorável para a região de ocorrência a linhagem Guiana, embora o modelo de Guiana tenha previsto área favorável para esta linhagem ao norte do rio Amazonas na Amazônia Central, área ocupada atualmente pelas linhagens Norte e Sul (Figura 2).

Tabela 2. Resultados dos modelos MaxEnt selecionados para *L. pentadactylus* e para as três linhagens intraespecíficas separadamente. *N* representa número de pontos de ocorrência após filtragem espacial, utilizados na calibração dos modelos. Em curvas de resposta, L= *Linear*, Q=*Quadratic*, P=*Product*. Valores entre parênteses em contribuição das variáveis referem-se à contribuição de cada variável ao ganho do modelo durante o processo iterativo de treinamento do algoritmo e estão em porcentagem.

	Modelo	<i>L. pentadactylus</i> (<i>N</i> = 36)	Sul (<i>N</i> =17)	Norte (<i>N</i> =12)	Guiana (<i>N</i> =9)
Curvas de Resposta	§	LQ	LQP	LQP	LQP
	†	LQP	LQP	LQP	LQ
β multiplicador	§	3	3	1.5	3
	†	1	1.5	1.5	3
AUC	§	0.91	0.92	0.95	0.95
	†	0.90	0.91	0.95	0.95
Contribuição das variáveis	§	bio2 (74.6) bio4 (9.5) bio19 (8)	bio2 (46.3) bio4 (29.4) bio3 (14.2)	bio2 (55.8) argila (18.8) bio19 (17.2)	bio2 (49.7) CEC (34.2) pH (8.5)
	†	bio2 (60.7) bio4 (12.4) bio19 (9.2)	bio2 (43) bio4 (28.9) bio3 (19.6)	bio2 (66.5) bio5 (17.7) bio19 (9.4)	bio2 (86.6) bio18 (10.5) bio3 (2.9)

§: modelo com todas variáveis, climáticas e não climáticas.

†: modelo apenas com variáveis climáticas

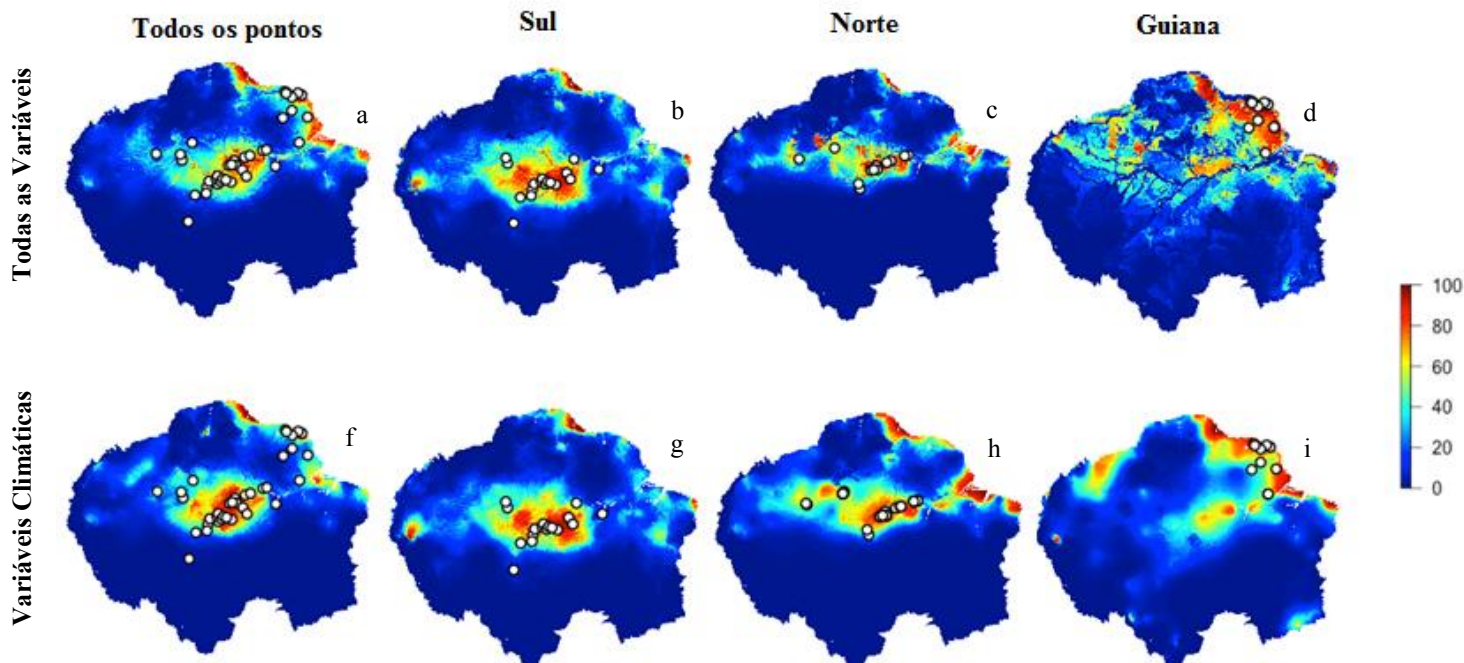


Figura 2. Modelos de distribuição de nicho ecológico de *Leptodactylus pentadactylus* para o Presente considerando diferentes conjuntos de pontos de ocorrência (colunas) e de variáveis (linhas). Modelos com todas as variáveis incluem climáticas, edáficas e de estrutura da vegetação. A barra lateral representa o índice de adequabilidade ambiental, variando de 0 (azul - inadequada) a 100 (vermelho - adequado). Pontos brancos representam os pontos de ocorrência espacialmente filtrados considerando um raio de 25km² que foram usados nas análises.

A projeção dos modelos para o Último Máximo Glacial (LGM) mostrou a presença de áreas de alta adequabilidade ambiental para as linhagens do Sul e do Norte principalmente na Amazônia central, áreas onde elas atualmente ocorrem (Figura 3). Embora o modelo da linhagem Norte tenha previsto áreas favoráveis na região das Guianas, uma extensa área desfavorável foi prevista isolando estas duas regiões. Já o modelo da linhagem Guiana mostrou áreas favoráveis ao longo da calha do médio-baixo rio Amazonas e ao norte da Amazônia Central, em direção perpendicular ao rio Amazonas. Ainda no LGM, o modelo para linhagem Guiana não indica a presença de habitat adequado para sua área de ocorrência atual. Apenas a partir do Holoceno é que se pode verificar a presença de áreas favoráveis para o estabelecimento da linhagem

Guiana na sua área de ocorrência presente. Por outro lado, os modelos para as linhagens Norte e Sul para o Holoceno indicaram uma diminuição de habitat adequado na região da Amazônia central e um deslocamento de ambientes favoráveis para oeste.

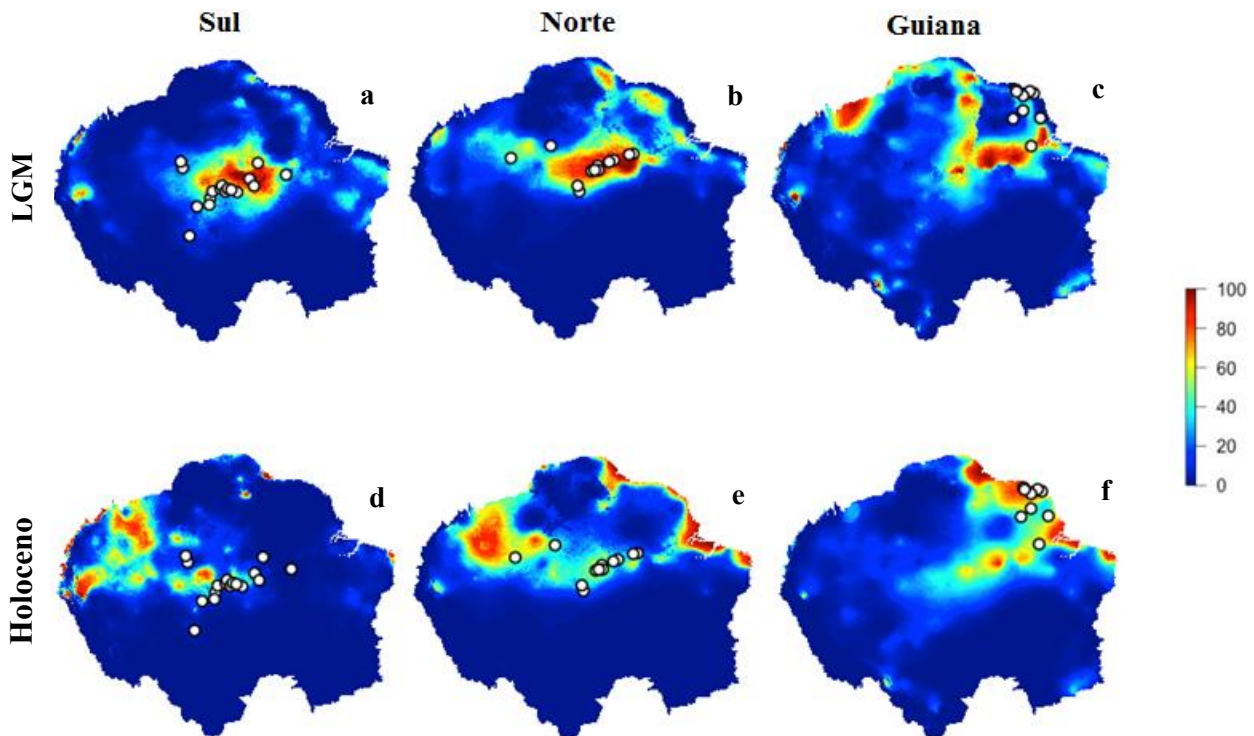


Figura 3. Modelos de paleodistribuição de *Leptodactylus pentadactylus*. Para o LGM (~22mil anos): Linhagem Sul (a); linhagem Norte (b) e linhagem Guiana (c). Para o Holoceno (~6mil anos): Linhagem Sul (d); linhagem Norte (e) e linhagem Guiana (f). A barra lateral representa o índice de adequabilidade ambiental, variando de 0 (azul - inadequada) a 100 (vermelho - adequado). Pontos brancos representam os pontos de ocorrência espacialmente filtrado considerando um raio de 25km².

Importância relativa de isolamento por distância geográfica, isolamento por ambiente e isolamento por barreira fluvial

Comparando-se as linhagens Norte e Sul as diferenças genéticas entre seus indivíduos estiveram mais associadas com as diferenças de margem do rio (Tabela 3 e Figura 4a), significando que as diferenças genéticas tendem a ser maiores quando comparamos indivíduos de margens diferentes e menores quando comparamos

indivíduos que ocorrem no mesmo lado da margem. Tanto isolamento por ambiente quanto isolamento por distância geográfica tiveram uma baixa associação com as diferenças genéticas dos indivíduos destas duas linhagens (Norte e Sul). A baixa diferenciação de nicho entre os indivíduos das linhagens Norte e Sul pode ser observada também na Figura 5b, onde se observa uma mistura entre os indivíduos destas duas linhagens no espaço de nicho.

Para as linhagens Norte e Guiana, observamos que o efeito do isolamento por distância geográfica foi maior que isolamento por ambiente (Tabela 3 e Figura 4). No entanto, houve uma clara separação de nicho entre as duas linhagens (Figura 5a). Assim, o efeito compartilhado desses dois fatores (Figura 4) indica a importância de ambos sobre a diferenciação genética entre as linhagens Norte e Guiana.

Tabela 3. Teste de Mantel entre distância genética (*GEN*) e distâncias ambiental (*AMB*), geográfica (*GEO*) e de rio (*RIO*) obtidos através da comparação entre os indivíduos das linhagens Norte e Guiana, e Norte e Sul. Valores de significância *p* obtidos através de 999 permutações: * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 e *** ≤ 0.001 .

	<i>NORTE – GUIANA</i>	<i>NORTE-SUL</i>
<i>GEN ~ AMB</i>	0.501***	0.271***
<i>GEN ~ GEO</i>	0.686***	0.369***
<i>GEN ~ RIO</i>		0.675***

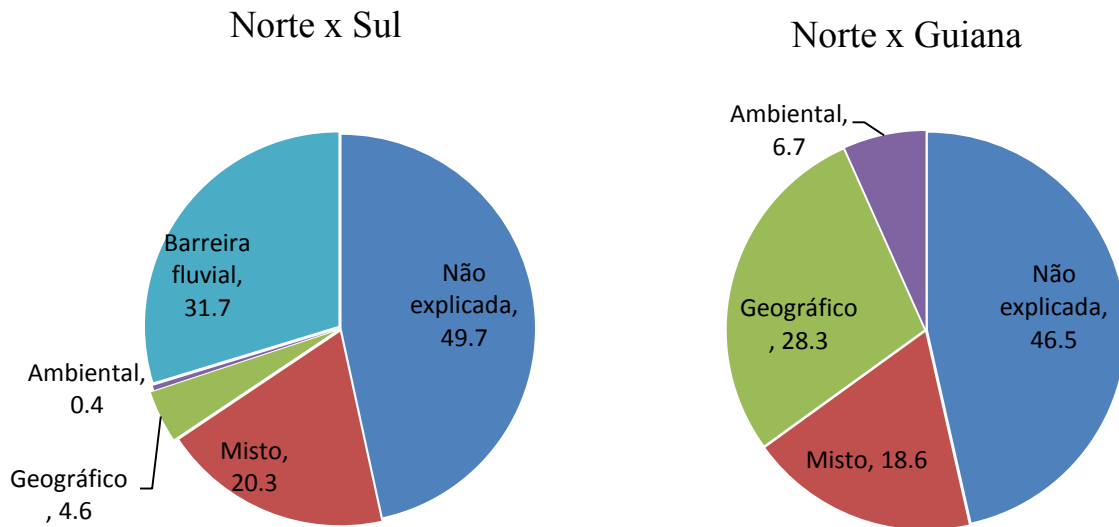


Figura 4. Efeitos puros e compartilhados (mistos) dos diferentes tipos de isolamento sobre as distâncias genéticas entre as linhagens de *L. pentadactylus*, obtidos através da análise de partição de variância dos modelos de regressão de matrizes de distâncias.

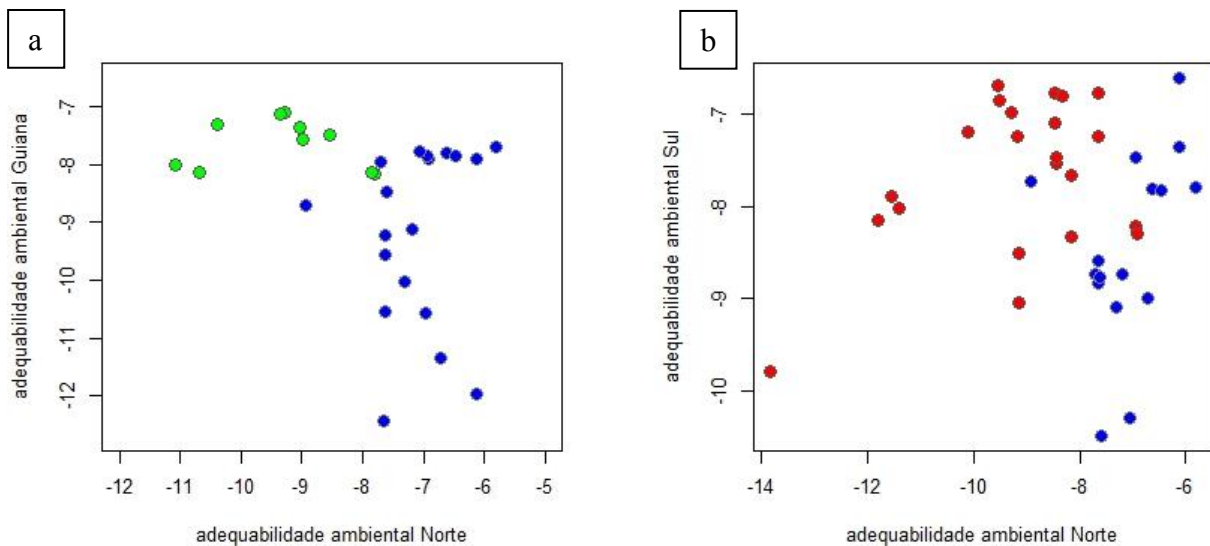


Figura 5. Comparação entre os nichos ecológicos de cada linhagem. Os eixos representam a adequabilidade ambiental de cada linhagem (resultado dos mapas preditivos – ver métodos para detalhamento dos métodos empregados). Em **a** – comparação entre os nichos da linhagem Guiana (círculos verdes) e Norte (círculos azuis). Em **b** – comparação entre os nichos da linhagem Norte (círculos azuis) e Sul (círculos vermelhos).

4. DISCUSSÃO

Diferentes processos estiveram associados com a estrutura genética dentro de *L. pentadactylus*. Aqui observamos primeiramente um processo de divergência genética ocorrendo na Amazônia central imposto pela presença de barreira fluvial, rio Amazonas, limitando o fluxo gênico. Os resultados indicam ainda uma história de divergência mais recente entre as populações do Norte e Guiana controlada por mudanças climáticas, através de isolamento adaptativo (isolamento por ambiente) e não adaptativo (isolamento geográfico).

Embora o rio Amazonas tenha sido o principal condicionante na diferenciação genética entre as populações que ocorrem em suas margens opostas, nós encontramos compartilhamento de haplótipos entre as populações Norte e Sul em três localidades (Jatapu, Br 319 Km350 e Moioyamba – Figura 1). Nos últimos 2,5 milhões de anos o rio Amazonas vem sofrendo diversas alterações. Dado o contexto histórico geológico dessa área (Rosseti et al., 2005; Latubresse et al., 2002; Hoorn et al., 2010; Rosseti et al., 2015), é plausível considerar que no passado, possa ter ocorrido conexão entre ambas as margens, facilitando o contato entre populações do norte e sul desse rio, como já demonstrado em alguns trabalhos com vertebrados utilizando genes mitocondriais (Muniz, 2012; Kaefer et al., 2013; Gravena et al., 2014).

A projeção espacial do modelo de nicho de *L. pentadactylus* para o presente com todos os pontos de ocorrência (Figura 2a), revelou uma extensa área inadequada para a linhagem da Guiana. Podemos inferir a partir dos modelos projetados para o passado, que essa área pode ter sido adequada durante o Pleistoceno, que forneceu um caminho para a dispersão a partir das populações do Norte (Figura 3a e 3d). Essa rota de dispersão poderia ter sido pela calha do rio Amazonas e/ou num sentido nordeste (a partir da população Norte) durante o LGM (~22 mil anos) (Figura 3c). Já durante o Holoceno (~6mil anos), teria aumentado a disponibilidade de habitat adequado para essa população ao passo que as potenciais rotas de dispersão diminuiriam, fazendo com estas se isolassem das outras populações (Figura 3f). Essa separação entre Norte e Guiana também pode ter sido favorecida devido à mudança de adequabilidade ambiental, durante o Holoceno, do Norte para oeste da Amazônia (Figura 3e), enquanto que a adequabilidade ambiental para a linhagem da Guiana migrava para leste da Amazônia (Figura 3’). Cheng et al., 2013, caracterizou a variabilidade hidroclimática da Amazônia para diversas escalas de tempo, através de registros datados de isótopos

de oxigênio. Os autores encontram que a variabilidade climática durante o Pleistoceno exibiu um padrão quase dipolo, onde o clima na parte oeste da Amazônia era diferente da parte leste. Assim, é possível que as oscilações climáticas do Pleistoceno possam ter tido uma grande influência na estrutura genética de *L. pentadactylus* observada no presente.

Fatores geográficos e ambientais em conjunto, criam diferenciação genética mais forte e mais discreta do que o isolamento por distância sozinho, enfatizando a importância da seleção ambiental na formação de padrões de variação genética (Lee et al., 2011; Mallet et al., 2014; McGaughan et al., 2014). Em contrapartida, Orsini et al. (2013), a partir de uma compilação de estudos recentes, relataram que isolamento por ambiente com ou sem isolamento por distância, parece ser o processo mais comum na condução da diferenciação genética. O fluxo gênico entre as populações que habitam ambientes diferentes pode ser reduzido por seleção divergente, resultante da adaptação local (isolamento por ambiente), mas que pode ser intensificado pelo isolamento por distância geográfica, principalmente se o gradiente de mudanças ambientais se distribui ao longo de uma extensa área geográfica. Nossos resultados indicam que a diferenciação genética e história de colonização da linhagem Guiana, está relacionada tanto com processos não-adaptativos (isolamento por distância geográfica) quanto por processos adaptativos (isolamento por ambiente) (Figura 4b). Assim, apoiamos a ideia de que isolamento por ambiente e por distância geográfica, juntos, tem influência na estruturação genética de *L. pentadactylus*, como já demonstrado anteriormente para outras espécies (Lee et al., 2011; Mallet et al., 2014; McGaughan et al., 2014).

Apesar de já ter sido observado que algumas populações de tetrápodes da Amazônia estão estruturadas devido a isolamento por distância (Mota, 2010; Kaefer et al., 2012) estes estudos não consideraram se existe uma diferenciação ambiental ao longo do gradiente geográfico analisado. Nas análises de diferenciação de nicho das populações da linhagem Norte e Guiana, ficou evidente que ambas tem baixa similaridade de nicho (Figura 5a), indicando isolamento por ambiente atuando conjuntamente com isolamento por distância (Tabela 2). Sob isolamento por ambiente, a adaptação local das populações ao seu habitat impulsiona sua diferenciação de nicho ecológico e, portanto, limita a probabilidade de fluxo gênico entre elas (Shaffer et al., 2013). Dessa forma, esses fatores explicariam a forte estruturação para a linhagem Guiana (Figura 1). Em contrapartida, para as populações Norte e Sul, a comparação dos modelos de nichos ecológico delas indicou que ambas tem alta similaridade de nicho

(Figura 5b). Neste caso, a variação genética dessas populações pode estar mais associada ao efeito do rio Amazonas (Tabela 3), significando que as diferenças genéticas tendem a serem maiores quando comparamos indivíduos de margens diferentes e menores quando comparamos indivíduos que ocorrem no mesmo lado da margem.

A variação fenotípica observada em *Leptodactylus pentadactylus* (Heyer, 2005) poderia, então, ser atribuída à influência desses fatores (ambientais e geográficos), os quais estariam atuando principalmente na forma e tamanho de caracteres que estão associados com gradientes abióticos seletivos (Bridle & Vines 2007), justificando assim a grande confusão taxonômica envolvida nesse complexo (Hero & Galatti, 1990; Galatti, 1992; Savage, 2002; Heyer, 2005; Lima et al., 2006, Costa et al., 2013). Vale ressaltar que *L. pentadactylus* está distribuído em toda a bacia amazônica (sensu Heyer 2005 e de Sá et al., 2014) e nós focamos esforços em uma parte dessa distribuição, Amazônia central e Guiana. Portanto a inclusão de novas amostras, contemplando a distribuição da espécie em toda sua extensão, poderá fornecer maior embasamento sobre a história evolutiva de *L. pentadactylus*, bem como identificar possíveis linhagens evolutivas independentes. Dessa forma as ferramentas que aqui foram utilizadas (filogeografia e modelagem de nicho ecológico) adicionadas a estudos com caracteres morfológicos, comportamentais e acústicos poderão elucidar a taxonomia complexa que envolve a espécie.

5. CONCLUSÃO

A partir de nossas análises foi possível observar que diferentes fatores contribuem para moldar a variabilidade genética de *L. pentadactylus* vista atualmente. Conseguimos com esse estudo, elucidar quase 60% dos fatores que estão envolvidos na diferenciação de *L. pentadactylus*, o que é considerado muito relevante em estudos amazônicos. Barreira fluvial, oscilações climáticas do Quaternário, isolamento por distância e isolamento ambiental se mostram entre os fatores que mais elucidam a distribuição espacial de *L. pentadactylus*. No entanto, a associação entre esses fatores tem sido pouco incorporada em estudos para a fauna amazônica, uma região onde há

uma elevada diversidade de habitats, os quais poderiam exercer um efeito direto na estrutura genética populacional das espécies. Essa conclusão só foi possível ao aliar ferramentas de modelagem de nicho ecológico juntamente com abordagens filogeográficas, comumente utilizadas sozinhas. Esta última tem sido amplamente utilizada na Amazônia, mas a primeira, raramente. Portanto a aplicação destas duas ferramentas em conjunto deve contribuir de maneira significativa no entendimento da complexidade dos processos envolvidos na diversificação da biota Amazônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.

Beheregaray, L. B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17:3754-74

Borcard D., Legendre P., Drapeau P. (1992). Partialling out spatial component of ecological variation. *Ecology*, 73, 1045-1055.

Boria, R. A.; Olson, L. E.; Goodman, S. M. & Anderson, R. P. (2014). Spatial filtering to reduce sampling bias can improve the performance of ecological niche models. *Ecological Modelling* 275: 73–77.

Caldwell JP, Lima AP (2003) A new Amazonian species of *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae) with a nidicolous tadpole. *Herpetologica* 59:219–234.

Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323:785-789.

Camargo, A., F. Werneck, M. Morando, J. Sites, and L. Avila. (2013). Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata: Liolaemidae) in the Monte Desert of Central Argentina using Bayesian phylogeography and ecological niche modelling. *Molecular Ecology*.22:4038–4054.

Carstens, B.C., Richards, C.L. (2007) Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution*, 61, 1439–1454.

Chan, L. M.; Brown, J. L.; Yoder, A. D. (2011). Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59: 523–537.

Cheng H, Sinha A, Cruz FW, Wang X, Edwards RL, d’Horta FM, Ribas CC, Vuille M, Stott LD, Auler AS. (2013) Climate change patterns in Amazonia and biodiversity. *Nature Communication*. 4:1411

Cockerham, C.C.; Weir, B.S. (1993). Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution*. 47: 855-863.

Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J.; Tang, J. (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9(1): 539.

Costa, J. B. S.; Bermerguy, R. L.; Hasui, Y.; Borges, M. S; Ferreira Júnior, C. R. P.; Bezerra, P. E. L.; Costa, M. L.; Fernandes, J. M. G. (1996). Neotectônica da região Amazônica: aspectos tectônicos, geomorfológicos e deposicionais. *Genomos*, v. 2, p. 23-44.

Costa, J.B.S.; Bermerguy,R.L.; Hasui, Y.; Borges, M. S. (2001). Tectonics and paleogeography along the Amazon River. *South American Earth Sciences*, v. 14, p. 335- 347.

Davis, M.B., Shaw, R.G. (2001) Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, 292, 673– 679.

De Sá, R. O., Grant, T., Camargo, A., Heyer, W. R., Ponssa, M. L., & Stanley, E. (2014). Systematics of the Neotropical Genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): Phylogeny, the Relevance of Nonmolecular Evidence, and Species Accounts. *South American Journal of Herpetology*, 9(s1), S1–S100.

Drummond, A.J.; Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 214.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of

fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11-15.

Duellman, W.E. (1978): The biology of an Equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publication University of Kansas Museum of Natural History* **65**: 1–352.

Duellman, W. E. (1999). Distribution patterns of amphibians in South America. In: *Patterns of distribution of amphibians: A global perspective*. W.E. Duellman (ed.). The John Hopkins University Press, Baltimore & London, p. 255-328.

Duellman, W.E. & L. Trueb. (1994). *Biology of amphibians*. Baltimore. The Johns Hopkins University Press.

Eva, H. D. & Huber, O. (2005) *Una Propuesta para la Definición de los Límites Geográficos de la Amazonía*. Joint Research Center, European Comisión & the Organización del Tratado de Cooperación Amazónica Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. Document No. EUR21808-ES.

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial 22 DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491

Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C.; Blanc, M.; Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, 10: 1–10.

Frost, Darred R. 2014. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Eletronic Database accesible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Galatti, U. (1992). "Population biology of the frog *Leptodactylus pentadactylus* in a Central Amazonian rainforest." *Journal of Herpetology*, 26(1), 23-31.

Gascon, C., Malcolm, J.R., Patton, J.L., da Silva, M.N.F., Bogart, J.P., Loughheed, S.C., Peres, C.A., Neckel, S. & Boag, P.T. (2000). Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13672–13677.

Gravena W, Farias IP, da Silva VMF, Hrbek T. (2014). Living between rapids: genetic structure and hybridization in the pink river dolphins. *Biological Journal of the Linnean Society*.

Haffer J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165,131–137.

Hess, L.L.; Melack, J.M.; Novo, E.M.L.M.; Barbosa, C.C.F.; Gastil, M. (2003). Dual season mapping of wetland inundation and vegetation on the central Amazon basin. *Remote Sensing of Environment*, 87: 404-428.

Heyer, W.R. (2005): Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, northern South America, and Amazonia. *Arquivos de Zoologia* 37: 269–348.

Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.-A.C.Hayek, M.S. Foster. (1994). *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard methods for amphibians.* Smithsonian Institution Press. Washington, USA.

Hero, J-M., Galatti, U. (1990): Characteristics distinguishing *Leptodactylus pentadactylus* and *L. knudseni* in the central Amazon rainforest. *Journal of Herpetology* 24: 421–428.

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. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avis*. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 54,291–301.

Hoorn C., et al. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.

Hrbek T and Larson A (1999) The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* 53:1200-1216.

Hutchinson, G.E. (1957) Concluding remarks. Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology, 22, 415–427.

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Visitado em 20 Dezembro 2015.

Kaefer, I. L., Tsuji-Nishikido, B. M., Mota, E. P., Farias, I. P., & Lima, A. P. (2013). The early stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. *Evolutionary Biology*, 40(2), 228–245.

Kidd, D.M., Ritchie, M.G. (2006) Phylogeographic Information Systems; putting the geography into phylogeography. *Journal of Biogeography*, 33, 1851–1865.

Kinupp, V.F., & W.E. Magnusson. (2005). Spatial patterns in the understory shrub genus *Psychotria* in central Amazonia: effects of distance and topography. *Journal of Tropical Ecology*, 21: 363-374.

Lee, C.-R., and T. Mitchell-Olds. (2011). Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. *Molecular Ecology*. 20:4631–4642.

Legendre P, Fortin MJ (2010) Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 831–844.

Lichstein, J. W. (2007). Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecology*, 188, 117-131.

Lima, A.P., Magnusson, W.E., Menin, M., Erdtmann, L.K., Rodrigues, D.J., Keller, C., Hödl, W. (2012): Guia de Sapos da Reserva Adolpho Ducke - Amazônia Central / Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke - Central Amazonia, 2nd Edition. Manaus, Editora INPA.

McGaughran A, Morgan K, Sommer RJ (2014) Environmental variables explain genetic Structure in a Beetle-Associated Nematode. *PLoS ONE* 9(1): e87317.

Menin, M., F. Waldez & A.P. Lima. (2008). Temporal variation in the abundance and number of species of frogs in 10,000 ha of a forest in Central Amazonia, Brazil. *South America Journal of Herpetology*,3(1): 68-81.

Menin, M., Lima, A.P., Rodrigues, D.J. (2010): The tadpole of *Leptodactylus pentadactylus* (Anura: Leptodactylidae) from Central Amazonia. *Zootaxa* 2508: 65–68.

Mota, E. P, (2010). Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura; Hylidae) na Amazônia brasileira. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, da Conservação e Biologia Evolutiva.

Muniz, F de L. (2012). Filogeografia e genética de populações de jacaré-paguá (*Paleosuchus palpebrosus*) ao longo do rio Madeira e bacia do rio Paraguai (Pantanal). Genética, Conservação e Biologia Evolutiva Mestrado: 79.

Orsini L, Vanoverbeke J, Swillen I, Mergeay J, De Meester L (2013) Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Molecular Ecology*.

Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W. O.; Stice, L.; Grabowski, G. (1991). “The Simple Fool’s Guide to PCR, Version 2.0.” Privately published document compiled by S. Palumbi, Dept. Zoology, *Univ. Hawaii*.

- Pearson, R.G.; Raxworthy, C.J.; Nakamura, M. & Peterson, A.T. (2007). Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34: 102-117.
- Phillips, S. J.; Anderson, R. P. & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231–259.
- Posada D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253–1256.
- Pulliam, H.R. (2000). On the relationship between niche and distribution. *Ecology Letters*, 3,349–361.
- R Development Core Team. (2014) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Radosavljevic, A. and R.P. Anderson. (2013). Making better Maxent models of species distributions: complexity, overfitting and evaluation. *Journal of Biogeography*.
- Rambaut, A.; Pybus, O. G.; Nelson, M. I.; Viboud, C.; Taubenberger, J. K.; Holmes, E. C. (2008). The Genomic and Epidemiological Dynamics of Human Influenza A Virus, *Nature*, 453, 615-619.
- Ricklefs, R.E. 2007. History and diversity: Explorations at the intersection of ecology and evolution. *The American Naturalist* 170: S56-S70.
- Rodríguez, L.O., Duellman, W.E. (1994): Guide to the frogs of the Iquitos region, Amazonian Peru. The University of Kansas, Natural History Museum, Special Publication **22**:1–80 + 12 plates.
- Roelants K, Gower, D. J., Wilkinson, M., Loader, S.P., Biju, S.D., Guillaume, K., Moriau, L. Bossuyt, F. (2007) Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings National Academy Sciences USA* **104**:887–892.

Rossetti, D.F.; Toledo, P.M. & Góes, A.M. (2005). New geological framework for Western Amazônia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary research*. 63, 78-89

Rossetti DF, Bertani TC, Zani H, Cremon EH, Hayakawa (2012). EH: Late Quaternary sedimentary dynamics in Western Amazonia: Implications for the origin of open vegetation/forest contrasts. *Geomorphology*, 177- 870 178:74–92.

Salzburger, W.; Ewing, G.B.; Von Haeseler, A. (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952-1963.

Savage, J. M. (2002). *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica*. The University of Chicago Press, Chicago.

Shafer ABA, Wolf JBW. (2013) Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta-analysis of isolation-by-ecology. *Ecology Letters*. 16, 940 – 950.

Silva J. M. C., Rylands A. B., Fonseca G. A. B. (2005) The fate of Amazonian areas of endemism. *Conservation Biologist*. **19**, 689–694.

Sombroek, W. (2001) Spatial and temporal patterns of Amazon rainfall - Consequences for the planning of agricultural occupation and the protection of primary forests. *Ambio* 30: 388-396.

Souza, V.M., M.B. Souza & E.F. Morato. (2008). Efeitos da sucessão florestal sobre a anurofauna (Amphibia: Anura) da Reserva Catuaba e seu entorno, Acre, Amazônia sul-ocidental. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(1): 49-57.

Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I., Dalén, L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 277, 661–671.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1996). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193–1213.

Vences, M.; Thomas, M.; Meijden, A. van der; Chiari, Y.; Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(5): 1–12.

Vences, M. & D. B. Wake (2007): Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. – In: Heatwole, H. H. & M. Tyler (eds.): *Amphibian Biology*, Vol. 6, Systematics: pp. 2613-2669. – Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, Australia.

Xia X, et al. (2003) Effects of GC content and mutational pressure on the lengths of exons and coding sequences. *Journal Molecular Evolution*. 56(3):362-70

Wallace, A.R. (1876). *The Geographical Distribution of Animals*. Harper & Brothers, New York, Vol. 1.

Warren, D.L., and S.N. Seifert. (2011). Environmental niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications* 21:335-342.

Werneck, F.P., Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Sites, J.W. Jr. (2012) 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.

Wiens, J.J., M. J. Donoghue. (2004) Historical biogeography, ecology, and species richness. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 639–644.

Wright, S. (1943) Isolation by Distance. *Genetics*, 28, 114–38.

7. Material Suplementar

Tabela 1. Lista dos espécimes utilizados com suas respectivas informações de procedência e coordenadas geográficas.

Amostras	Localidade	Longitude	Latitude	Procedência
6551Act	Açutuba	-60.3568611	-3.1004167	CTGA
AF1779	Apatou	-54.20495	5.24286	CNRS
6544Aut	Autazes	-59.1166667	-3.7	CTGA
6545Aut	Autazes	-59.1166667	-3.7	CTGA
6547Aut	Autazes	-59.1166667	-3.7	CTGA
6541Aut	Autazes	-59.1166667	-3.7	CTGA
6543Aut	Autazes	-59.1166667	-3.7	CTGA
49Br319	BR 319 Km 300	-61.6147222	-5.0186111	INPA
209Br319	BR 319 KM 300	-61.6147222	-5.0186111	INPA
288Br319	BR 319 KM 300	-61.6147222	-5.0186111	INPA
289Br319	BR 319 KM 300	-61.6147222	-5.0186111	INPA
154Br319	BR 319 KM 300	-61.6147222	-5.0186111	INPA
608Br319	BR 319 Km 350	-61.9588889	-5.3019444	INPA
5656Ufam	Campus da UFAM	-59.9617222	-3.0840556	CTGA
5657Ufam	Campus da UFAM	-59.9617222	-3.0840556	CTGA
203Can	Canutama	-64.5723889	-6.5768333	INPA
432Can	Canutama	-64.5723889	-6.5768333	INPA
464Can	Canutama	-64.5723889	-6.5768333	INPA
463Can	Canutama	-64.5723889	-6.5768333	INPA
105Can	Canutama	-64.5661111	-6.4951389	INPA
441Can	Canutama	-64.5661111	-6.4951389	INPA
204Can	Canutama	-64.5723889	-6.5768333	INPA
119Can	Canutama	-64.5661111	-6.4951389	INPA
5683Cat	Catalão	-59.9080556	-3.1630556	CTGA
AF0644	Cayenne	-52.257589	4.879124	CNRS
AF0837	Chutes Voltaire	-54.0877778	5.0312222	CNRS
5439Fex	Fazenda Experimental da UFAM	-60.0530556	-2.6493333	CTGA
5423Fex	Fazenda Experimental da UFAM	-60.0530556	-2.6493333	CTGA
AF1869	Flat de la Waki	-53.41185	3.08364	CNRS

16Ipx	Floresta Estadual Tapauá – Ipixuna	-63.2906944	-6.3742222	INPA
288Ipx	Floresta Estadual Tapauá - Ipixuna	-63.2906944	-6.3742222	INPA
110Ftb	Fonte Boa, rio Solimões	-66.074393	-2.584065	*
104Ftb	Fonte Boa, rio Solimões	-66.074393	-2.584065	*
105Ftb	Fonte Boa, rio Solimões	-66.074393	-2.584065	*
109Ftb	Fonte Boa, rio Solimões	-66.074393	-2.584065	*
MTR12798	Igarapé Açu, Rio Abacaxis	-58.65	-4.4416667	MZUSP
6503Mdr	Lago Aracu, Novo Aripuanã, rio Madeira	-60.3073694	-5.2333	CTGA
MTR18943	Lago Chaviana, Itapuru, rio Purus	-61.9847222	-4.4016667	MZUSP
MTR13888	Lourenço	-51.6109	2.3215556	MZUSP
6550Mnc	Manacapuru	-60.6826	-3.1978056	CTGA
6548Mnc	Manacapuru	-60.6826	-3.1978056	CTGA
AF2742	Mitaraka	-54.44928	2.23577	CNRS
MTR19115	Moiobamba, Rio Purus	-62.133008	-4.720112	MZUSP
MTR19269	Moiobamba, Rio Purus	-62.133008	-4.720112	MZUSP
AF0234	Montagne des singes	-52.7166667	5.0666667	CNRS
84PNNJ	Parque Estadual Matupiri	-63.153611	-5.815278	INPA
147PNNJ	Parque Estadual Matupiri	-63.153611	-5.815278	INPA
184Parmat	Parque Estadual Matupiri	-61.0173889	-4.8333778	INPA
183Parmat	Parque Estadual Matupiri	-61.0173889	-4.8333778	INPA
168PNNJ	Parque Nacional Nascente do Lago Jari	-63.153611	-5.815278	INPA
51PNNJ	Parque Nacional Nascente do Lago Jari	-63.153611	-5.815278	INPA
123IgPa	RDS Igapó Açu	-61.3998056	-4.7477222	INPA
39RDSUat	Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã	-58.856448	-2.249315	INPA
Auati60	Reserva Extrativista Auati-Paraná, rio Solimões	-66.26969	-1.922898	Mamirauá
2136Jpr	rio Japurá	-69.047	-1.8496667	CTGA
2141Jpr	rio Japurá	-69.047	-1.8496667	CTGA
2377Jpr	rio Japurá	-69.1388611	-1.7228056	CTGA
186Jat	rio Jatapu	-58.245783	-2.060967	CTGA
128Jat	rio Jatapu	-58.3750556	-2.0712778	CTGA
132Jat	rio Jatapu	-58.245783	-2.060967	CTGA
129Jat	rio Jatapu	-58.3750556	-2.0712778	CTGA
23Jat	rio Jatapu	-58.245783	-2.060967	CTGA
6504Mdr	rio Madeira	-60.41101	-5.076183	CTGA
844Pur	rio Purus	-63.19925	-5.6934722	CTGA
886Pur	rio Purus	-62.9606111	-4.9850556	CTGA
885Pur	rio Purus	-62.9606111	-4.9850556	CTGA
1031Pur	rio Purus	-63.217833	-5.711633	CTGA

838Pur	rio Purus	-63.217833	-5.711633	CTGA
1034Pur	rio Purus	-63.217833	-5.711633	CTGA
1032Pur	rio Purus	-63.217833	-5.711633	CTGA
1033Pur	rio Purus	-63.217833	-5.711633	CTGA
1092Tap	rio Tapajós	-55.3091944	-3.2779167	CTGA
1531Trb	rio Trombetas	-56.7856833	-1.4832	CTGA
1729Trb	rio Trombetas	-56.7856833	-1.4832	CTGA
1765Trb	rio Trombetas	-56.351749	-1.409543	CTGA
1463Trb	rio Trombetas	-56.351749	-1.409543	CTGA
1820Trb	rio Trombetas	-56.351749	-1.409543	CTGA
1586Trb	rio Trombetas	-56.351749	-1.409543	CTGA
1728Trb	rio Trombetas	-56.7856833	-1.4832	CTGA
1621Trb	rio Trombetas	-56.351749	-1.409543	CTGA
1754Trb	rio Trombetas	-56.7856833	-1.4832	CTGA
94IgPa	Reserva de Desenvolvimento Sustentável Igapó Açú	-61.3884722	-4.7249444	INPA
59IgPa	Reserva de Desenvolvimento Sustentável Igapó Açú	-61.3884722	-4.7249444	INPA
412Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9101694	-0.5875528	CTGA
671Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9071222	-0.5923611	CTGA
672Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9071222	-0.5923611	CTGA
436Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9084722	-0.5886667	CTGA
719Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9041389	-0.5991667	CTGA
441Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9023694	-0.5950611	CTGA
705Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9059722	-0.5931528	CTGA
641Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.7855056	-0.4006583	CTGA
652Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.8054444	-0.3897222	CTGA
437Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9116417	-0.5811139	CTGA
463Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9071222	-0.5923611	CTGA
248Stf	Santa Isabel do rio Negro	-58.245783	-2.060967	CTGA
504Stf	Santa Isabel do rio Negro	-64.9071222	-0.5923611	CTGA
AF1161	Trinité	-53.415191	4.608465	CNRS
H2561	Usina Hidrelétrica de Jirau, Abunã	-65.35764	-9.59788	MZUSP
619UHJ	Usina Hidrelétrica do Jari	-52.56694	-0.57666	INPA
376UHJ	Usina Hidrelétrica do Jari	-52.53294	-0.56447	INPA

CNRS: Centre National de la recherche scientifique da Guiana Francesa

CTGA: Coleção de Tecidos de Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas

MZUSP: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

Mamirauá: Acervo Biológico do Instituto Mamirauá

INPA: Coleção de Recursos Genéticos do Instituto de Pesquisas de Amazônia

* Coleção particular, cedido por Marcelo Gordo

Tabela 2. Lista das variáveis utilizadas nos modelos de nicho ecológico

Variável	Categoria	Local de Acesso
Bio2	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio3	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio4	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio5	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio13	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio14	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio18	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Bio19	Climática	WorldClim - Global Climate Data (http://www.worldclim.org/bioclimate)
Argila	Edáfica	SoilGrids 1 km (http://soilgrids1km.isric.org/index.html)
CEC	Edáfica	SoilGrids 1 km (http://soilgrids1km.isric.org/index.html)
Ph	Edáfica	SoilGrids 1 km (http://soilgrids1km.isric.org/index.html)
Silte	Edáfica	SoilGrids 1 km (http://soilgrids1km.isric.org/index.html)
Slope	Estrutura da vegetação	WorldGrids (http://www.worldgrids.org/doku.php)
EVI	Estrutura da vegetação	WorldGrids (http://www.worldgrids.org/doku.php)