

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/10/2018.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE ZOOLOGIA)**

**DIVERSIFICAÇÃO E HIBRIDAÇÃO EM UM ANURO ENDÊMICO
DO CERRADO: GENÉTICA, MORFOLOGIA E COMPORTAMENTO**

RENATO CHRISTENSEN NALI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia) .

Outubro - 2016

RENATO CHRISTENSEN NALI

**DIVERSIFICAÇÃO E HIBRIDAÇÃO EM UM ANURO ENDÊMICO DO
CERRADO: GENÉTICA, MORFOLOGIA E COMPORTAMENTO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Câmpus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Zoologia)

Orientadora: Cynthia Peralta de Almeida Prado

Rio Claro

2016

575 Nali, Renato Christensen
N171d Diversificação e hibridação em um anuro endêmico do
Cerrado : genética, morfologia e comportamento / Renato
Christensen Nali. - Rio Claro, 2016
151 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Cynthia Peralta de Almeida Prado

1. Evolução (Biologia). 2. Amphibia. 3. Bioacústica. 4.
Genética da paisagem. 5. Conservação. 6. Seleção sexual. I.
Título.

RENATO CHRISTENSEN NALI

**DIVERSIFICAÇÃO E HIBRIDAÇÃO EM UM ANURO ENDÊMICO DO
CERRADO: GENÉTICA, MORFOLOGIA E COMPORTAMENTO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Câmpus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Zoologia)

Comissão examinadora:

Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado (orientadora)

Dra. Paula Cabral Eterovick

Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro

Dr. Milton Cezar Ribeiro

Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Rio Claro, 04 de outubro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os colegas que me auxiliaram nas coletas de campo, imprescindíveis para o trabalho como um todo: Gabriela Pina, Marília Borges, Luiza Cholak, Cilene Mazzarelli, Isabela Oliveira, Isabela Corrêa e Vinícius Anelli. Agradeço especialmente ao Rubens Turin, que me ajudou na maioria das viagens, e à Natalia Salles, com quem tive a sorte de conviver e compartilhar experiências no Laboratório de Ecologia e Comportamento de Anuros da Unesp/Jaboticabal.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Herpetologia de Rio Claro, onde sempre me senti em casa, apesar das poucas vezes em que estive por perto. Agradecimento especial à Nadya e ao Danilo (Jesus), por auxiliarem no tombamento de espécimes e tecidos, e envio de centenas de amostras para os EUA. Agradeço à Fernanda Centeno, por disponibilizar tecidos de sua espécie de estudo, e ao Prof. Dr. Célio Haddad, que sempre manteve as portas abertas do laboratório e da coleção herpetológica, fornecendo amostras adicionais para este trabalho.

Agradeço aos colegas do Zamudio Lab, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Cornell University (Ithaca, NY, EUA), por me ajudarem nesse desafio que foi "fazer molecular": Pavitra, Mike, Amy, Rayna, Ana, Nick, e muitos outros que conheci durante os dois períodos de estágio. Agradecimento especial à técnica do laboratório e minha amiga Miranda Gray, sempre disponível a ajudar mesmo após meu retorno ao Brasil, e ao meu "irmão por parte de orientadora" Gabriel Faggioni, com quem compartilhei todo o processo de aprendizagem das análises moleculares.

Agradeço ao colega e colaborador Guilherme Becker, que conheci durante meu primeiro estágio na Cornell University. Sua ampla experiência com ecologia da paisagem e conservação de anuros contribuiu muito no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à FAPESP, pela bolsa de Doutorado no país (processo #2012/06228-0) e duas Bolsas de Estágio Pesquisa no Exterior (processos #2013/04023-5 e #2014/04394-6). Agradeço à Neotropical Grassland Conservancy, pelos Douglas Smith and Sheila M. Deaner Memorial Grants, e à CAPES, pelos dois auxílios concedidos para participação em congressos.

Agradeço à minha orientadora no exterior, Dra. Kelly Zamudio, por abrir as portas do seu laboratório em Cornell e acompanhar todos os passos do meu trabalho, me apoiando científica e logisticamente. Acima de tudo, agradeço pelas vezes em que ela

"gave me a hard time", pois no esforço de corresponder às suas altas expectativas, obtive nada menos do que um grande crescimento profissional.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Cynthia Prado, não apenas pelos quatro anos de doutorado, mas também por ser responsável por toda a minha formação acadêmica desde a iniciação científica em 2009. Muito obrigado por todo o apoio pessoal, profissional, financeiro, logístico e, principalmente, pela confiança depositada em mim ao longo dos anos. Agradeço pela oportunidade de poder combinar duas personalidades tão diferentes em uma bela parceria que, apesar de se encerrar burocraticamente com este doutorado, tenho esperança de manter pelo resto de nossas carreiras.

Agradeço a todos os meus amigos, tanto os conquistados durante essa etapa da minha vida, quanto os que me acompanham de longa data. Muito obrigado pela compreensão e paciência, e por tornar mais leve e divertida uma caminhada cheia de obstáculos. Gostaria de agradecer especialmente à Mariana Maluli, minha amiga desde a graduação, que ingressou na área acadêmica, o que me permitiu compartilhar sucessos, frustrações e também (muitas) risadas.

Agradeço ao meu irmão Ivan e à minha cunhada Taisy, que neste período trouxeram um grande presente, meu sobrinho Rafael. Agradeço à minha irmã Lívia, que compartilha comigo a luta de trabalhar na área de biológicas, e ao meu irmão Eduardo, que torce pelo meu sucesso, mesmo à distância.

Agradeço a meu pai Odair, meu modelo de caráter e honestidade, responsável pelo desenvolvimento do meu lado racional e prático, sempre me apoiando em todas as decisões. Agradeço à minha mãe Anna, que nos deixou logo no meu primeiro ano de doutorado. Onde quer que esteja, sei que sua presença espiritual me ajudou a finalizar essa importante etapa da minha vida.

Finalmente, agradeço a Deus, pela possibilidade de compreender melhor o mundo nos momentos em que a ciência e a razão se mostram impotentes.

A todos, meu profundo e sincero obrigado!

“It's your road, and yours alone.
Others may walk it with you,
but no one can walk it for you.”

Rumi

RESUMO

A configuração da paisagem e as características fenotípicas associadas ao reconhecimento de parceiros podem influenciar na estrutura genética das populações e nos processos de diversificação de uma espécie. Além disso, interações reprodutivas entre espécies distintas podem alterar a história evolutiva de linhagens com a formação de híbridos viáveis. Para investigar essas interações complexas, estudamos o anuro *Bokermannohyla ibitiguara*, uma espécie com reprodução prolongada, cantos elaborados, corte complexa, fêmeas seletivas e machos agressivos/territoriais. A espécie é endêmica do Cerrado e tem reprodução associada à vegetação ripária dentro e fora do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC), uma zona de contato com o congênero *B. sazimai*. Amostramos vários riachos e desenvolvemos microssatélites para analisar a influência da topografia e cobertura vegetal na diferenciação genética. Comparamos, em seguida, morfologia e cantos através da área de distribuição e examinamos os papéis da seleção sexual, deriva genética e adaptação acústica a ambientes florestados (Hipótese da Adaptação Acústica; HAA) na diferenciação acústica. Testamos também a hipótese de que *B. ibitiguara* e *B. sazimai* podem hibridizar devido a semelhanças fenotípicas. Indivíduos de *B. ibitiguara* mostraram diferença genética significativa entre riachos, exceto naqueles dentro do Parque, os quais apresentaram maiores níveis de riqueza alélica e heterosigozidade. A diferenciação genética foi melhor explicada pela complexidade topográfica, bem como algumas medidas genéticas intra-populacionais. Os cantos variaram mais do que caracteres morfológicos, sugerindo uma maior pressão seletiva nesse fenótipo comportamental. Parâmetros acústicos associados com discriminação individual e/ou atração de fêmeas foram significativamente diferentes entre populações. Nem diferenciação genética nem cobertura de vegetação ripária (HAA) explicaram as diferenças acústicas entre populações, mas cantos que variaram em contraste à HAA indicaram um papel da competitividade de machos associada com aumento da densidade. Dez por cento dos indivíduos dentro do PNSC eram híbridos, apresentando valores de dissimilaridade genética sobrepostos, mas intermediários comparados às espécies parentais *B. ibitiguara* e *B. sazimai*. Características morfológicas e acústicas não foram intermediárias, mas um mosaico de fenótipos, incluindo um canto distinto em dois híbridos. Enfatizamos que a topografia pode ser um forte promotor de estruturação genética em anfíbios, e que diferenças observadas dentro e fora do Parque

podem estar relacionadas à complexidade do relevo. Estratégias de conservação devem incorporar não apenas distúrbio de hábitat, como também a complexidade topográfica, principalmente em regiões ameaçadas como o Cerrado. Nossa análise fenotípica sugere que a seleção sexual promove diferenciação acústica nessa espécie por meio de reconhecimento individual, preferência de fêmeas e competitividade entre machos. Um enfoque com vários caracteres e mecanismos foi importante para explicar esses intrincados processos. Além disso, são poucos os registros de híbridos em anuros com comportamento elaborado e/ou período reprodutivo prolongado, mas esse fenômeno deve ocorrer, provavelmente, devido a similaridades nos sistemas de reconhecimento e estratégias alternativas de acasalamento, como machos satélites. A diversificação multifacetada de *B. ibitiguara* contribui para o conhecimento nas áreas de conservação, evolução e ecologia comportamental. Acreditamos que nossos resultados podem ser aplicados a diferentes animais e biomas, devido às associações generalizadas entre indivíduos com a paisagem, com coespecíficos (do mesmo sexo ou do sexo oposto), e com outras espécies simpátricas.

Palavras-chave: Amphibia. Bioacústica. Conservação. Genética da paisagem. Seleção sexual.

ABSTRACT

Landscape configuration and phenotypic characteristics linked with mating recognition may influence population genetic structure and diversification processes. Moreover, reproductive interactions among different species may alter the evolutionary history of lineages with the formation of viable hybrids. To investigate these complex interactions we studied the treefrog *Bokermannohyla ibitiguara*, a species with prolonged reproduction, complex calls, elaborate courtship, choosy females and territorial/aggressive males. It is endemic to the threatened Brazilian Cerrado and breeds in streams associated with riparian forests within and outside the Serra da Canastra National Park (SCNP), a contact zone with the congener *B. sazimai*. We sampled many streams and developed microsatellite markers to analyze the roles of topography and land cover on genetic differentiation. We then compared morphology and calls throughout the range and examined the roles of sexual selection, genetic drift, and acoustic adaptation to forested habitats (Acoustic Adaptation Hypothesis; AAH) on call differentiation. We also tested the hypothesis that *B. ibitiguara* and *B. sazimai* may hybridize due to phenotypic similarities. Individuals of *B. ibitiguara* showed significant genetic differentiation among streams, except those within the Park, which had higher levels of allelic richness and heterozygosity. Genetic differentiation was best explained by topographic complexity, as were some within-population genetic measures. Calls varied more than morphology, suggesting stronger selective pressures on this behavioral phenotype. Acoustic traits associated with individual discrimination and/or female attraction showed significant population differences. Neither genetic differentiation nor riparian forest cover (the AAH) explained population acoustic differences, but call traits that varied in contrast with AAH indicated a role of male competition associated with increased density. Ten percent of individuals within the SCNP were hybrids, showing overlapping but intermediate values of genetic dissimilarities compared to parental *B. ibitiguara* and *B. sazimai*. Morphology and calls were not intermediate, but a mosaic of phenotypes, including a distinct call type in two hybrids. We underscore that topography is a strong driver of genetic structure in amphibians, and differences observed within and outside the Park may rely on the degree of topographic relief. Conservation strategies should incorporate not only habitat

disturbance, but also topographic complexity, especially in threatened regions such as the Cerrado. Our phenotypic analyses suggest that sexual selection shapes call differentiation in this species in the forms of individual recognition, female preferences and intermale competition. A multi-trait and multi-mechanism approach was nevertheless crucial to explain these intricate processes. Also, records of hybridization in frogs with elaborate behavior and/or long reproductive period are underrepresented, but may also occur likely due to similarities in mating recognition systems and alternative mating tactics, such as satellite males. The multi-faceted diversification of *B. ibitiguara* enhances our knowledge on conservation, evolution and behavioral ecology. We believe that our results can be applied to different animals and biomes, given the widespread associations observed among individuals with the landscape, with conspecifics (within and between the sexes) and with other sympatric species.

Keywords: Amphibia. Bioacoustics. Conservation. Landscape genetics. Sexual selection.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CHAPTER I: TOPOGRAPHY, MORE THAN LAND COVER, EXPLAINS GENETIC DIVERSIFICATION OF A NEOTROPICAL SAVANNA TREEFROG.....	27
ABSTRACT	28
INTRODUCTION	29
MATERIALS AND METHODS	32
RESULTS	36
DISCUSSION	38
ACKNOWLEDGEMENTS	45
REFERENCES.....	46
TABLES AND FIGURES.....	55
SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	60
CHAPTER II: ENVIRONMENT, GENETICS OR SEXUAL SELECTION? PHENOTYPIC DIFFERENTIATION IN A NEOTROPICAL TREEFROG.....	63
ABSTRACT	64
INTRODUCTION	65
MATERIALS AND METHODS	68
RESULTS	73
DISCUSSION	75
ACKNOWLEDGEMENTS	81
REFERENCES.....	81
TABLES AND FIGURES.....	89
SUPPLEMENTAL MATERIAL.....	93
CHAPTER III: HYBRIDIZATION DESPITE ELABORATE REPRODUCTIVE BEHAVIORS AND FEMALE CHOICE IN NEOTROPICAL TREEFROGS	103
ABSTRACT	104
INTRODUCTION	105

MATERIALS AND METHODS	107
RESULTS	112
DISCUSSION	114
ACKNOWLEDGEMENTS	120
REFERENCES	120
TABLES AND FIGURES	128
SUPPLEMENTAL MATERIAL	132
CONCLUSÃO	141
APÊNDICE A	144

INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado brasileiro é o segundo maior domínio morfoclimático da América do Sul, com uma área original de aproximadamente 2,5 milhões de quilômetros quadrados (Silva *et al.*, 2006), em sua maioria composto de savanas sazonais, campos e corredores de mata de galeria. Esse domínio é a maior savana do mundo em área geográfica e em riqueza de espécies, estando entre os 35 hotspots mundiais de biodiversidade (Mittermeier *et al.* 2004; Klink & Machado, 2005). Apesar disso, a modificação intensa nos últimos 40 anos devido ao desenvolvimento urbano e agrícola resultou em perda ou modificação de metade de sua área (Machado *et al.*, 2004). Apenas 2,2% do Cerrado é legalmente protegido (Klink & Machado, 2005), sendo considerada a savana mais ameaçada do mundo (Silva & Bates, 2002). Esta formação neotropical abriga cerca de 2600 espécies de vertebrados, incluindo mais de 200 espécies de anfíbios anuros, com altas taxas de endemismo (Klink & Machado, 2005; Vasconcelos & Rossa-Feres, 2005; Nogueira, 2006; Valdujo, 2011). Estima-se que 35% das espécies de anfíbios neotropicais encontram-se ameaçadas principalmente pela perda e fragmentação de habitats (e.g. Silvano & Segalla, 2005; Becker *et al.*, 2007; Loyola *et al.*, 2008). Somado a outros fatores como doenças infecciosas emergentes, poluição e aquecimento global, este grupo está entre os mais ameaçados atualmente, levando ao chamado Declínio Global de Anfíbios (Beebee & Griffiths, 2005; Vredenburg & Wake, 2007). Assim, estudos de diversificação populacional em anuros que objetivem integrar evolução e conservação são imprescindíveis, já que medidas de conservação para este grupo devem ser constantes (Beebee & Griffiths, 2005; Lips *et al.* 2005), principalmente em um domínio tão ameaçado quanto o Cerrado.

As matas de galeria constituem o componente florestal mais representativo e diverso no Cerrado, constituídas por matas estreitas permanentes ou semidecíduas (Redford & Fonseca, 1986; Felfili, 1997; Johnson *et al.*, 1999). Estas podem funcionar como corredores ecológicos, ligando diferentes manchas de habitats favoráveis, além de servirem como área de vida para espécies endêmicas dependentes de ambientes florestais (Redford & Fonseca, 1986; Meave *et al.*, 1991; Felfili, 1995; Johnson *et al.*, 1999). Em anfíbios anuros, a utilização da vegetação ripária como área de vida e reprodução é bem documentada (e.g. Lugli & Haddad, 2006a, b; Brasileiro *et al.*, 2005; Barros, 2011; Nali & Prado, 2012; Nali *et al.*, 2015). Esses organismos apresentam alto

risco de dessecação, e como consequência uma baixa capacidade de dispersão, impedindo seu movimento migratório por grandes distâncias (Rothermel & Semlitsch, 2002; Smith & Green, 2005; Wells, 2007; Titon Junior & Gomes, 2015). Assim, muitas espécies de anfíbios apresentam alta fidelidade ao sítio reprodutivo, principalmente em espécies que se reproduzem em corpos de água permanentes (Blaustein *et al.*, 1994; Cushman, 2006; Peterman *et al.*, 2014). Portanto, a configuração da paisagem que conecta as populações deve facilitar essa movimentação limitada (Holderegger & Wagner, 2008; Spear & Storfer, 2008), mantendo uma viabilidade ecológica e evolutiva das populações, já que o isolamento entre elas pode limitar o fluxo gênico (e.g. Spear & Storfer, 2008; Dixo *et al.*, 2009; Richmond *et al.*, 2009), maximizando os efeitos negativos da endogamia (Freeland, 2005; Allendorf & Luikart, 2007).

Nesta abordagem, a genética da paisagem tem contribuído bastante para compreender os processos de migração e fluxo gênico de diferentes animais (e.g. Arnaud, 2003; Holzhauer *et al.*, 2006; Sork & Smouse, 2006), incluindo os anfíbios (Austin *et al.*, 2004; Zamudio & Wieczorek, 2007; Angelone & Holderegger, 2009; Chan & Zamudio, 2009). A genética de paisagem é uma área de pesquisa atual e crescente, definida como a combinação da genética de populações com a ecologia de paisagens (Manel *et al.*, 2003). Seu objetivo é compreender a interação entre as variáveis da paisagem (com sua composição, configuração espacial e dinâmica) e os processos evolutivos populacionais, como fluxo gênico entre subpopulações (i.e. dispersão), deriva genética e seleção (Manel *et al.*, 2003; Holderegger & Wagner, 2006). A genética de paisagem permite estudar a estruturação genética entre populações ao longo de sua distribuição geográfica, estabelecendo barreiras ao fluxo gênico como estradas (Marsh *et al.*, 2005), rios (Angelone *et al.*, 2011), topografia (Funk *et al.*, 2005), gradientes de umidade (Manel *et al.*, 2003), cobertura vegetal (Dixo *et al.*, 2009), entre outros. Dentre os marcadores moleculares mais utilizados como ferramenta, destacam-se os microssatélites, inclusive em estudos com populações de anuros (e.g. Angelone & Holderegger, 2009; Blouin *et al.*, 2010; Schoville *et al.*, 2011). A alta variabilidade destes marcadores é útil para inferir diferentes processos demográficos e evolutivos, como (1) a detecção de impactos sobre as populações decorrentes de ação antrópica (Pearse & Crandall, 2004), (2) a evolução neutra de aspectos fenotípicos (Boul *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009) e (3) eventos de hibridação interespecífica (Johnson *et al.* 2015; Malukiewicz *et al.*, 2015).

Uma aplicação prática da análise de variação populacional é a detecção de áreas prioritárias para conservação, levando em conta não apenas a riqueza ou abundância das espécies, mas também a integridade genética das populações (Angermeier & Karr, 1996). Esta informação não é útil apenas às espécies atualmente ameaçadas de extinção, mas também para espécies endêmicas com distribuição restrita, cujas subpopulações podem estar isoladas em fragmentos, comprometendo a qualidade genética e o tamanho efetivo da população (e.g. Funk *et al.*, 2009). Ao amostrar tanto áreas antropizadas (e.g. fragmentos de matas em fazendas, com estradas próximas, culturas e pastagens), quanto áreas preservadas (e.g. unidades de conservação), pode-se comparar a integridade genética de populações com diferentes níveis de perturbação, verificando assim se (1) as áreas de proteção existentes são adequadas para a manutenção genética da espécie, e/ou (2) as áreas desprotegidas precisam ser incorporadas como unidade de conservação (e.g. Dixo *et al.*, 2009). Ações conservacionistas serão geralmente necessárias em populações isoladas e desprotegidas, pois são nessas áreas que se espera uma maior perda da diversidade genética devido aos efeitos negativos da endogamia, levando a uma maior probabilidade de extinção (Brown, 1995; Lande, 1999; mas veja Zamudio *et al.*, 2009). No entanto, interações com outras variáveis espaciais, como topografia, são importantes para gerar conclusões mais precisas no contexto da genética da paisagem (Manel *et al.*, 2003).

Além da estrutura genética, variações morfológicas e comportamentais tem sido utilizadas no contexto de diversificação populacional de anuros. Dentre as características morfológicas, alguns exemplos são o tamanho e forma do corpo, evidenciado por caracteres morfométricos (Lougheed *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008; Amézquita *et al.*, 2009; Warwick *et al.*, 2015). Aspectos da variação morfológica sempre foram incorporados no campo da taxonomia, e mais recentemente combinados com diversificação genética em estudos de evolução para elucidar, por exemplo, a presença de espécies crípticas e diversificação de linhagens (Brusa *et al.*, 2013; Warwick *et al.*, 2015; Ortega-Andrade *et al.*, 2015; Clemente-Carvalho *et al.*, 2016). Na área comportamental, a análise de parâmetros acústicos das vocalizações dos machos de anuros tem revelado que sinais acústicos variam entre as populações distribuídas na paisagem (Ryan & Wilczynski, 1988; Castellano *et al.*, 2002; Pröhl *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009). Os motivos da variabilidade acústica interpopulacional pode estar associada com (1) a diferenciação genética, inferindo uma evolução neutra (Velázquez *et al.*, 2013), (2)

características da paisagem, como adaptação acústica de parâmetros do canto a ambientes com diferentes coberturas vegetais (hipótese da adaptação acústica; Morton, 1975; Ey & Fischer, 2009; Erdtmann & Lima, 2013), ou (3) a seleção sexual, como decorrência da escolha de fêmeas (seleção intersexual) e competição entre machos (seleção intrasexual; Boul *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009). Além disso, existe normalmente uma associação entre morfologia e cantos em anuros, decorrente de modificações físicas do aparato vocal (McClelland *et al.*, 1996; Nali & Prado, 2014a). Portanto, estudos combinando a morfologia, bioacústica e genótipos de indivíduos ao longo de sua distribuição geográfica permitem um entendimento amplo sobre os padrões e processos evolutivos que levam à diversificação observada (Lougheed *et al.*, 2006; Brusa *et al.*, 2013).

Embora a diversificação populacional remeta a estudos intraespecíficos, a análise de variação genética, morfológica e comportamental pode ser empregada em espécies filogeneticamente próximas ao longo de áreas geográficas onde há simpatria. Interferências reprodutivas interespecíficas podem resultar em hibridação, definida como a reprodução entre membros de populações geneticamente distintas (Barton & Hewitt, 1985). Antigamente, a hibridação era considerada um fenômeno raro e desimportante na evolução biológica, devido a efeitos geralmente deletérios presentes nos híbridos, reduzindo seu *fitness* (Dobzhansky, 1940; Mayr, 1963; Wagner-Jr, 1969; Haddad *et al.*, 1990). Porém, a visão contemporânea é a de que a hibridação é um processo mais comum do que se imaginava (Abbott *et al.*, 2013), podendo ocorrer de diferentes formas (Allendorf *et al.*, 2001), e sendo responsável pela evolução e especiação em diferentes grupos animais e vegetais (Bogart, 1980; Bullini & Nascetti, 1990; Rieseberg & Wendel, 1993; Vanhaecke *et al.*, 2012; Abbott *et al.*, 2013). Além disso, a dinâmica entre características positivas e negativas da presença de híbridos em diferentes sistemas é complexa, já que ela pode resultar de interações naturais ou decorrentes de mudanças ambientais (Allendorf *et al.*, 2001; Detwiler *et al.*, 2005; Seehausen *et al.*, 2008). Em anuros, estudos de hibridação são aparentemente enviesados para espécies de reprodução explosiva, onde há geralmente pouca oportunidade de escolha das fêmeas e não há defesa de territórios pelos machos, facilitando a formação de acasalamentos heteroespecíficos (Brown, 1977; Sullivan, 1986; Haddad *et al.*, 1990; Ficetola & De Bernardi, 2005; Pearl *et al.*, 2005; Wells, 2007). No entanto, utilizando um conjunto apropriado de marcadores moleculares em espécies

simpátricas, e incorporando na análise caracteres morfológicos e acústicos, pode-se verificar a presença, a frequência, e também os possíveis mecanismos de hibridação até mesmo em anuros com complexos sistemas de reprodução, o que é atualmente pouco conhecido (Haddad *et al.*, 1994).

A espécie *Bokermannohyla ibitiguara* (Cardoso, 1983) é um hilídeo endêmico do Cerrado brasileiro, restrito à Serra da Canastra e áreas montanhosas adjacentes, no estado de Minas Gerais (Cardoso, 1983; Haddad *et al.*, 1988; Nali & Prado, 2012). É uma espécie abundante, que se reproduz ao longo de riachos com mata ciliar, e variação de caracteres morfológicos e acústicos dentro de uma mesma área já foi observada (Nali & Prado, 2014a; R. C. Nali, obs. pess.; Turin *et al.*, submetido). Sua reprodução é prolongada (outubro a maio) e mediada por seleção intra e intersexual; a corte é complexa e consiste de estímulos acústicos e táteis, e há emissão diferentes tipos de canto usados para atração das fêmeas e defesa de território contra machos intrusos, que podem resultar em combates físicos (Nali & Prado, 2012; 2014a; 2014b). A presença de machos satélites também foi observada, uma tática em que machos oportunistas não vocalizam e tentam interceptar a fêmea que foi atraída por machos vocalizadores residentes (Nali & Prado, 2012). A espécie ocorre tanto em áreas antropizadas dentro de propriedades rurais (Cardoso, 1983; Nali & Prado, 2012) quanto no Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC; Haddad *et al.*, 1988; Barros, 2011). O PNSC é constituído em sua maioria por um platô com baixa complexidade topográfica, com área de 700km², o "Chapadão da Canastra", e foi estabelecido em 1972 (Medeiros & Fiedler, 2004; MMA/IBAMA, 2005). Uma área maior foi recentemente legalizada, mas é composta ainda, em sua maioria, por áreas rurais não desapropriadas (MMA/IBAMA, 2005; May *et al.*, 2009). No Chapadão da Canastra, é conhecida a simpatria de *B. ibitiguara* com uma espécie que possui canto, morfologia, habitat e padrão reprodutivo semelhante, apesar de estar atualmente incluída em um grupo taxonômico distinto (*Bokermannohyla sazimai*; C. F. B. Haddad, com. pess.; Cardoso & Andrade, 1982; Faivovich *et al.*, 2005; Carvalho & Giaretta, 2013).

Desta forma, utilizamos a espécie *Bokermannohyla ibitiguara* como modelo para estudo de diversificação populacional nos contextos de conservação, evolução de caracteres fenotípicos e hibridação. A presente tese foi dividida em três capítulos e um apêndice. Neste último, já publicado (Nali *et al.*, 2014; apêndice A), caracterizamos e otimizamos 22 microssatélites para a espécie focal, e testamos a amplificação cruzada

em três outras espécies do mesmo gênero que ocorrem no Cerrado e/ou na Mata Atlântica brasileira (*Bokermannohyla hylax*, *B. circumdata* e *B. alvarengai*). No primeiro capítulo, em um contexto de conservação, comparamos a estrutura genética de populações de localidades dentro e fora do Parque Nacional da Serra da Canastra, e analisamos os papéis da topografia, modificação de habitat, cobertura de mata ciliar e distância geográfica na diversificação e integridade genética da espécie focal. No segundo capítulo, comparamos a variação morfológica e acústica entre as populações, e os mecanismos responsáveis pela diversificação acústica observada. Especificamente, avaliamos a influência da seleção sexual, da adaptação dos cantos ao ambiente (hipótese da adaptação acústica) e da diferenciação genética na diversificação acústica. No terceiro capítulo, estudamos o contexto de hibridação entre a espécie focal e a espécie *B. sazimai*, as quais ocorrem em simpatria na região do PNSC. Para tanto, além dos dados genéticos, incorporamos também dados de morfologia e vocalizações de ambas as espécies e dos híbridos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; *et al.* (39 co-autores). Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 229-246, 2013.
- ALLENDORF, F.; LEARY, R.; SPRUELL, P.; WENBURG, J. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, p. 613-622, 2001.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H. **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell, Oxford, 2007.
- AMÉZQUITA, A.; LIMA, A.; JEHLE, R.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, O.; CRAWFORD, A. J.; GASSER, H.; HÖDL, W. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, p. 826-838, 2009.
- ANGELONE, S.; KIENAST, F.; HOLDEREGGER, R. Where movement happens: scale-dependent landscape effects on genetic differentiation in the European tree frog. **Ecography**, v. 34, p. 714-722, 2011.

- ANGELONE, S.; HOLDEREGGER, R. Population genetics suggests effectiveness of habitat connectivity measures for the European tree frog in Switzerland. **Journal of Applied Ecology**, v. 46, p. 879-887, 2009.
- ANGERMEIER, P. L.; KARR, J. R. Biological integrity versus biological diversity as policy directives: Protecting biotic resources. In: SAMSON, F. B.; KNOPF, F. L. (Eds.). **Ecosystem Management: Selected Readings**. New York, Springer-Verlag, 1996. p. 264-275.
- ARNAUD, J-F. 2003. Metapopulation genetic structure and migration pathways in the land snail *Helix aspersa*: influence of landscape heterogeneity. **Landscape Ecology**, v. 18, p. 333-346, 2003.
- AUSTIN, J. D.; LOUGHEED, S. C; BOAG, P. T. Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) populations. **Genetics**, v. 168, p. 1491-1506, 2004.
- BARROS, A. B. **Herpetofauna do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- BARTON, N. H.; HEWITT, G. M. Analysis of hybrid zones. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 113-148, 1985.
- BECKER, C. G.; FONSECA, C. R.; HADDAD, C. F. B.; BATISTA, R. F.; PRADO, P. I. Habitat split and the global declines of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775-1777, 2007.
- BEEBEE, T. J. C; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, p. 271-285, 2005.
- BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, p. 60-71, 1994.
- BLOUIN, M.; PHILLIPSEN, I.; MONSEN, K. Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 2179-2194, 2010.
- BOGART, J. P. Evolutionary implications of polyploidy in amphibians and reptiles. In: LEWIS, W. H. (Ed.). **Polyploidy: Biological Relevance**. New York, Plenum Press, 1980. p. 341-378.

- BOUL, K. E.; FUNK, W. C.; DARST, C. R.; CANNATELLA, D. C.; RYAN, M. J. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 274, p. 399-406, 2007.
- BRASILEIRO, C. A.; SAWAYA, R. J.; KIEFER, M. C.; MARTINS, M. Amphibians of an open Cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, 5, 2005. Acessível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN00405022005>.
- BROWN, H. A. A case of interbreeding between *Rana aurora* and *Bufo boreas* (Amphibia, Anura). **Journal of Herpetology**, v. 11, p. 92-94, 1977.
- BROWN, J. H. **Macroecology**. Chicago, Chicago University Press, 1995.
- BRUSA, O.; BELLATI, A.; MEUCHE, I.; MUNDY, N. I.; PRÖHL, H. Divergent evolution in the polymorphic granular poison-dart frog, *Oophaga granulifera*: genetics, coloration, advertisement calls and morphology. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 394-408, 2013.
- BULLINI, L.; NASCETTI, G. Speciation by hybridization in phasmids and other insects. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, p. 1747-1760, 1990.
- CARDOSO, A. J. Descrição e biologia de uma nova espécie de *Hyla* Laurenti, 1768 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 62, p. 37-45, 1983.
- CARDOSO, A. J.; ANDRADE, G. V. Nova espécie de *Hyla* do Parque Nacional Serra da Canastra (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, p. 589-593, 1982.
- CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A. A reappraisal of the geographic distribution of *Bokermannohyla sazimai* (Cardoso and Andrade, 1982) (Anura: Hylidae) through morphological and bioacoustics approaches. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 12, p. 33-45, 2013.
- CASTELLANO, S.; CUATTO, B.; RINELLA, R.; ROSSO, A.; GIACOMA, C. The advertisement call of the European treefrog: a multilevel study of variation. **Ethology**, v. 108, p. 75-89, 2002.
- CHAN, L. M.; FITZGERALD, L. A.; ZAMUDIO, K. R. The scale of genetic differentiation in the Dunes Sagebrush-Lizard (*Sceloporus arenicolus*), an endemic habitat specialist. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 131-142, 2009.
- CHAN, L. M.; ZAMUDIO, K. R. Population differentiation of temperate amphibians in unpredictable environment. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3185-3200, 2009.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; PEREZ, S. I.; TONHATTI, C. H.; CONDEZ, T. H.; SAWAYA, R. J.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. Boundaries of morphological and molecular

- variation and the distribution of a miniaturized froglet, *Brachycephalus nodoterga* (Anura: Brachycephalidae). **Journal of Herpetology**, v. 50, p. 169-178, 2016.
- CUSHMAN, S. A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. **Biological Conservation**, v. 128, p. 231-240, 2006.
- DETWILER, K. M.; BURRELL, A. S.; JOLLY, C. J. Conservation implications in hybridization in African cercopithecine monkeys. **International Journal of Primatology**, v. 26, p. 661-684, 2005.
- DIXO, M.; METZGER, J. P.; MORGANTE, J. S.; ZAMUDIO, K. R. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1560-1569, 2009.
- DOBZHANSKY, T. Speciation as a stage in evolutionary divergence. **American Naturalist**, v. 74, p. 312-21, 1940.
- ERDTMANN, L. K.; LIMA, A. P. Environmental effects on anuran call design: what we know and what we need to know. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 25, p. 1-11, 2013.
- EY, E.; FISCHER, J. The “acoustic adaptation hypothesis” - a review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics*, v. 19, p. 21-48, 2009.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 1-240, 2005.
- FELFILI, J. M. Diversity, structure and dynamics of a gallery forest in central Brazil. **Vegetatio**, v. 117, p. 1-15, 1995.
- FELFILI, J. M. Dynamics of the natural regeneration in the Gama gallery forest in central Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 91, p. 235-245, 1997.
- FICETOLA, G. F.; DE BERNARDI, F. Interspecific social interactions and breeding success of the frog *Rana latastei*: a field study. **Ethology**, v. 111, p. 764-774, 2005.
- FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. West Sussex, John Wiley & Sons, 2005.
- FUNK, W. C.; BLOUIN, M. S.; CORN, P. S.; MAXELL, B. A.; PILLIOD, D. S.; AMISH, S.; ALLENDORF, F. W. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 483-496, 2005.

- FUNK, W. C.; CANNATELLA, D. C.; RYAN, M. J. Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergi*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, p. 1839-1853, 2009.
- HADDAD, C. F. B.; ANDRADE, G. V.; CARDOSO, A. J. Anfíbios anuros do Parque Nacional da Serra da Canastra, estado de Minas Gerais. **Brasil Florestal**, v. 64, p. 9-20, 1988.
- HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J.; CASTANHO, L. M. Hibridação natural entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 739-744, 1990.
- HADDAD, C. F. B.; POMBAL-Jr, J. P.; BATISTIC, R. F. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). **Journal of Herpetology**, v. 28, p. 425-430, 1994.
- HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. A brief guide to landscape genetics. **Landscape Ecology**, v. 21, p. 793-796, 2006.
- HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. Landscape genetics. **BioScience**, v. 58, p. 199-207, 2008.
- HOLZHAUER, S. I. J.; EKSCHMITT, K.; SANDER, A. C.; DAUBER, J.; WOLTERS, V. Effect of historic landscape change on the genetic structure of the bush-cricket *Metrioptera roeseli*. **Landscape Ecology**, v. 21, p. 891-899, 2006.
- JOHNSON, B. B.; WHITE, T. A.; PHILLIPS, C. A.; ZAMUDIO, K. R. Asymmetric introgression in a spotted salamander hybrid zone. **Journal of Heredity**, v. 106, p. 608-617, 2015.
- JOHNSON, M. A.; SARAIVA, P. M.; COELHO, D. The role of gallery forests in the distribution of cerrado mammals. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 421-427, 1999.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707-713, 2005.
- LANDE, R. Extinction risk from anthropogenic, ecological and genetic factors. In: LANDWEBER, L. F.; DOBSON, A. P. (Eds.). **Genetics and the extinction of species**. Princeton, Princeton University Press, 1999. p. 1-22.
- LIPS, K. R.; BURROWES, P. A.; MENDELSON, J. R.; PARRA-OLEA, G. Amphibian declines in Latin America: widespread population declines, extinctions, and impacts. **Biotropica**, v. 37, p. 163-165, 2005.

- LOUGHEED, S. C.; AUSTIN, J. D.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T.; CHEK, A. A. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a Neotropical hylid frog. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 23, 2006.
- LOYOLA, R. D.; BECKER, C. G.; KUBOTA, U.; HADDAD, C. F. B.; FONSECA, C. R.; LEWINSOHN, T. M. Hung out to dry: Choice of priority ecoregions for conserving threatened Neotropical anurans depends on life-history traits. **PloS ONE**, v. 3, p. e2120, 2008.
- LUGLI, L.; HADDAD, C. F. B. A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from central Bahia, Brazil (Amphibia, Hylidae). **Herpetologica**, v. 62, p. 453-465, 2006a.
- LUGLI, L.; HADDAD, C. F. B. New species of *Bokermannohyla* (Anura, Hylidae) from Central Bahia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 40, p. 7-15, 2006b.
- MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, C.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília, Conservation International do Brasil, 2004.
- MALUKIEWICZ, J.; BOERE, V.; FUZESSY, L. F.; GRATIVOL, A. D.; SILVA, I. O.; PEREIRA, L. C. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; VALENÇA, Y. M.; STONE, A. C. Natural and anthropogenic hybridization in two species of eastern Brazilian marmosets (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). **PloS ONE**, v. 10, p. e0127268, 2015.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 189-197, 2003.
- MARSH, D. M.; MILAM, G. S.; GORHAM, N. P.; BECKMAN, N. G. Forest roads as partial barriers to terrestrial salamander movement. **Conservation Biology**, v. 19, p. 2004-2008, 2005.
- MAY, J. A.; SONGSASEN, N.; AZEVEDO, F. C.; SANTOS, J. P.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, F. H. G.; RODDEN, M. D.; WILDT, D. E.; MORATO, R. G. Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 81-90, 2009.
- MAYR, E. **Animal Species and Evolution**. Belknap, Cambridge, 1963.

- McCLELLAND, B. E.; WILCZYNSKI, W.; RYAN, M. J. Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 1907-1919, 1996.
- MEAVE, J.; KELLMAN, M.; MACDOUGALL, D.; ROSLES, J. Riparian habitats as tropical forests refugia. **Global Ecology and Biogeography Letters**, v. 1, p. 69-76, 1991.
- MEDEIROS, M. B.; FIEDLER, N. C. Incêndios florestais no Parque Nacional da Serra da Canastra: desafios para a conservação da biodiversidade. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 157-168, 2004.
- MITTERMEIER, R. A.; ROBLES GIL, P., HOFFMAN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; DA FONSECA, G. A. B. **Hotspots Revisited**. Mexico City, CEMEX, 2004.
- MMA/IBAMA. **Plano de manejo – Parque Nacional da Serra da Canastra**. Brasília, Distrito Federal, 2005.
- MORTON, E. S. Ecological sources of selection on avian sounds. **American Naturalist**, v. 109, p. 17-34, 1975.
- NALI, R. C.; PRADO, C. P. A. Habitat use, reproductive traits and social interactions in a stream-dweller treefrog endemic to the Brazilian Cerrado. **Amphibia-Reptilia**, v. 33, p. 337-347, 2012.
- NALI, R. C.; PRADO, C. P. A. Complex call with different messages in *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura, Hylidae), a gladiator frog of the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 48, p. 407-414, 2014a.
- NALI, R. C.; PRADO, C. P. A. The fight call of *Bokermannohyla ibitiguara* (Anura: Hylidae): first record for the genus. **Salamandra**, v. 50, p. 181-184, 2014b.
- NALI, R. C.; BORGES, M. M.; PRADO, C. P. A. Advertisement and release calls of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae) with comments on the social context of emission. **Zoologia (Curitiba)**, v. 32, p. 263-269, 2015.
- NALI, R. C.; ZAMUDIO, K. R.; PRADO, C. P. A. Microsatellite markers for *Bokermannohyla* species (Anura, Hylidae) from the Brazilian Cerrado and Atlantic Forest domains. **Amphibia-Reptilia**, v. 35, p. 355-360, 2014.
- NOGUEIRA, C. C. **Diversidade e padrões de distribuição da fauna de lagartos do Cerrado**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

- ORTEGA-ANDRADE, H. M.; ROJAS-SOTO, O. R.; VALENCIA, J. H.; DE LOS MONTEROS, A. E.; MORRONE, J. J.; RON, S. R.; CANNATELLA, D. C. Insights from integrative systematics reveal cryptic diversity in *Pristimantis* frogs (Anura: Craugastoridae) from the Upper Amazon Basin. **PloS ONE**, v. 10, p. e0143392, 2015.
- PEARL, C. A.; HAYES, M. P.; HAYCOCK, R.; ENGLER, J. D.; BOWERMAN, J. Observations of interspecific amplexus between western North American ranid frogs and the introduced American bullfrog (*Rana catesbeiana*) and an hypothesis concerning breeding interference. **American Midland Naturalist**, v. 154, p. 126-134, 2005.
- PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F_{ST} : analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 585-602, 2004.
- PETERMAN, W. E.; CONNETTE, G. M.; SEMLITSCH, R. D.; EGGERT, L. S. Ecological resistance surfaces predict fine-scale genetic differentiation in a terrestrial woodland salamander. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 2402-2413, 2014.
- PRÖHL, H.; HAGEMAN, S.; KARSCH, J.; HOEBEL, G. Geographic variation in male sexual signals in strawberry poison frogs (*Dendrobates pumilio*). **Ethology**, v. 113, p. 825-837, 2007.
- REDFORD K. H.; FONSECA, G. A. B. The role of gallery forests in the zoogeography of the cerrado's non-volant mammalian fauna. **Biotropica**, v. 18, p. 126-135, 1986.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.
- RICHMOND, J. Q.; REID, D. T.; ASHTON, K. G.; ZAMUDIO, K. R. Delayed genetics effects of habitat fragmentation on the ecologically specialized Florida sand skink (*Plestiodon reynoldi*). **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1281-1297, 2009.
- RIESEBERG, L. H.; WENDEL, J. F. Introgression and its consequences in plants. In: HARRISON, R. G. (Ed.). **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. New York, Oxford University Press, 1993. p. 70-109.
- ROTHERMEL, B. B.; SEMLITSCH, R. D. An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. **Conservation Biology**, v. 16, p. 1324-1332, 2002.
- RYAN, M. J.; WILCZYNSKI, W. Coevolution of sender and receiver: effects on local mate preference in cricket frogs. **Science**, v. 240, p. 1786-1788, 1988.
- SCHOVILLE, S. D.; TUSTALL, T. S.; VREDENBURG, V. T.; BACKLIN, A. R.; GALLEGOS, E.; WOOD, D. A.; FISHER, R. N. Conservation genetics of evolutionary lineages of the

- endangered mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa* (Amphibia: Ranidae), in southern California. **Biological Conservation**, v. 144, p. 2031-2040, 2011.
- SEEHAUSEN, O.; TAKIMOTO, G.; ROY, D.; JOKELA, J. Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 30-44, 2008.
- SILVA, D. M.; CRUZ, A. D.; BASTOS, R. P.; TELLES, M. P. C.; DINIZ FILHO, J. A. F. Morphometric and genetic differentiation among populations of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from Central Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, p. 493-500, 2008.
- SILVA, J. F.; FARINAS, M. R.; FELFILI, J. M.; KLINK, C. A. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the Cerrado region of Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 536-548, 2006.
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. **BioScience**, v. 52, p. 225-234, 2002.
- SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 79-86, 2005.
- SMITH, M. A.; GREEN, D. M. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibians populations metapopulations? **Ecography**, v. 28, p. 110-128, 2005.
- SORK, V. L.; SMOUSE, P. E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape Ecology**, v. 21, p. 821-836, 2006.
- SPEAR, S. F.; STORFER, A. Landscape genetic structure of coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in protected vs. management forests. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4642-4656, 2008.
- SULLIVAN, B. K. Hybridization between the toads *Bufo microscaphus* and *Bufo woodhousii* in Arizona: morphological variation. **Journal of Herpetology**, v. 20, p. 11-21, 1986.
- TITON JUNIOR, B.; GOMES, F. R. Relation between water balance and climatic variables associated with the geographical distribution of anurans. **PLoS ONE**, v. 10, p. e0140761, 2015.
- TURIN, R. A. F.; NALI, R. C.; PRADO, C. P. A. Submetido. Intraspecific call variation in a Neotropical gladiator frog with a complex advertisement call.

- VALDUJO, P. H. **Diversidade e distribuição de anfíbios no Cerrado: O papel dos fatores históricos e dos gradientes ambientais**. 2011. Tese (Doutorado em Ecologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- VANHAECKE, D.; GARCIA DE LEANIZ, C.; GAJARDO, G.; YOUNG, K.; SANZANA, J.; ORELLANA, G., FOWLER, D.; HOWES, P.; MONZON-ARGUELLO, C.; CONSUEGRA, S. DNA barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered galaxiid fishes. **PLoS ONE**, v. 7, p. e32939, 2012.
- VASCONCELOS, T. S.; ROSSA-FERES, D. C. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 137-150, 2005.
- VELÁSQUEZ, N. A.; MARAMBIO, J.; BRUNETTI, E.; MÉNDEZ, M. A.; VÁSQUEZ, R. A.; PENNA, M. Bioacoustic and genetic divergence in a frog with a wide geographical distribution. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 110, p. 142-155, 2013.
- VREDENBURG, V. T.; WAKE, D. B. Global Declines of Amphibians. **Encyclopedia of Biodiversity, Elsevier Press**, p. 1-7, 2007.
- WAGNER-Jr, W.H. The role and taxonomic treatment of hybrids. **BioScience**, v. 19, p. 785-95, 1969.
- WARWICK, A. R., TRAVIS, J., LEMMON, E. M. Geographic variation in the Pine Barrens Treefrog (*Hyla andersonii*): concordance of genetic, morphometric and acoustic signal data. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 3281-3298, 2015.
- WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago, The University of Chicago Press, 2007.
- ZAMUDIO, K. R.; ROBERTSON, J. M.; CHAN, L. M.; SAZIMA, I. Population structure in the catfish *Trichogenes longipinnis*: Drift offset by asymmetrical migration in a tiny geographic range. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 97, p. 259-274, 2009.
- ZAMUDIO, K. R.; WIECZOREK, A. M. Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 257-274, 2007.

CONCLUSÃO

- *Bokermannohyla ibitiguara* é um anuro habitante de riachos que apresenta variação genética, morfológica e acústica na sua área de distribuição (Serra da Canastra, no Cerrado de Minas Gerais), e hibridação com a espécie *Bokermannohyla sazimai* dentro do Parque Nacional da Serra da Canastra original (PNSC).
- Para *B. ibitiguara*, análises genéticas com indivíduos de 12 localidades, utilizando 21 microssatélites, revelaram quatro grupos genéticos distintos, separando, grosseiramente, populações que ocorrem em riachos dentro do PNSC de populações que ocorrem em áreas alteradas nas propriedades rurais ou não desapropriadas do parque.
- Indivíduos de diferentes riachos apresentaram diferenciação genética, exceto em riachos dentro do PNSC, onde os indivíduos apresentaram também maior heterozigosidade e riqueza alélica. Consequentemente, observamos um maior grau de diferenciação entre indivíduos localizados fora do PNSC comparados aos de dentro do PNSC.
- A diferenciação genética foi explicada, além da distância geográfica, pela complexidade topográfica, enquanto a cobertura vegetal apresentou uma fraca correlação. De forma semelhante, a variação de alguns parâmetros genéticos das populações foi explicada apenas por aspectos topográficos.
- A importância do PNSC para a conectividade espacial entre populações de *B. ibitiguara* pode ser explicada por sua baixa complexidade topográfica, facilitando a dispersão de indivíduos. Características de relevo devem ser levadas em consideração para o estabelecimento de medidas de conservação, não apenas o uso de hábitat e/ou cobertura vegetal. Tal caracterização é particularmente importante em áreas prioritárias de preservação do Cerrado como a Serra do Espinhaço (também em MG) e a Chapada dos Guimarães (MT), as quais também apresentam particularidades quanto ao seu relevo.

- Na análise fenotípica de *B. ibitiguara*, a variação acústica foi muito maior do que morfológica através da área de distribuição, sugerindo uma seleção direcional de fêmeas sobre parâmetros acústicos dos machos.
- Variáveis acústicas significativamente diferentes entre populações podem ser associadas à preferência de fêmeas e/ou reconhecimento individual nesta espécie, demonstrando um papel da seleção sexual na variabilidade acústica.
- A diferenciação genética não explicou a diferenciação acústica entre populações, excluindo a evolução neutra por deriva e isolamento genético como um mecanismo responsável pela variação geográfica dos cantos da espécie.
- Não encontramos suporte para a hipótese de adaptação acústica (AAH) como mecanismo de variação acústica populacional. No entanto, dois parâmetros das notas associados à agressividade (notas curtas) correlacionaram-se com a vegetação ripária de forma contrária ao previsto pela AAH. Tal fato poderia ser explicado por uma maior densidade possível de machos reproduzindo-se em áreas com menos vegetação ripária, aumentando a seleção intrasexual (competição entre machos), o que por sua vez impõe pressões seletivas sobre tais parâmetros do canto agressivo.
- Nossos resultados sugerem que a seleção sexual promove diferenciação acústica nesta espécie em detrimento dos outros mecanismos analisados, confirmado por observações comportamentais anteriores. Demonstramos que caracteres fenotípicos e genéticos, bem como diferentes mecanismos devem ser analisados na evolução de sinais de comunicação, especialmente em animais com comportamento reprodutivo complexo.
- Em uma análise interespecífica na zona de contato entre *B. ibitiguara* e *B. sazimai* (PNSC), identificamos híbridos genéticos em sete dos oito riachos amostrados, os quais apresentam estrutura genética sobreposta, porém intermediárias aos parentais.

- Análises com três espécies de *Bokermannohyla* não simpátricas reforçaram a grande similaridade genética entre *B. ibitiguara* e *B. sazimai*, apesar de estarem atualmente incluídas em grupos taxonômicos distintos.
- Análises multivariadas com caracteres morfométricos e acústicos demonstraram que os híbridos identificados não são intermediários fenotipicamente entre as espécies parentais (*B. ibitiguara* e *B. sazimai*), mas sim apresentam um mosaico de fenótipos. Especificamente com relação à vocalização, dois machos híbridos apresentaram algumas notas diferentes dos parentais, e outros dois apresentaram cantos semelhantes.
- Sugerimos que a hibridação nestas espécies pode ocorrer por falhas no principal sistema de reconhecimento (comunicação acústica), devido à similaridade das vocalizações entre machos de ambas as espécies. Além disso, táticas alternativas de acasalamento, como machos satélites (observados em *B. ibitiguara*), e diferenças morfológicas entre os sexos poderiam explicar a ocorrência de reprodução interespecífica.
- Apesar de estudos com hibridação em anuros serem aparentemente enviesados para espécies com reprodução explosiva e pouca oportunidade de escolha de machos por fêmeas, demonstramos que eventos de hibridação podem ocorrer também em espécies de reprodução prolongada (*B. ibitiguara* e *B. sazimai*), com mecanismos de seleção sexual e comportamento de corte elaborados, bem como territorialidade/agressividade (*B. ibitiguara*). Reiteramos também a necessidade de incorporar análises filogenéticas na caracterização dos grupos de *Bokermannohyla*, levando em conta a possível hibridação entre espécies simpátricas do gênero.
- A diversificação multifacetada de *Bokermannohyla ibitiguara* traz contribuições para as áreas de conservação, biologia evolutiva e ecologia comportamental. Acreditamos que os enfoques e resultados desta tese possam ser aplicados a diferentes organismos e biomas, já que a história evolutiva das espécies é sempre mediada pela interação dos indivíduos com a paisagem, com indivíduos coespecíficos (do mesmo sexo ou do sexo oposto) e com outras espécies simpátricas.