

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 08/11/2021.

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

**EVOLUÇÃO EM CYCLORAMPHIDAE (ANURA):
DIVERSIDADE E ESPECIAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA**

FÁBIO PERIN DE SÁ

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 (Área de Concentração: Zoologia).

NOVEMBRO - 2019

FÁBIO PERIN DE SÁ

**EVOLUÇÃO EM CYCLORAMPHIDAE (ANURA):
DIVERSIDADE E ESPECIAÇÃO NA MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Zoologia).

Orientador: Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Coorientadora: Dra. Kelly Raquel Zamudio

**Rio Claro
2019**

S111e

Sá, Fábio Perin de

Evolução em Cycloramphidae: Diversidade e especiação na Mata Atlântica brasileira / Fábio Perin de Sá. -- Rio Claro, 2019
186 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad

Coorientadora: Kelly Raquel Zamudio

1. Evolução. 2. Seleção natural. 3. Filogenia. 4. Hibridação.
5. Anfíbio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Evolução em Cycloramphidae (Anura): Diversidade e especiação na Mata Atlântica brasileira.

AUTOR: FÁBIO PERIN DE SÁ

ORIENTADOR: CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD

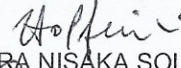
COORIENTADORA: KELLY R. ZAMUDIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
Departamento de Zoologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

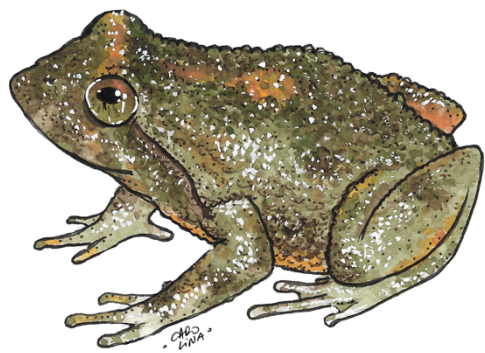

Profa. Dra. CYNTHIA PERALTA DE ALMEIDA PRADO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Unesp/ Câmpus de Jaboticabal


Prof. Dr. FELIPE GOBBI GRAZZIOTIN
Instituto Butantan / Laboratório Especial de Coleções Zoológicas


Profa. Dra. VERA NISAKA SOLFERINI
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Estadual de Campinas


Prof. Dr. FÁBIO SARUBBI RAPOSO DO AMARAL
Departamento de Ciências Biológicas - Câmpus de Diadema / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

Rio Claro, 08 de novembro de 2019



AGRADECIMENTOS

É imensa a alegria ao chegar nesta etapa de minha jornada. É fácil reconhecer que sozinho não teria conseguido percorrer todo o caminho. Ao escrever neste momento sinto a gratidão pelos momentos e aprendizados, mas sobretudo às pessoas que fizeram meu caminhar muitas vezes mais leve e prazeroso e em muitas outras vezes o fizeram possível. O texto que deixo pode ser lido como um sincero abraço de obrigado.

O professor Célio Haddad e a professora Kelly Zamudio são pessoas inspiradoras, a oportunidade de os ter tido como orientadores ao longo destes anos traz uma grande satisfação. Sou grato por todas as oportunidades que me proporcionaram e por confiarem em mim. Sempre me impulsionando um pouco mais adiante, agradeço aos dois pela compreensão, pelas risadas e pelas discussões sobre ciência e sobre a vida. Sempre acolhedores, é uma alegria os reconhecer como amigos.

Agradeço à minha família, Luzia Perin, Diogo Perin, Rafael Queiroz e Suélen Figueiredo, pois é imensurável o apoio e o amor que recebi de vocês para que esta tese hoje possa estar aqui consolidada. Obrigado por acreditarem em mim, por toda a compreensão e por sempre estarem prontos para conversar. Agradeço também ao meu pai, Silvio de Sá (em memória).

Sou também muito grato a dois amigos que tive o privilégio de reconhecer ao longo do doutorado, Thais Condez e Leo Malagoli. Pela Mata Atlântica, laboratórios e pela vida, a caminhada teve muito mais cores com a companhia de vocês. Quanta alegria e risadas!

Agradeço aos queridos colegas de laboratório da UNESP e de CORNELL pelas contribuições e pela companhia e afeto no dia-a-dia ao longo destes anos: Juliane Monteiro, Caitlin McDonald, Ariadne Sabbag, Délio Baêta, Ana Paula Motta, Maria Akopyan, Megan Barkdull, Carla Lopes, Priscila Lemes, Nicholas Polato, Amanda Santiago, Anyelet Aguilar, Cinnamon Mittan, Bianca Berneck, Marcus Thadeu Santos, Luciana Fusinato, Boris Blotto, Mariana Lyra, Lucas Bandeira, Pedro Taucce, João Giovanelli, Natália Sales, Tereza Thomé, Thiago Carvalho, Ana Carolina Calijorne, Paulo Pinheiro, Kaleb Gatto, Rafael Consolmagno, Olívia Araújo, Danilo Delgado, Francisco Brusquetti e Jordan Garcia. À Miranda Gray, à Nadya

Pupin e ao Steve Bogdanowicz meu especial obrigado pela amizade e pela atenção à tudo que foi preciso pelos laboratórios.

Proporcionando camadas intermináveis de conhecimento, a importância dos parques naturais e dos museus é imensurável. Assim, agradeço aos parques nos quais coletei e aos museus que visitei e, estendendo aos gestores e funcionários, agradeço pelo zelo e profissionalismo. Particularmente agradeço aos curadores e técnicos dos museus que gentilmente me receberam: Taran Grant, José Pombal Junior, Felipe Toledo, Rayna Bell, Sergio Potsch, Manoela Cardoso e Addison Wynn. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram com minhas coletas de dados. Agradeço aos funcionários, aos pós-doutores e aos professores da pós graduação da UNESP de Rio Claro.

Agradeço também a todos os colaboradores que muito contribuíram com os estudos desta tese, em particular: Vanessa Verdade, Miguel Rodrigues, Cinthia Brasileiro, Erika Santana, Gustavo de Gaspari e Pavitra Muralidhar. Agradeço aos professores Harry Greene e Patrícia Morellato pelas conversas e amizade. Sou também grato pela oportunidade que tive em orientar a Andréa de Lourenço, o Caio Pompeu e a Clara Silva, levo comigo aprendizado, amizade e crescimento.

Finalmente, agradeço a todos os anuros, estes animais incríveis que tanto têm me ensinado sobre os processos naturais.

O imprescindível financiamento desta tese foi concedido principalmente pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) por meio de bolsa de estudo (#2014/24972-4). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os estágios no exterior (#2016/06876-3 e #2018/17993-6) assim como a participação em cursos e congressos também foram financiados pelas agencias de fomento citadas.

Muito obrigado!!

**“A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.
E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da
alegria.”**

Paulo Freire

RESUMO

As forças de seleção natural e sexual atuam sobre os indivíduos e podem os levar ao isolamento reprodutivo. O acúmulo de modificações evolutivas pode levar ao surgimento de novas entidades. Espécie é unidade basal em biologia; assim, com sua exuberante biodiversidade, a Mata Atlântica é uma floresta neotropical fundamental para estudos de processos evolutivos em anfíbios anuros. Reunindo os gêneros *Cycloramphus*, *Thoropa* e *Zachaenus*, a família Cycloramphidae agrupa espécies de anuros saxícolas e terrestres, todas endêmicas da Mata Atlântica brasileira. Pelos seus hábitos especializados de vida e reprodução, os cicloramfídeos formam um grupo atrativo para estudos evolutivos. Na presente tese são apresentados quatro capítulos que abordam três escalas distintas da evolução: a diversificação entre espécies, populações e indivíduos. São abordados: (1) a filogenia molecular multilocus de *Cycloramphus-Zachaenus*, demonstrando que a evolução da terrestrialidade no clado se correlaciona com o dimorfismo sexual em tamanho; (2) a diversificação fenotípica associada a diversificações genéticas em populações de *C. boraceiensis* e *C. dubius*, demonstrando que estas duas espécies-irmãs saxícolas apresentam zona de contato e hibridação; (3) o sistema de acasalamento promíscuo e as relações sociais em *C. boraceiensis*, demonstrando que tamanho das fêmeas e dos machos e parentesco genético influenciam a formação dos casais; e (4) o sistema de acasalamento poligínico com fidelidade na espécie saxícola *Thoropa taophora*, estendendo o sistema harêmico para todos os tetrápodes.

análises comparativas, anfíbios, *Cycloramphus*, ddRADseq, dimorfismo sexual, discordância mitonuclear, evolução correlacionada, filogenia molecular multilocus, hibridação, microssatélites, parentesco genético, reconstrução ancestral, seleção sexual, sistema de acasalamento, sucesso reprodutivo, tamanho do corpo, *Thoropa*, *Zachaenus*, zona de contato.

ABSTRACT

Natural and sexual selection forces act on individuals and may lead to reproductive isolation. The increase in evolutionary modifications may lead to the emergence of new entities. Species is the basal unity in biology; thus, with its exuberant biodiversity, the Atlantic rainforest is a fundamental Neotropical forest for studies of evolutionary processes in anuran amphibians. Comprising the genera *Cycloramphus*, *Thoropa*, and *Zachaenus*, the family Cycloramphidae gathers saxicolous and terrestrial anuran species, all endemic to the Brazilian Atlantic rainforest. Because of their specialized life and reproductive habits, cycloramphids are an attractive group for evolutionary studies. In the present thesis we show four chapters that address three distinct scales of evolution: the diversification among species, populations, and individuals. We goaled: (1) the multilocus molecular phylogeny of *Cycloramphus-Zachaenus*, demonstrating that the evolution of terrestriality in the clade is correlated with the sexual size dimorphism; (2) the phenotypic diversification associated with the genetic diversifications in populations of *C. boraceiensis* and *C. dubius*, demonstrating that these two saxicolous sister species show a contact zone and hybridization; (3) the promiscuous mating system and the social relations in *C. boraceiensis*, demonstrating that female and male sizes, and mate relatedness influence pair formation; and (4) the polygynic mating system with fidelity in the saxicolous species *Thoropa taophora*, extending the harem system for all tetrapods.

amphibians, ancestral reconstruction, body size, comparative analyses, contact zone, correlated evolution, *Cycloramphus*, ddRADseq, hybridization, mate relatedness, mating system, microsatellite, mitonuclear discordance, multilocus molecular phylogeny, reproductive success, sexual dimorphism, sexual selection, *Thoropa*, *Zachaenus*.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 11 |
| Processos evolutivos: Diversificação e especiação | 11 |
| Diversidade e endemismo dos anuros na Mata Atlântica | 11 |
| Família Cycloramphidae (Anura)..... | 12 |
| Objetivos | 13 |
| Referências | 14 |
| | |
| CAPÍTULO I: Male-male competition and repeated evolution of terrestrial breeding in Atlantic Coastal Forest frogs | 18 |
| Acknowledgements | 20 |
| Abstract | 21 |
| Introduction..... | 21 |
| Material and Methods..... | 25 |
| Results | 34 |
| Discussion | 37 |
| Literature Cited..... | 45 |
| Tables..... | 62 |
| Figures | 64 |
| Supporting Information | 71 |
| | |
| CAPÍTULO II: Asymmetry in genetic and phenotypic introgression in a frog hybrid zone from the Atlantic rainforest..... | 86 |
| Abstract | 87 |
| Introduction..... | 88 |
| Material and Methods..... | 92 |
| Results | 97 |
| Discussion | 100 |
| Acknowledgements | 104 |
| References | 105 |
| Table | 114 |
| Figures | 115 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO III: Body size and relatedness shape a promiscuous mating system in a territorial Neotropical frog | 121 |
| Abstract | 122 |
| Introduction..... | 123 |
| Material and Methods..... | 127 |
| Results | 133 |
| Discussion | 138 |
| Acknowledgements | 146 |
| References | 147 |
| Figures | 158 |
| | |
| CAPÍTULO IV: Unexpected reproductive fidelity in a polygynous frog..... | 161 |
| Abstract | 162 |
| Introduction..... | 163 |
| Results | 164 |
| Discussion | 167 |
| Materials and Methods | 169 |
| References and Notes..... | 172 |
| Acknowledgements | 175 |
| Figures and Tables..... | 177 |
| Supplementary Materials..... | 180 |
| | |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 185 |

INTRODUÇÃO GERAL

PROCESSOS EVOLUTIVOS: DIVERSIFICAÇÃO E ESPECIAÇÃO

Apesar dos diversos conceitos, muitas vezes até mesmo parcialmente incompatíveis, espécie ainda constitui uma unidade fundamental na biologia (Mayr 1982, Claridge et al. 1997, Jackson et al. 2017). O ponto principal do conceito de espécie está vinculado à sua delimitação, norteando a resolução das fronteiras e da quantidade das entidades consideradas existentes (de Queiroz 2007). No entanto, devido a discordância sobre os critérios para reconhecimento das entidades, a delimitação das espécies é uma das questões mais desafiadoras da filogenética e da genética de populações (Coyne & Orr 2004). Em essência, a interrupção do fluxo gênico é o que proporciona a conclusão da formação de novas espécies e, desta forma, de Queiroz (2007) propõe um conceito unificado de espécie, retendo apenas o elemento comum de todas as propostas anteriores: espécies são linhagens metapopulacionais que estão sob os mesmos e independentes processos evolutivos.

Em organismos relacionados, o quão o fluxo gênico será responsável pela variação genética entre populações distintas está fortemente associado aos diversos processos mutacionais, distribuições geográficas, histórias naturais e regimes de seleção envolvidos (Endler 1973, Slatkin 1987, Barraclough & Vogler 2000, Servedio & Boughman 2017). Particularmente nos processos relacionados à adaptação e especiação locais, a seleção sexual desempenha diversas e complexas funções, podendo não só promover como também em alguns casos inibir tais processos (Emlen & Oring 1977, Andersson 1994, Servedio & Boughman 2017, Cooney et al. 2017). Existe um amplo conjunto de evidências indicando que a seleção sexual de fato contribui para os processos de especiação; entretanto, hoje se compreende que a seleção sexual tem atuação apenas em conjunto com a seleção natural (Servedio & Boughman 2017).

DIVERSIDADE E ENDEMISMO DOS ANUROS NA MATA ATLÂNTICA

As florestas neotropicais do domínio da Mata Atlântica são excelentes locais de estudo para a compreensão dos processos de diversificação e especiação, pois

abrigam uma das biodiversidades mais vastas do mundo (Morellato & Haddad 2000, Corlett & Primack 2005, Carnaval et al. 2009). Particularmente com relação aos anfíbios anuros, a alta diversidade e o elevado índice de endemismos são marcadamente observáveis em áreas montanhosas da Mata Atlântica. Este fato se deve à forte associação destas áreas com uma elevada variedade climática e ambiental (variações em níveis de umidade, variações em temperatura e topografias acidentadas; Heyer & Maxson 1983, Silva et al. 2012, Vasconcelos et al. 2019). Esta variedade em características climáticas e ambientais proporciona inúmeros microhabitats adequados ao desenvolvimento dos anuros.

Quando comparados aos outros tetrápodes, os anuros apresentam baixa capacidade de dispersão, o que reflete em elevada filopatria e evidentes estruturações filogeográficas (Beebee 1996, Zeisset e Beebee 2008, Brunet et al. 2015, Rodríguez et al. 2015). A variedade em microhabitats na Mata Atlântica, somada à filopatria dos anuros, gera condições que exigem adaptações extremas à sobrevivência, que, por sua vez, podem levar ao surgimento de endemismos dentro de uma rede natural de barreiras ao fluxo gênico (Carnaval et al. 2009, Vasconcelos et al. 2014, Vasconcelos et al. 2019). Estas interações animal-ambiente são perceptíveis pela exuberante diversidade em espécies de anuros na Mata Atlântica, apresentando variadas morfologias, biológicas e comportamentos (Haddad & Prado 2005, Haddad et al. 2013).

FAMÍLIA CYCLORAMPHIDAE (ANURA)

Cycloramphidae é uma família de anuros que ocorre exclusivamente na Mata Atlântica do Brasil, sendo composta pelos gêneros *Cycloramphus*, *Thoropa* e *Zachaenus* (Frost et al. 2006, Grant et al. 2006, Fouquet et al. 2013, Jetz & Pyron 2018). No entanto, o monofiletismo dos gêneros vigentes ainda não está totalmente demonstrado (Heyer 1983, Heyer & Maxson 1983, Verdade 2005, Sabbag et al. 2018). Os cicloramfídeos são encontrados em regiões montanhosas das formações de Mata Atlântica, ocorrendo desde o estado do Rio Grande do Sul até a porção sul do estado da Bahia.

Apesar do pouco conhecimento acerca da história natural de tais espécies, dois agrupamentos ecomorfológicos são distinguíveis para *Cycloramphus*, sendo um grupo terrestre e o outro saxícola (Verdade 2005). As espécies de *Zachaenus* se assemelham aos *Cycloramphus* terrestres (Lutz 1947, Heyer & Crombie 1979, McDiarmid & Altig 1999, Verdade 2005, Brasileiro et al. 2007, Zocca et al. 2014). Com membros curtos e ausência de membranas interdigitais, os cicloramfídeos terrestres são espécies que vivem associadas à serapilheira de áreas florestadas ou ao solo de campos de altitude, com algumas delas apresentando hábitos semifossoriais. A reprodução ocorre no próprio ambiente terrestre. Os ovos terrestres são grandes e despigmentados, sendo depositados em cavidades úmidas, embaixo de troncos ou em tocas. Há cuidado com a prole envolvendo um ou ambos os parentais. Os girinos terrestres eclodem bastante desenvolvidos e são endotróficos. Por sua vez, as espécies de *Thoropa* se assemelham aos *Cycloramphus* saxícolas (Bokermann 1965, Cocroft & Heyer 1988, Haddad & Sazima 1989, Giaretta & Facure 2003, Giaretta & Facure 2004, Verdade 2005). Com o corpo achatado e membranas interdigitais desenvolvidas, os *Cycloramphus* saxícolas são espécies que vivem associadas a riachos encachoeirados de áreas florestadas ou campos de altitude. A reprodução ocorre no próprio ambiente saxícola. Os ovos terrestres são também grandes e despigmentados, sendo depositados sobre rochas emergentes nos riachos ou em fendas úmidas de paredões rochosos nas proximidades de cachoeiras. Há cuidado paternal, com os machos altamente territoriais defendendo ativamente as desovas. Os girinos semiterrestres eclodem em estágios iniciais de desenvolvimento e são exotróficos.

OBJETIVOS

Na presente tese são apresentados quatro capítulos de estudos de processos evolutivos de diversificação e especiação em espécies dos gêneros *Cycloramphus*, *Thoropa* e *Zachaenus* (família Cycloramphidae), anuros endêmicos da Mata Atlântica do Brasil. Com o uso de ferramentas moleculares e incluindo dados morfológicos, biológicos, ecológicos e comportamentais, são abordadas três escalas distintas da evolução: a diversificação entre espécies, entre populações e entre indivíduos. Especificamente, os capítulos abordam:

- I. A diversificação entre espécies: por meio da construção da filogenia molecular multilocus do clado *Cycloramphus-Zachaenus* e, incluindo métodos de reconstrução de estados ancestrais e análises comparativas, é demonstrado como a evolução da terrestrialidade nos cicloramfídeos se correlaciona com o dimorfismo sexual em tamanho.
- II. A diversificação entre populações: por meio do estudo de variações fenotípicas (padrões morfológicos dorsais) associadas a variações genômicas (SNPs; sequenciamento de próxima geração) e a variações de um fragmento de gene mitocondrial (16S), é demonstrado como se caracteriza a zona de contato entre as linhagens das espécies-irmãs saxícolas *Cycloramphus boraceiensis* e *C. dubius*.
- III. A diversificação entre indivíduos: por meio de genotipagem de microssatélites e análises genéticas de parentesco, é demonstrado como se caracteriza o sistema de acasalamento em *Cycloramphus boraceiensis*, evidenciando as relações entre tamanho do corpo, parentesco genético, escolha de parceiros e sucesso reprodutivo.
- IV. A diversificação entre indivíduos: por meio de caracterização larval e de registros comportamentais do ritual de corte, é demonstrado como se caracteriza o sistema de acasalamento em *Thoropa taophora*, evidenciando a fidelidade entre parceiros e apresentando um novo sistema de acasalamento para anfíbios, o qual já era conhecido para todos os demais tetrápodes.

REFERÊNCIAS

- Andersson MB. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton.
- Barracough TG & Vogler AP. 2000. Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. *The American Naturalist*. 155: 419–434.
- Beebee T. 1996. Ecology and conservation of amphibians. Chapman & Hall, London.
- Bokermann WCA. 1965. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 37: 525–537.

- Brasileiro CA, Haddad CFB, Sawaya RJ & Sazima I. 2007. A new and threatened island dwelling species of *Cycloramphus* (Anura: Cycloramphidae) from southeastern Brazil. *Herpetologica*. 63: 501–510.
- Brunes TO, Thomé MTC, Alexandrino J, Haddad CFB & Sequeira F. 2015. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic forest. *Organisms Diversity & Evolution*. 15: 695–710.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT & Moritz C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*. 323: 785–789.
- Claridge MF, Dawah HA & Wilson MR. 1997. *Species: the units of biodiversity*. Chapman & Hall, London.
- Cocroft RB & Heyer WR. 1988. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 101: 209–220.
- Cooney CR, Tobias JA, Weir JT, Botero CA & Seddon N. 2017. Sexual selection, speciation and constraints on geographical range overlap in birds. *Ecology Letters*. 20: 863–871.
- Corlett R & Primack R. 2005. Dipterocarps: trees that dominate the Asian rain forest. *Arnoldia* 63: 3–7.
- Coyne JA & Orr HA. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- de Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. 56: 879–886.
- Emlen ST & Oring LW. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*. 197: 215–223.
- Endler JA. 1973. Gene flow and population differentiation. *Science*. 179: 243–250.
- Fouquet A, Blotto BL, Maronna MM, Verdade VK, Juncá FA, de Sá R & Rodrigues MT. 2013. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67: 445–457.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, de Sá RO, Channing A, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JD, Green DM & Wheeler WC. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2006: 1–291.

- Giaretta AA & Facure KG. 2003. *Cycloramphus boraceiensis* (flattened waterfall frog), clutch attendance. *Herpetological Review*. 34:50.
- Giaretta AA & Facure KG. 2004. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). *Biota Neotropica*. 4: 1–10.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo RON, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE & Wheeler, WC. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2006: 1–262.
- Haddad CFB & Prado CPA. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*. 55: 207–217.
- Haddad CFB & Sazima I. 1989. A new species of *Cycloramphus* from southeastern Brazil (Amphibia: Leptodactylidae). *Herpetologica*. 45: 425–429.
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D, Gasparini JL & Sazima I. 2013. *Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia*. Anolis, São Paulo.
- Heyer WR. 1983. Variation and systematics of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Arquivos de Zoologia (São Paulo)*. 30: 235–339.
- Heyer WR & Crombie RI. 1979. Natural history notes on *Craspedoglossa stejnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). *Journal of the Washington Academy of Sciences*. 69: 17–20.
- Heyer WR & Maxson LR. 1983. Relationships, zoogeography, and speciation mechanisms of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Arquivos de Zoologia*. 30: 341–373.
- Jackson ND, Carstens BC, Morales AE & O'Meara BC. 2017. Species delimitation with gene flow. *Systematic Biology*. 66: 799–812.
- Jetz W. & Pyron RA. 2018. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nature Ecology & Evolution*. 2: 850–858.
- Lutz B. 1947. Trends towards non-aquatic and direct development in frogs. *Copeia*. 1947: 242–252.
- Mayr E. 1982. *The growth of biological thought*. Harvard University Press, Cambridge.
- McDiarmid RW & Altig R. 1999. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, Chicago.

- Morellato LPC & Haddad CFBH. 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 32: 786–792.
- Rodríguez A, Börner M, Pabijan M, Gehara M, Haddad CFB & Vences M. 2015. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. *Evolutionary Ecology*. 29: 765–785.
- Sabbag AF, Lyra ML, Zamudio KR, Haddad CFB, Feio RN, Leite FSF, Gasparini JL & Brasileiro CA. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 122: 142–156.
- Servedio MR & Boughman JW. 2017. The role of sexual selection in local adaptation and speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 48: 85–109.
- Silva FR, Almeida-Neto M, Prado VHM, Haddad CFB & Rossa-Feres DC. 2012. Humidity levels drive reproductive modes and phylogenetic diversity of amphibians in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*. 39: 1720–1732.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787–792.
- Vasconcelos TS, Prado VHM, da Silva FR & Haddad CFB. 2014. Biogeographic distribution patterns and their correlates in the diverse frog fauna of the Atlantic Forest hotspot. *PLoS One*. 9: e104130.
- Vasconcelos TS, da Silva FR, dos Santos TG, Prado VHM & Provete DB. 2019. Biogeographic patterns of South American Anurans. Springer, Nova Iorque.
- Verdade VK. 2005. Relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros *Cycloramphus* Tschudi 1838 e *Zachaenus* Cope 1866 (Anura, Leptodactylidae). Tese de Doutorado em Zoologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Zeisset I. & Beebee TJC. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*. 101: 109–119.
- Zocca CZ, Lirio FF & Ferreira RB. 2014. Observações sobre história natural de *Zachaenus carvalhoi* Izecksohn, 1983 “1982” (Amphibia: Anura: Cycloramphidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*. 34: 63–74.

CONCLUSÕES GERAIS

- i. O ancestral comum do clado *Cycloramphus-Zachaenus* foi provavelmente pequeno, saxícola e com baixo dimorfismo sexual em tamanho. A partir desse ancestral, a terrestrialidade evoluiu independentemente três vezes. Ao longo da evolução há uma associação significativa entre o habitat reprodutivo e o dimorfismo sexual em tamanho. As passagens para a reprodução terrestre evoluíram de modo correlacionado com diminuições no tamanho de corpo dos machos, mas não no tamanho de corpo das fêmeas. A reprodução terrestre aumenta a disponibilidade de sítios reprodutivos, além de resultar em uma maior ocultação do amplexo, da oviposição e do cuidado parental, reduzindo assim a competição intrasexual dos machos em todos os estágios reprodutivos. É inferido que a evolução da reprodução terrestre correlacionada com o tamanho menor dos machos é decorrente de uma atenuação na intensa competição macho-macho, que é típica na reprodução saxícola (por ser mais exposta).

- ii. Na zona de contato secundária das espécies-irmãs saxícolas *Cycloramphus boraceiensis* e *C. dubius* está ocorrendo hibridação entre linhagens, havendo discordância mitonuclear e introgressão assimétrica de alelos nucleares. A distribuição do padrão morfológico dorsal das linhagens segue aproximadamente a distribuição das variações genômicas (dados nucleares). É inferido que principalmente uma dispersão maior das fêmeas em relação aos machos somada à competição intrasexual interespecífica (de fêmeas e de machos) está promovendo as discordâncias genéticas e fenotípica encontradas. Esta zona híbrida ocorre precisamente em uma região altamente diversificada e historicamente dinâmica, com contrações e expansões conhecidas para uma ampla gama de espécies. Contatos secundários afetam a distribuição das variações genéticas e fenotípicas, contribuindo para a origem e manutenção da diversificação na Mata Atlântica.

- iii. A espécie *Cycloramphus boraceiensis* apresenta um sistema de acasalamento promíscuo, com ambos fêmeas e machos tendo parceiros sequenciais. Ocasionalmente há formações recorrentes de pares, mas os dados de fidelidade são inconclusivos. As fêmeas maiores têm vantagens reprodutivas. As vantagens reprodutivas dos machos maiores variam de acordo com as distintas condições ambientais e populacionais. Na formação dos casais não há correlação de tamanhos entre fêmeas e machos, porém os casais formados são geneticamente mais relacionados do que a média populacional. Com ambos fêmeas e machos competindo por recursos, os resultados sugerem que o parentesco genético influencia a estrutura social em *C. boraceiensis*. Este sistema promíscuo com cuidado parental dos machos é organizado de modo não aleatório, provavelmente envolvendo competição intrasexual marcante tanto para os machos como para as fêmeas.
- iv. Ao longo de estações reprodutivas prolongadas, a espécie *Thoropa taophora* apresenta sistema de acasalamento poligínico com macho único e alta fidelidade intragrupo, o que também é referido como harém. O macho monopolizador domina o sítio reprodutivo que é escasso, guardando a prole e reproduzindo exclusivamente com duas fêmeas. Este sistema provavelmente evoluiu em resposta à intensa competição por sítios reprodutivos e à intensa competição intrasexual por parceiros. Este sistema de acasalamento não era conhecido para anfíbios e é aqui estendido para todos os tetrápodes.