

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

Diversidade críptica em *Pristimantis fenestratus* (Anura: Craugastoridae) na Amazônia Oriental
brasileira

Elciomar Araújo de Oliveira

Manaus, Amazonas
Maio, 2015

Elciomar Araújo de Oliveira

Diversidade críptica em *Pristimantis fenestratus* (Anura: Craugastoridae) na Amazônia
Oriental brasileira

Orientador: Tomas Hrbek

Coorientadores: Emil José Hernández Huz (UFPA)

Marcelo Gordo (UFAM)

Dissertação apresentada ao
Instituto Nacional de Pesquisas
da Amazônia como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Genética,
Conservação e Biologia
Evolutiva

Manaus, Amazonas
Maio, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

O48 Oliveira, Elciomar Araújo de
Diversidade críptica em *Pristimantis fenestratus* (Anura, Craugastoridae) na Amazônia Oriental brasileira/ Elciomar Araújo de Oliveira. --- Manaus: [s.n.], 2015.
xii,88 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA/UFAM, Manaus, 2014.
Orientador: Tomas Hrbek.
Coorientador: Emil José Hernández Ruz, Marcelo Gordo.
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Anuros. 2. Divergência genética. 3. Anfíbios. I. Título.

CDD 597.8

Sinopse:

Estudou-se a diversidade críptica dentro de *Pristimantis fenestratus* (Anura: Craugastoridae) na Amazônia Oriental brasileira. Foram utilizados genes mitocondriais 16S e COI e o gene nuclear tirosinase. Medidas morfométricas de 17 variáveis foram realizadas em 132 indivíduos. Nossos resultados demonstraram uma alta estruturação genética entre os interflúvios amazônicos, com alta divergência genética e conservação da morfologia. Estes resultados possibilitaram uma revisão morfológica de um dos grupos estruturados neste estudo e assim propomos uma nova espécie para o gênero *Pristimantis*.

Palavras chaves: Anuros, Morfologia conservada e Divergência genética.

Dedico esta obra a meus pais pela grande ajuda e por entender que este trabalho é importante para mim. Meus irmãos, que mesmo estando longe, me ajudaram a chegar onde cheguei. Minha futura esposa, suas palavras me ajudaram a ir sempre mais longe.

“A natureza não faz nada bruscamente”

Lamarck

Agradecimentos

São muitas as pessoas que gostaria de agradecer.

Inicialmente agradeço muito a meus pais (José Emar Moita de Oliveira e Maria da Paz Araújo de Oliveira), vocês sempre perguntando “tudo bem meu filho?”, obrigado por sempre se preocuparem comigo. Meus irmãos Gilcimar, Heltomar, Kelciomar e Kelciane Vitória, tudo que passei com vocês (e foi muita coisa) me guiou até onde cheguei, obrigado.

Rosiane Amorim de Castro, sem palavras para dizer o quanto suas palavras foram importantes para eu sempre ir mais longe, “nada é fácil, principalmente para nós”, e você tem razão, obrigado meu amor.

Meus orientadores Tomas Hrbek, Emil Hernández e Marcelo Gordo, dois anos passaram rápidos, mas sei que tentaram me passar o necessário para completar esse trabalho, muito obrigado por tudo, principalmente a paciência que tiveram comigo.

Meu outro “orientador” Igor Kaefer pelas longas conversas, discussões e ideias para escrever parte deste trabalho, muito obrigado pelas sugestões e paciência.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado durante os dois anos de curso. Ao INPA, instituição na qual realizei este mestrado. Ao programa de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva onde estudei por dois anos, obrigado.

Vinícius Carvalho pela grande ajuda com a parte de morfologia e taxonomia. José Gregório, Mário Nunes, Aline Ximenes, obrigado pela ajuda e muita paciência para me ensinarem a trabalhar no Laboratório e interpretar meus resultados, obrigado.

Fabício (Gaúcho), Roberto Zamora (Peruano), Joice obrigado pelas conversas, na salinha, no “cafofo” ou tomando café, conversas que me ajudaram muito, obrigado.

Pessoas “legais”: professora Izeni Farias, Fabinho, Sandra, Jessica, Juliana, Priscila, Ana Paula Melo, Lucéia, Valéria, Waleska, Senna, Israela, Roberta, Alexandre, Luciana obrigado pelas longas conversas e discussões sobre evolução, genética e outras coisas.

Aos professores Marcelo Menin e José Gomes pelas contribuições no meu plano de trabalho na qualificação, obrigado.

As conversas que tive com o professor Nadson e Hermes da UFPA/ Campus de Altamira, obrigado. E a todas as pessoas que contribuíram para o sucesso deste trabalho, muito obrigado por tudo.

RESUMO

Em termos de diversidade de anfíbios, a região Neotropical é inigualável, ocorrendo aproximadamente 2.065 espécies, mais do que em qualquer outra região no planeta. Só para a América do Sul são reconhecidos 95% dessa diversidade (1.959). O Brasil é o país mais rico em espécies de anfíbios do planeta com 946 descritas e os anuros, o grupo mais diverso, com 350 espécies para a Amazônia. Várias teorias biogeográficas tentam explicar essa grande diversidade, utilizando-se de marcadores moleculares, morfologia, diversidade de espécies, etologia, modelagem, dentre outras. O gênero *Pristimantis* contém mais de 470 espécies, divididas em 11 grupos. A espécie deste estudo, *Pristimantis fenestratus*, pertence ao grupo *Pristimantis conspicillatus*, com mais de 33 espécies. Este trabalho teve por objetivos investigar a existência de espécies crípticas dentro de *P. fenestratus* na Amazônia Oriental e observar o efeito dos rios Trombetas, Jatapu, Tapajós e Xingu na distribuição da diversidade genética dentro de *P. fenestratus*. Para isso foram sequenciados 114 indivíduos de *P. fenestratus* para o gene mitocondrial 16S DNAm, 62 sequências do gene Citocromo Oxidase sub-unidade I (COI) do DNAm e 84 sequências do gene nuclear tirosinase. Cento e trinta e dois machos foram medidos para Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Função Discriminante (AFD). A análise de estruturação populacional para todos os genes concatenados, revelou forte estruturação nos principais interflúvios formados pelos grandes tributários do Rio Amazonas. As árvores de Máxima Verossimilhança, para os genes mitocondriais concatenados e o gene nuclear, apresentou uma topologia concordante com os grupos encontrados pela análise Bayesiana de agrupamentos biológicos, separando os agrupamentos em clados com alto suporte de *Bootstrap*. A distância genética *p* par a par não corrigida entre os grupos variou de 2-11% para o gene 16S, enquanto que dentro dos grupos variou de 1-2%. A ACP não mostrou uma separação no espaço morfométrico entre as localidades. A AFD apresentou somente 52% de acurácia para classificar os indivíduos de acordo com seu agrupamento genético pelo BAPS, características que corroboram um complexo de espécies crípticas dentro de *P. fenestratus*. A análise do tempo de divergência mostrou uma divisão basal entre dois grupos, tanto para o gene 16S (DNAm) e tirosinase (nDNA), durante o médio Mioceno. Com base nestes resultados, sugerimos uma nova espécie para o gênero *Pristimantis*, apoiada por evidências moleculares (gene 16S) e caracteres morfológicos que a distingue de *P. fenestratus* da localidade tipo e de outras espécies do grupo *P. conspicillatus*. Estes resultados mostram que *Pristimantis fenestratus* apresenta uma forte estruturação entre os interflúvios amazônicos com alta divergência genética entre eles. Sua morfologia conservadora não nos permitiu encontrar diferenças morfométricas entre as localidades analisadas, no entanto estes resultados (morfológicos e moleculares) disponibilizam evidências de que a espécie pode estar mascarando um complexo de espécies e uma revisão taxonômica é necessária para resolver esse problema.

Palavras chaves: Anuros, Morfologia conservada, Divergência genética.

ABSTRACT

In terms of diversity of amphibians, the Neotropics is unmatched, occurring approximately 2,065 species, more than any other region on the planet. Only for South America are recognized 95% of this diversity (1,959). The Brazil is the richest amphibians country in diversity in the planet with 946 species described and frogs the most diverse group with 350 species to Amazon. Several biogeographic theories try to explain this great diversity, using of molecular markers, morphology, species diversity, ethology, modeling, among others. The genus *Pristimantis* contains more than 470 species, divided into 11 groups. The species in this study, *Pristimantis fenestratus* belongs to *Pristimantis conspicillatus* group with over 33 species. This study aimed to investigate the existence of cryptic species within *P. fenestratus* in eastern Amazonia and observe the effect of rivers Trombetas, Jatapu, Tapajós and Xingu in the distribution of genetic diversity within *P. fenestratus*. Were sequenced 114 individuals of *P. fenestratus* for the mitochondrial 16S rDNA, 62 sequences gene Cytochrome Oxidase subunit I (COI) of mtDNA and 84 sequences from nuclear gene tyrosinase. One hundred and thirty-two males were measured for Principal Component Analysis (PCA) and discriminant function analysis (DFA). The population structure analysis for all concatenated genes, revealed strong structure in the main interfluve formed by the major tributaries of the Amazon River. The Maximum Likelihood trees, to the concatenated mitochondrial genes and the nuclear gene, showed a consistent topology with the groups found by BAPS, separating the groups in clades with high bootstrap support. The genetic distance p unadjusted pairwise groups ranged between 2-11% for the 16S gene, whereas in the groups ranged from 1-2%. The ACP showed no separation in morphometric space between locations. AFD presented only 52% accurate to classify individuals according to their genetic grouping of BAPS, features that support a complex of species within *P. fenestratus*. The analysis of the divergence time showed a basal division between two groups for both the 16S gene (rDNA) and tyrosinase (nDNA), during the middle Miocene. Based on these results, we suggest a new species for the genus *Pristimantis*, supported by molecular evidence (16S) and morphological characters that distinguishes it from *P. fenestratus* the type locality and other species of *P. conspicillatus* group. These results show that *Pristimantis fenestratus* has a strong structuring between the Amazon interfluvia with high genetic divergence between them. His conservative morphology does not enable us to find morphometric differences between the locations analyzed, although results (morphological and molecular) provides evidence that the species may be masking a complex of species and taxonomic revision is needed to resolve this taxonomic problem.

Keyword: Frogs, Conserved morphology, Genetic divergence

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
OBJETIVO GERAL.....	13
Objetivos específicos.....	13
Capítulo 1.....	14
Diversidade críptica e alta divergência genética em <i>Pristimantis fenestratus</i> (Anura: Craugastoridae) na Amazônia oriental brasileira.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	21
Discussão.....	27
Conclusão.....	31
Informação suplementar.....	31
Capítulo 2.....	33
<i>Pristimantis</i> (Jiménez de La Espada 1870), um gênero megadiverso: uma nova espécie críptica de <i>Pristimantis</i> (Anura: Craugastoridae) para a bacia Amazônica oriental brasileira.....	33
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
<i>Pristimantis</i> sp. nov.	37
Discussão.....	44
Apêndice 1.....	45
Referências.....	48

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: *Pristimantis fenestratus* de Cuzcu, Peru (a) e *P. fenestratus* do Município de Borba, Amazonas (b).

CAPÍTULO I

Figura 1: Região amostrada com pontos de coleta de *P. fenestratus* para a Amazônia brasileira. Os círculos correspondem às localidades de indivíduos cujas medidas morfométricas foram aferidas.

Figura 2: Estruturação populacional em *P. fenestratus* a partir dos dados de 16S, COI e Tirosinase concatenados. Os números correspondem às localidades da tabela 1. As cores dispostas verticalmente representam cada um dos agrupamentos genéticos (*clusters*).

Figura 3: Árvores de genes mitocondrial (superior) e nuclear (inferior) para *Pristimantis fenestratus* baseadas em máxima verossimilhança (ML). O grupo externo é *Craugastor tabasarae* para genes mitocondriais e *C. longirostris* para gene nuclear. Os valores nos ramos representam o valor de *bootstrap* e os números em frente aos círculos correspondem à localidade de acordo com a Tabela 1. As cores de cada círculo correspondem ao agrupamento genético inferido por meio de BAPS com base em DNAmT e DNAn.

Figura 4: Cronograma derivado do gene 16S (superior) e do gene tirosinase (inferior) para *Pristimantis fenestratus*. As cores representam os agrupamentos genéticos de acordo com BAPS. Para ambos, usamos um modelo de relógio lognormal relaxado. A data de divergência é uma média *a posteriori* em milhões de anos antes do presente com probabilidade máxima posterior (HPD) de 95% representada pelas barras nos nós. As HPDs são apresentadas abaixo dos ramos da seguinte forma: * ≥ 0.95 e sem rótulo < 0.95 . Os números em cima dos nós correspondem a separação dos grupos biológicos em Milhões de anos.

Figura 5: Distribuição de escores individuais de 132 indivíduos machos de *P. fenestratus* ao longo de dois componentes principais (PCs) sumarizando medidas morfométricas externas. As cores representam os agrupamentos genéticos: amarelo (EG), vermelho (IXA), azul claro (ITA), rosa (BM1), azul escuro (BM2) e verde (IMT).

CAPÍTULO II

Figura 1. Lectótipo de *Pristimantis fenestratus* do Rio Mamoré, Rondônia – Brasil (vista dorsal em a; vista ventral em b; vista lateral da cabeça em c) e Paralectótipo do município de Borba, Amazonas – Brasil (vista dorsal em d; vista ventral em e; vista lateral da cabeça em f).

Figura 2. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) utilizando o modelo evolutivo GTR+G, inferindo o relacionamento filogenético entre *Pristimantis sp. nov.* e outras espécies do grupo *P. conspicillatus* com base no marcador mitocondrial 16s rRNA com 490 pb. Os suportes dos ramos foram encontrados com 10 mil pseudoréplicas de bootstrap. A barra horizontal representa a distância genética entre os clados

Figura 3. Holótipo de *Pristimantis sp. nov.* (A) Vista ventral, (B) vista dorsal, (C) vista lateral da cabeça, (D) mão e (E) pé direito (INPA-H 34576).

Figura 4. Variação morfológica dorsal e ventral da série tipo de *Pristimantis sp. nov.* (A) fêmeas e (B) machos.

Figura 5. Localidade tipo de *Pristimantis sp. nov.* (estrela), comunidade Cametá, Pará, Brasil (círculo) e município de Borba (quadrado).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Localidades de amostragem de *Pristimantis fenestratus* e respectivos números de amostras para genes mitocondriais (16S e COI), nuclear (tir), e medidas morfométricas dos machos.

Tabela 2: Distância genética p não-coriigida (em %) entre os grupos biológicos encontrados por meio de Análise Bayesiana de Estrutura Populacional. A diagonal separa distâncias de acordo com o fragmento do gene 16 S (abaixo) e com o gene nuclear (acima). IMT (Interflúvio Madeira Tapajós), BM1 (Baixo Madeira), Baixo Madeira 2 (BM2), IXA (Interflúvio Xingu Araguaia), ITA (Interflúvio Tapajós Araguaia) e EG (Escudo da Guiana).

Tabela 3: Distância genética p não-coriigida (em %) entre as localidades de amostragem de *P. fenestratus*. Os números representam as localidades da tabela 1. A diagonal separa distâncias de acordo com o fragmento do gene 16 S (abaixo) e com o gene nuclear (acima). Asteriscos indicam sequências obtidas por meio do GenBank.

Informação Suplementar 1: Valores dos dois primeiros componentes principais dos machos, usando apenas os resíduos da regressão linear das outras medidas em relação ao CRC.

Informação Suplementar 2: Matriz de classificação *Jackknifed* para os machos, utilizando apenas os resíduos das regressões em relação das outras medidas em relação ao CRC.

CAPÍTULO II

Tabela1: Lista de espécimes utilizados para análise molecular

Tabela 2: Comparação dos caracteres diagnósticos de algumas espécies do grupo *Pristimantis conspicillatus* junto com a nova espécie: (1) textura do ventre (liso ou granular);(2) tubérculos dorsal (presente ou ausente); (3) franja nos dedos da mão (presente ou ausente); (4) dobra dorso lateral (presente ou ausente); (5) franja nos pés (proeminente, fraca, ausente); (6) membrana basal nos pés (persente ou ausente); (7) dobra tarsal (proeminente, fraca ou ausente); (8) padrão de coloração da garganta (manchado, imaculado, variável ou claro); (9) tubérculo supernumerário plantar (presente ou ausente); (10) tubérculo palmar externo (inteiro, dividido ou semi dividido).

Tabela 4: Distancia genética entre as espécies do grupo *Pristimantis conspicillatus* utilizadas neste estudo.

Informação Suplementar (Tabela 1). Medidas dos 38 indivíduos de *Pristimantis sp. nov.* e seis indivíduos de *P. fenestratus* do município de Borba, (AM).

INTRODUÇÃO GERAL

As florestas tropicais são famosas por apresentarem a maior diversidade de espécies do planeta (Gentry, 1992). A maior parte está concentrada na região Neotropical e por isso se torna o alvo de pesquisas sobre a diversidade biológica (Rull, 2008). Em termos de diversidade de anfíbios, o Neotrópico é inigualável, ocorrendo aproximadamente 2.065 espécies, mais do que qualquer outro lugar no planeta (Young *et al.*, 2004), e só para a América do Sul são conhecidos 95% dessa diversidade (1.959). O Brasil é o país mais rico em diversidade de anfíbios do planeta, com 946 espécies descritas (SBH, 2012), sendo os anuros o grupo mais diverso com 350 espécies para a Amazônia (Avila-Pires *et al.*, 2010).

Várias teorias biogeográficas tentam explicar quais foram os processos que ocorreram no espaço e tempo, que proporcionaram os mecanismos de especiação e o atual padrão de distribuição das espécies, como por exemplo: Centro de origem e dispersão (Hershkovitz, 1977; Reig, 1984); Refúgios (Haffer, 1969); Gradientes ecológicos (Endler, 1982); Rios como barreiras (Wallace, 1849); Dinâmica de rios (Salo *et al.*, 1986); Lago amazônico (Morroig e Cerqueira, 1997); Hipótese do museu (Fjeldsa, 1994); Hipótese de assincronia nos trópicos (Moore *et al.*, 2005).

Mas para estudarmos estes processos, devemos primeiramente identificar corretamente as unidades básicas destes estudos – as espécies. No entanto, um dos principais problemas na estimativa da diversidade de espécies são as espécies crípticas, ou seja, quando duas ou mais espécies são tratadas como apenas uma, devido à similaridade morfológica (Pfenninger e Schwenk, 2007). Para sua correta identificação, a utilização de várias linhas de evidências (morfologia, bioacústica, anatomia interna e dados moleculares), se tornam imprescindíveis, pois a complexa biologia das espécies requer uma abordagem integrativa (Dayrat, 2005; Padial e De la Riva, 2009).

Dados moleculares possuem um grande potencial na alfa taxonomia, principalmente marcadores padronizados como 16S e COI (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007a, b; Che *et al.*, 2012; Funk *et al.*, 2011). A identificação das linhagens, permite posteriormente uma análise mais detalhada de morfologia, bioacústica, osteologia, etologia, resultando na descrição de novas espécies (Elmer e Cannattela, 2008; Padial e De la Riva, 2009). Enquanto que os genes nucleares possibilitam caracterizar com maior confiabilidade o relacionamento filogenético entre diferentes níveis hierárquicos (Moritz, 1994b), bem como lançar mão de conceitos de espécies baseados em linhagens (Gamble *et al.*, 2008).

O gênero *Pristimantis* Jiménez de La Espada 1870, desde o começo foi alvo de controvérsias por parte dos pesquisadores, mudando para *Cyclocephalus* com base em *Cyclocephalus lacrimosus* Jiménez de La Espada 1875, onde mais tarde foi considerado como

sinônimo de *Eleutherodactylus* por Lynch e Schwartz (1971), onde permaneceu por um longo tempo. Heinicke *et al.* (2007) ressuscita o gênero *Pristimantis* com base em dados moleculares, dividindo o gênero *Eleutherodactylus* em três: *Eleutherodactylus* para o Caribe, *Craugastor* para a América Central e *Pristimantis* para a América do Sul.

Talvez um dos principais problemas taxonômicos do gênero *Pristimantis*, seja a ausência de sinapomorfias morfológicas que os diferencie dos outros gêneros dentro de Terrarana, apesar de Hedges *et al.* (2008) descreverem uma série de combinações de características para diagnosticar *Pristimantis*, estas não são tidas como sinapomorfias (Taboada *et al.*, 2013) pois são características presentes em outros gêneros dentro de Terrarana. Crawford *et al.* (2010) sugerem que a ausência da D-stem do RNA^{cys}t representa uma condição derivada no gênero *Pristimantis*, e que mudanças na estrutura secundária do gene pode ser uma fonte de caracteres importantes para resolver problemas de relacionamento entre Terraranas e outros anuros. A fusão anterior do ducto Wolff, da região urogenital, pode ser considerada como uma sinapomorfia de Terrarana (Taboada *et al.* 2013), mas em *Pristimantis fenestratus* Steindachner 1864, está fusão ocorre posteriormente, sendo interpretada como uma condição plesiomórfica.

Recentemente espécies de *Pristimantis* foram descritas para a Amazônia, algumas estavam sendo alocadas como outras espécies (Padial e De La Riva, 2009). A semelhança morfológica dentro de espécies de *Pristimantis* é documentada em alguns trabalhos e após análises morfológicas mais minuciosas, estas resultaram em descrição de novas espécies (Elmer e Cannatella, 2008). Nos últimos 10 anos, mais de 10 espécies de *Pristimantis* foram descritas para a Amazônia utilizando-se de dados moleculares, bioacústicos e morfológicos (Duellman e Hedges, 2007; Lehr *et al.*, 2009; Padial e De La Riva, 2009; Barrio-Amorós *et al.*, 2010; Arteaga-Navarro e Guayasamin, 2011; Reyes-Puig e Yáñez-Muñoz, 2012; Maciel *et al.*, 2012). Este número tende a aumentar, tendo em vista que trabalhos com este gênero apontam um alto número de espécies crípticas, como por exemplo, Elmer *et al.* (2007) que encontraram no mínimo três espécies diferentes dentro de *P. ockendeni* no Equador. Kieswetter e Schneider (2013), trabalhando com *P. w-nigrum*, em parte da Colômbia, encontraram profundas divergências genéticas utilizando marcadores mitocondriais e nuclear, sugerindo a existência de um complexo de espécies.

Pristimantis fenestratus (Figura 1) pertence ao grupo *P. conspicillatus* proposto por Lynch e Duellman (1997) e contém 33 espécies distribuídas na América do Sul e Central (Padial *et al.*, 2014). A espécie não possui um holótipo, apenas dois sítipos, um para o rio Mamoré – Rondônia (alto Rio Madeira) e outro para o município de Borba – Amazonas (baixo Rio Madeira), ambas no Brasil (Frost, 2014). Reichle (1999) designa como lectótipo o sítipo do Rio Mamoré e paralectótipo o sítipo do município de Borba.



Figura 1: *Pristimantis fenestratus* de Cuzcu, Peru (a) e *P. fenestratus* do Município de Borba, Amazonas (b).

Pristimantis fenestratus, possuem juvenis com hábitos diurnos e os adultos de hábitos noturnos (Lima *et al.*, 2006). De acordo com Frost (2014) essa espécie pode ser encontrada na bacia amazônica no leste do Peru, nordeste da Bolívia, sudoeste do Equador, sudoeste da Colômbia e Brasil a uma elevação de 100-1800 m., sendo registrada em diversos trabalhos (Lima *et al.*, 2006; Bernarde e Macedo, 2008; França e Venâncio, 2010; Avila-Pires *et al.*, 2010; Barros, 2011).

Pristimantis fenestratus tem sido considerada uma espécie amplamente distribuída no sul do rio Amazonas (Avila-Pires *et al.*, 2010), tendo sido registrada para a porção norte do Rio Amazonas, no município de Manaus, Amazonas, Brasil e sudeste da Guiana (Lima *et al.*, 2006). No entanto, dados citogenéticos comparando populações de Manaus e do município de Borba, apontam diferenças que indicam que os indivíduos encontrados em Manaus sejam uma espécie ainda não descrita (Siqueira *et al.*, 2009). Este tipo de questionamento vem sendo encontrado para outras regiões do Brasil onde Duellman e Lehr (2009) sugerem que os indivíduos encontrados no Brasil Central representam uma espécie diferente de *P. fenestratus* que ocorre na Amazônia peruana.

JUSTIFICATIVA

Por possui uma ampla distribuição geográfica e variações morfológicas dentro da espécie *Pristimantis fenestratus*, trabalhos que fazem uso de dados moleculares aliados a morfológicos, podem ser bastantes úteis para resolver problemas de identificação e contribui para a alfa taxonomia. A espécie aqui estudada apresenta complicações taxonômicas, como por exemplo, populações morfológicamente diferentes sendo encontradas dentro e entre as localidades dos sítios da espécie. Devido a essa discordância, buscamos através de dados morfológicos e moleculares identificar as populações distintas e as espécies candidatas não confirmadas. Um trabalho exploratório para uma espécie amplamente distribuída na Amazônia pode nos dar

esclarecimentos sobre os processos de diversificação da biota e contribuir com informações sobre a real diversidade de espécies para a região amazônica.

OBJETIVO GERAL

Estudar a distribuição da diversidade críptica de *Pristimantis fenestratus* na Amazônia Central e Oriental com marcadores moleculares e morfometria.

Objetivos específicos

- i. Observar o padrão de estruturação genética das populações de *P. fenestratus* em parte de sua distribuição;
- ii. Inferir a possível existência de espécies crípticas em *P. fenestratus*.

Capítulo 1

Diversidade críptica e alta divergência genética em *Pristimantis fenestratus* (Anura: Craugastoridae) na Amazônia oriental brasileira

Resumo

A crescente utilização conjunta de marcadores moleculares e fenotípicos, bem como recentes incrementos no esforço de coleta em áreas remotas têm possibilitado o reconhecimento e delimitação de diversas unidades taxonômicas dentro de complexos de espécies, promovendo assim uma resolução mais acurada acerca da distribuição da diversidade biológica em regiões megadiversas. *Pristimantis fenestratus* é um anuro da família Craugastoridae encontrado na bacia Amazônica boliviana e encostas dos Andes, sudeste da Colômbia e Amazônia brasileira. A ampla distribuição de *P. fenestratus* ao longo de distintos interflúvios e áreas de endemismo suscita questionamentos a respeito da magnitude da diversidade existente sob este nome. Dessa forma, o presente estudo utiliza árvores de genes mitocondriais e nucleares (1499pb) além de dados morfométricos (17 medidas lineares) com os objetivos de 1) clarificar os eventos recentes que levaram à organização espacial da variabilidade genética e fenotípica observada atualmente em *P. fenestratus* e 2) investigar a existência de linhagens crípticas na espécie ao longo dos estados brasileiros do Amazonas e Pará, nas porções central e oriental do bioma amazônico. Com base nas análises genéticas, observou-se que a maior parte da variabilidade está distribuída entre as populações. As distâncias genéticas entre os agrupamentos e entre as localidades de coleta mostraram um grande nível de diferenciação remontando ao Mioceno/Plioceno, acompanhado de baixa divergência intrapopulacional. A análise dos genes mitocondriais e nucleares revelou uma distribuição da variabilidade genética congruente com a transposição de grandes rios amazônicos com profundas divergências entre pelo menos quatro clados bem suportados. Em oposição, análises morfométricas falharam em delimitar ou predizer o pertencimento de conjuntos de indivíduos a seus respectivos agrupamentos genéticos. Dessa forma, *Pristimantis fenestratus* representa um complexo de espécies candidatas entre as quais se observa elevado conservatismo morfológico acompanhado de profundas distâncias genéticas.

Palavras-chave: Amphibia, DNA mitocondrial, DNA nuclear, filogeografia, morfometria, rios como barreira.

Introdução

Dentre os diversos desafios provocados pela subestimativa da riqueza de espécies presente em regiões tropicais, destacam-se o entendimento da história evolutiva da paisagem e da biota a ela associada (Antonelli *et al.*, 2011), bem como a designação de padrões geográficos de diversidade e, conseqüentemente, de áreas prioritárias para conservação (Bickford *et al.*, 2007). Tal subestimativa é fortemente relacionada à ocorrência de espécies crípticas, as quais podem ser definidas como dois ou mais táxons distintos que são erroneamente classificados sob um único nome (Pfenninger e Schwenk, 2007). A crescente utilização conjunta de marcadores moleculares e fenotípicos, bem como recentes incrementos no esforço de coleta em áreas remotas têm possibilitado o reconhecimento e delimitação de diversas unidades taxonômicas dentro de complexos de espécies,

promovendo assim uma resolução mais acurada acerca da distribuição da diversidade biológica em regiões megadiversas (Padial *et al.*, 2010).

Anfíbios anuros são apontados como um grupo de elevada diversidade críptica em regiões tropicais por conta do forte conservatismo fenotípico presente entre espécies em contraste com a forte estruturação e elevada diferenciação genética observada entre diferentes populações (Zeisset e Beebee, 2008; Vieites *et al.*, 2009; Kaefer *et al.*, 2013). Na região Neotropical, estimativas baseadas em abordagens genéticas do tipo código de barras sugerem que a proporção de espécies candidatas em relação às já descritas varia entre 22 a 115% (Fouquet *et al.*, 2007b), enquanto abordagens integrando diferentes classes de caracteres apontaram incrementos entre 150 e 300% na riqueza de espécies de anuros da região amazônica (Funk *et al.*, 2011). Estudos recentes têm corroborado tais estimativas e revelado uma riqueza severamente subestimada de anfíbios (e.g., Glaw e Vences, 2002; Elmer *et al.*, 2007; Lehtinen *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2007a; Padial e De La Riva, 2009; Funk *et al.*, 2011; Kieswetter e Schneider, 2013). Atualmente são registradas cerca de 554 espécies na região Amazônica (Amphibiaweb 2014), correspondendo a 26,8% da diversidade de anfíbios da América do Sul. Estimativas de riqueza de anuros na Amazônia se alteram constantemente, especialmente por conta da elevada e constante taxa de descrição de novas espécies, em grande parte por conta da utilização de diferentes classes de caracteres no contexto da taxonomia integrativa (Dayrat, 2005; Peloso, 2010).

Apesar do crescente uso de linhas acessórias de evidências, tais como marcadores acústicos, morfométricos e de coloração, o desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares possui um papel determinante tanto na prática taxonômica quanto em estudos evolutivos sobre anfíbios, possibilitando que a relação entre a variabilidade espacial em caracteres fenotípicos e genotípicos de organismos possa ser acessada (Funk *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2014). Embora fragmentos de DNA mitocondrial tais como 16S e COI apresentem grande utilidade na alfa-taxonomia de anfíbios (Vences *et al.*, 2000; Che *et al.*, 2012), a incorporação de genes nucleares possibilita caracterizar com maior confiabilidade o relacionamento filogenético entre diferentes níveis hierárquicos (Moritz, 1994 a), bem como lançar mão de conceitos de espécies baseados em linhagens (Gamble *et al.*, 2008).

Pristimantis fenestratus Steindachner 1864, conhecido popularmente como sapo ladrão do Rio Mamoré, pertence ao grupo *P. conspicillatus* proposto por Lynch e Duellman (1997). Steindachner (1864) define duas localidades na descrição da espécie, ambas no Brasil: uma no Rio Mamoré – Rondônia (alto Rio Madeira) e outra no município de Borba – Amazonas (baixo Rio Madeira) sem a designação de um holótipo. Reichle (1999) em visita ao Naturhistorisches Museum Wien (NMW) designa o sítipo de *Pristimantis fenestratus* da localidade do Rio Mamoré, Rondônia

(NMW 19940:1) como o lectótipo e o sítipo do município de Borba, Amazonas (NMW 19940:2) como o paralectótipo. *Pristimantis fenestratus* pode ser encontrado na bacia Amazônica boliviana e encostas dos Andes (De La Riva, 2000; Padial e De La Riva, 2009), sudeste da Colômbia e Amazônia brasileira (Frost, 2014). No contexto taxonômico desta espécie amplamente distribuída ao longo da Amazônia, este estudo utiliza árvores de genes e dados morfométricos com os objetivos de 1) clarificar os eventos recentes que levaram à organização espacial da variabilidade genética e fenotípica observada atualmente em *P. fenestratus* e 2) investigar a existência de linhagens crípticas na espécie.

Material e Métodos

Área de estudo

Este estudo abrange os estados brasileiros do Amazonas e Pará, nas porções central e oriental do bioma amazônico. A região é caracterizada por extensas áreas de floresta tropical pluvial. Os principais rios da região são o Tocantins/Araguaia, Xingu, Tapajós, Madeira, Negro, Jatapu e Trombetas, delimitando quatro diferentes áreas de endemismo: Xingu, Tapajós, Rondônia e Guiana (Silva *et al.*, 2005).

Amostras para estudos genéticos

Foram coletados tecidos de 114 indivíduos de *P. fenestratus* em 17 localidades nos Estados do Pará e Amazonas, Brasil (Fig. 1). Em adição, foram obtidas quatro sequências de DNA mitocondrial provenientes de espécimes coletados em La Paz, Bolívia (número de acesso no GenBank: EU192273-5 e EU192277) totalizando 118 amostras de 18 localidades (Tab. 1). Os espécimes coletados em campo foram eutanasiados com pomada de lidocaína de uso tópico (BENZOTOP®). Os tecidos foram retirados do músculo ou fígado e armazenados em etanol 95%. Os espécimes foram fixados em formalina 10%, armazenados em álcool 70% e depositados na coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA genômico total foi extraído através do protocolo CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e ressuspenso em 50 ml de água ultrapura. A qualidade do DNA foi verificada em Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) e em gel de agarose em cuba de eletroforese. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada para amplificar um fragmento de 497 pb do gene mitocondrial 16S, um fragmento de 503 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e 499 pb do gene nuclear Tirosinae (*tir*).

A reação para amplificação do fragmento do gene mitocondrial 16S (volume total de 15 µL) conteve 6.7 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de 10 mM dNTPs (2.5mM cada dNTP), 1.25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1.5 µL do *primer* 16S A (5'-CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCT-3'), 1.5 µL do *primer* 16S B (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi *et al.*, 1991), 0.3 µL de 1 U Taq DNA Polimerase e 1 µL of DNA (30 – 50 ng/µL) nas seguintes condições: uma temperatura inicial de 92°C (60 sec.), seguidos por 35 ciclos de 92°C (60 sec.), 50°C (50 sec.) e 72°C (1.5 min.) e uma extensão final a 72 °C por 7 min.

Tabela 1: Localidades de amostragem de *Pristimantis fenestratus* e respectivos números de amostras para genes mitocondriais (16S e COI), nuclear (tir), e medidas morfométricas dos machos.

Local.	Localidade	Coordenadas	16S	COI	tir	Morfometria
1	Caxiuanã (PA)	2° 1'24.44"S; 51°36'4.80"O	5	3	6	33
2	Marabá (PA)	5°22'50.86"S; 49° 7'46.12"O	3	3	6	
3	Anapu (PA)	3° 9'28.15"S; 51°27'51.67"O	6	4	4	24
4	S. José Porfírio (PA)	2°34'7.60"S; 51°50'54.90"O	3	3	2	
5	Altamira (PA)	3°13'24.85"S; 52°14'22.74"O	8	5	4	
6	Medicilândia (PA)	3°26'37.93"S; 52°53'35.26"O	3	2	2	
7	Tapajós_D (PA)	3°24'41.33"S; 55°12'13.85"O	19	9	7	
8	Tapajós_E (PA)	3°23'14.35"S; 55°21'31.09"O	1	1	1	16
9	Juruti (PA)	2°13'22.09"S; 56° 3'42.20"O	17	5	14	
10	Borba (AM)	4°24'28.43"S; 59°34'55.33"O	9	8	9	7
11	Manaus (AM)	2°59'20.73"S; 60° 5'19.95"O	17	13	15	51
12	Jatapu_E (AM)	1°52'50.70"S; 58°14'7.14"O	5	4	4	
13	Trombetas_D (PA)	0°35'45.66"S; 56°59'43.78"O	12	2	8	
14	Jatapu_D (AM)	1°59'42.30"S; 58°22'59.99"O	1	-	-	-
15	Tucuruí (PA)	3°46'10.94"S; 49°40'48.22"O	3	-	2	-
16	Silves (AM)	2°50'13.94"S; 58°27'59.05"O	1	-	-	-
17	Araguaia (TO)	5°21'17.44"S; 48°41'25.59"O	1	-	-	-
18	La Paz (Bolívia)	16°24'12.89"S;68° 6'10.20"O	4	-	-	-
Total			118	62	84	132

A reação de PCR para a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial COI (15 µL volume total) conteve 7.1 µL ddH₂O, 1.6 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de 10 mM dNTPs (2.5mM cada dNTP), 1.25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1.5 µL do *primer* LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3') e HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), 0.3 µL de 1 U Taq DNA Polimerase e 1 µL of DNA (30 – 50 ng/µL) nas seguintes condições: 3 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 53 °C, 40s a 72 °C e uma extensão final de 7 min. a 72 °C.

Para o gene nuclear, realizamos duas PCR (volume total de 20 µL), sendo a primeira com um par de *primers* externos tir1A (5'-AGGTCCTCTTRAGCAAGGAATG-3') e tir1E (5'-GAGAAGAAAGAWGCTGGGCTGAG-3') (Bossuyt e Milinkovitch, 2000) contendo 8.8 µL ddH₂O, 2.4 µL de 25 mM MgCl₂, 0.8 µL de 10 mM dNTPs (2.5mM cada dNTP), 2.0 µL de 10x buffer (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1.0 µL de cada *primer* (2 µM), 0.3 µL de

1 U Taq DNA Polimerase e 3 μL de DNA (com 50 ng/ μL) nas seguintes condições: uma temperatura inicial de 68°C (60sec.), seguido por 35 ciclos de 93°C (10 seg.), 50°C (35 seg.) e 68°C (1.5 min.) e extensão final de 68 °C por 7 min. Na segunda PCR utilizamos 1 μL do produto da primeira e repetimos as mesmas condições, porém com temperatura de anelamento de 55 °C e os *primers* internos tir1F (5'- GTAAAACGACGGCCAGTCCTGTCTAACTCTTCCATAGG-3') e tir1R (5'-AGTCCCAGAAGGGAATGGTGRAG-3').

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit BigDye Terminator (*Life Technology*) seguindo o protocolo do fabricante. Os *primers forward* 16S A (mDNA), cauda M13 para o gene COI e os *primers forward* tir1F e *reverse* tir1R para o gene nuclear, foram utilizados nas reações de sequenciamento. O produto das reações de sequenciamento foram precipitados com etanol de acordo com recomendações do fabricante (*Applied Biosystems*), ressuspendidos em 10 μL de formamida deionizada (ABI) e posteriormente injetados no sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*).

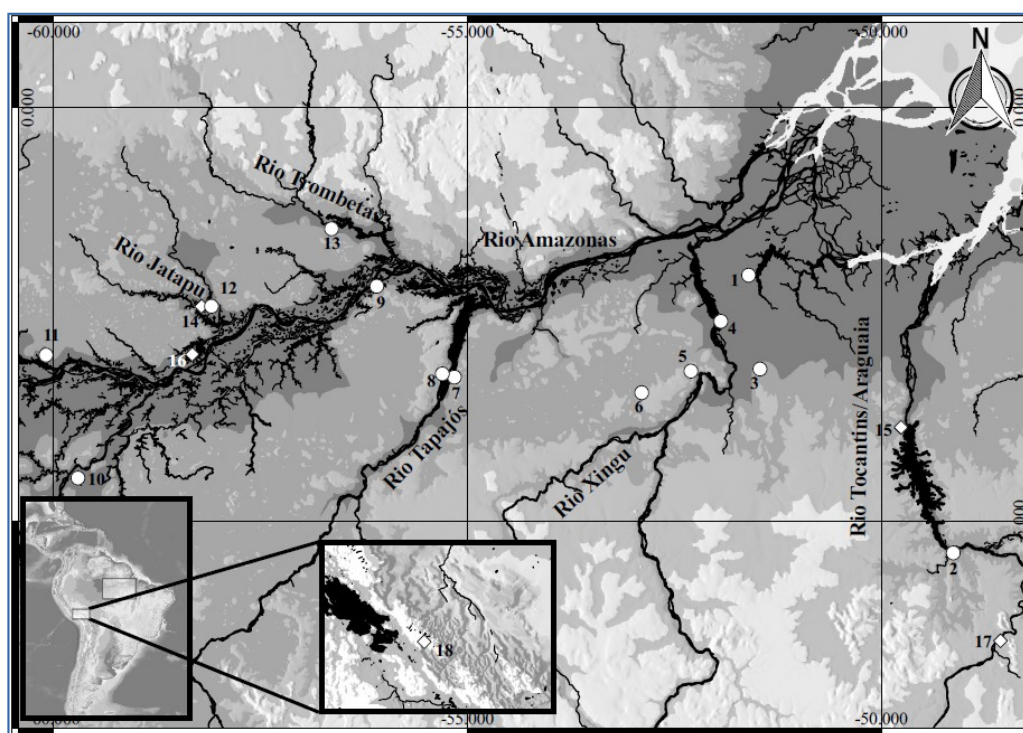


Figura 1: Região amostrada com pontos de coleta de *P. fenestratus* para a Amazônia brasileira. Os círculos correspondem às localidades de indivíduos cujas medidas morfométricas foram aferidas e que possuem os três genes sequenciados. Os diamantes representam as localidades que possuem apenas o gene 16s sequenciado. 1) Flona de Caxiuanã (Belém); 2) Marabá; 3) Anapu; 4) Senador José Porfírio; 5) Altamira; 6) Medicilândia; 7) Margem direita Rio Tapajós; 8) Margem esquerda Rio Tapajós; 9) Juruti; 10) Borba; 11) Manaus; 12) Margem esquerda Rio Jatapu; 13) Margem direita Rio Trombetas; 14) Margem direita Rio Jatapu; 15) Tucuruí; 16) Silves; 17) Fazenda Xambioá (Tocantins) e 18) La Paz (Bolívia).

Alinhamento das seqüências e Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram alinhadas no software BioEdit (Hall, 1999) utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) e editadas manualmente. Duas árvores de Máxima Verossimilhança foram estimadas: uma para os genes 16S e COI concatenados (1000 pb), utilizando o modelo evolutivo GTR+G e outra árvore para o gene nuclear com o modelo evolutivo HKY. Os modelos evolutivos foram estimados no programa JModeltest (Darriba *et al.*, 2012) e escolha entre modelos alternativos foi feita via Critério de Informação Akaike Corrigido (AICc).

As árvores de Máxima Verossimilhança (ML) foram geradas no software *Treefinder* (Jobb, 2011) com 10 mil réplicas não paramétricas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) tendo como grupo externo *Craugastor longirostris* (número de acesso no GenBank: tir JN991417.1) e *C. tabasarae* (número de acesso no GenBank: 16S KC014806.1). As distâncias genéticas *p* par a par não corrigidas entre as localidades foram obtidas pelo programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Análise de estrutura populacional

Análise Bayesiana de Estrutura Populacional (BAPS) foi implementada no software BAPS 5.0 (Corander *et al.*, 2008) para encontrar agrupamentos formados com as sequências obtidas de todos os genes concatenados (13 localidades). O software BAPS utiliza frequências nucleotídicas das amostras para inferir o número *K* de grupos diferentes geneticamente através de análise Bayesiana, alocando sequências similares no mesmo grupo. O número máximo de *K* escolhido para a análise foi 15, sendo esse um número maior do que o de localidades amostradas, uma vez que análises filogenéticas indicaram a existência de mais de um grupo genético para uma mesma localidade. O valor de *log-likelihood* do melhor modelo foi usado para escolher a configuração de agrupamentos mais provável. Os haplótipos das sequências nucleares foram obtidas utilizando o algoritmo PHASE (Stephens *et al.*, 2001) implementado no software DNAsp 5.0 (Librado e Rozas, 2009) com 10 mil interações de MCMC e um *burn-in* de 10%, utilizando o código IUPAC para os sítios ambíguos.

Para o cálculo da distância genética *p* entre os grupos gerados pelo BAPS e entre as localidades, utilizamos apenas as sequências dos genes 16S e tirosinase. Optamos por usar os genes separadamente para viabilizar comparações com outros estudos, os quais majoritariamente utilizaram fragmentos provenientes destes genes. A partição da variância genética entre grupos foi acessada por meio de Análise de Variância Molecular (AMOVA) implementada no programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O mesmo programa foi empregado para a realização de testes de correlação entre uma matriz de distância geográfica linear (em km) e uma matriz de distância genética (*Fst* para o gene 16S) contendo todas as localidades de amostragem. Apenas o

gene 16S foi utilizado para este teste, pois apresentou o maior número de indivíduos sequenciados, correspondendo para as 18 localidades.

Estimativa do tempo de divergência

Para estimar o tempo de divergência entre as linhagens deste estudo, foram utilizados os genes 16S e tirosinase separadamente, pois apresentaram pelo menos um indivíduo para cada localidade. Todas as sequências (114 para 16S e 84 para tir) foram utilizadas. Três pontos de divergência conhecidos foram utilizados: 1) a separação dos hilídeos *Agalychnis callidryas* e *Litoria caerulea* entre da linhagem Eleutherodactylina (57 milhões de anos) (Roelants *et al.*, 2007); 2) a separação do clado Sudeste do Brasil (*Ischnocnema*) de *Eleutherodactylus*, *Craugastor* e *Pristimantis* (50 milhões de anos) e 3) a separação do clado da América central (*Craugastor*) do gênero *Pristimantis* por volta de 42 milhões de anos (Heinicke *et al.*, 2007), utilizando o software BEAST (Drummond e Rambaut, 2007).

Tais análises foram realizadas assumindo um relógio molecular relaxado do tipo lognormal, que assume taxas independentes sobre diferentes ramos (Drummond *et al.*, 2006). As árvores prévias foram modeladas de acordo com o processo de especiação Yule. A cadeia (MCMC) utilizada na análise de divergência do BEAST teve um tamanho de 100 milhões de passos, com uma árvore consenso gravada a cada 10 mil passos em três corridas independentes. Desse modo, foram gravadas 10.000 árvores e descartadas as mil primeiras, considerando um *burn-in* de 10%.

A estacionalidade da distribuição posterior para todos os parâmetros foi visualizada no programa TRACER v1.5 (Drummond e Rambaut, 2007). Para o *output* do MCMC, geramos uma árvore consenso final utilizando o *Tree Annotator* v1.6.6 (Drummond e Rambaut, 2007).

Dados morfométricos

As medidas morfométricas foram aferidas de 132 machos provenientes de coleções zoológicas e coletas de campo. Fêmeas não foram utilizadas nas análises morfométricas, uma vez que o número de indivíduos coletados por localidade foi insuficiente. As medidas foram realizadas com um paquímetro digital com 0.1 mm de precisão. A nomenclatura das medidas seguiu Kok e Kalamandeen (2008), Padial e De La Riva (2009) e Duellman e Lehr (2009): comprimento rostro cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CoC); largura da cabeça (LaC); comprimento do rostro (CoR); distância do olho ao nariz (DON); distância internasal (DIn); comprimento do olho (CoO); distância interorbital (DIo); largura da supraocular (LSo); comprimento do tímpano (CoT); comprimento do braço (CoB); comprimento da mão (CoM); comprimento da coxa (CCo);

comprimento da tíbia (CTi); comprimento do tarso (CTa); comprimento do pé (CoP); comprimento da perna (CPe).

Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise da Função Discriminante (AFD) foram realizadas para investigar o grau de diferenciação morfométrica entre as localidades. Para visualizar a diferença na forma, independente do tamanho, a ACP foi realizada com os resíduos da regressão linear das outras variáveis em relação ao CRC (Funk *et al.*, 2011). Para investigar a existência de diferenças morfométricas significativas entre as localidades, uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) foi aplicada com os dois primeiros componentes, pois apresentaram a maior proporção de variância. A AFD foi aplicada tendo como variável preditora os grupos gerados pelo BAPS com o objetivo de testar atribuição de cada indivíduo a seu respectivo agrupamento genético.

Resultados

Estrutura populacional e divergência genética

Foram obtidas 114 sequências de 16S DNAr, correspondendo a 23 haplótipos distintos; 62 sequências de COI DNAm, sendo 29 haplótipos diferentes e 84 sequências de tirosinase DNAn, com 34 haplótipos distintos. Os genes 16S, COI e tir foram concatenados, totalizando 56 sequências com 1499pb, sendo 1185 sítios conservados, 314 sítios variáveis e 305 sítios informativos.

A AMOVA mostrou que a maior parte da variabilidade genética está distribuída entre as populações (92.95%) ($\Phi_{ST} = 0.9295$, $p < 0.001$). A análise do BAPS para todos os genes concatenados revelou a existência de seis agrupamentos genéticos ($\log ML = -4252.7784$; probabilidade = 1) (Fig. 2), sendo eles: Interflúvio Xingu Araguaia (IXA) com as populações de Marabá e Floresta Nacional de Caxiuanã – PA; Interflúvio Tapajós Araguaia (ITA) com populações de Anapu, Senador José Porfírio, Altamira, Medicilândia e Tapajós_D; Interflúvio Madeira Tapajós (IMT) com as localidades de Juruti e Rio Tapajós_E; Baixo Madeira 1 (BM1) com três indivíduos da localidade de Borba; Baixo Madeira 2 (BM2) com cinco indivíduos de Borba; e Escudo das Guianas (EG) com as localidades de Manaus, Rio Jatapu e Rio Trombetas_D – PA.

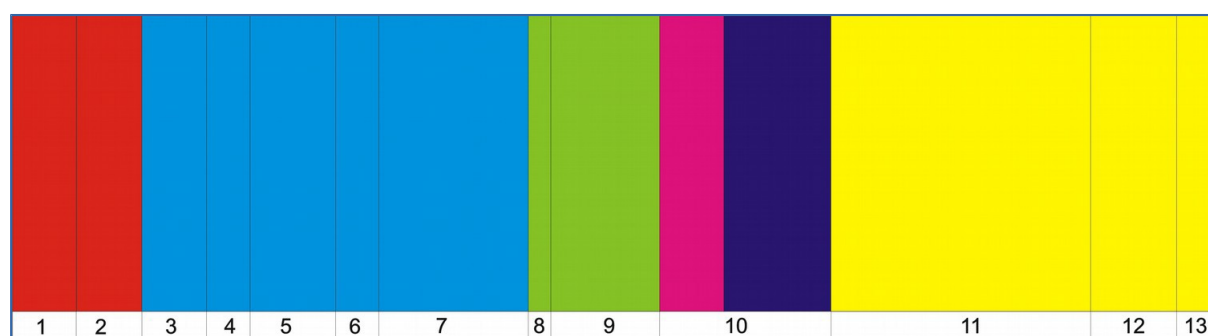


Figura 2: Estruturação populacional em *P. fenestratus* a partir dos dados de 16S, COI e Tirosinase concatenados. As cores dispostas verticalmente representam cada um dos agrupamentos genéticos (*clusters*). Os números correspondem as localidades amostradas: 1) Flona de Caxiuana (Belém); 2) Marabá; 3) Anapu; 4) Senador José Porfírio; 5) Altamira; 6) Medicilândia; 7) Margem direita Rio Tapajós; 8) Margem esquerda Rio Tapajós; 9) Juruti; 10) Borba; 11) Manaus; 12) Margem esquerda Rio Jatapu; 13) Margem direita Rio Trombetas.

A distância genética p entre os grupos gerados pelo BAPS (tabela 2) e entre as localidades (tabela 3) mostram uma grande diferenciação entre os agrupamentos genéticos acompanhada de baixa divergência dentro dos agrupamentos. O padrão de distribuição desses grupos pode ser observado no mapa da Fig. 3, onde se pode observar a delimitação de alguns deles pelo curso de grandes rios amazônicos.

Tabela 2: Distância genética p não corrigida (em %) entre os grupos encontrados por meio de Análise Bayesiana de Estrutura Populacional. A diagonal separa distâncias de acordo com o fragmento do gene 16 S (abaixo) e com o gene nuclear (acima). IMT (Interflúvio Madeira Tapajós), BM1 (Baixo Madeira), Baixo Madeira 2 (BM2), IXA (Interflúvio Xingu Araguaia), ITA (Interflúvio Tapajós Araguaia) e EG (Escudo da Guiana).

	IMT	BM1	IXA	ITA	EG	BM2
IMT	-	0	2	2	2	1
BM1	4	-	3	3	2	1
IXA	12	12	-	0	2	2
ITA	12	11	7	-	2	2
EG	11	12	11	10	-	1
BM2	11	11	11	11	2	-

O teste de Mantel entre as distâncias geográfica e genética não foi significativo para nenhum dos genes (16S $r = -0.12$; $p = 0.62$; COI $r = -0.13$; $p = 0.83$; tir $r = -0.16$; $p = 0.91$), indicando que isolamento por distância não é responsável pela estruturação destas populações.

Tabela 3: Distância genética p não-corrigida (em %) entre as localidades de amostragem de *P. fenestratus*. Os números representam as localidades da tabela 1. A diagonal separa distâncias de acordo com o fragmento do gene 16 S (abaixo) e com o gene nuclear (acima). Asteriscos indicam sequências obtidas por meio do GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10'	11	12	13	14*	15*	16*
1	-	0	0	0	0	0	0	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
2	0	-	0	0	0	0	0	3	3	3	1	1	1	1	-	-	4
3	8	8	-	0	0	0	0	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
4	8	8	1	-	0	0	0	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
5	8	8	1	0	-	0	0	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
6	8	8	1	0	0	-	0	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
7	8	8	1	1	2	2	-	3	3	3	1	1	2	1	-	-	4
8	11	11	12	11	11	12	11	-	0	0	1	1	1	1	-	-	5
9	11	11	12	11	12	12	11	0	-	0	2	1	1	1	-	-	5
10	12	12	12	12	12	12	11	4	4	-	2	2	1	2	-	-	5
10'	9	9	9	9	9	9	9	12	11	12	-	0	0	0	-	-	4
11	9	9	8	8	8	8	9	12	12	13	1	-	0	0	-	-	4
12	9	9	10	10	10	10	10	12	12	14	2	1	-	0	-	-	4
13	9	10	10	10	10	10	10	12	12	14	2	1	0	-	-	-	4
14*	11	11	14	13	13	13	14	12	12	12	3	4	3	3	-	-	-
15*	11	12	15	13	14	14	14	17	17	17	2	3	3	3	3	-	-
16*	29	28	22	23	23	24	22	27	27	30	22	21	20	20	22	21	-

Obs: 14* *Pristimantis fenestratus*, 15* *P. koehleri* (número de acesso no GenBank: EU192278-9 e EU192280-2) e 16* *P. gutturalis* (número de acesso no GenBank: JN691313.1)

Filogeografia com base em genes mitocondriais

A análise dos genes mitocondriais concatenados de 60 indivíduos de *P. fenestratus* revelou que a distribuição da variabilidade genética é influenciada por alguns dos grandes rios amazônicos, com profundas divergências genéticas entre seis clados bem suportados (Fig. 3). Dentre os seis grupos observados, podemos ver uma divisão em duas grandes regiões: sul do Rio Amazonas (Borba, Juruti, Tapajós, Xingu e Araguaia) e norte do Rio Amazonas (Manaus, Jatapu e Trombetas). O município de Borba, localizado no Baixo Madeira, apresentou dois grupos, um mais relacionado com localidades do Escudo da Guiana (distância p 2%) e outro com as populações do sul do Rio Amazonas. Para o sul do Amazonas, foram recuperados quatro clados bem suportados: IXA, ITA, IMT e BM1. A distância genética entre estes clados varia entre 5 e 12% (ver Tabela 2). O grupo formado por IMT + BM1 se encontram no interflúvio Madeira/Tapajós, sendo este grupo irmão de ITA + IXA, separados pelo Rio Tapajós. O clado EG, de distribuição limitada até a margem direita do Rio Trombetas, apresenta distâncias genéticas entre 0 a 2% com as demais localidades amostradas (Manaus, Rio Jatapu e Rio Trombetas_D).

Filogeografia com base no gene nuclear tirosinase

Podemos observar quatro linhagens bem suportadas, sendo três restritas a interflúvios: as localidades IMT+BM1 estão entre os rios Madeira e Tapajós; IXA entre os rios Xingu e Tocantins-Araguaia e ITA entre o Tapajós e o Tocantins-Araguaia. No clado IMT+BM1, não encontramos uma boa resolução filogenética, onde foi observada politomia entre as localidades de Borba, Juruti e Tapajós_E, tendo como grupo irmão ITA+IXA+EG+BM2. O mesmo pode ser encontrado na relação entre EG e BM2, com distância genética de 1%.

Tempo de divergência

A análise do tempo de divergência estimado com o gene 16S (Fig. 4) indicou uma divisão basal entre os grupos do norte e sul do Amazonas entre o Inferior e Médio Mioceno ~17.3 Ma (95% HPD: 11.8 – 23.6 Ma). O tempo de divergência entre as populações EG e BM2 foi estimado para o Plioceno em torno de ~3 Ma (95% HPD: 1.4 – 4.9 Ma). No sul do Amazonas, as populações do ITA divergiram das outras no Médio Mioceno ~13 Ma (95% HPD: 9.2 – 19.4). As populações do IXA divergiram das populações do IMT+BM1, ~11 Ma durante o Médio Mioceno (95% HPD: 7.4 – 16.8 Ma) e estas últimas divergiram-se durante o Plioceno por volta de 3.5 Ma (95% HPD: 1.6 – 6.5 Ma). *Pristimantis koehleri* divergiu de *P. fenestratus* da Bolívia por volta de 4.8 Ma (Plioceno),

enquanto que esta última divergiu das populações de *P. fenestratus* do norte do Amazonas por volta de 3.8 Ma (Plioceno).

Com o gene nuclear, observamos uma divisão basal por volta de 12 Ma no Médio Mioceno (95% HPD: 6.2 – 21.2 Ma) separando as linhagens do IMT+BM1 de EG, BM2, IXA e ITA. Em seguida a separação das linhagens do EG+BM2 do clado ITA+IXA por volta de 8 Ma (95% HPD: 4.1 – 15.4 Ma) no Mioceno Superior, marcou a última divisão no Mioceno entre as populações de *Pristimantis* analisadas. No Plioceno Inferior ~3.5 Ma (95% HPD: 1.1 – 7.6 Ma) eventos de diversificação dividiram as linhagens do ITA e IXA.

Durante o Pleistoceno, as populações encontradas em Manaus divergiram das populações do BM2+Trombetas+Rio Jatapu em ~2.4 Ma (95% HPD: 0.3 – 5.9 Ma). O BM1 divergiu do IMT em ~2.0 Ma (95% HPD: 0.3 – 5.5 Ma). Um último momento de divergência foi indicado para o BM2 e o Rio Jatapu, ocorrendo em ~0.4 (95% HPD: 0 – 1.9 Ma) no Médio Pleistoceno.

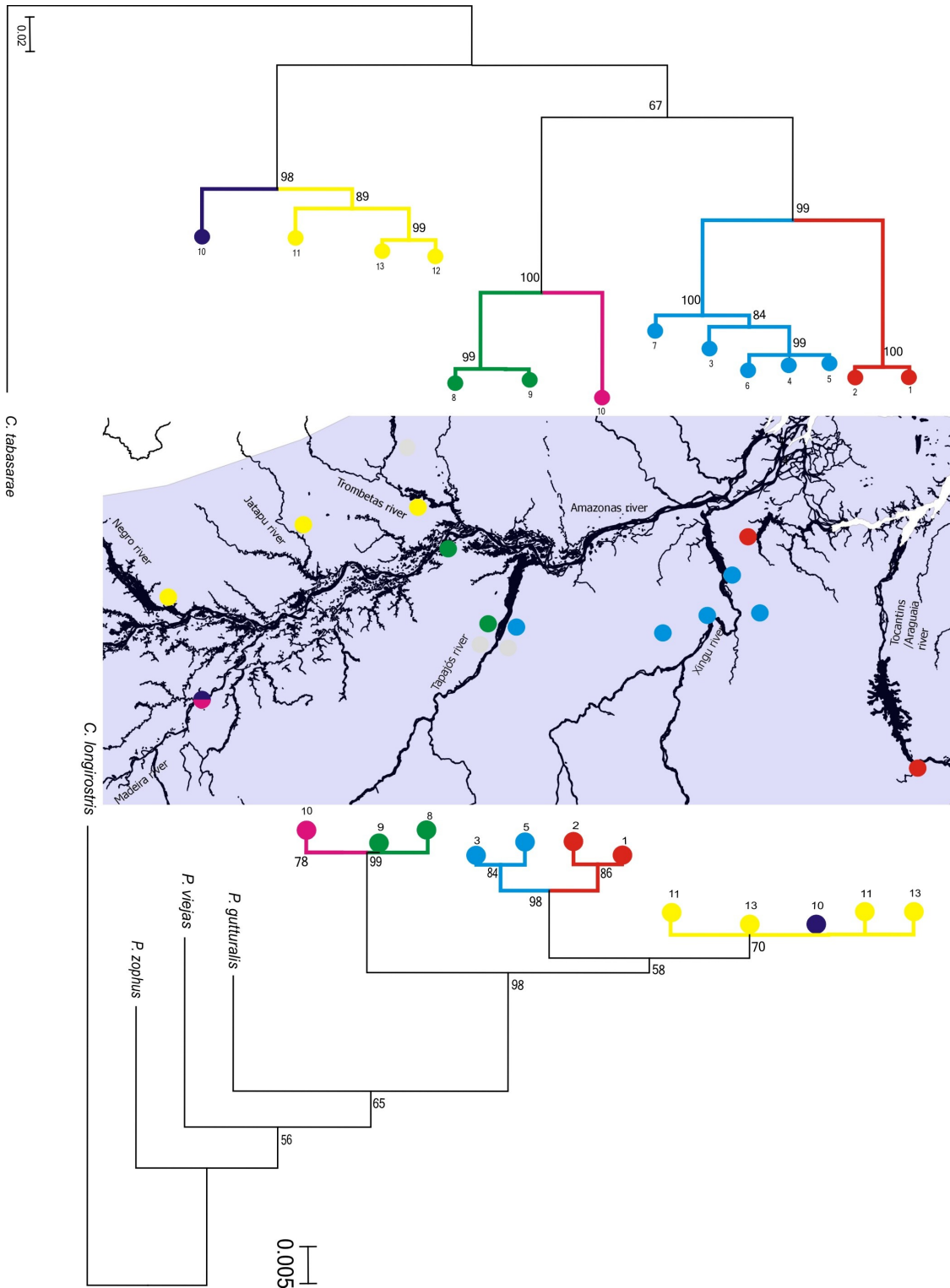


Figura 3: Árvores de genes mitocondriais (superior) e nuclear (inferior) para *Pristimantis fenestratus* baseadas em máxima verossimilhança (ML). O grupo externo é *Craugastor tabasarae* para genes mitocondriais e *C. longirostris* para gene nuclear. Os valores nos ramos representam o valor de *bootstrap* e os números em frente aos círculos correspondem à localidade de acordo com a Tabela 1. As cores de cada círculo correspondem ao agrupamento genético inferido por meio do programa BAPS com base em DNAm e DNAn.

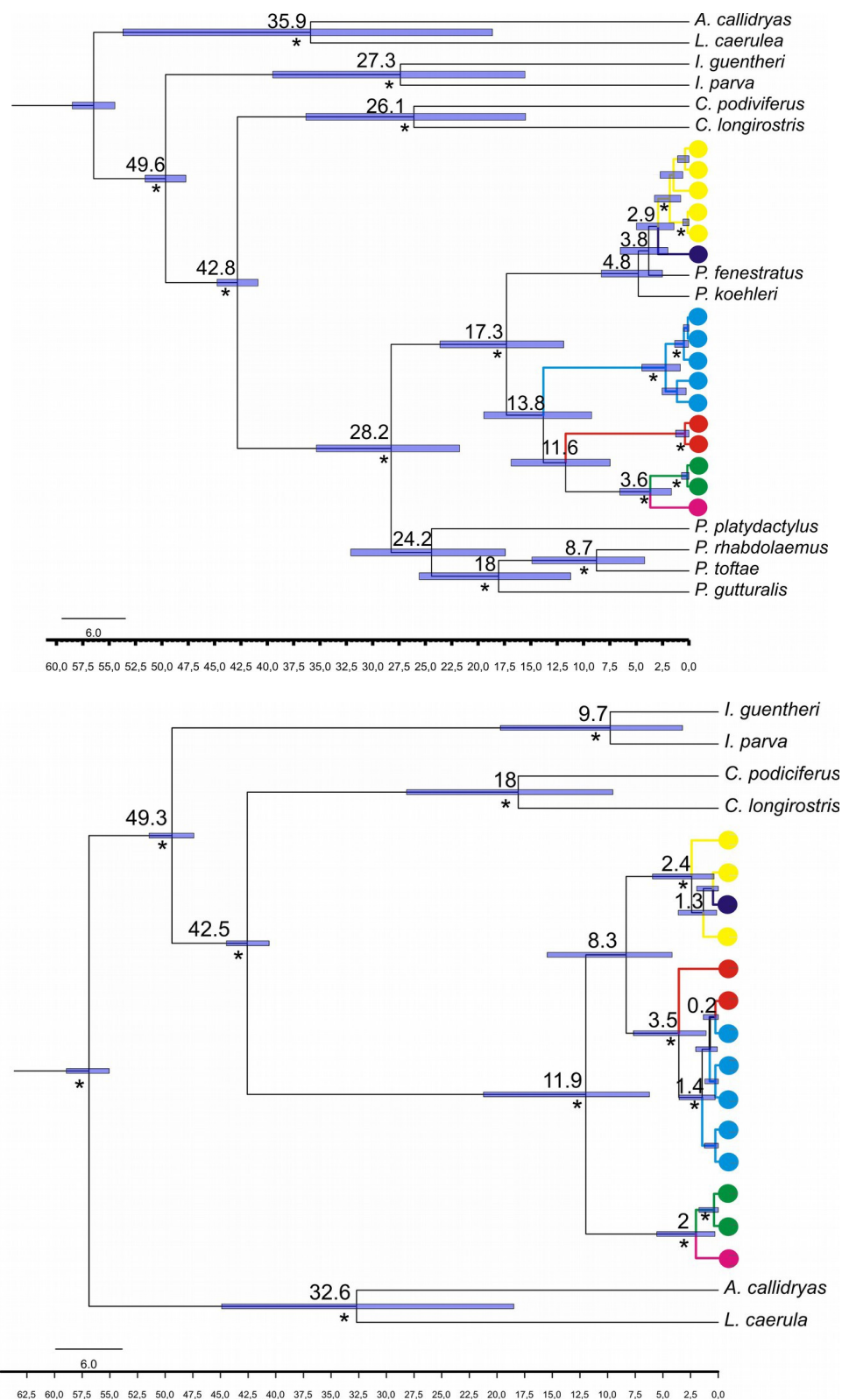


Figura 4: Cronograma derivado do gene 16S (superior) e do gene tirosinase (inferior) para *Pristimantis fenestratus*. As cores representam os agrupamentos genéticos de acordo com BAPS. Para ambos, usamos um modelo de relógio lognormal relaxado. A data de divergência é uma média *a posteriori* em milhões de anos antes do presente com probabilidade máxima posterior (HPD) de 95% representada pelas barras nos nós. As HPDs são apresentadas abaixo dos ramos da seguinte forma: * ≥ 0.95 e sem rótulo < 0.95 . Os números em cima dos nós correspondem a separação dos grupos biológicos em Milhões de anos.

Análises morfométricas

Os dois primeiros componentes da ACP explicaram 78.38% da variação encontrada no conjunto de dados morfométricos. O primeiro componente foi responsável por 68.81% e o segundo por 9.57% da variação (Fig. 5) (Informação Suplementar 1). A Análise de Variância Multivariada indicou a existência de diferenças significativas estatisticamente entre as populações examinadas (Pillai trace = 0.25; $p < 0.0001$).

A matriz de classificação *Jackknifed* da função discriminante mostrou que apenas 52% dos machos foram corretamente atribuídos a seus respectivos agrupamentos genéticos (Informação Suplementar 2).

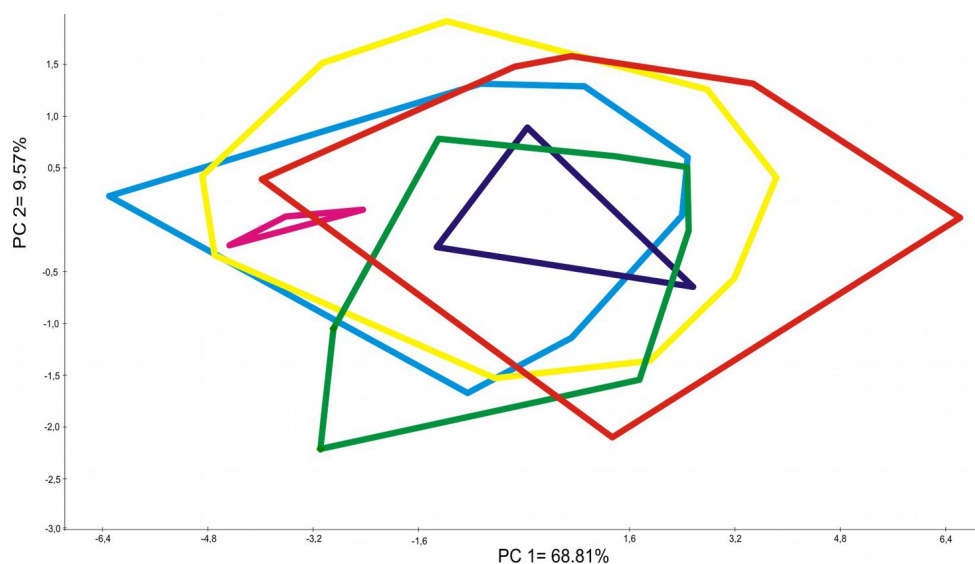


Figura 5: Distribuição de escores individuais de 132 indivíduos machos de *P. fenestratus* ao longo de dois componentes principais (PCs) resumindo medidas morfométricas externas. As cores representam os agrupamentos genéticos: amarelo (EG), vermelho (IXA), azul claro (ITA), rosa (BM1), azul escuro (BM2) e verde (IMT).

Discussão

Estruturação espacial da variabilidade genética

Encontramos pronunciada estruturação entre as populações de *Pristimantis fenestratus* no leste da Amazônia, indicando uma forte influência dos principais rios amazônicos na determinação deste padrão. O predomínio de altos graus de estruturação genética é amplamente documentado na literatura sobre anfíbios (Elmer *et al.*, 2007; Zeisset e Beebee, 2008; Kaefer *et al.*, 2013), revelando que as populações muitas vezes encontram-se distribuídas de tal forma que estimativas de fluxo gênico entre elas são praticamente nulas. Anuros com desenvolvimento direto apresentam estratégias de vida que promovem alta estruturação populacional, pois apresentam baixa capacidade

de dispersão (Fouquet *et al.*, 2012), filopatria e até mesmo territorialidade (Wells, 2007, Bogart, 1991). O padrão de estruturação genética encontrado no presente estudo se assemelha àquele observado em *Allobates* (Kaefer *et al.*, 2013), gênero que inclui espécies com desenvolvimento direto e que compartilha com *Pristimantis* características que promovem baixa vagilidade.

Podemos observar um padrão espacial de distribuição da variabilidade genética similar ao proposto para a hipótese de rios como barreiras, proposta por Wallace (1849). Tal padrão tem sido encontrado por diversos estudos com diferentes vertebrados terrestres (Antonelli *et al.*, 2010), embora seja importante salientar que a diversidade de organismos e de rios testados não permitem grandes generalizações a respeito do tema (Rogers e Leite, 2013; Dias-Terceiro *et al.*, 2015). No presente estudo, a previsão de monofilia recíproca entre populações provenientes de margens opostas não foi observada em todos os casos. Em contraste, a correlação entre distância geográfica e genética não foi significativa, sugerindo que outros fatores geográficos, tais como barreiras, devem ser determinantes na distribuição da variabilidade genética. Por fim, o desenho amostral empregado no presente estudo não permitiu avaliar se existe “permeabilidade” dos rios ao fluxo gênico ao longo de suas respectivas extensões. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo vem se somar a um crescente corpo de conhecimento que indica que a variabilidade genética nos níveis intra e interespecífico em anfíbios apresentam relação com a transposição de grandes rios amazônicos (e.g., Funk *et al.*, 2007; Fouquet *et al.*, 2012; Kaefer *et al.*, 2012, Kaefer *et al.*, 2013, Simões *et al.*, 2014).

A cronologia da divergência de linhagens é importante para testarmos as hipóteses dos mecanismos e forças que causaram essa diversificação (Rull, 2011). Nossos dados mostram um tempo de divergência para o DNAm e DNAn concordante com outros trabalhos com o gênero *Pristimantis* (Elmer *et al.*, 2007; Kieswetter e Schneider, 2013), *Hypsiboas cinerascens* (Motta comunicação pessoal) e *Allobates* spp. (Kaefer *et al.*, 2013), os quais relacionam eventos de diversificação ao Inferior e Médio Mioceno para o Inferior do Plioceno. Esta época foi marcada por significativa reorganização tectônica e paleogeográfica, principalmente pela criação/alteração de novos caminhos e barreiras para a evolução biótica por meio de movimentação tectônica (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Como observado no presente estudo, também é importante destacar o papel do Pleistoceno na estruturação das linhagens mais recentes, pois os complexos processos de interações paleogeográficos e paleoclimáticos afetaram o surgimento de linhagens antigas e recentes (Bush, 1994; Rull, 2008). Muitas espécies começaram a diversificar durante o Terciário (Mioceno/Plioceno) como consequência dos eventos tectônicos de orogênese (soerguimento dos Andes). Depois, no início do Quaternário, as flutuações climáticas e a formação do atual sistema de drenagem da bacia Amazônica teriam fragmentado essas linhagens causando a estruturação das

populações e o surgimento de novas espécies (Santos *et al.*, 2009; Rull, 2011).

A região do Baixo Madeira apresentou uma forte estruturação genética, com duas linhagens simpátricas com histórias evolutivas e relacionamentos filogenéticos distintos. Talvez este padrão possa ser explicado pelo estabelecimento do sistema de drenagem do Rio Amazonas em ~7 Ma (Hoorn *et al.*, 2010), separando as linhagens do Baixo Madeira (BM2) e Escudo das Guiana (EG) e Baixo Madeira (BM1) da linhagem do Interflúvio Madeira Tapajós (IMT). A formação do baixo Madeira teve um papel importante e intrigante na formação da biota desta região, causando grandes efeitos na estruturação de anuros como *Hypsiboas cinerascens* (Motta comunicação pessoal), *Allobates nidicola* e *Allobates masniger* (Kaefer *et al.*, 2013) e outros grupos de vertebrados: Crocodylia *Paleosuchus palpebrosus* (Muniz, 2012), Cetacea *Inia geoffrensis* e *Inia boliviensis* (Gravena *et al.*, 2014).

Diversidade críptica e delimitação de espécies candidatas

Nossos resultados com DNA mitocondrial, DNA nuclear e dados morfométricos revelaram uma alta diversidade críptica para a espécie *Pristimantis fenestratus* no leste da Amazônia, indicando seis linhagens genéticas fortemente suportadas de acordo com o DNAmT e quatro de acordo com o DNAn. Provavelmente o número de linhagens crípticas em *P. fenestratus* é muito maior, visto que a distribuição da espécie não foi totalmente contemplada pelo desenho amostral da presente investigação. Esta alta diversidade críptica vem sendo revelada para outros grupos (Fouquet *et al.*, 2007a; Elmer *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2011; Gehara *et al.*, 2014), mostrando que muitas das espécies conhecidas como amplamente distribuídas estão mascarando uma diversidade ainda desconhecida (Fouquet *et al.*, 2007a; Kieswetter e Schneider, 2013). Uma vez que estimativas apontam que nos últimos 250 anos da classificação taxonômica apenas 14% de todas as espécies terrestres foram descritas (Mora *et al.*, 2011), nossos resultados fazem parte de um amplo conjunto de evidências que apontam que a biodiversidade e a diversidade críptica Neotropical e, particularmente, amazônica não podem ser trivializada.

Antes dos avanços das técnicas com sequências de DNA em estudos na região amazônica, esta por muito tempo foi considerada uma região com alta diversidade alfa (muitas espécies em um mesmo local) e baixa diversidade beta (espécies diferentes em locais distintos) (Funk *et al.*, 2011). Isso se deve à ampla utilização de conceitos de espécies baseados em morfologia, a qual colaborou para a ideia de que muitas espécies apresentavam uma ampla distribuição na Amazônia (Padial e De la Riva, 2009). Nossos resultados, assim como outros estudos utilizando dados genéticos e/ou bioacústicos (Fouquet *et al.*, 2007a,b; Lehtinen *et al.*, 2007; Padial e De la Riva, 2009; Kaefer *et al.*, 2013), ajudam a mudar essa visão da Amazônia, mostrando que espécies com ampla

distribuição, podem estar mascarando espécies crípticas e com distribuição mais restrita, revelando que as diversidades beta e gama (total) são severamente subestimadas.

Quatro linhagens encontradas neste estudo (IXA, ITA, IMT e BM1) podem ser classificadas como Espécies Candidatas Não-confirmadas (ECN), pois apresentam uma divergência genética acima de 3%, valor proposto para o marcador 16S DNAr (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007b) para delimitar espécies proximamente relacionadas. Quando uma revisão nos caracteres diagnósticos na morfologia e/ou vocalização forem incorporadas nas linhagens encontradas neste estudo, acreditamos que as mesmas serão elevadas para o status de Espécies Candidatas Confirmadas (ECC), obedecendo as premissas propostas na literatura recente em taxonomia de anfíbios (Vieites *et al.*, 2009; Padial *et al.*, 2010). Para os agrupamentos genéticos do EG e BM2, a distância genética p (16S DNAr) entre os mesmos é de 2%. Entretanto, dados citogenéticos (Siqueira *et al.*, 2009) e diferenças em caracteres bioacústicos (Marcelo Gordo, comunicação pessoal) destas duas populações fazem delas compatíveis com a classificação como ECC, pois independente da divergência genética entre elas, a constatação de uma barreira pré-zigótica, tal como a vocalização, é suficiente para delimitar espécies (Vieites *et al.*, 2009; Padial *et al.*, 2010). Muitos outros exemplos de espécies distintas com baixa divergência genética são documentados na literatura: anuros de Madagascar (Vieites *et al.*, 2009), *Egystomops* (Ron *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2011) e ciclídeos Africanos (Meyer *et al.*, 1990).

De modo geral, nossas análises mostraram que *P. fenestratus* apresenta pelo menos quatro novas espécies-candidatas crípticas bem suportadas, apontamos um incremento de até 400% no número de espécies através das populações de *P. fenestratus* analisadas. Fouquet *et al.* (2007b) encontrou em 60 espécies analisadas para a Amazônia e Guiana, um incremento de 22 – 115% de potenciais novas espécies com base no DNAm, enquanto que Funk *et al.* (2011) sugerem um aumento de 150 – 250% para *Egystomops* e 200 – 350% para *Hypsiboas* no número de espécies, com dados moleculares, morfológicos e bioacústicos. Mesmo assim, em *Pristimantis*, essa grande diversidade não pode ser considerada surpreendente: anuros com desenvolvimento direto apresentam uma taxa de especiação mais elevada, devido em parte ao modo de vida (desenvolvimento direto) (Vences e Wake, 1999). *Pristimantis* põem poucos ovos e tendem a permanecer no mesmo local, favorecendo a endogamia e a fixação de mutações em condições homozigóticas (Bogart, 1991). Dubois (2005) propõe que a alta taxa de mortalidade favorece a fixação de alelos nas populações e assim favorece o surgimento de novas espécies.

Dois razões são apontadas para a ocorrência de espécies crípticas, morfologicamente semelhantes: 1) reconhecimento de um sinal de acasalamento não visual, ou seja, feromônios ou sinais bioacústicos (Bickford *et al.*, 2007). Espécies que diferem por esse caminho, escapam de um

taxonomista baseado apenas em morfologia, pois não apresentam caracteres morfológicos diagnósticos (De Sá *et al.*, 2005; Tsuji-Nishikido *et al.*, 2012) 2) Seleção estabilizadora que, sob condições ambientais restritivas, reduzem ou eliminam mudanças morfológicas que poderiam ser acompanhadas de especiação (Bickford *et al.*, 2007). As espécies que vivem sob forte seleção do ambiente ou caracteres fisiológicos para adaptação em um determinado habitat, podem não apresentar mudanças na morfologia entre indivíduos (Schönrogge *et al.*, 2002).

Conclusão

Pristimantis fenestratus representa um complexo de espécies entre as quais se observa conservatismo morfológico acompanhado de profundas distâncias genéticas. Embora necessite de uma revisão taxonômica integrativa que contemple dados moleculares, morfológicos e comportamentais, o conjunto de dados analisado permite assinalar quatro linhagens como espécies candidatas. A variabilidade genética do complexo *P. fenestratus* é distribuída de acordo com a transposição de grandes rios amazônicos. As divergências mais profundas em *P. fenestratus* remontam ao Mioceno/Plioceno, embora eventos mais recentes de diversificação tenham modelado a variabilidade genética atual da espécie. Um incremento no número de áreas amostradas deverá permitir a delimitação de um número ainda maior de espécies candidatas, bem como uma melhor compreensão a respeito da história deste conjunto de unidades evolutivas.

Informação suplementar:

I. S. 1 Valores dos dois primeiros componentes principais dos machos, usando apenas os resíduos da regressão linear das outras medias em relação ao CRC.

Variável	PC1	PC2
CCo	-0.367518096	8.721601e-01
CoP	-0.394314278	-1.577263e-01
CoC	-0.124013620	4.036435e-02
LaC	-0.125832000	1.433050e-01
DIo	-0.035460475	-1.346139e-03
LSo	0.019027895	1.132526e-02
DIn	-0.009612552	-2.572970e-02
DON	-0.052160694	3.017538e-02
CoO	-0.019989116	4.124621e-03
CoT	-0.029607866	1.439539e-02
CTi	-0.433821817	-1.388558e-02
CoM	-0.193236455	-1.813041e-05
CoR	-0.056137366	4.208964e-02
CPe	-0.621674985	-3.789120e-01
CTa	-0.204660314	-2.117020e-01
CoB	-0.124362626	-3.210994e-03
Eigenvalor	4.67503	0.650359
% variação	68.81%	9.57

I. S. 2: Matriz de classificação *Jackknifed* para os machos, utilizando apenas os resíduos das regressões em relação das outras medidas em relação ao CRC.

<i>Jackknifed Classification Matrix</i>							
	ITA	EG	BM2	BM1	IMT	IXA	% correto
ITA	11	2	0	0	6	5	46
EG	9	23	1	2	9	8	44
BM2	0	0	4	0	0	0	100
BM1	0	1	0	2	0	0	67
IMT	2	2	0	2	7	3	44
IXA	5	3	0	1	3	21	64
Total	27	31	5	7	25	37	52

Capítulo 2

***Pristimantis* (Jiménez de La Espada 1870), um gênero megadiverso: uma nova espécie *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) para a bacia Amazônica oriental brasileira**

Resumo

Descrevemos uma nova espécie de *Pristimantis* (Anura: Craugastoridae) do grupo *Pristimantis conspicillatus*. *Pristimantis* **sp. nov.** é conhecida para o município de Juruti, Estado do Pará, Brasil – Amazônia Oriental e comunidade Cameté no município de Aveiro, Pará, Brasil na margem esquerda do rio Tapajós (3°13'36.40"S; 55°19'58.73"W). A nova espécie é diferenciada das outras espécies do grupo por apresentar a combinação de seguintes caracteres: o ventre liso, pequenos tubérculos dorso laterais espalhados, pequenas dobras dorsolaterais, franja nos dedos das mãos e pés, tubérculos supernumerários plantares, membrana basal nos pés, região gular e ventre com pontos marrom em um fundo branco. A análise molecular para o gene 16S DNAr apontam uma distância genética de 11% para *P. koehleri* e 12% para *P. fenestratus*.

Palavra chave: *Pristimantis* **sp. nov.**, DNA mitocondrial, morfologia.

Introdução

O gênero *Pristimantis* Jiménez De la Espada 1870 possui atualmente 473 espécies divididas em 11 grupos de espécies (Padial *et al.*, 2014), amplamente distribuídas na América Central e do Sul (Frost, 2014). O grupo *P. conspicillatus* (Lynch e Duellman, 1997) compreende 33 espécies (Padial *et al.*, 2014) que estão distribuídas principalmente no norte da América do Sul, leste da Colômbia, Guianas e Ilha Taboga no Panamá (Hedges *et al.*, 2008). A diversidade de espécies deste gênero é a maior entre todos os grupos de vertebrados (Fouquet *et al.*, 2013). Essa diversidade pode ser associada com a evolução do desenvolvimento direto e uma variedade de traços morfológicos que adaptam estes anuros a ocuparem regiões não ocupados por outros anfíbios (Terán-Valdez e Guayasamin, 2010). Um desses traços, tamanho corporal, pode variar de 14,5 mm (*P. andinognomus* Lehr e Coloma 2008) para 73 mm (*P. lymani* Barbour e Noble 1920) (Hedges *et al.*, 2008).

Pristimantis fenestratus (Steindachner 1864) pertence ao grupo *P. conspicillatus* e possui ampla distribuição na Amazônia (Lima *et al.*, 2006; Bernarde e Macedo 2008; França e Venâncio, 2010; Avila-Pires *et al.*, 2010). A taxonomia de *Pristimantis fenestratus* encontra-se, em grande parte, sem uma resolução adequada; onde muitas populações morfológicamente diferentes têm sido tratadas erroneamente sobre o mesmo nome (Duellman e Lehr, 2009; Freitas, 2011; Siqueira *et al.*, 2009). Em parte devido à incongruência das informações a respeito da localidade tipo da espécie (De la Riva, 2000; Siqueira *et al.*, 2009), assim Reichle

(1999) em visita ao *Naturhistorisches Museum Wien* (NMW) designa o sítipo de *Pristimantis fenestratus* da localidade do Rio Mamoré, Rondônia (NMW 19940:1 – Figura 1 a,b,c) como o lectótipo e o sítipo do município de Borba, Amazonas (NMW 19940:2 – Figura 1 d,e,f) como o paralectótipo. De La Riva (2000) e Padial e De La Riva, (2009), consideram *P. fenestratus* coletados na bacia Amazônica boliviana e encostas dos Andes, como coespecífico de *P. fenestratus* da localidade tipo do lectótipo.

Evidências recentes suportam a ideia de *P. fenestratus* ser um complexo de espécie (Rodríguez *et al.*, 2004). Padial e De La Riva (2009) descreveram *Pristimantis koehleri* para a Bolívia, mas antigamente esta era identificada como possível população de *P. fenestratus*, *P. samaipatae* (Köhler e Jungfer 1995), *P. dundeei* (Heyer e Muñoz 1999) ou *P. peruvianus* (Melin 1941) devido a similaridades morfológicas. Maciel *et al.* (2012) descrevem *P. ventrigranulosus* para o Brasil Central apoiada por dados morfológicos e bioacústicos, onde Duellman e Lehr (2009) consideravam populações que ocorrem no Brasil Central diferentes de *P. fenestratus* dos Andes e Bolívia.

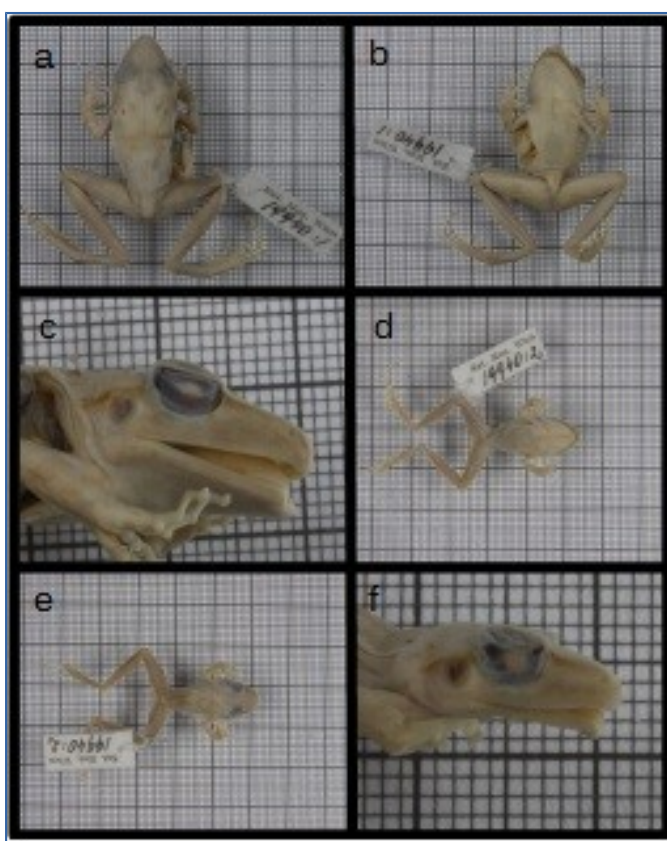


Figura 1. Lectótipo de *Pristimantis fenestratus* do Rio Mamoré, Rondônia – Brasil (vista dorsal em a; vista ventral em b; vista lateral da cabeça em c) e Paralectótipo do município de Borba, Amazonas – Brasil (vista dorsal em d; vista ventral em e; vista lateral da cabeça em f).

Utilizando dados morfológicos e moleculares, descrevemos uma nova espécie de

Pristimantis para o grupo *P. conspicillatus*, relacionada com *P. fenestratus* e *P. koehleri* Padial e De la Riva 2009.

Material e Métodos

Análises morfológicas: Foram analisados 38 espécimes de *Pristimantis* aff. *fenestratus* provenientes da Coleção Zoológica de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-H) e Coleção Herpetológica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). As comparações dos estados dos caracteres foram realizadas com sete espécimes da localidade tipo do município de Borba, Amazonas, Brasil indicada por (Steindachner, 1864) (Apêndice I). Utilizamos também informações disponíveis na literatura, seguindo a descrição dos caracteres diagnósticos indicados por Padial e De la Riva (2009) para *P. fenestratus*.

Seguimos a nomenclatura sugerida por Kok e Kalamandeen (2008), Padial e De La Riva (2009) e Duellman e Lehr (2009) para as medidas morfométricas, utilizando um paquímetro digital com 0.1 mm de precisão: comprimento rostro cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CoC); largura da cabeça (LaC); comprimento do rostro (CoR); distancia do olho ao nariz (DON); distância internasal (DIn); comprimento do olho (CoO); distancia interorbital (DIo); largura da supraocular (LSo); comprimento do tímpano (CoT); comprimento do braço (CoB); comprimento da mão (CoM); comprimento da coxa (CCo); comprimento da tíbia (CTi); comprimento do tarso (CTa); comprimento do pé (CoP); comprimento da perna (CPe).

Para a identificação do sexo, uma incisão lateral foi feita nos espécimes, com o objetivo de examinar as gônadas. Em adição, registramos caracteres sexuais secundários em machos e fêmeas adultos, tais como a presença/ausência de saco vocal e calo nupcial.

Análise molecular: O DNA genômico total foi extraído para 15 espécimes usando o protocolo CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987). Um fragmento 16S DNAr foi amplificado via PCR usando os *primers* 16Saf e 16Sbr (Palumbi, 1996). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 92°C à 60 s seguida por 35 ciclos de 92°C (60 s), 50°C (50 s) e 72°C (1.5 min). O volume final da reação de PCR foi de 12 µL e contendo 4.4 µL ddH₂O, 1.5 µL de 25 mM MgCl₂, 1.25 µL de 10 mM dNTPs (2.5mM cada dNTP), 1.25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1 µL de cada *primer* (2 µM), 0.3 µL de 1 U Taq DNA Polimerase e 1 µL de DNA (30 – 50 ng/µL). Reação de sequenciamento foi realizada de acordo com recomendações do fabricante para o *mix* de sequenciamento ABI *BigDye Terminator*, usando o *primer* 16Saf e uma temperatura de anelamento de 50°C. As reações de sequenciamento foram precipitadas usando o protocolo padronizado de

EDTA/Etanol, resuspendido com 10µL de formamida deionizada (ABI) e sequenciado no sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*).

Para a construção da árvore filogenética foi obtida um total de 490 bp de 15 espécimes de *P. aff. fenestratus* da localidade de Juruti, estado do Pará, Brasil e seis topótipos do município de Borba, Amazonas, Brasil. Adicionalmente foram obtidas sequências do GenBank de *Pristimantis fenestratus*, *P. koehleri*, *P. samaipatae* (Köhler e Jungfer 1995), *P. toftae* (Duellman 1978), *P. rhabdolaemus* (Duellman 1978) e *P. platydactylus* (Boulenger 1903) (Tabela 1). Usamos *Oreobates discoidalis* (Peracca 1895), como grupo externo, seguindo Padial e De La Riva (2009). Todas as sequências foram alinhadas usando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) implementado no software BioEdit 7.2 (Hall, 1999). O modelo molecular evolutivo GTR+G foi escolhido através do software Jmodel Test (Darriba *et al.*, 2012) e uma árvore filogenética com 10.000 réplicas de *bootstrap* foi gerada no software *Treefinder* (Jobb, 2008). A distância genética par a par não corrigida (*p*-distance) entre as espécies foram calculadas no software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Tabela1: Lista de espécimes utilizados para análise molecular

Espécies	Localidades	GenBank	Nº na coleção	Status dos espécimes
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 292	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 296	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 304	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 307	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 308	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 309	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 310	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 317	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 318	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 319	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 330	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 332	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 341	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Juruti, PA – Brasil	-----	J 342	Parátipos
<i>Pristimantis sp. nov</i>	Comunidade Cametá, PA – Brasil	-----	INPA-H 34566	Parátipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34571	Topótipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34577	Topótipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34562	Topótipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34573	Topótipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34580	Topótipos
<i>fenestratus</i>	Borba, AM – Brasil	-----	INPA-H 34575	Topótipos

<i>koehleri</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192278	MNCN 42990	Paratopótipo
<i>koehleri</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192279	MNCN 6627/	Paratopótipo
<i>koehleri</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192280	MNCN 42983	Parátipos
<i>koehleri</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192281	MNCN 43013	Parátipos
<i>koehleri</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192282	MNCN 42986	Parátipos
<i>fenestratus</i>	Peru, Madre de Dios	EU192277	MHNC 3130	Vouchers
<i>fenestratus</i>	Bolívia, La Paz	EU192273	MNKA 6629	Vouchers
<i>fenestratus</i>	Bolívia, La Paz	EU192274	MNKA 6630	Vouchers
<i>fenestratus</i>	Bolívia, Cochabamba	EU192275	MNKA 6631	Vouchers
<i>samaipatae</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192292.1	MNCN 42987	Vouchers
<i>chiastonotus</i>	UHE Jari, AP – Brasil	-----	Jari 08 – 10 e 12	Vouchers
<i>zeuctotylus</i>	Rio Trombetas, PA – Brasil	-----	CTGA 1512 – 15 e 1670	Vouchers
<i>danae</i>	Rio Purus, AM – Brasil	-----	CTGA 769, 788-9 e 796	Vouchers
<i>rhabdolaemus</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192257.1	MNCN-DNA4120	Vouchers
<i>rhabdolaemus</i>	Bolívia, Santa Cruz	EU192258.1	MNCN-DNA3940	Vouchers
<i>toftae</i>	Peru, Cusco	EU192294.1	MNCN 43246	Vouchers
<i>toftae</i>	Bolívia, Cochabamba	EU192293.1	MNCN 43025	Vouchers
<i>platydactylus</i>	Bolívia, Santa Cruz.	EU192283.1	MNKA - JMP 054	Vouchers
<i>platydactylus</i>	Bolívia, Cochabamba	EU192284.1	MNCN 43003	Vouchers
<i>Oreobates</i>	Bolívia, Tarija	EU368896.1	MNCN43133	Vouchers
<i>discoidalis</i>				

Abreviações: MNCN, Museu Nacional de Ciências Naturais (Espanha); MNK-A, Coleção de Anfíbios, Museu de História Natural Noel Kempff Mercado (Bolívia); MHNC, Museu de História Natural, Universidade Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Peru; CTGA, Coleção de Tecidos de Genética Animal; J, Juruti.

***Pristimantis* sp. nov.**

(Figura 2)

Holótipos: INPA-H 34576, macho adulto, coletado no município de Juruti, Estado do Pará, Brasil (02°36'46.09"S; 56°11'38.53"W) por Marcelo Gordo em 23 de Junho de 2010.

Parátipos: INPA-H 34568 – 70 e 34572 quatro machos adultos e INPA-H 34563, 34564, 34567 e 34574 quatro fêmeas adultas, coletados na mesma localidade do holótipo. INPA-H 34566, fêmea adulta coletada na margem esquerda do médio rio Tapajós, na comunidade de Cametá do município de Aveiro, Pará, Brasil (3°13'36.40"S; 55°19'58.73"W), distante em 100 km do município de Juruti, PA, Brasil.

Grupo *Pristimantis conspicillatus*: A nova espécie pertence ao grupo *Pristimantis conspicillatus* (Lynch e Duellman, 1997; Hedges *et al.*, 2008). Até o momento, não existem sinapomorfias morfológicas identificadas para suportar o gênero *Pristimantis* (Hedges *et al.*, 2008). Avaliamos a nova espécie para este gênero, com base na geografia e semelhanças com outras espécies de *Pristimantis*. Consideramos a nova espécie no grupo *P. conspicillatus* por apresentar os dedos da mão I>II, membrana timpânica e tímpanos annulus distintos e crista cranial ausente (Hedges *et al.*, 2008).

Diagnoses. *Pristimantis* **sp. nov.** é diferenciada das outras espécies do grupo, pela seguinte combinação dos caracteres (Tabela 2): (1) pele dorsal *shagreen*, com poucos tubérculos pretos espalhados pela região dorso lateral, pequena dobra dorso lateral formada por pequenos grânulos, pele do ventre lisa com dobras discoidais conspícuas; (2) saco vocal com manchas marrom escuro em um fundo branco; (3) coloração ventral esbranquiçada com pontos marrons; (4) um tubérculo subarticular no dedo da mão I e II, dois tubérculos no dedo da mão III e IV; (5) tubérculo supernumerário presente nas mãos e quase do mesmo tamanho dos tubérculos subarticular; (6) franja lateral ligeiramente desenvolvida nos dedos das mãos com fraca rede basal entre os dedos I e II; (7) tubérculo supernumerário presente na base do dedo IV do pé (Figura 4E); (8) rede basal nos dedos dos pés com franja lateral ligeiramente desenvolvidas; (9) superfície dorsal das coxas com faixas marrom escura que estende-se para o posterior da coxa; (10) cinquenta autapomorfias moleculares para o fragmento do gene 16S do DNAr.

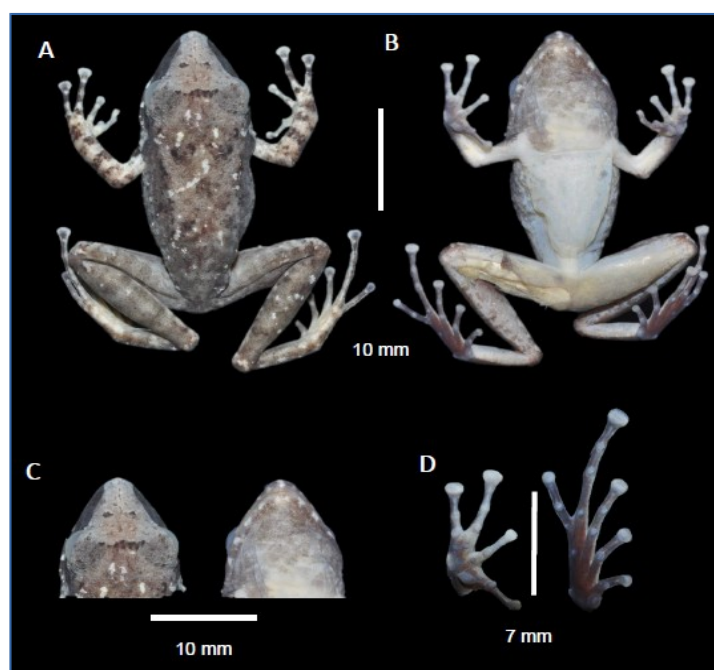


Figura 2. Holótipo de *Pristimantis* **sp. nov.** (A) Vista ventral, (B) vista dorsal, (C) vista lateral da cabeça, (D) mão e (E) pé direito (INPA-H 34576).

Tabela 2: Comparação dos caracteres diagnósticos de algumas espécies do grupo *Pristimantis conspicillatus* junto com a nova espécie: (1) textura do ventre (liso ou granular); (2) tubérculos dorsal (presente ou ausente); (3) franja nos dedos da mão (presente ou ausente); (4) dobra dorso lateral (presente ou ausente); (5) franja nos pés (proeminente, fraca, ausente); (6) membrana basal nos pés (presente ou ausente); (7) dobra tarsal (proeminente, fraca ou ausente); (8) padrão de coloração da garganta (manchado, imaculado, variável ou claro); (9) tubérculo supernumerário plantar (presente ou ausente); (10) tubérculo palmar externo (inteiro, dividido ou semi dividido).

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>P. fenestratus*</i>	liso	presente	ausente	-----	fraca	presente	-----	manchado	ausente	-----
<i>P. fenestratus**</i>	liso	ausente	presente	ausente	fraca	presente	presente	variável	-----	dividido
<i>P. koehleri</i>	granular lateralmente	ausente	ausente	ausente	fraca	ausente	presente	claro	presente	dividido
<i>P. dundeei</i>	granular	presente	ausente	ausente	proeminente	presente	presente	manchado	-----	dividido
<i>P. samaipatae</i>	liso	ausente	ausente	ausente	proeminente	ausente	presente	imaculado	-----	dividido
<i>P. zeuctotylus</i>	liso	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	ausente	manchado	presente	inteiro
<i>Pristimantis sp. nov.</i>	liso	presente	presente	presente	fraca	presente	fraca	manchado	presente	dividido

Obs: O (*) descrição feita por Duellman e Lehr (2009) para *Pristimantis fenestratus* do Peru e o (**) descrição de Padial e De La Riva (2009) para *Pristimantis fenestratus* da Bolívia.

Análise filogenética e distância genética. A análise filogenética da espécie conhecida como *Pristimantis fenestratus*, apontou a existência de três linhagens (Figura 3). A primeira linhagem agrupando os indivíduos de Borba, Amazonas, Brasil. Uma segunda linhagem para os espécimes da Bolívia. A terceira linhagem agrupa os indivíduos de Juruti, Pará, Brasil e comunidade de Cameté no município de Aveiro, Pará, Brasil. Amostras coletadas na localidade tipo de *P. fenestratus*, para o município de Borba, aparecem como grupo irmão de *P. koehleri* com uma *p*-distance de 2%. *Pristimantis fenestratus* da Bolívia aparece como grupo irmão de *P. fenestratus* (Borba) + *P. koehleri*, com uma *p*-distance de 3% para ambas. A nova espécie, *Pristimantis sp. nov.* possui uma *p*-distance de 11% para *P. fenestratus* de Borba e *P. koehleri* e 12% para *P. fenestratus* da Bolívia (Tabela 3).

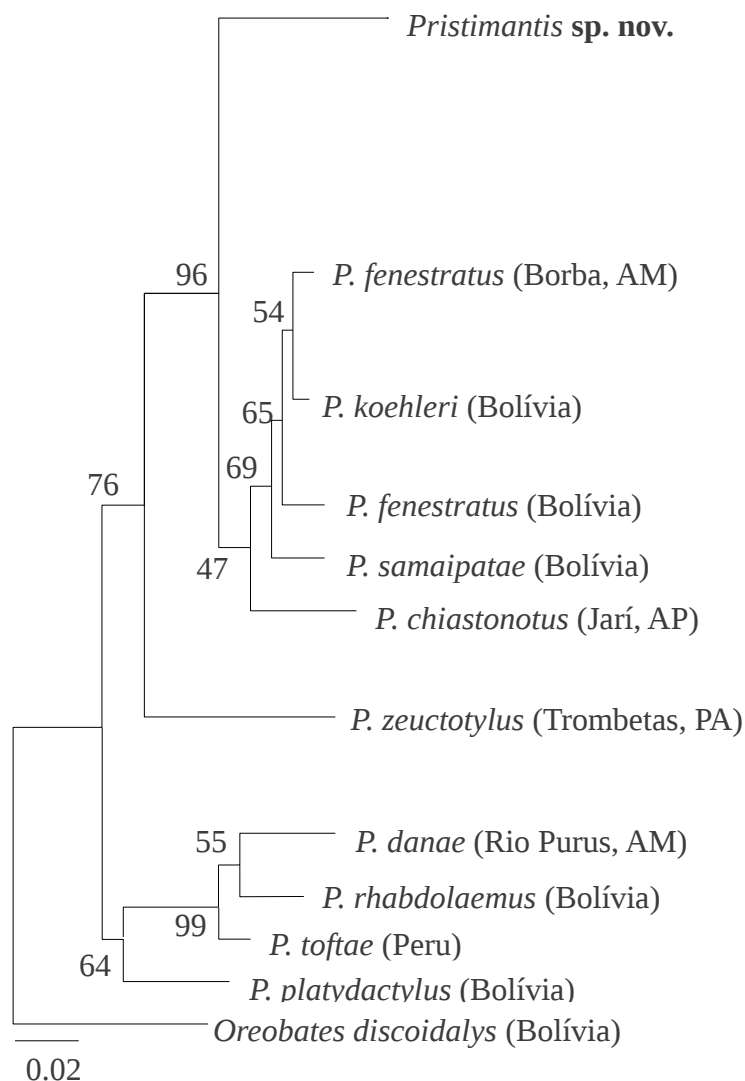


Figura 3. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) utilizando o modelo evolutivo GTR+G, inferindo o relacionamento filogenético entre *Pristimantis sp. nov.* e outras espécies do grupo *P. conspicillatus* com base no marcador mitocondrial 16s rRNA com 490 pb. Os suportes dos ramos foram encontrados com 10 mil pseudoréplicas de bootstrap. A barra horizontal representa a distância genética entre os clados.

Tabela 3: Distancia genética entre as espécies do grupo *Pristimantis conspicillatus* utilizadas neste estudo.

	<i>Pristimantis</i> sp. nov.	<i>P. fenestratus</i> (Borba)	<i>P. koehleri</i> (Bolívia)	<i>P. samaipatae</i> (Bolívia)	<i>P. fenestratus</i> (Bolívia)	<i>P. chiastonotus</i> (Brasil)	<i>P. zeuctotylus</i> (Brasil)
<i>Pristimantis</i> sp. nov.	-						
<i>P. fenestratus</i> (Borba)	0.11	-					
<i>P. koehleri</i> (Bolívia)	0.11	0.02	-				
<i>P. samaipatae</i> (Bolívia)	0.11	0.04	0.05	-			
<i>P. fenestratus</i> (Bolívia)	0.12	0.03	0.03	0.06	-		
<i>P. chiastonotus</i> (Brasil)	0.14	0.09	0.09	0.09	0.09	-	
<i>P. zeuctotylus</i> (Brasil)	0.17	0.15	0.15	0.14	0.15	0.17	-

Comparação com outras espécies. *Pristimantis sp. nov.* pode ser distinguido de *P. fenestratus*, *P. koehleri*, *P. samaipatae*, *P. dundeei* (Heyer e Muñoz 1999), *P. ventrigranulosus* Maciel, Vaz-Silva, Oliveira e Padial 2012 e *P. zeuctotylus* (Lynch e Hoogmoed 1977) por uma série de combinações de caracteres (estado do caractere das espécies comparadas em parênteses): para *P. fenestratus* por tubérculo supernumerário plantar presente (ausente), presença de franja nos dedos das mãos (ausente), presença de tubérculos dorsais (ausente); para *P. koehleri* por membrana basal nos dedos dos pés (ausente); para *P. samaipatae* por fraca franja lateral nos dedos das mãos (ausente), ventre de cor creme esbranquiçado com pontos marrom escuro (imaculado); para *P. dundeei* por ventre liso (areolado), presença de dobras dorso laterais (ausente); *P. ventrigranulosus* por ventre liso (fracamente areolado), tubérculo supernumerário plantar presente (ausente); para *P. zeuctotylus* por tubérculo palmar dividido (inteiro), ventre cor creme esbranquiçado com pontos marrom escuro e dorso marrom escuro (ventre de cor preta e dorso de cor bronze).

Descrição do holótipo. Pele dorsal *shagreen*, com poucos tubérculos pretos espalhados pelo corpo; região ventral e gular lisa; cabeça mais longa que larga; rostro longo subacuminado em vista dorsal e protuberante em vista lateral; narinas visíveis em vista lateral; *canthus rostralis* côncavo e região loreal plana; língua ovalada, cobrindo todo o chão da boca; processo dentífero do vômer oblíquo e situado posterior às coanas; saco vocal subgular com manchas escuras em um fundo branco; olho representando 4.2% do CRC; pupila elíptica; dobra supratímpanica proeminente e ovalada; membrana timpânica e tímpanos annulus arredondado e proeminente; mãos relativamente pequenas, representando 26.4% do CRC; comprimento relativo dos dedos das mãos: II < IV < I < III; discos

dos dedos III e IV das mãos mais expandidos que o I e II; fraca franja lateral nos dedos das mãos e uma fraca rede basal entre os dedos I e II das mãos; um proeminente tubérculo metacarpal externo dividido, em forma de coração; tubérculo metacarpal interno pequeno na base do dedo I; um tubérculo subarticular no dedo I e II da mão, dois tubérculos subarticulares proeminente nos dedos III e IV; tubérculos supernumerários presente na base dos dedos das mãos; pernas longas, com tíbia representando 55.3% do CRC; comprimento relativo dos dedos dos pés: $I < II < V < III < IV$; tubérculo metatarsal interno bem desenvolvido e ovalado; tubérculo metatarsal externo menor que o interno; um tubérculo subarticular nos dedos I e II do pé; dois tubérculos subarticular nos dedos III e V do pé; e três tubérculos subarticular no dedo IV do pé; um tubérculo supernumerário na base do dedo IV do pé; franja lateral fracamente desenvolvida nos dedos dos pés; rede basal entre dos dedos I e II, II e III, III e IV; ausência de dobra tarsal externa.

Medidas do holótipo (mm). CRC: 28.0; CoC: 10.5; LaC: 10.0; CoR: 5.7; DON: 3.9; DIn: 2.8; CoO: 4.0; DIO: 3.0; LSo: 2.7; CoT: 1.8; CoB: 5.8; CoM: 7.4; CCo: 13.7; CTi: 15.5; CTa: 7.6; CoP: 13.9; CPe: 20.2.

Coloração em álcool. Machos são marrom escuro no dorso, exceto o parátipo INPA-H 34569 (marrom claro), todas as fêmeas têm o dorso marrom claro. Tubérculos pretos no dorso. O ventre é creme esbranquiçado, com poucos pontos escuros espalhados pelo ventre. A região gular apresenta manchas marrom escuras em um fundo branco.

Varição (Figura 4). Os machos INPA-H 34570 e INPA-H 34572 possuem membros fortemente barrados; alguns parátipos têm manchas pretas e/ou brancas espalhadas pelo dorso (INPA-H 34568 e 34570). Fêmeas podem apresentar a região gular mais esbranquiçada e manchas marrom escuro nas laterais.

Distribuição. *Pristimantis* **sp. nov.** é conhecida somente para o município de Juruti e comunidade de Cametá no município de Aveiro, Pará, Brasil margem esquerda do rio Tapajós (Figura 5).



Figura 4. Variação morfológica dorsal e ventral da série tipo de *Pristimantis* sp. nov. (A) fêmeas e (B) machos.

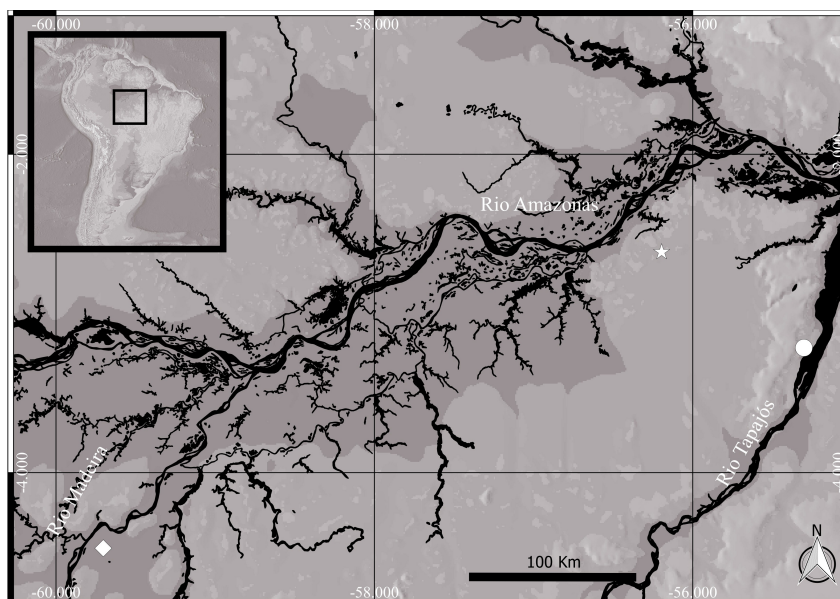


Figura 5. Localidade tipo de *Pristimantis* sp. nov. (estrela), comunidade Cametá, Pará, Brasil (círculo) e município de Borba (quadrado).

Discussão

Pristimantis fenestratus tem sido considerada uma espécie amplamente distribuída na Amazônia, sendo registrada em diversos trabalhos, porém levantamos um problema que já vem sendo encontrado por outros autores, sobre a diversidade críptica nesta espécie (Padial e De la Riva, 2009; Duellman e Lehr, 2009, Siqueira *et al.*, 2009). Nossas análises mostram que *P. fenestratus* do município de Borba e *P. fenestratus* de La Paz, Bolívia, são duas linhagens separadas pela distância genética de 3% . Alguns autores defendem o limite de 3% de divergência com o gene 16S, para separar espécies (Vences *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007b). Assim, uma revisão taxonômica é necessária em *P. fenestratus*, pois as duas localidades que correspondem para o tipo da espécie, apresentam divergências genéticas consideráveis.

Pristimantis sp. nov. é descrita para a Amazônia Oriental, após uma comparação morfológica e molecular com *P. fenestratus*. Porém, devido a ampla distribuição da espécie, acreditamos que mais espécies serão descritas, depois de uma revisão taxonômica integrativa de *P. fenestratus*. Trabalhos recentes vem revelando que espécie amplamente distribuídas, mascaram espécies ainda não descritas (Elmer *et al.*, 2007; Padial e De la Riva, 2009; Gehara *et al.*, 2014), em parte por causa da similaridade morfológica do gênero e a carência de estudos na Amazônia Oriental. Algumas descrições do estado dos caracteres de *P. fenestratus* são encontrados na literatura (Padial e De La Riva, 2009; Duellman e Lehr, 2009), baseado neles, a nova espécie

apresenta diferenças que suportam a sua validade, diferenciando esta também de outras espécies do grupo *P. conspicillatus*.

Pristimantis é um gênero com muitas espécies para algumas regiões da Amazônia (Peru, Colômbia, Equador, Bolívia, Venezuela), resultado do grande número de trabalhos realizados nestas áreas (Duellman e Hedges, 2007; Elmer e Cannatella, 2008; Padial e De la Riva, 2009; Duellman e Lehr, 2009; Barrios-Amorós *et al.*, 2010; Arteaga-Navarro e Guayasamin, 2011; Mueses-Cisneros *et al.*, 2013), fazendo com que a região Oriental amazônica apareça com uma baixa diversidade de espécies, evidenciado pela carência de estudos taxonômicos.

Apêndice 1

Espécimes examinados

Pristimantis fenestratus: INPA-H 34571, INPA-H 34577, INPA-H 34562, INPA-H 34573, INPA-H 34578, INPA-H 34575, MPEG 7088, município de Borba, Amazonas, Brasil (localidade tipo).

Pristimantis sp. nov. MPEG 15961, MPEG 14266, MPEG 15929, MPEG 14270, MPEG 27433, MPEG 27435, MPEG 27426, MPEG 27439, MPEG 27432, MPEG 27424, MPEG 27430, MPEG 22392, MPEG 20537, MPEG 20523, MPEG 20530, MPEG 20535, MPEG 20534, MPEG 20538, MPEG 20539, MPEG 20529, MPEG 20527, MPEG 20525, MPEG 20540, MPEG 20526, MPEG 20536, MPEG 20524, MPEG 20528, MPEG 20533, INPA-H 34569, INPA-H 34574, INPA-H 34567, INPA-H 34564, INPA-H 34572, INPA-H 34568, INPA-H 34576, INPA-H 34570 e INPA-H 34563, igarapé mutum no município de Juruti, Pará, Brasil. INPA-H 34566, comunidade de Cametá no município de Aveiro, margem esquerda do rio Tapajós, Pará, Brasil.

I.S.1: Medidas dos 38 indivíduos de *Pristimantis sp. nov.* e seis indivíduos de *P. fenestratus* do município de Borba,(AM).

Exemplar	Sexo	CRC	CCo	CPe	CoC	LaC	DIO	LSo	DIn	DON	DiO	CoT	CTi	CoM	CoR	CPe	CTa	CoB
INPA-H 34571	M	32.8	16.4	17	12.8	12.3	2.3	3.9	2.5	4.3	4.3	1.8	17.8	9.3	6.5	24.6	8.5	7.7
INPA-H 34577	M	30.8	15.3	14.5	11.3	10.7	2.4	3.6	2.9	3.8	4.5	1.5	16.8	7.6	5.6	22.1	8.6	6.4
INPA-H 34562	F	32.4	15.7	15.4	11.9	11.1	2.6	4.1	2.7	3.9	4.4	1.8	16.2	7.8	6.5	21.6	7.2	6.7
INPA-H 34573	M	34.3	19.1	17.8	12.6	11.6	2.6	4	2.9	4.5	3.9	1.6	19	10.2	6.5	26.2	9	7.7
INPA-H 34580	M	31.1	14.4	14	11.6	10.2	2.6	3.8	2.8	4.2	4.3	1.6	16	7.4	6	21.1	8	5.7
INPA-H 34575	M	31.6	15.9	16.3	11.1	10.5	2.3	3.3	2.6	4.2	4	1.4	17.5	8.7	5.7	23.3	8.2	6.8
INPA-H 34569	M	30.5	15.6	15.7	12.1	11.4	3.4	3.6	3	4.2	4.6	1.6	17.6	8.8	6.1	23.3	8.9	6.3
INPA-H 34574	F	28.6	15.7	14.3	11.7	10.7	3.2	2.8	2.7	4	3.5	1.6	18.3	8.3	6.1	23.8	9.3	6.2
INPA-H 34567	F	33	18.5	18.3	13.7	12.6	3.3	3.7	3.2	5.1	4.7	2.1	21.7	9.2	7.2	27.5	11.1	7.7
INPA-H 34564	F	29	14.8	15.9	11.8	10.9	3	3.3	2.8	4.1	3.9	1.7	17.9	8.4	6.3	22.9	8.5	5.8
INPA-H 34572	M	30.9	14.7	15.7	12	11	2.8	3.4	2.7	3.6	3.9	1.5	17.6	8.1	5.6	23.6	9.1	6.3
INPA-H 34568	M	29.1	15.4	15.4	12.2	11.3	3.1	3.4	3	3.9	4.3	1.8	17.5	8.3	6.1	22.9	8.4	6.5
INPA-H 34576	M	28	13.7	13.9	10.5	10	3	2.7	2.8	3.9	4	1.8	15.5	7.4	5.7	20.2	7.6	5.8
INPA-H 34570	M	30.6	14.7	14.6	11.9	11.4	3	3.7	3	4.2	4.1	1.6	17.2	8.6	6	22.8	8.8	6.1
INPA-H 34563	F	41.6	21.3	20.6	15.3	14.7	3.7	3.9	3.9	5.5	4.8	2.1	24.2	10.8	8.2	32.1	12.5	8.4
INPA-H 34566	F	42.2	22.2	21.6	16.1	15.1	4.2	3.8	3.7	6.1	4.9	2.3	24.8	11	8.8	31.5	12	8.7
MPEG 15961	F	38.2	18.4	19.5	14.7	13.6	3.2	3.3	3.4	5.6	4.9	2.1	22.4	10.9	7.5	28.9	11.3	8.3
MPEG 14266	F	39.5	22.1	20.7	15.2	14.7	3.5	4.4	3.4	5.6	5.2	2.2	24.1	11	7.8	31.6	11.9	9.9
MPEG 15929	F	37	20.5	18.6	14.1	13.5	3.2	3.7	3.2	5.2	4.6	1.9	22.4	10.4	7.4	29.3	11.6	9
MPEG 14270	F	38.3	18.7	17.3	15.1	14.6	3.5	3.9	3.3	5.7	4.9	2.4	20.8	9.3	7.6	26.3	10	8.3
MPEG 27433	M	28.9	14.1	15.8	11.3	10.9	2.7	3.3	2.7	3.8	3.5	1.8	17.1	7.9	6	23.8	8.4	7
MPEG 27435	M	30.2	14	14.7	11.7	11.1	2.9	3.1	2.6	3.8	3.8	1.8	16.7	8	6.1	22.2	8.2	6.6
MPEG 27426	M	30	13.4	13.7	11.5	10.7	2.6	2.6	2.6	3.9	3.7	1.8	16.1	7.3	6.2	21.7	7.8	6.5
MPEG 27439	M	30.6	14.2	15.4	11.9	11.2	3.2	3.2	2.4	4.2	3.8	1.6	17.3	8.2	6.1	23.3	8.6	7

MPEG 27432	M	31.7	13.3	14.8	11.7	11.4	2.6	3.5	2.7	3.9	4.1	2	17.2	7.9	6.1	23	9.1	6.7
MPEG 27424	M	29	14.1	14.1	11.4	10.6	2.5	3	2.5	3.9	3.9	1.6	16.9	7.9	6	22	8.6	6.6
MPEG 27430	M	31.4	14.3	15.2	12.1	11.2	2.6	3.5	2.7	4.3	4	1.9	17.2	8	6.3	24.5	8.8	6.9
MPEG 22392	M	30.8	16.1	14.7	11.7	11.3	2.8	3.3	2.7	4.3	4.2	1.9	17.1	8.4	6.2	22.3	8.4	7
MPEG 20537	F	40.7	22.7	21.7	15.8	14.3	4.5	3.1	3.6	6	4.6	2.3	24.2	11.6	7.9	32.4	12.2	9.7
MPEG 20523	F	41.3	19	18.7	16.6	15.4	3.4	3.8	3.3	5.8	4.9	2.5	22.7	10.1	8.1	28.6	11.7	8.2
MPEG 20530	F	42.1	21.3	10	16.4	15.4	3.5	4.3	3.6	6.8	4.7	2.2	23	9.6	8.9	28.8	11.3	8.1
MPEG 20535	F	36.1	19.9	18.2	13.4	12.7	3.8	2.7	3.1	4.7	4.3	1.9	22.1	9.3	7.2	28.1	10.9	8.2
MPEG 20534	F	37.4	19.4	18.9	14	13.6	3.6	3.2	3.2	5	4.2	2.2	22.5	10.2	7.4	29.1	10.9	8.7
MPEG 20538	F	36.1	20.6	18.3	13.7	12.9	3.5	2.8	3.3	5.1	4.6	2	22.3	9.7	7.3	28.3	11.3	8.5
MPEG 20539	F	33.8	18.6	18.2	13.1	12	2.9	3.6	2.9	4.5	4.5	1.9	21.5	10	6.9	27.8	10.5	7.9
MPEG 20529	F	39.5	21.8	20.7	14.6	14.5	3.9	3.8	3.5	5.5	4.7	2.2	23.9	11	7.6	31	11.9	8.8
MPEG 20527	M	38.1	21.4	19.2	14.4	13.1	3.7	3.3	3.3	5.6	4.4	2.2	23.1	10.7	8	29.7	11.5	8.3
MPEG 20525	F	36.4	18.2	18.3	14.2	12.7	3.7	3.4	2.9	4.8	4.4	1.9	22.6	9.9	7.4	29.5	11.9	8.3
MPEG 20540	F	40.8	22.9	21.2	16.2	15.2	4.6	3.9	3.3	6.1	4.9	1.9	24.2	11.3	8.1	31.8	11.8	9
MPEG 20526	F	32.3	16.2	15.7	12.2	11.1	3.1	2.9	2.4	4.4	3.4	1.7	18.2	7.8	6.5	24.1	9	7.3
MPEG 20536	F	37.6	20.8	20.8	14.3	13.6	3.6	3.9	3	5.8	4.7	2	23.3	10.8	7.6	30	11.3	8.9
MPEG 20524	F	37.1	11.1	19.5	14	12.9	3.4	3.4	2.9	5.2	3.9	2	23.1	9.7	7.5	29.5	12.2	8.4
MPEG 20528	M	27.8	15.4	14.3	10.6	9.7	2.9	2.5	2.3	3.5	3.1	1.5	17	7.8	5.8	23.1	9	6.6
MPEG 20533	M	25.8	14.6	13	10.2	9.6	2.8	2.4	2.1	3.4	3.4	1.6	16.1	6.8	5.7	21.2	8.4	6

Referências

- Antonelli, A.; Quijada-Mascarênas, A.; Crawford, A. J.; Bates, J. M.; Velazco, P. M.; Wuster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In Hoorn C & Wesselingh F (Ed.). *Amazonia, Landscape and Species Evolution: a look into the past*. Blackwell Publishing. p. 386-404.
- Arteaga-Navarro, A.F.; Guayasamin, J.M. 2011. A new frog of the genus *Pristimantis* (Amphibia: Strabomantidae) from the high Andes of Southeastern Ecuador, discovered using morphological and molecular data. *Zootaxa* 29, 17–29.
- Avila-Pires, T.C.S.; Hoogmoed, M.S.; Rocha, W.A. da. 2010. Notes on the Vertebrates of northern Pará, Brazil: a forgotten part of the Guianan Region, I. Herpetofauna. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 5, 13–112.
- Avise, J.C.; Walker, D. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian population and the speciation process. *Proceedings Royal Society London Ser. B*, 1998, 547–63
- Barrio-amorós, C.L.; Rojas-Runjaic, F.; Barros, T.R. 2010. Two new *Pristimantis* (Anura : Terrarana : Strabomantidae) from the Sierra de. *Zootaxa* 2329, 1 – 21.
- Barros, F.B. 2011. *Biodiversidade, usos de recursos naturais e etnoconservação na Reserva Extrativista Riozinho do Anfrísio (Amazônia, Brasil)*. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia Animal PhD., 223.
- Bernarde, P.S.; Macedo, L.C. 2008. Impacto do desmatamento e formação de pastagens sobre a anurofauna de serapilheira em Rondônia. *Iheringia. Série Zoologia* 98, 454–459.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148–155.
- Bogart, J. P. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. Pp. 233-58 in "Amphibian Cytogenetics and Evolution", ed by D. M. Green; S. K. Sessions. Academic Press, San Diego.
- Bossuyt, F.; Milinkovitch, F. C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings National Academy of Sciences*, 97(12): 6585–6590.
- Brower, A. V. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6491–6495.
- Bush, M. B. 1994. Amazonian speciation – a necessarily complex model. *Journal of Biogeography*, 21, 5–17.
- Corander, J.; Sirén, J.; Arjas, E. 2008. Bayesian Spatial modeling of genetic Population Structure. *Computational Statistics* 23: 111-129

- Cracraft, J.; Prum, R.O. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution* 42, 603– 20
- Crawford, A.J.; Ryan, M.J.; Jaramillo, C. a. 2010. A New Species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the Pacific Coast of the Darien Province, Panama, with a Molecular Analysis of its Phylogenetic Position. *Herpetologica* 66, 192–206.
- Che, J.; Chen, H.M.; Yang, J.X.; Jin, J.Q.; Jiang, K.; Yuan, Z.Y.; Murphy, R.W.; Zhang, Y.P. 2012. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources* 12, 247–258.
- Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8), 772.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 407–415.
- De la Riva, I.; Köhler, J.; Lötters, S.; Reichle, S. 2000. Ten years of research on Bolivian amphibians: updated checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. *Revista Española de Herpetología* 14, 19–164.
- De Sá, R.O.; Heyer, W.R.; Camargo, A. 2005. Are *Leptodactylus didymus* and *L. mystaceus* Phylogenetically Sibling Species (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)? *Herpetologia Petropolitana*, 90–92.
- Dias-Terceiro, R.G.; Kaefer, I.L.; Fraga, R. De; Lima, A.P.; Alegre, P. 2015. A Matter of Scale : Historical and Environmental Factors Structure Anuran Assemblages from the Upper Madeira River , Amazonia. *Biotropica*, 0, 1–8.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1):13-15
- Dubois A. 2005. Developmental pathway, speciation and supraspecific taxonomy in amphibians 1. Why are there so many frog species in Sri Lanka? *Alytes* 22: 19–37.
- Duellman, W.E.; Hedges, S.B. 2007. Three New Species Of *Pristimantis* (Anura: Leptodactylidae) From The Cordillera De Huancabamba In Northern Peru. *Herpetologica* 6, 119–135.
- Duellman, W. E; Lehr, E. 2009. *Terrestrial breeding frogs (Strabomantidae) in Peru*. NTV Science. Germany, 382 pp.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Drummond, A.J.; Ho, S.Y.W.; Phillips, M.J.; Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4, 88.
- Elmer, K.R.; Cannatella, D.C. 2008. Three new species of leaf litter frogs from the upper Amazon forests: cryptic diversity within *Pristimantis "ockendeni"* (Anura: Strabomantidae) in Ecuador. *Zootaxa* 38, 11–38.
- Elmer, K.R., Dávila, J. A; Loughheed, S.C. 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC evolutionary biology* 7, 247.

- Endler, J. A. 1982. Pleistocene forest refuges: fact or fancy? *In*: Prance, G. T. (Ed). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York. p.641-657.
- Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M.; Meyer, A.; Marty, C.; Blanc, M.; Gilles, A. 2007a. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43, 567-582.
- Fouquet, A.; Gilles, A.; Vences, M.; Marty, C.; Blanc, M.; Gemmell, N.J. 2007b. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2.
- Fouquet, A.; Ledoux, J.B.; Dubut, V.; Noonan, B.P.; Scotti, I. 2012. The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society* 106, 356-373.
- Fouquet, A.; Martinez, Q.; Courtois, E.A.; Dewynter, M.; Pineau, K.; Gaucher, P.; Blanc, M.; Marty, C.; Kok, P.J.R. 2013. A new species of the genus *Pristimantis* (Amphibia, Craugastoridae) associated with the moderately elevated massifs of French Guiana. *Zootaxa* 3750, 569-586.
- França, F.G.R.; Venâncio, N.M. 2010. Reptiles and amphibians of a poorly known region in southwest Amazonia. *Biotemas* 23, 71-84.
- Frost, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (*Date of access*). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Funk, W.C.; Caldwell, J. P.; Peden, C. E.; Padial, J. M.; Riva, I. De La; Cannatella, D. C. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Mol. Phylogen. Evol.* 44: 825-837.
- Funk, W.C.; Caminer, M.; Ron, S.R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 1806-1814.
- Gamble, T.; Berendzen, P.B.; Bradley Shaffer, H.; Starkey, D.E.; Simons, A.M. 2008. Species limits and phylogeography of North American cricket frogs (Acris: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 112-125.
- Gehara, M.; Crawford, A.J.; Orrico, V.G.D.; M.; Rodríguez, A.; Lötters, S.; Fouquet, A.; Barrientos, L.S.; Brusquetti, F.; De la Riva, I.; Ernst, R.; Urrutia, G.G.; Glaw, F.; Guayasamin, J.M.; Hölting, M.; Jansen, M.; Kok, P.J.R.; Kwet, A.; Lingnau, R.; Lyra, M.; Moravec, J.; Pombal, J.P.; Rojas-Runjaic, F.J.M.; Schulze, A.; Señaris, J.C.; Solé, M.; Rodrigues, M.T.; Twomey, E.; Haddad, C.F.B.; Vences, M.; Köhler, J. 2014. High Levels of Diversity Uncovered in a Widespread Nominal Taxon: Continental Phylogeography of the Neotropical Tree Frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE* 9.

- Gentry, A.H. 1992. Tropical Forest Biodiversity: Distributional Patterns and Their Conservational Significance. *Oikos* 63, 19–28.
- Glaw, F; Vences, M. 2002. A new cryptic frog species of the *Mantidactylus boulengeri* group with a divergent vocal sac structure. *Amphibia-Reptilia* 23:293-304
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165, 131–137.
- Gravena, W.; Pires, I. P.; da Silva, M. N. F.; da Silva, V. M. F.; Hrbek, T. 2014. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? *Conservation Genetics*.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hedges, S.B.; Duellman, W.E.; Heinicke, M.P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737, 1–182.
- Heinicke, M.P.; Duellman, W.E.; Hedges, S.B. 2007. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10092–10097.
- Heinicke, M.P.; Duellman, W.E.; Trueb, L.; Means, D.B.; Macculloch, R.D.; Hedges, S.B. 2009. A new frog family (Anura : Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Blood* 35, 1 – 35.
- Hershkovitz, P. 1977. *Living New World Monkeys (Platyrrhini) with an Introduction to Primates*, Vol. 1. Chicago: Chicago University Press.
- Hoorn, C.; Wesselingh, F.P.; Steege, H.; Bermudez, M.A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C.L.; Figueiredo, J.P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F.R., Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T.; Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science (New York, N.Y.)* 330, 927–931.
- Jiménez de la Espada, M. 1870. Fauna e neotropicalis species quaedam nondum cognitae. *Jornal de Ciências, Matemáticas, Physicas e Naturaes*. 65, 57–65.
- Jobbs, G. 2008. TREEFINDER version of March of 2011. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de. (accessed 30 of June 2014)
- Kaefer, I.L.; Tsuji-Nishikido, B.M.; Lima, A.P. 2012. Beyond the river: Underlying determinants of population acoustic signal variability in Amazonian direct-developing *Allobates* (Anura: Dendrobatoidea). *Acta Ethologica* 15, 187–194.
- 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, 228–245.
- Kieswetter, C.M.; Schneider, C.J. 2013. Phylogeography in the northern Andes: Complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, *Pristimantis w-nigrum* (Craugastoridae). *Molecular*

Phylogenetics and Evolution 69, 462–468.

Kok, P.J.R.; Kalamandeen, M. 2008. *Introduction to the taxonomy of the amphibians of Kaieteur National Park, Guyana*. *Abc Taxa* 5, 1–279.

Köhler, J. 2000a. Amphibian diversity in Bolivia: a study with special reference to montane forest regions. - Ph. D. Dissertation, Univ. Bonn. 281pp.

Leite, R. N; Rogers, D. S. 2013. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms, diversity & evolution*. 1-28

Lehr, E.; Catenazzi, A.; Rodríguez, D. 2009. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the Amazonian. *Historia* 40, 30 – 40.

Lehtinen, R. M.; Nussbaum, R. A.; Richards, C. M.; Cannatella, David C.; Vences, M. 2007. Mitochondrial genes reveal cryptic diversity in plant-breeding frogs from Madagascar (Anura, Mantellidae, Guibemantis). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1121–1129

Librado, P.; Rozas, J. 2009. DnaSp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452

Lima, A. P.; Mangnusson, W. E.; Menin, M.; Erdtmann, L. K.; Rodrigues, D. J.; Keller, C.; Hödl, W. 2006. *Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central = Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia* /– Manaus: Áttema Design Editorial, 168pp.

Lynch, J.D.; Duellman, W.E. 1997. *Frogs of the genus Eleutherodactylus (Leptodactylidae) in western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography*. The University of Kansas Natural History Museum, 236pp.

Maciel, N.M.; Vaz-Silva, W.; De Oliveira, R.M.; Padial, J.M. 2012. A new species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae) from the Brazilian Cerrado. *Zootaxa* 56, 43–56.

Meyer, A.; Kocher, T. D.; Basasibwaki, P.; Wilson, A. C. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347, 550–553.

Mora, C.; Tittensor, D. P.; Adl, S.; Simpson, A. G. B.; Worm, B. 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *Plos biology*, 9(8), 1 – 8.

Moore, I.T.; Bonier, F.; Wingfield, J.C. 2005. Reproductive asynchrony and population divergence between two tropical bird populations. *Behavioral Ecology* 16, 755–762.

Moritz, C. 1994b. Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373–375.

Moritz, C.; Patton, J.L.; Schneider, C.J.; Smith, T.B. 2000. Diversification Of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 533–563.

Morroig, G.; Cerqueira, R. 1997. Plio-Pleistocene South American history and The Amazon Lagoon Hypothesis: A piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Comparative Biology*, 2, 103-119.

Mueses-Cisneros, J.J.; Perdomo-Castillo, I.V.; Cepeda-Quilindo, B. 2013. A new species of the

- genus *Pristimantis* (anura : craugastoridae) from southwestern colombia. *Herpetotropicos* 9, 37–45.
- Muniz, F. L. 2012. Filogeografia e genética de populações de jacaré-paguá (*Paleosuchus palpebrosus*) ao longo do Rio Madeira e bacia do Rio Paraguai (Pantanal). Dissertação 95pp
- Padial, J.M.; De La Riva, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155, 97–122.
- Padial, J.M.; Miralles, A.; De la Riva, I.; Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology* 7, 16.
- Padial, J.M.; Grant, T.; Frost, D.R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825, 1–132.
- 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.
- Peloso, P.L.V. 2010. A safe place for amphibians? A cautionary tale on the taxonomy and conservation of frogs , caecilians , and salamanders in the Brazilian Amazonia. 27, 667–673.
- Pfenninger, M.; Schwenk, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology* 7, 121.
- Pyron, R.A.; Wiens, J.J. 2011. Molecular Phylogenetics and Evolution A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61, 543–583.
- Reyes-Puig, J.P.; Yáñez-Munoz, M.H. 2012. Una nueva especie de *Pristimantis* (anura: craugastoridae) del corredor ecológico llangantes-sangay, andes de Ecuador. *Papeis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de Sao Paulo* 52, 81–91.
- Reig, O. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muróideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Revista Brasileira de Genética*, 7, 333-365.
- Ribas, C.C.; Aleixo, A.; Nogueira, A.C.R.; Miyaki, C.Y.; Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 681–689.
- Rodríguez, L.; Martínez, J. L.; Azevedo-Ramos, C.; Reynolds, R.; Reichle, S.; Gascon, C. 2004. *Pristimantis fenestratus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Available from: www.iucnredlist.org (accessed 24 July 2013).
- 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 of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 3, 887-892
- Ron, S. R.; Santos, J. C.; Cannatella, D. C. 2006. Phylogeny of the tu’ngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular*

Phylogenetics Evolution, 39, 392–403.

Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: The Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17, 2722–2729.

Rull, V. 2011. Origins of biodiversity. *Science* 331, 398–399.

Salo, J.; Kalliola, R.; Häkkinen, I.; Mäkinen, Y.; Niemelä, P.; Puhakka, M.; Coley, P.D. 1986. River dynamics and the diversity of Amazon lowland forest. *Nature*, 322, 254-258.

Santos, J.C.; Coloma, L. A.; Summers, K.; Caldwell, J.P.; Ree, R.; Cannatella, D.C. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS Biology* 7, 0448–0461.

Schönrogge, K; Barr, B.; Wardlaw, J. C.; Napper, E.; Gardner, M. G.; Breen, J.; Elmes, G. W.; Thomas, J. A. 2002. When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75,3, 29-300

Silva, J. M. Da, Ryles, A. B. e Fonseca, G. A. B. Da. 2005. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. *Megadiversidade*, 1 (1): 124-131

Simões, P.I.; Stow, A.; Hödl, W.; Amézquita, A.; Farias, I.P.; Lima, A.P. 2014. The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (*Allobates femoralis*). *Research Article*, 7, 811–828.

Siqueira, S.; Aguiar, O.; Souza, M.B.; Lima, A.P.; Recco-Pimentel, S.M. 2009. Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). *Hereditas* 146, 141–151.

Steindachner, F. 1864. *Batrachologische Mittheilungen*. 67 pp.

Stephens, M.; Smith, N.; Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68, 978-989.

Taboada, C.; Grant, T.; Lynch, J.D.; Faivovich, J. 2013. New Morphological Synapomorphies for the New World Direct-Developing Frogs (Amphibia: Anura: Terrarana). *Herpetologica* 69, 342–357.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA 6.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.

Terán-valdez, A.; Guayasamin, J.M. 2010. The smallest terrestrial vertebrate of Ecuador : A new frog of the genus *Pristimantis* (Amphibia : Strabomantidae) from the Cordillera del Cóndor. *Zootaxa* 68, 53 – 68.

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.

Tsuji-nishikido, B.M.; Kaefer, I.L.; Freitas, F.C. De; Menin, M.; Lima, A.P. 2011. Significant but not diagnostic: Differentiation through morphology and calls in the Amazonian frogs *Allobates*

nidicola and *A. masniger*. *Herpetological Journal* 22, 105–114

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.; Wake, D.B. 1999. Speciation, Species Boundaries and Phylogeography of Amphibians. 43pp.

Vences, M.; Kosuch, J.; Lötters, S.; Widmer, A.; Jungfer, K.H.; Köhler, J.; Veith, M. 2000. Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution* 15, 34–40.

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, 1–12.

Vieites, D.R.; Wollenberg, K.C.; Andreone, F.; Köhler, J.; Glaw, F.; Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8267–8272.

Zeisset, I.; Beebee T. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109–119.

Young, B.E.; Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Boucher, T. M. 2004. *Disappearing Jewels: the status of New World Amphibians*. 53 pp.

Wallace, A.R. 1849. On the monkeys of the Amazon. *Zoological Society of London*, 20,107-110.