

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Gabriel Toselli Barbosa Tabosa do Egito

**“Variabilidade genética e relações interpopulacionais
de *Dendropsophus minutus* do Brasil”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GABRIEL TOSELLI BARBOSA TABOSA DO
EGITO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Eg48v

Egito, Gabriel Toselli Barbosa do
Variabilidade genética e relações interpopulacionais de
Dendropsophus minutus do Brasil / Gabriel Toselli Barbosa
do Egito. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Shirlei Maria Recco Pimentel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anfíbio - Genética. 2. Morfometria. 3. Filogenia –
Aspectos moleculares. 4. Hylidae. I. Recco-Pimentel,
Shirlei Maria, 1954-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Morphological variation and mitochondrial DNA diversity in natural populations of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae).

Palavras-chave em inglês: Amphibians - Genetics; Morphometry; Phylogeny – Molecular aspects; Hylidae.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco Pimentel, Cynthia Peralta de Almeida Prado, Odair Aguiar Junior.

Data da defesa: 11/05/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 11 de maio de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado



Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela oportunidade, orientação, paciência, atenção, pelo seu coração, sua compreensão e pelas excelentes condições do laboratório, onde nunca faltou nada. Devo-lhe eterna gratidão pela inesquecível experiência profissional e pessoal proporcionada.

Ao colaborador Prof. Dr. João Alexandrino pelo aprendizado, comentários, sugestões e por “abrir a mente” para olhar a ciência com outros olhos.

À Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo nº. 04/12285-0) e pelas críticas através de seu assessor.

Aos membros da banca de análise prévia dessa tese, bem como a revisora de língua inglesa pelas sugestões de alteração no manuscrito da dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi por disponibilizar o seqüenciador de seu laboratório.

Aos Profs. Célio F. B. Haddad e Gilda V. Andrade, João Alexandrino, Sérgio Siqueira Júnior, Olívia Araújo e Ana Carolina Carnaval, e todos os outros que participaram direta ou indiretamente das coletas e envio dos espécimes utilizados.

Ao Museu de História Natural da Unicamp e ao Dr. Célio F.B. Haddad pelo empréstimo e depósito de espécimes, bem como auxílio na sua identificação e sexagem.

Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela concessão e renovação da Licença Nº. 098/2005 de captura, coleta e transporte de exemplares da espécie em estudo.

Aos colegas de laboratório Klélia, Yeda, Paula, Sérgio, Lílian, Fernanda, Eduardo, Mônica, especialmente Odair Aguiar Júnior, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello e Luciana B. Lourenço, pelo apoio, atenção em tirar dúvidas e pela convivência prazerosa de todos.

À Prof. Dra. Maria Júlia Marques, Sérgio Siqueira Júnior e aos colegas SETEC/AP pelo apoio e pela sobriedade com que me ajudaram a resgatar a motivação perdida em alguns momentos.

À minha família, pelas doses semestrais de incentivo. Em especial, agradeço a tio Eriberto, Ana e Júlia, por todo carinho desde minha saída de Natal.

Aos colegas da faculdade, especialmente meus “novos irmãos” Alessandro, Pedro e Zapa.

À Deus, se existir...

ÍNDICE GERAL

I	Resumo	06
II	Abstract	07
1.	Introdução	08
1.1	Conservação ambiental	08
1.2	A filogeografia molecular	10
1.2.1	DNAmt: uma ferramenta para inferências filogeográficas	13
1.3	Análises morfométricas	14
1.4	A espécie em estudo: <i>Dendropsophus minutus</i>	15
1.5	Objetivos gerais	16
1.6	Referências bibliográficas.....	17
2.	Artigo: Morphological variation and mitochondrial DNA diversity in natural populations of <i>Dendropsophus minutus</i> (Anura: Hylidae)	24
	Abstract	25
	Introduction	26
	Material and methods	28
	Results	31
	Discussion	33
	Aknowledgements.....	36
	References	36
3.	Conclusões Gerais	55

I. RESUMO

Dendropsophus minutus está amplamente distribuído ao Leste dos Andes, na América do Sul e possui uma grande diversidade acústica e morfológica, o que sugere que possa haver mais de uma espécie sob esse nome. Sua coloração dorsal pode ser classificada em dois padrões principais, *hourglass* e *bivittata*. No presente estudo, 14 parâmetros morfométricos e seqüências de DNA com 357 pares de bases do gene citocromo b mitocondrial foram analisados objetivando um melhor entendimento acerca da variação de *D. minutus* no Brasil. Tanto os resultados moleculares quanto os fenotípicos revelaram a presença de uma alta estruturação da diversidade dessa espécie, mostrando que a divergência entre populações é, geralmente, proporcional à distância geográfica, exceto no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Nessa região, a Serra do Mar está aparentemente agindo como uma barreira geográfica para o fluxo gênico, isolando duas linhagens. A primeira, formada pelas populações da Mata Atlântica, tem padrão *hourglass* de coloração dorsal. A segunda, do interior de São Paulo, assim como a população do Rio Grande do Sul, possui padrão *bivittata* de coloração dorsal. Esses resultados corroboram a hipótese de que o táxon *D. minutus* contém duas linhagens crípticas. Apesar disso, uma amostragem maior se faz necessária, bem como um melhor estudo de caracteres para defini-las como espécies ou não.

II. ABSTRACT

In despite of its complex reproductive behavior, *Dendropsophus minutus* has a large distribution at East of Andes, South America and show high acoustic and morphologic diversity, suggesting that possibly more than one species may exist under this name. Its dorsum coloration has basically two main patterns, *hourglass* or *bivittata*. Here, 14 morphometric parameters and partial mitochondrial cytochrome b gene sequences (357 base pairs) were analyzed aiming to understand more about Brazilian *D. minutus* variation. Both molecular and morphologic results agree with a high structuration of this species diversity, showing population divergence generally proportional to their geographic distance, except in São Paulo State, southeastern Brazil. At this region, Serra do Mar high mountains are apparently acting as a barrier for dispersion, isolating two lineages. The first of them, formed by populations from Atlantic Rainforest domain, has an *hourglass* dorsum pattern, whereas the second, comprising inner São Paulo State populations gathered with *D. minutus* from Rio Grande do Sul (South Brazil), shows *bivittata* dorsum coloration pattern. These results corroborate the hypothesis that *D. minutus* could comprise more than one species, revealing two cryptic lineages. However, these lineages should not be defined as different species before sampling enlargement to the present study.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conservação Ambiental

Um dos maiores desafios da conservação ambiental tem sido conter o Declínio Global dos Anfíbios. Há várias hipóteses que foram levantadas como causas para esse fenômeno, tais como a destruição de habitats, mudanças climáticas globais e doenças (Carey *et al.*, 2001). Recentemente, populações de anfíbios da Costa Rica sofreram extinções em massa, fenômeno que atingiu, por exemplo, 67% das 110 espécies do gênero *Atelopus*, endêmico dos trópicos (Pounds *et al.* 2006).

O Brasil abriga hoje cerca de 15% da riqueza de espécies de anfíbios do mundo, distribuídos por seis biomas diferentes (Frost, 2009). Esse grande número de espécies pode ainda ser uma subestimativa de nossa biodiversidade, visto que muitas outras espécies ainda estão para ser descritas e descobertas (Haddad, 1998).

Tornam-se imperativas, portanto, políticas de preservação e de aumento do conhecimento sobre essa biodiversidade, tanto no que diz respeito à sua quantificação quanto ao seu manejo e conservação. A legislação brasileira, por sua vez, considera a existência de diretrizes com bases científicas fundamental para essas políticas de conservação (Milaré, 2001).

Estudos visando uma maior informação sobre a biodiversidade brasileira e como ela está distribuída no território nacional são necessários, portanto, para a regulação do crescimento da ocupação humana. Esses estudos devem ser desenvolvidos com urgência, especialmente quando se trata de grupos de animais, como os anfíbios, que vêm perdendo sua diversidade. Tradicionalmente,

o planejamento da conservação ambiental tem focado mais na representação da diversidade do que nos processos necessários para a sua persistência e, para isso, tem enfatizado mais a diversidade de espécies, ecossistemas e comunidades em vez da diversidade genética como um todo.

Uma visão mais moderna da conservação prevê a manutenção de processos evolutivos e da viabilidade das espécies e do cenário necessário para isso. Para tanto, são necessárias estratégias para conservação da variabilidade intra-específica.

O conceito de Unidade Significativa de Evolução (ESU, do inglês "Evolutionarily Significant Unit") foi inicialmente introduzido para guiar manejo de animais em cativeiro e depois passou a ser utilizado como um termo mais geral para segmentos de populações distintos com certo grau de isolamento reprodutivo e divergência adaptativa (Moritz, 2002). Hey *et al.* (2003) argumentam que, apesar de ser uma entidade intra-específica, as definições teóricas e práticas de ESUs são alvos de discussão bem como o próprio conceito de espécie, mas convergem no sentido de que são entidades coesas com origem evolutiva comum. Segundo eles, ESU seria um sinônimo de espécie de acordo com o conceito filogenético, com ênfase na conservação de diversidade genética para a manutenção dos processos evolutivos.

É natural que não seja possível definir uma ESU estaticamente, visto que o termo pode se referir a entidades dinâmicas em processo evolutivo. Mesmo com todas as discussões teóricas, definir ESUs biogeograficamente é fundamental para o gerenciamento da conservação ambiental e essa definição pode ser

acessada pelo mapeamento da diversidade genética e fenotípica e de sua estruturação geográfica.

1.2. A filogeografia molecular

Os recentes avanços das técnicas de DNA têm tornado mais freqüentes análises genéticas em estudos sistemáticos e de genética populacional em busca de conhecer um pouco mais sobre a biologia de seres vivos antes que sejam localmente extintos (Goebel *et al.*, 1999).

O entendimento de processos evolutivos básicos que levam aos padrões de diversidade biológica é fundamental para a conservação em longo prazo de todos os seres vivos. Esses processos que modelam a biodiversidade podem ser inferidos por estudos moleculares de populações naturais que busquem revelar a história biogeográfica de *taxa* ou linhagens evolutivas relacionadas, ou seja, estudos filogeográficos (Avise, 2000).

Através desse tipo de abordagem se investiga a distribuição espacial de linhagens evolutivas e suas relações filogenéticas, que são importantes na quantificação da diversidade biológica dentro e entre populações geográficas (Moritz & Faith, 1998). Assim, eventuais contribuições para sistemática podem surgir como, por exemplo, a detecção de espécies morfologicamente crípticas com interrupção significativa de fluxo gênico. Estudos filogeográficos também podem discutir as relações interpopulacionais de modo a permitir um melhor entendimento de como as espécies reagem a alterações dos seus habitats (Carnaval, 2002). Dessa forma, pode-se revelar como a distribuição de determinadas linhagens se comporta em períodos de glaciação e como poderia variar em eventuais cenários de ação antrópica ou aquecimento global.

Quando se adiciona o efeito de eventos paleo-ecológicos a estudos filogeográficos pode-se explicar eventuais dinâmicas populacionais históricas fundamentais para o entendimento da estrutura genética de uma espécie. Em períodos de glaciação pode ocorrer uma diminuição na área de distribuição de espécies, o que se restaura após a volta de uma situação climática mais favorável. Lessa *et al.* (2003) testaram a hipótese de expansões populacionais em pequenos mamíferos amazônicos após o último período de glaciação no final do Pleistoceno. Eles encontraram pouca ou nenhuma evidência dessa expansão, o que nos faz pensar que esses animais não passaram por uma distribuição restrita nesse período glacial ou, alternativamente, houve uma retomada da estrutura genética populacional causada pela grande mobilidade desses mamíferos.

O Brasil possui duas matas úmidas com maior densidade de vegetação: As florestas Atlântica e Amazônica. Entre elas, na região mais central, há um corredor mais seco formado pela Caatinga e pelo Cerrado, que de certa forma restringe o fluxo gênico entre as matas úmidas. Há evidências de que as Matas Atlântica e Amazônica já foram interconectadas por uma floresta úmida (ver revisão em Costa, 2003). Costa (2003) apresentou, ainda, hipóteses filogeográficas para grupos de espécies de pequenos mamíferos procurando entender mais sobre a relação da Mata Atlântica com a Amazônica. Em suas análises, as espécies do cinturão de mata seca se mostraram relacionadas com as duas matas, mostrando seu papel intermediário que sofre influência tanto na floresta Atlântica como na Amazônica.

No que se diz respeito aos anfíbios anuros neotropicais, abordagens filogeográficas já foram aplicadas em alguns estudos, utilizando majoritariamente

marcadores moleculares do genoma mitocondrial (DNAm_t). Slade & Moritz (1998), por exemplo, revelaram através da análise de seqüências do gene ND3 do DNAm_t uma hipótese filogeográfica para o grupo de *Rhinella marina* (anteriormente *Bufo marinus*), identificando eventos de especiação e de introdução de espécies exóticas pelo homem. Loughheed *et al.* (1999) avaliaram a influência do surgimento de rios como barreiras geográficas para especiação de *Allobates femoralis* (anteriormente *Epipedobates femoralis*) analisando o gene mitocondrial codificante do citocromo b. Clough & Summers (2000) focalizaram na utilização de relógio molecular para estimar o tempo de divergência entre os sapos venenosos da família Dendrobatidae. Chek *et al.* (2001) e Vences *et al.* (2004) também utilizaram marcadores do DNAm_t como relógio molecular em suas inferências filogeográficas. Carnaval (2002) associou o hábito de cada espécie com as mudanças da variabilidade genética em resposta à ação antrópica, que levou ao favorecimento das espécies generalistas e o avanço da estruturação genética entre as espécies com perfil mais especialista. Roberts *et al.* (2006) concluíram que diferença de altitude encontra correlação genética em espécies peruanas da Amazônia e dos Andes. Loughheed *et al.* (2006) focaram na história evolutiva de *Dendropsophus leucophyllatus* da região Norte do Brasil. Mais recentemente, Guarnizo *et al.* (2009) compararam as influências do gradiente de altitude dos Andes e do isolamento geográfico na diferenciação genética de *Dendropsophus labialis*.

Embora haja alguns trabalhos na Amazônia e um no nordeste brasileiro, ainda não existem publicações de estudos filogeográficos envolvendo anuros para as outras regiões do Brasil. Em seu trabalho com pequenos mamíferos, Costa

(2003) defende que a especiação neotrópica não será explicada por modelos simples de vicariância e mudanças climáticas.

1.2.1. DNAm: uma ferramenta para inferências filogeográficas

O DNA mitocondrial (DNAm) tem sido preferido em estudos filogeográficos por apresentar uma taxa de evolução maior, uma maior facilidade para obtenção de amostras e o tamanho reduzido comparativamente ao genoma nuclear. Um outro ponto positivo é a herança citoplasmática somente materna do DNAm, o que facilita a análise dessas seqüências para estudos filogenéticos. Outra característica que favorece a utilização de DNAm em inferências filogenéticas refere-se ao fato de que esse genoma apresenta predominantemente divergência linear e não toco genética. Ou seja, não é comum a ocorrência de origem reticulada no mtDNA, diferentemente das seqüências nucleares que possuem recombinação (Hennig, 1965; Doyle, 1997).

A principal premissa para essas conclusões é a de que árvores filogenéticas originadas de genes mitocondriais representem a divergência linear das espécies, o que significa que alguns fatores como polimorfismo de haplótipos e introgressões por hibridização não sejam comuns nesse genoma (Glaw & Vences, 2002).

Apesar de haver alguns exemplos de recombinação entre DNAm de animais, de introgressão interespecíficas dessas organelas (Spolsky & Uzzell, 1984) e até cópias nucleares do DNA mitocondrial (Ballard & Whitlock, 2004), na maioria dos casos esses fenômenos são incomuns (Avice, 2000 *apud* Glaw & Vences, 2002).

Além desses casos incomuns, a herança materna pode ser uma desvantagem em determinados estudos, dando origem a simplificações nas inferências sobre a evolução de uma espécie, por serem baseadas apenas na evolução da linhagem materna. Ballard & Whitlock (2004) listaram três possíveis erros ao reconstruir uma história filogenética através de DNAm: erro na inferência da genealogia de um gene através dos dados, erro na inferência da genealogia do táxon através de uma molécula única (DNAm) e o erro inerente da interpretação de histórias demográficas através de genealogias genéticas. Esses autores argumentam também que mesmo informações obtidas por diferentes genes do DNAm de um indivíduo, estando em completo desequilíbrio de ligação (ausência de recombinação), não são independentes e sugerem que o DNA nuclear seja utilizado como uma alternativa.

1.3. Análise morfométrica

Além da filogeografia molecular, que estuda a diversidade genética, um outro componente para distinguir Unidades Significativas de Evolução (ESUs) é a diversidade adaptativa. Padrões de alterações fenotípicas, por exemplo, podem sugerir processos evolutivos como a ação da seleção natural ao longo de gradientes ambientais.

Através de análises estatísticas multivariadas, padrões fenotípicos podem ser encontrados entre populações ou dentro das populações. Esse tipo de dado pode ser usado para testar a associação geográfica da variação fenotípica encontrada. Ainda, essas análises morfométricas podem ser confrontadas com as hipóteses filogeográficas obtidas através do DNA mitocondrial, assim contribuindo

para um melhor entendimento dos processos evolutivos que determinam a biodiversidade.

Em anfíbios anuros, Loughheed *et al.* (2006) estudaram a morfometria, juntamente com canto de anúncio e marcadores moleculares, apresentando uma abordagem filogeográfica para a espécie *Dendropsophus leucophyllatus*. Carnaval & Bates (2007) avaliaram a diversidade de alguns anfíbios frente as mudanças climáticas do Pleistoceno no nordeste brasileiro. Telles e colaboradores (2007) estudaram a estrutura genética de *Physalaemus cuvieri* frente a perda de habitat e a ocupação humana.

1.4. O objeto de estudo: *Dendropsophus minutus*

Essa espécie foi descrita por Peters em 1872 e pertencia ao gênero *Hyla* até ser reagrupada por Faivovich *et al.* (2005), juntamente com as espécies do gênero *Dendropsophus* que possuem número diplóide de 30 cromossomos.

Dendropsophus minutus é um exemplo de espécie com perfil generalista. Essa perereca pequena (18 a 28 mm de comprimento rostro-cloacal) é um dos anuros mais comuns em vários ambientes por quase todo o leste dos Andes na América do Sul, em altitudes que vão desde áreas de baixada até 2.000m (Ribeiro *et al.*, 2004; Frost, 2009). Os machos são territoriais e disputam os melhores locais nos brejos, de onde coaxam para atrair as fêmeas. Essas disputas por melhores sítios de vocalização podem levar a combates físicos (Haddad, 1987), e há casos em que o vencedor adota a estratégia de macho cantor e o perdedor fica de macho satélite, ou seja, fica tentando roubar uma possível fêmea atraída pelos coaxos do macho mais vencedor (Haddad, 1991).

Ao longo do gradiente geográfico pode-se observar diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas nas notas emitidas em sua vocalização (Cardoso & Haddad, 1984). Contudo, esses pesquisadores preferiram atribuir a existência de diferentes estágios de especiação a esse fato, considerando essas diferenças variações intra-específicas de *D. minutus* devido à ausência de características que impedissem o fluxo gênico entre populações. Entretanto, diferenças em canto de anúncio, importante no sistema de reconhecimento de casais (MRS, do inglês "*Mate Recognition System*"), podem indicar eventuais ESUs visto que sua diferenciação está intrinsecamente relacionada ao surgimento de linhagens evolutivas diferentes devido ao isolamento reprodutivo (Lougheed *et al.*, 2006).

No que diz respeito às variações fenotípicas interpopulacionais, pode-se citar a variabilidade do padrão de coloração do dorso. Nas populações do Sul do Brasil, *D. minutus* apresenta dorso castanho-alaranjado, castanho ou bege, com duas longas estrias escuras longitudinais paralelas (Kwet & Di-Bernardo, 1999). Nas populações do Rio de Janeiro e São Paulo há o padrão mais comum de coloração para a espécie, onde a mancha escura no dorso é em forma de ampulheta (Heyer *et al.*, 1990; Izecksohn, 2003; Bastos *et al.*, 2003). Kaplan (1991) e Ramos e Gasparini (2004) sugeriram que *D. minutus* seja na verdade um complexo de espécies.

Algumas espécies que hoje são consideradas sinônimas de *D. minutus* – então referidas como *Hyla bivittata*, *H. emrichi*, *H. goughi*, *H. pallens*, *H. suturata* e *H. velata* - foram descritas basicamente pelo padrão de coloração do dorso e posteriormente sinonimizadas pela (1) existência de indivíduos com padrões de coloração intermediária, (2) a ocorrência em simpatria de algumas de suas

variações e (3) a presença de uma marca em forma de ampulheta e uma linha branca no tarso e na cloaca dessas variações (Kaplan, 1994). *Dendropsophus stingi* é uma espécie com coloração muito parecida com *D. minutus*, mas Kaplan (1994) mostrou que elas não estão relacionadas filogeneticamente, questionando assim a validade da utilização de padrões de coloração como um caráter taxonômico.

Quanto às relações de *D. minutus* com as demais espécies de *Dendropsophus*, há várias propostas. Barrio (1967) e Cei (1987) consideraram *D. minutus* próximo a *D. nanus* e *D. sanborni*, e as incluíram no grupo “*minutus*”. Lutz (1973) juntou *D. minutus* e *D. microps* no grupo artificial de espécies muito pequenas do então gênero *Hyla*. Heyer *et al.* (1990), porém, afirmaram que ambas não parecem ser proximamente relacionadas, apesar de apresentarem muitas semelhanças tanto morfológicas quanto de canto. Hoje, essa espécie compõe o grupo *Dendropsophus minutus*, juntamente com *D. delarivai*, *D. limai*, and *D. xapuriensis* (Faivovich *et al.*, 2005).

Assim, *D. minutus* é uma espécie com ampla distribuição geográfica e que ocupa vários tipos de ambiente, dada sua ampla distribuição, a ocupação de diferentes ambientes e sua variação fenotípica, seu estudo do ponto de vista filogeográfico parece interessante.

1.5. Objetivos gerais

- Descrever a variabilidade genética do gene mitocondrial citocromo b dentro e entre populações brasileiras de *D. minutus*.
- Determinar as relações filogenéticas e o grau de divergência entre populações brasileiras de *D. minutus*.

- Verificar se a variabilidade fenotípica apresenta correlação com o padrão genético de distribuição.
- Testar a hipótese taxonômica de que essa espécie se trata, na verdade, de um complexo de espécies.

1.6. Referências bibliográficas

- Avise, J. (2000). **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press. 439pp.
- Ballard, J.W.O. & M.C. Whitlock. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. **Mol. Ecol.** 13: 729-744
- Barrio, A. (1967). Sobre la validez de *Hyla sanborni* y *H. uruguayana* (Anura, Hylidae). **Physis** 26: 521-524.
- Bastos, R.P., Motta, J.A.O., Lima, L.P. & Guimarães, L.D. (2003) **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. [s. n.] 82 pp. Goiânia, GO.
- Cardoso, A.J. & Haddad, C.F.B. (1984). Variabilidade Acústica em diferentes populações e interações agressivas de *Hyla minuta* (Amphibia, Anura). **Ciênc. Cult.** 36: 1393-1399.
- Carey, C., Heyer, W.R., Wilkinson, J., Alford, R.A., Arntzen, J.W., Halliday, T., Hungerford, L., Lips, K.R., Middleton, E.M., Orchard, S.A. & Rand, A.S. (2001). Amphibian declines and environmental change: use of remote-sensing data to identify environmental correlates. **Cons. Biol.** 15: 903-913.

- Carnaval, A.C.O.Q (2002). Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil – a preliminary study. **Integr. Comp. Biol.** 42: 913-921.
- Cei, J.M. (1987). Additional notes to “Amphibians of Argentina”: An update, 1980-1986. **Monitore Zool. Ital. (N.S.)** 21: 209-272.
- Chek, A.A., Loughheed, S.C., Bogart, J.P. & Boag, P.T. (2001). Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Mol. Phyl. Evol.** 18: 370-385.
- Costa, L. (2003). The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **J. Biogeog.** 30: 71-86.
- Clough, M. & Summers, K. (2000). Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. **Biol. J. Linnean Soc.** 70: 515-540.
- Doyle, J.J. (1997). Trees within trees: genes and species, molecules and morphology. **Syst. Biol.** 46: 537-553.
- Egito, G., Lourenco, L.B., Recco-Pimentel, S.M. & Bacci-Jr, M. Molecular phylogeny of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) species based on 12S mitochondrial gene. **Em preparação.**
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P. C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. of Am. Mus. Nat. Hist.** 294: 1-140.

- Frost, D.R. (2009). **Amphibian species of the world: an online reference. V5.3**
(15 February, 2009).
<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, American Museum of Natural History, New York, USA.
- Glaw, F. & Vences, M. (2002). A new sibling species of the anuran subgenus *Blommersia* from Madagascar (Amphibia: Mantellidae: Mantidactylus) and its molecular phylogenetic relationships. **Herpet. J.** 12: 11-20.
- Goebel, A.M., Donnelly, J.M. & Atz, M.E. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and others frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians sucessfully. **Mol. Phyl. Evol.** 11: 163-199.
- Guarnizo, C. E., Amézquita, A., Bermingham, E. (2009). The relative roles of vicariance versus elevational gradients inte genetic differentiation of the high Andean tree frog, *Dendropsophus labialis*. **Mol. Phyl. Evol.** 50: 84-92.
- Haddad, C. F. B. (1987). **Comportamento reprodutivo e comunicação sonora de *Hyla minuta* Peters 1872 (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- Haddad, C. F. B. (1991). Satellite behavior in the neotropical frog *Hyla minuta*. **J. Herpet.** 25: 226-229.
- Haddad, C.F.B. (1998). Biodiversidade dos anfíbios no Estado de São Paulo. *In*: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. Vol. 6: Vertebrados. R.M.C. Castro (Org.), FAPESP, São Paulo.

- Hennig, W. (1965). Phylogenetic systematics. **Ann. Rev. Entomol.** 10: 97-116.
- Hey, J., Waples, R. S., Arnold, M. L., Butlin, R. K. & Harrison, R. G. (2003).
Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation.
Trends Ecol. Evol. 18: 597-603.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990).
Frogs of Boracéia. **Arq. Zool. São Paulo** 31: 231-410.
- Hugall, A., Moritz, C., Moussallli, A. & Stanisic, J. (2002). Reconciling
paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6112-6117.
- Izecksohn, E. & Carvalho-e-Silva, S. P. (2001). **Anfíbios do município do Rio
de Janeiro.** 148 p. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
- Kaplan, M. (1991). A new species of *Hyla* from the eastern slope of the Cordillera
Oriental in northern Colombia. **J. Herpet.** 25: 313–316.
- Kaplan, M. (1994) A new species of frog of the genus *Hyla* from the Cordillera
Oriental in Northern Colombia with comments on the taxonomy of *Hyla minuta*.
J. Herpet. 28: 79-87
- Kwet, A. & Di-Bernardo, M. (1999) **Anfíbios - Amphibien - Amphibians.** 107 p.
Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Lessa, E.P., Cook, J.A & Patton, J.L. (2003). Genetic footprints of demographic
expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary.
PNAS 100: 10331-10334.
- Loughheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Bogart, J.P. & Boag, P.T. (1999)
Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification

- using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 266(1431): 1829-1835.
- Loughheed, S.C., Austin, J.D., Bogart, J.P., Boag, P.T. & Chek, A.A. (2006) Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. **BMC Evol. Biol.** 6(23): 1-16.
 - Lutz, B. (1973). **Brazilian species of *Hyla***. University of Texas Press. Austin. pp.1-165;
 - Milaré, E. (2001). **Direito do Ambiente: doutrina, prática, jurisprudência, glossário**. 2a. Edição, Revista dos Tribunais, São Paulo.
 - Moritz, C. & Faith, D.P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Mol. Ecol.** 7: 270-279.
 - Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the processes that sustain it. **Sist. Biol.** 51: 238-254.
 - Nascimento, L.B., Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (2005). 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). **Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro** 63: 297-320.
 - Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecol. Model.** 190: 231-259.
 - Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N.F., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sanchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J., Young, B.E. (2006). Widespread

- amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature** 439: 161-167.
- Pulliam, H.R. (2000). On the relationship between niche and distribution. **Ecol. Let.** 3: 349-361
 - Ramos, A. D. & Gasparini, J. L. (2004). **Anfíbios de Goiapaba-Açu, Fundão, Estado do Espírito Santo.** 75 p. Fundão, ES.
 - Ribeiro, R. S., Egito, G.T.B.T. & Haddad, C.F.B (2005). Chave de identificação: Anfíbios anuros da vertente de Jundiaí da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotrop.**, 5: 1-15, 2005.
 - Rissler, L.J., Hijmans, R.J., Graham, C.H., Moritz, G. & Wake, D.B. (2006). Phylogeographic lineages and species comparisons in conservation analyses: a case study of California herpetofauna. **Amer. Nat.** 167: 655-666.
 - Roberts, J.L., Brown, J.L., May, R., Arizabal, W., Schulte, R., Summers, K. (2006). Genetic divergence and speciation in lowland and montane Peruvian poison frogs. **Mol. Phyl. Evol.** 41: 149-64.
 - Slade, R.W., Moritz, C. (1998). Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced ranges. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 265(1398): 769-777.
 - Spolsky, C. & Uzzell, T. (1984). Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 5802-5805.
 - Vences, M., Chiari, Y., Rraharivololoniaina, L., Meyer, A. (2004). High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs. **Mol. Phyl. Evol.** 30: 295-307.
 - Vivo, M. (1997). Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. **J. Comp. Biol.** 2: 65-73.

Morphological variation and mitochondrial DNA diversity in natural populations of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae)

G.T.B.T. Egito¹, J. M. B. Alexandrino², C.F.B. Haddad² & S. M. Recco-Pimentel^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP, Brazil.

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil.

*Correspondence Author: shirlei@unicamp.br; fax: +55-19-35216111

Abstract

In spite of its apparently complex reproductive behavior, *Dendropsophus minutus* is widely distributed in a vast South American area, East of Andes. Acoustic and morphologic diversity in *D. minutus* have suggested that possibly more than one species exist under this name. The *hourglass* and *bivittata* are the main dorsal coloration patterns in this species. In the present work, morphological variation and molecular genetic diversity of *D. minutus* were assessed in several Brazilian populations aiming at better understanding evolutionary mechanisms determining biodiversity in this species. The analyses comprised morphometric parameters, in a total of 14, and a partial sequence (357 base pairs) of the mitochondrial cytochrome *b* gene. Both molecular and morphological data indicated high structure in the diversity of this species. Overall, population divergence was associated with geographic distance, except for specimens sampled in the state of São Paulo, southeastern Brazil. In this region, the high mountain range Serra do Mar apparently represents a geographic and reproductive barrier. Morphological analyses showed that Atlantic Rainforest populations are mainly characterized by the *hourglass* dorsal pattern. The analyzed *D. minutus* populations from inner São Paulo State and from Rio Grande do Sul, southern Brazil, have mainly *bivittata* dorsal coloration pattern. The data described in the present work corroborated the hypothesis that *D. minutus* comprises more than one species under this name, identified two cryptic lineages and provided valuable insight into phylogeographic diversity of these frogs. Further studies increasing the number of analyzed specimens and populations will define if these two identified cryptic lineages constitute diverse species and should help to understand of *D. minutus* genetic diversity patterns.

Key words

Amphibia, color pattern variation, *Dendropsophus minutus*, Hylidae, lesser frog, molecular phylogeography, morphometry

Introduction

Dendropsophus minutus Peters, 1872, is a small tree frog (18 to 28 mm) commonly found in South America, East of Andes, in lowlands up to 2,000 m (Ribeiro *et al.*, 2004; Frost, 2009). The reproductive behavior of this species is well known. Male territorialism induces dispute for best heath places where they call to attract females and reproduct. Their disputes for vocalization sites often result in physical combats. Afterwards, the winner adopts a male calling strategy while the losers remain as satellite males trying to steal the females that are attracted by the winner (Haddad, 1991).

Cardoso & Haddad (1984) studied acoustical variability in *D. minutus* populations and proposed the hypothesis of several degrees of speciation. They considered the existence of intraspecific diversity based on the absence of characteristics that would hinder gene flow. However, diversity in male advertisement calls may lead to different “Mate Recognition Systems” (MRS) that typify eventual “Evolutionarily Significant Units” (ESUs) (Lougheed *et al.*, 2006).

The dorsal coloration pattern is a substantial trait to be considered in analysis of anuran morphological variation. In Rio Grande do Sul, a southern state of Brazil, the populations of *D. minutus* are characterized by brown-orange, brown or tan dorsal color. They usually have two dark, broad, parallel and longitudinal bands across the middorsum, known as *bivittata* pattern (Kwet & Di-Bernardo, 1999). In the states of Rio de Janeiro and São Paulo, in southeastern Brazil, and Goiás, in central-western Brazil, the populations are characterized by the most

common *D. minutus* dorsal light-brownish coloration, the *hourglass* pattern, and an hourglass-like dark mark (Heyer, 1990; Izecksohn, 2001; Bastos *et al.*, 2003).

Kaplan (1991) and Ramos & Gasparini (2004) suggested that *D. minutus* is actually a species complex. Recent phylogenetic analyses of nineteen *Dendropsophus* species, based on 12S ribosomal mitochondrial DNA (mtDNA), suggested that six *D. minutus* populations of Brazil are monophyletic, and did not discard the hypothesis of a species complex (Egito *et al.*, in preparation).

Several species currently in synonymy with *D. minutus* and referred to as *Hyla bivittata*, *H. emrichi*, *H. goughi*, *H. pallens*, *H. suturata* and *H. velata* were described basically considering their dorsal coloration pattern. They were classified as synonymies because of the (1) occurrence of specimens with intermediate coloration pattern, (2) sympatric distribution of variations and (3) presence of an hourglass-like dark mark and a white line on tarsum and vent (Kaplan, 1994). The coloration pattern of *Dendropsophus stingi* is similar to *D. minutus*. However, Kaplan (1994) showed that these two species are not phylogenetically related and the coloration trait was considered useless for their taxonomy.

Molecular characteristics have been proven useful in population genetics and systematics. Moreover, molecular markers applied to the study of principles and processes regulating the geographic distribution of genealogical lineages, especially within and among closely related species, have created a new research area named phylogeography (Avice, 2000). In Anura, most of the phylogeographical studies have used mitochondrial DNA analysis (Slade & Moritz, 1998, Loughheed *et al.*, 1999, Clough & Summers, 2000, Chek *et al.*, 2001, Vences *et al.*, 2004, Loughheed *et al.*, 2006 and Roberts *et al.*, 2006).

In Brazil, the Amazon and Atlantic rainforests are geographically separated by a dry corridor formed by the *Caatinga* and *Cerrado* biomes. Gene flow among individuals of the two rainforests is limited by this dry corridor. Interestingly, there are evidences that the Atlantic and Amazon rainforests were connected previously to the origin of this dry corridor. In a phylogeographic study, Costa (2006) reported evidence reinforcing the hypothesis of Atlantic and Amazon biodiversity relationships. The data showed that small mammals from the dry corridor have intermediate species composition between the Amazon and Atlantic rainforests, and appear to be related to both of them.

In the present work, Brazilian populations of *Dendropsophus minutus* were analyzed for genetic diversity using DNA sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene, and morphological characters were examined attempting to recognize molecular and morphometrical patterns suitable for studying evolutionary mechanisms involved in the biodiversity of this species.

Material and Methods

Specimens of *Dendropsophus minutus* populations from fifteen Brazilian locations were studied in this work, as shown in Figure 1 and Table 1. Voucher specimens were deposited in the Collection of the Department of Zoology (CFBH), State University of São Paulo (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil and in the Collection of the Museum of Zoology “Prof. Dr. Adão José Cardoso” (ZUEC), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil (Table 1). Genomic DNA was extracted from muscle and liver tissues using the Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit (GE Healthcare) as recommended by the manufacturer. A

mtDNA fragment of the cytochrome *b* gene, consisting of 357 base pairs (bp), was PCR amplified from the extracted DNA samples using the primers L-MVZ15 (5' GAACT AATGG CCCAC ACWWT ACGNA A 3') and H-CYTB2 (5' CCCTC AGAAT GATAT TTGTC CTCA 3'). The primers were chosen based on Goebel *et al.* (1999). PCR amplification started with an initial incubation at 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30s, 51°C for 1 min and 72°C for 2 min, and a final extension at 74°C for 8 min. PCR products were separated on 1% agarose TE gels and purified using the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). The purified PCR products were directly used for sequencing using the Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA). The PCR reaction mixture was incubated at 94°C for 90s, followed by 25 cycles of 96°C for 12s, 50°C for 8s and 60°C for 4 min. PCR products were submitted to DNA sequencing in an automated sequencer ABI 377 (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA).

In addition to the sequences obtained in this work, the GenBank® accessions AY549398 and AY843883 of *D. minutus* (Faivovich *et al.*, 2004, 2005) were included in the analysis. DNA sequences were analyzed using BioEdit v5.0 (Hall, 1999). Phylogenetic analyses were performed using PAUP*4b4a (Swofford, 2003) and DAMBE (Xia & Xie, 2001) was used to test saturation. Maximum-Parsimony (MP) searches were done using heuristic search with random sequence addition (100 random replications) and tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping. Support for different clades was tested by bootstrap analysis based on 100 replicates using heuristic search, random sequence addition and TBR branch-

swapping. Neighbor-Joining (NJ) analysis was conducted with the Kimura 2-parameter model, supported by bootstrap (1,000 replicates). Genetic and geographic distances correlation was tested using Mantel Version 2.0 Software (Liedloff, 1999).

Morphometric analysis

The same specimens (Table 1) were analyzed for phylogeography according to polymorphisms in mtDNA sequences and morphometry. In addition, specimens of populations available in the CFBH and ZUEC collections, but fixed in formaldehyde and without tissues suitable for DNA extraction, were included in the morphometric analysis.

A total of 14 parameters were measured in 169 individuals (Figure 2) to the nearest 0.01mm, with a digital caliper. The evaluated parameters were: snout-vent length (SVL), head width (HW), head length (HL), horizontal diameter of the eye (HDE), distance between the eyes (DBE), minimum distance between the nostrils (DBN), diameter of the tympanum (DT), distance between eyes and nostrils (DEN), distance between nostrils and tip of snout (DNS), arm length (AL), femur length (FEL), tibia length (TL), tarsum and foot length (TFL), foot length (FOL) and distance between eye and tympanum (DET). Besides these characters, the specimens were also classified qualitatively according to their dorsal coloration pattern as *bivittata* (Figure 3) or *hourglass* (Figure 4) (Kwet & Di-Bernardo, 1999, Heyer, 1990; Izecksohn, 2001, Bastos *et al.*, 2003) and as *dotfull* or *dotless* regarding presence or absence of dots on the dorsum, respectively. These dorsum coloration patterns were compared phenotypically.

The software Statistica/w 6.0 (StatSoft, 1993) was used for statistical analyses. Statistical significance was determined using parametric tests, p values smaller than 0.05 were considered significant. The MANOVA analysis was used to confirm morphological differences between populations and eventual measurements disparity between genders were analyzed by t-test. Multivariate morphometric patterns of populations were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA).

Results

Molecular phylogeography

Nucleotide polymorphisms in the mitochondrial cytochrome *b* gene indicated high level of population structure in this species (Table 2). High and significant divergence in mtDNA sequences were observed among the *D. minutus* populations in relation to geographic distance. No haplotypes were found at two populations. (Table 3)

Both NJ and MP phylogenetic hypothetical tree (Figure 5) resulted in a quite high genetic distance between the AM and MT individuals, respectively from the northern and central-western regions of Brazil. The genetic distance was also high among these two populations and the remaining ones. The MA and TO specimens were grouped in a separated and highly supported clade, with bootstrap values higher than 80%. The southern RS *D. minutus* haplotypes and those from Argentina seemed to share a common evolutionary origin with the RC population from the southeastern region of Brazil. The coastal *D. minutus* populations UB and

RB, from São Paulo State, were clustered with the RJ, another coastal population, forming a clade in the Atlantic Rainforest.

Morphometry

Morphometric analysis revealed significant differences between populations and genders. Because of sexual polymorphism, 14 females were excluded from the analysis and the remaining 155 males were analyzed by PCA. The animal size, represented by the snout-vent length (SVL), explained most of the observed morphometric variation and affected the first axis that explained 49% of the variance. Therefore, residuals of the regression of $\ln(\text{character})$ against $\ln\text{SVL}$ were used to perform new PCA and DA.

The first and second PCA axes represented 47% of the variance (Figure 6), while the third and forth axes comprised 19% of the variance (Figure 7). The DA correctly reclassified 70% of the individuals in their population. The DA first and second axes population plot are shown in Figure 8. These morphometric results agree with the high divergence between AM and MA populations, but only the first two axes from PCA of 13 size adjusted morphometric variables (Figure 6) showed geographical correlation with the Atlantic Rainforest clade consisted of the ES, UB, RB and RJ populations. These latter populations are closer from each other than populations far from Atlantic Rainforest either on mtDNA analysis. The DA was correlated neither to geographical distribution nor to molecular data.

As for dorsal coloration, there were significant differences between the *bivittata* and *hourglass* patterns regarding the HW, HL, HDE (t-test, $p < 0.001$), DBN and DEN measurements (t-test, $p < 0.05$). The data on dorsal patterns

agreed with the hypothesis that São Paulo State is a transition area of *D. minutus* lineages distribution. More specifically, these data refer to the fact that RC and its neighbor populations are *bivittata*, such as the RS population and the ES, UB, RB and RJ) from coastal areas, and in the Atlantic Rainforest the populations are *hourglass* (see Figure 1). The HW and HDE parameters (t-test, $p < 0.05$) corroborated morphological variation between *dotfull* and *dotless* groups, but without geographical and genetic correlation between them.

Discussion

The molecular data described herein demonstrated high divergence between geographically distant *D. minutus* populations regarding the mitochondrial cytochrome *b* nucleotide sequence. Overall, mtDNA polymorphisms discriminated the geographically close southern and southeastern Brazilian *D. minutus* populations into two diverse lineages. The molecular, morphometric and dorsal coloration patterns revealed differentiation among specimens from the Atlantic Rainforest and populations from inner São Paulo State. The relief characteristics of São Paulo State may favor reproductive isolation between these two populations due to the high mountains (1,400m to 1,870m) of Serra do Mar in the coastal area. *D. minutus* has been found up to 2,000m (Frost, 2009), but interestingly the Serra do Mar mountain range may represent a barrier for dispersion, leading to genetic divergence.

It is conceivable that the *D. minutus* divergence of morphologic characters could be more closely associated with adaptation to microhabitats than to large geographic patterns. According to J. G. R. Giovanelli (personal communication), there are morphometric differences among specimens from low and high-density vegetation in São Luis do Paraitinga, coastal SP. Therefore, specimen resemblance in microenvironments with a same morphoclimatic domain could alternatively explain morphological similarity observed among the Atlantic Rainforest populations.

Dorsal coloration patterns *hourglass* and *bivittata* confirmed the two lineages identified in molecular analyses, supporting the hypothesis that the *D. minutus* taxon comprises more than one species. Even though, the *dotfull* and *dotless* patterns showed no correlation with these results. Actually, the origin of this coloration is not known, and it could be caused by a pathogen, such as a fungus, with no evolutionary meaning.

Although *hourglass* and *bivittata* patterns appear to be associated with genetic divergence and distinct geographic distribution, more important than indentifying the divergences is to understand the evolutionary process creating this differentiation. Considering the wide geographic distribution of *D. minutus*, including Atlantic and Amazon rainforests and the dry corridor that separated them, the knowledge about *D. minutus* lineages and their origins certainly will help to understand the dynamics of gene flow between Amazon and Atlantic rainforest.

Carnaval & Bates (2007) discuss about forest enclaves within Caatinga, dry corridor, relationing this phenomenon with Pleistocene rainforests expansions. They discussed the genetic structure of amphibian in northeastern Brazil. It's

possible that many of these factors that affected Caatinga evolution may have also occurred in Cerrado.

The dynamic of these forest expansions and contractions affected vertebrate evolution inside Amazonia (Haffer, 1997). A question to be answered is if this forests fluctuation affected *D. minutus* diversity between both wet Brazilian rainforests, atlantic and amazonic.

The absence of sharing haplotypes among diverse populations revealed high structuration of genetic diversity. Therefore, each of the analyzed populations should be considered a different ESU. The data corroborate the hypothesis proposed by Kaplan (1991) and Ramos & Gasparini (2004) that *D. minutus* comprises more than one species. The knowledge that defines species and ESUs have conservation consequences, since in a long term the genetic variability should be preserved in order to maintain evolutionary processes modeling species evolution, especially considering that the world amphibian populations are declining.

A common misunderstanding in the discussion of cryptic species stems from presumed mechanisms of speciation (Blickford *et al.* 2006). Regarding conservation purposes, the interpretation of the data presented in this work should carefully consider that the number of analyzed specimens and populations is still limited considering the vast geographic area of Brazil. Further studies in *D. minutus* including additional populations will provide supplemental useful data on gene flow, geographic isolation of populations and identification of ESUs. Sites and Marshall (2004) proposed operational criteria for delimiting species regarding to the fuzzy nature of species boundaries and the existence of two lineages can be considered

a factor to believe that actually exists a species complex in *D. minutus*. Only other studios would contribute with others factors or not to get a reliable classification.

Thus, an increased number of populations and genetic markers should be studied so that the *D. minutus* processes modeling this species diversity can be better understood.

Acknowledgements

The authors thank the Museum of Zoology “Prof. Dr. Adão José Cardoso” in the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) and the CFBH Collection of the Department of Zoology, Universidade Estadual Paulista (UNESP) for specimen access, and Olívia Araújo and Klélia A. Carvalho for helping with tissue banks, Gilda V. Andrade, Jerriane Gomes, Sérgio Siqueira Júnior, Ana Carolina Carnaval, Adelina F. Ferreira and all of the collaborators for helping with specimen samplings. This work was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP, process nº. 04/12285-0). Specimens were sampled with a permit issued by the “Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis” (IBAMA, License Nº 098/2005).

References

- Avise, J. (2000). **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press. 439pp.
- Bastos, R. P., Motta, J. A. O., Lima, L. P. & Guimarães, L. D. (2003) **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. [s. n.] 82 pp. Goiânia, GO.

- Cardoso, A. J. & Haddad, C. F. B. (1984). Variabilidade Acústica em diferentes populações e interações agressivas de *Hyla minuta* (Amphibia, Anura). **Ciênc. Cult.** 36: 1393-1399.
- Chek, A.A., Loughheed, S.C., Bogart, J.P. & Boag, P.T. (2001). Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of Neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Mol. Phyl. Evol.** 18(3): 370-385.
- Clough, M. & Summers, K. (2000). Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. **Biol. J. Linnean Soc.** 70: 515-540.
- Costa, L. (2006). The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **J. Biogeog.** 30: 71-86.
- Egito, G., Lourenço, L.B., Bacci M. & Recco-Pimentel, S.M. Molecular phylogeny of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) species based on 12S mitochondrial gene (in preparation).
- Faivovich, J., Garcia, P.C., Ananias, F., Lanari, L., Basso, N.G. & Wheeler, W.C. (2004). A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Mol. Phyl. Evol.** 32: 938-950.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. of Am. Mus. Nat. Hist.** 294: 1-140.

- Frost, D.R. (2009). **Amphibian species of the world: an online reference.** Version 5.3 (15 February, 2009). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, American Museum of Natural History, New York, USA.
- Goebel, A.M., Donnelly, J.M. & Atz, M.E. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and others frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians sucessfully. **Mol. Phyl. Evol.** 11(1): 163-199.
- Haddad, C.F.B. (1991). Satellite behavior in the Neotropical frog *Hyla minuta*. **J. Herpet.** 25(2): 226-229.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** 41:95-98.
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Cruz, C.A.G., Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990). Frogs of Boracéia. **Arq. Zool. São Paulo** 31(4): 231-410.
- Izecksohn, E. & Carvalho-e-Silva, S.P. (2001). **Anfíbios do município do Rio de Janeiro.** Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. 148 p.
- Kaplan, M. (1991). A new species of *Hyla* from the eastern slope of the Cordillera Oriental in northern Colombia. **J. Herpet.** 25: 313–316.
- Kaplan, M. (1994). A new species of frog of the genus *Hyla* from the Cordillera Oriental in Northern Colombia with comments on the taxonomy of *Hyla minuta*. **J. Herpet.** 28(1): 79-87.
- Kwet, A. & Di-Bernardo, M. (1999) **Anfíbios - Amphibien - Amphibians.** Porto Alegre: EDIPUCRS. 107 p.

- Liedloff, A.C. (1999) **Mantel Nonparametric Test Calculator**. Version 2.0.
School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology,
Australia.
- Loughheed, S.C., Austin, J.D., Bogart, J.P., Boag, P.T. & Chek, A.A. (2006) Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hyliid frog. **BMC Evol. Biol.** 6(23) 1-16.
- Loughheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Bogart, J.P. & Boag, P.T. (1999) Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 266(1431): 1829-1835.
- Ramos, A.D. & Gasparini, J.L. (2004). **Anfíbios de Goiapaba-Açu, Fundão, Estado do Espírito Santo**. Fundão, ES. 75 p.
- Ribeiro, R.S., Egito, G.T.B.T. & Haddad, C.F.B (2005). Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotrop.**, 5: 1-15..
- Roberts, J.L., Brown, J.L., May, R., Arizabal, W., Schulte, R. & Summers, K. (2006). Genetic divergence and speciation in lowland and montane Peruvian poison frogs. **Mol. Phyl. Evol.** 41(1): 149-64.
- Slade, R.W. & Moritz, C. (1998). Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced ranges. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 265(1398): 769-777.
- StatSoft. (1993). STATISTICA for Windows, Release 4.5. Stat Soft Inc., Tulsa, USA.
- Swofford, D.L. (2003). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Vences, M., Chiari, Y., Rarahivololoniaina, L. & Meyer, A. (2004). High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs. **Mol. Phyl. Evol.** 30: 295-307.
- Xia, X. & Xie, Z. (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Hered.** 92: 371-373.

Table 1. List of *D. minutus* voucher specimens and their origin. CFBH: Collection “Celio Fernando Baptista Haddad” of the Department of Zoology, UNESP, Rio Claro; ZUEC: Collection of the Museum of Zoology “Prof. Dr. Adão José Cardoso”, UNICAMP, Campinas, Brazil; MACN: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. (^M, used in morphometry; ^D, used in DNA analysis).

Locality	Total	Voucher Specimen Number	GenBank Accession Number
Manaus, Amazonas, Brazil	16	ZUEC 15070 ^{MD} , 15074 ^{MD} , 15069 ^{MD} , 15072 ^{MD} , 15067 ^{MD} , 15071 ^{MD} , 15068 ^{MD} , 15054 ^{MD} , 15082 ^M , 15080 ^{MD} , 15077 ^{MD} , 15075 ^{MD} , 15076 ^{FD} , 15081 ^M , 15078 ^{MD} and 15079 ^{MD}	To be deposited
Atibaia, São Paulo, Brazil	10	ZUEC 15090 ^M , 15083 ^M , 15088 ^M , 15092 ^M , 15084 ^M , 15086 ^M , 15089 ^M , 15091 ^M , 15085 ^M and 15087 ^M	To be deposited
Campinas, São Paulo, Brazil	11	15093 ^{MD} , 15095 ^{MD} , 15096 ^M , 15134 ^M , 15137 ^M , 15101 ^M , 15097 ^M , 15098 ^M , 15102 ^M , 15099 ^M and 15100 ^M	To be deposited
Conceição da Barra, Espírito Santo, Brazil	9	CFBH 8684 ^M , 8685 ^M , 8686 ^M , 8687 ^M , 8688 ^M , 8689 ^M , 8690 ^M , 8691 ^M and 8692 ^M	To be deposited
São Luis, Maranhão, Brazil	24	15109 ^F , 151117 ^{FD} , 15118 ^{FD} , 15107 ^{MD} , 15112 ^{MD} , 15106 ^{MD} , 15103 ^{MD} , 15111 ^{MD} , 15113 ^{MD} , 15108 ^{MD} , 15105 ^M , 15110 ^M , 15114 ^{MD} , 15116 ^M , 15115 ^{MD} , 15126 ^{MD} , 15124 ^{MD} , 15119 ^{FD} , 15121 ^{MD} , 15120 ^{MD} , 15123 ^{MD} , 15127 ^F , 15125 ^F and 15122 ^{MD}	To be deposited
Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil	14	ZUEC 15136 ^{MD} , 15142 ^{MD} , 15132 ^{MD} , 15135 ^{MD} , 15129 ^{MD} , 15140 ^M , 15139 ^M , 15133 ^M , 15143 ^{MD} , 15128 ^M , 15130 ^M , 15141 ^{MD} , 15138 ^{MD} and 15131 ^{MD}	To be deposited
Ribeirão Branco, São Paulo, Brazil	17	CFBH 1852 ^F , 2330 ^M , 4570 ^M , 4571 ^F , 6840 ^M , 6841 ^M , 6842 ^M , 6843 ^M , 6844 ^M , 6845 ^M , 6846 ^M , 6847 ^M , 6848 ^M , 6849 ^M , 6850 ^F , 6851 ^M and 6852 ^M	To be deposited
Rio Claro, São Paulo, Brazil	5	CFBH 610 ^{MD} , 611 ^{MD} , 6938 ^{MD} , 7159 ^{MD} and 7680 ^{MD}	To be deposited

Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil	5	CFBH 13881 ^{MD} , 13882 ^{MD} , 13883 ^{MD} , 13884 ^{MD} and 13885 ^{MD}	To be deposited
Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil	11	CFBH 5598 ^M , 5599 ^M , 5600 ^M , 5601 ^M , 5602 ^M , 5603 ^M , 5604 ^M , 5606 ^F , 5607 ^M , 5614 ^M and 5615 ^M	To be deposited
São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brazil	13	CFBH 8507 ^{MD} , 8508 ^{MD} , 8509 ^{MD} , 8510 ^{MD} , 8511 ^{MD} , 8512 ^{MD} , 8514 ^{MD} , 8515 ^M , 8516 ^F , 8517 ^M , 8518 ^M , 8519 ^M and 8520 ^{FD}	To be deposited
São Jorge, Alto Paraíso de Goiás, Goiás, Brazil	13	CFBH 6766 ^M , 6767 ^M , 6769 ^M , 6770 ^M , 6771 ^M , 6772 ^M , 6773 ^M , 6774 ^M , 6775 ^M , 6776 ^M , 6777 ^{MD} , 6778 ^M and 6779 ^{MD}	To be deposited
Ubatuba, São Paulo, Brazil	15	CFBH 1085 ^M , 1086 ^M , 1087 ^M , 1088 ^M , 1089 ^M , 1090 ^M , 1091 ^M , 1092 ^M , 1159 ^M , 1605 ^M , 5570 ^M , 7768 ^M , 7769 ^M , 7770 ^M and 7778 ^F	To be deposited
Vale da lua, Alto Paraíso de Goiás, Goiás, Brazil	6	CFBH 6726 ^M , 6727 ^M , 6729 ^M , 6731 ^M , 6732 ^M and 6734 ^M	To be deposited
Sao Vicente, Depto Guarani, Misiones, Argentina	1	MACN 37785	AY549398 AY843883

Table 2. Nucleotide polymorphisms in the sequence of the mtDNA Cyt B from *D. minutus* Brazilian populations. Polymorphic nucleotide sites are numbered from 01 to 355. Entire sequences is being deposited to GenBank.

[illegible]

Table 3. Genetic Distances among *D. minutus* populations estimated by the Kimura 2 Parameters model within (mean of each pair distances) and between populations, based on the mitochondrial cytochrome b DNA sequence.

	TO	MT	UB	MA	AM	RC	RJ	RB	RS	ARG
TO	0.000									
MT	0.110	0.020								
UB	0.145	0.137	0.000							
MA	0.018	0.106	0.151	0.002						
AM	0.180	0.200	0.216	0.182	0.008					
RC	0.079	0.097	0.124	0.085	0.173	0.006				
RJ	0.138	0.135	0.037	0.137	0.184	0.117	0.002			
RB	0.126	0.142	0.052	0.124	0.202	0.131	0.040	0.000		
RS	0.085	0.099	0.127	0.091	0.149	0.037	0.113	0.123	0.001	
ARG	0.082	0.102	0.131	0.094	0.146	0.034	0.117	0.127	0.003	0.000

Figure Captions

Figure 1. Map of Brazil displaying the 14 locations in which specimens of *D. minutus* were surveyed. Pie charts indicate proportion of dorsal coloration patterns. (AM) Manaus, Amazonas; (AT) Atibiaia, (CP) Campinas, (RB) Ribeirão Branco, (RC) Rio Claro, (RP) Ribeirão Preto and (UB) Ubatuba, in São Paulo; (ES) Conceição da Barra, Espírito Santo; (MA) São Luis, Maranhão; (MT) Chapada dos Guimarães, Mato Grosso; (RJ) Petrópolis, Rio de Janeiro; (RS) São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul; (SGO) São Jorge and (VGO) Vale da Lua, in Alto Paraíso de Goiás, Goiás. (ARG has no quantitative analysis).

Figure 2. Morphologic characters used for morphometric analysis. (1) SVL, (2) HW, (3) HL, (4) HDE, (5) DB, (6) DBN; (7) DT, (8) DEN, (9) DNS, (10) AL, (11) FEL, (12) TL, (13) TFL, (14) FOL and (15) DET.

Figure 3. *D. minutus* dorsal coloration pattern *bivittata*.

Figure 4. *D. minutus* dorsal coloration pattern *hourglass*.

Figure 5. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained from mitochondrial cytochrome b sequences of *D. minutus* haplotypes. Numbers above nodes indicate bootstrap confidence values, based on 1000 replicates)

Figure 6. The first two axes in the analysis of principal co-ordinates (PCA) of 13 size-adjusted morphometric variables, in 12 populations of *D. minutus*.

Figure 7. The third and fourth axes in the PCA analysis of 13 size-adjusted morphometric variables, in 12 populations of *D. minutus*.

Figure 8. *D. minutus* population means of canonical variables of the first and second axes obtained from Discriminant Analysis.

Figure 1

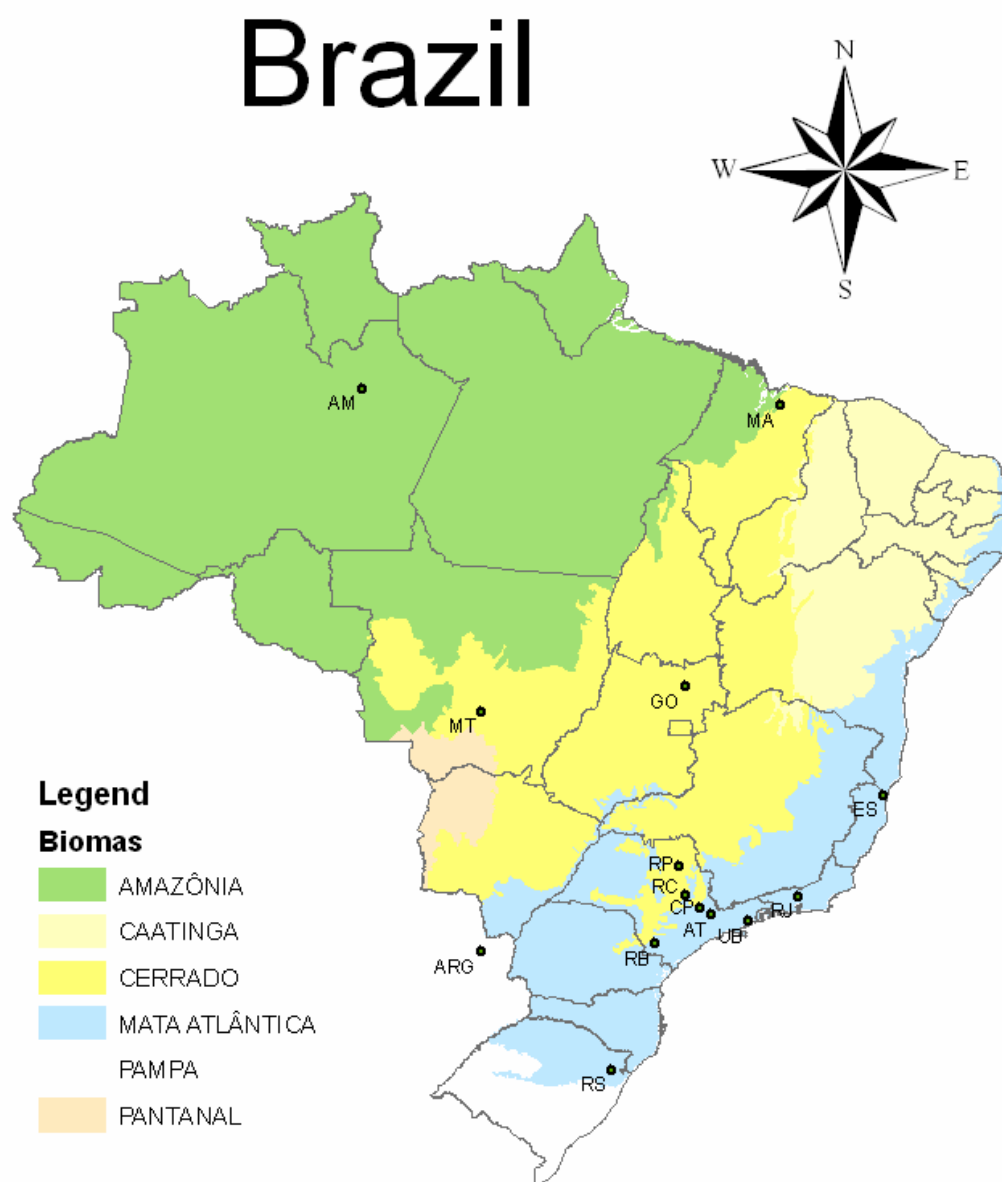


Figure 2

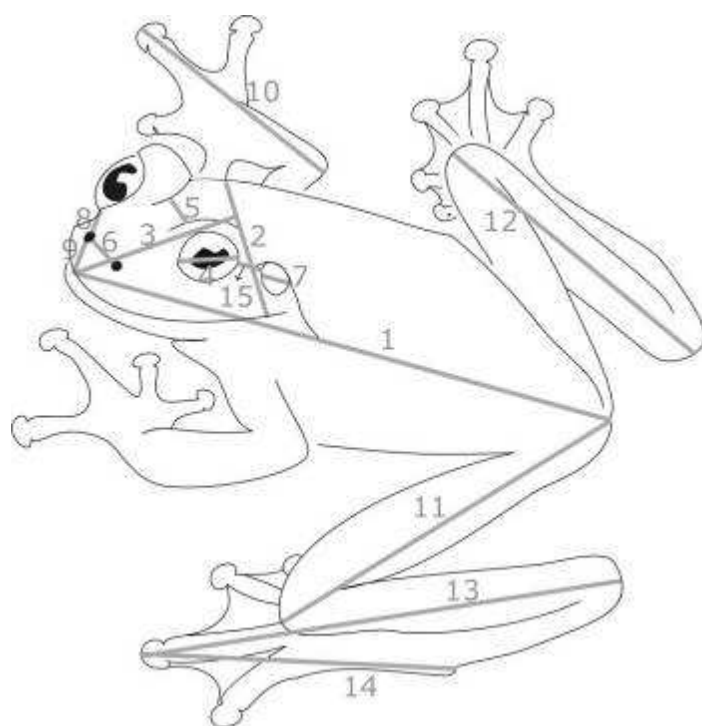


Figure 3



Figure 4



Figure 5

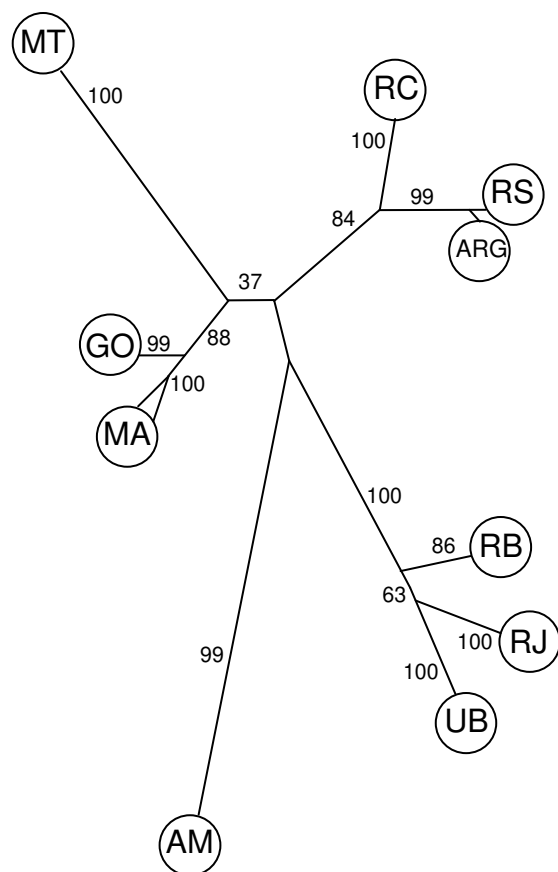


Figure 6

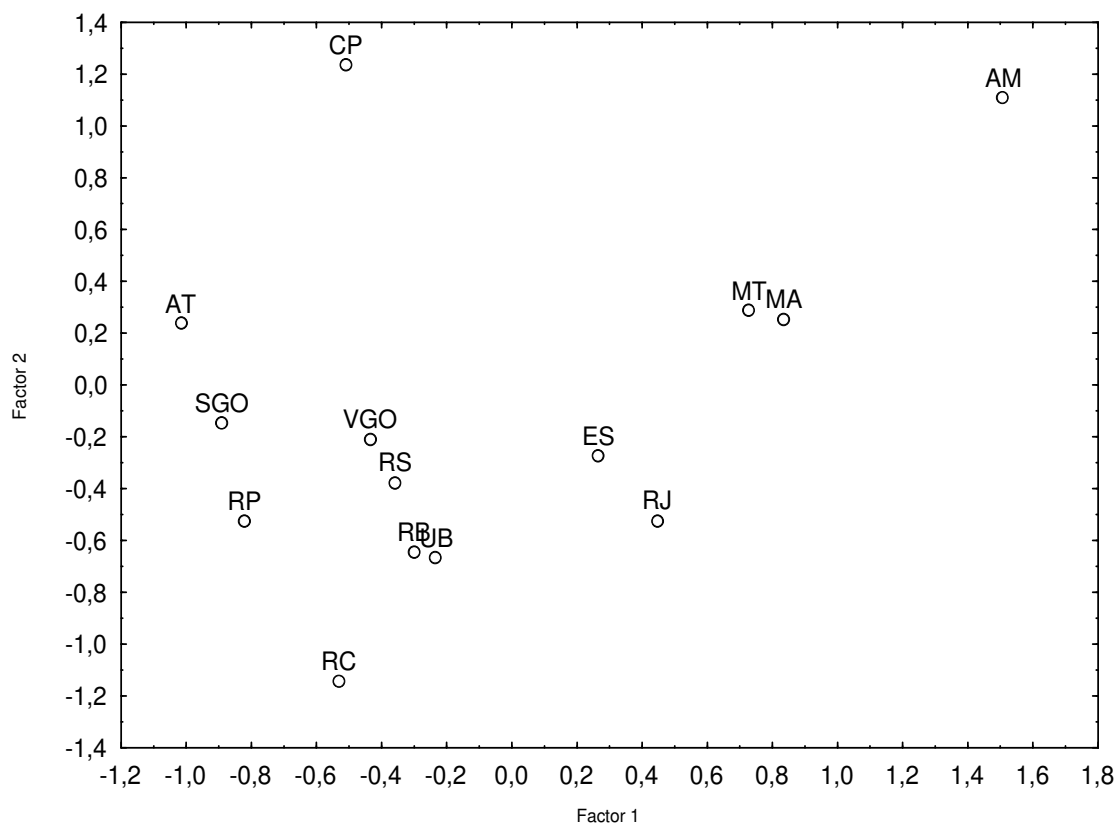


Figure 7

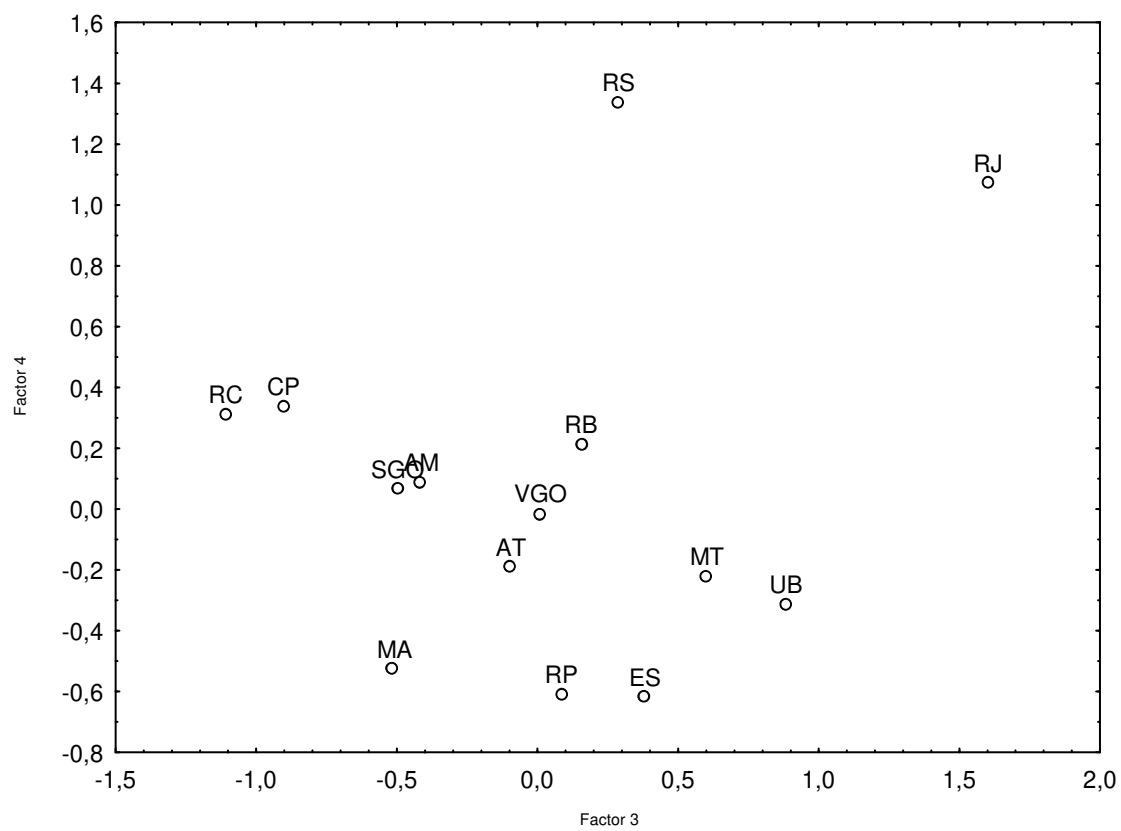
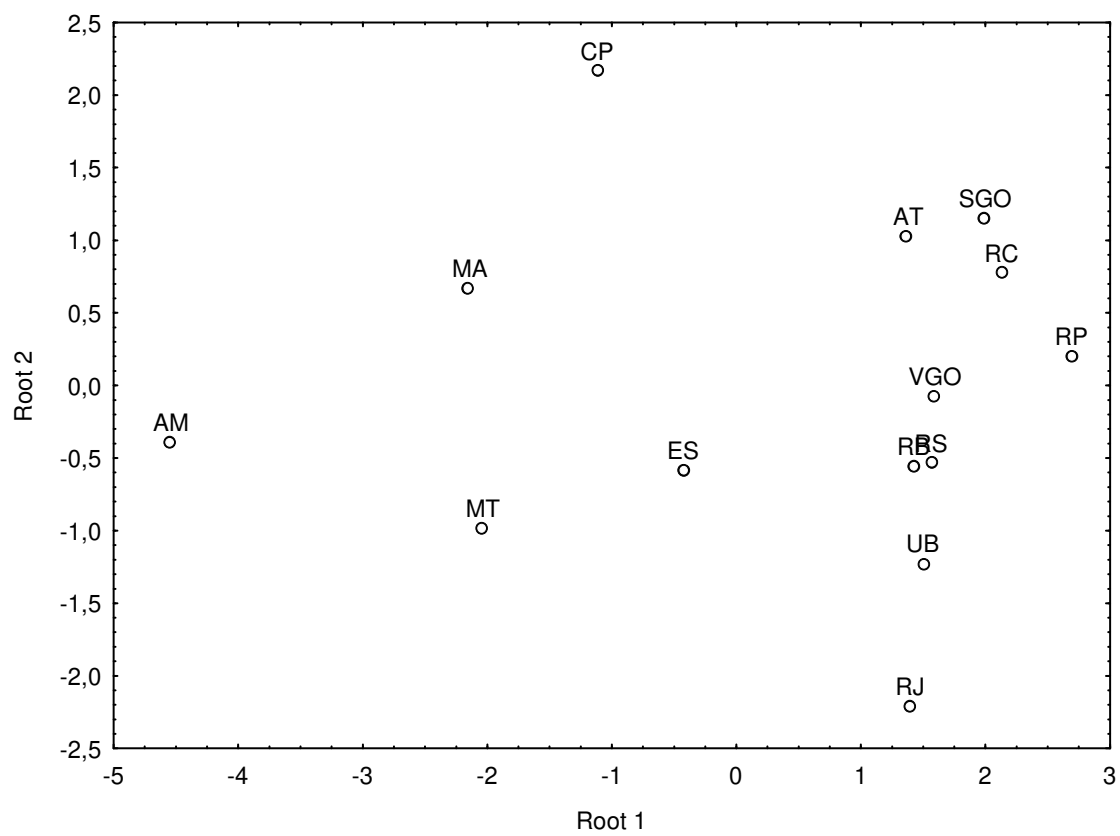


Figure 8



3. Conclusões Gerais

1. Os resultados moleculares mostraram uma grande distância genética entre *Dendropsophus minutus* de localidades distantes geograficamente. Uma exceção foi a divisão de localidades do sul e do sudeste em dois grupos aparentemente diferentes.

2. A filogeografia molecular, a morfometria e os padrões de coloração dorsal revelaram uma diferenciação entre *D. minutus* da Mata Atlântica e das localidades do interior de São Paulo e do Sul do Brasil, o que pode ser atribuído à existência da Serra do Mar entre essas populações que pode estar agindo como uma barreira para dispersão, explicando a divergência fenotípica e genética.

3. As diferenças nos caracteres morfológicos de *D. minutus* podem estar menos relacionadas a padrões geográficos de maior nível do que à adaptação a microhabitats. Assim, localidades com ambientes parecidos dentro da Mata Atlântica podem ser uma hipótese alternativa para explicar a similaridade fenotípica encontrada dentro desse domínio morfoclimático.

4. Os padrões de coloração dorsal *hourglass* e *bivittata* corroboram a existência das duas linhagens encontradas na análise molecular, concordando com a hipótese de que há mais de uma espécie sob esse nome. A origem dessa coloração não é conhecida.

5. A ausência de compartilhamento de haplótipos revela uma alta estruturação geográfica da diversidade genética. Dessa forma, cada população analisada deve ser considerada como uma ESU diferente, corroborando a hipótese de que pode haver mais de uma espécie sob o nome de *D. minutus*.

6. Grande divergência genética foi encontrada entre as populações da Mata Atlântica e da Amazônica, contudo a amostragem não foi suficiente para caracterizar os processos evolutivos, do passado nem do presente, na longa faixa de transição entre esses biomas.

7. Considerando que essas conclusões foram baseadas em dados moleculares de uma sequência nucleotídica parcial de um único gene mitocondrial e de poucas localidades, a adição de novas populações de outras localidades e mais marcadores genéticos devem ser adicionados para se conhecer melhor sobre os processos presentes e históricos que modelam a diversidade de *D. minutus*.