

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/01/2018.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

DIVERSIFICAÇÃO DE ANUROS NO CHACO SUL-AMERICANO

FRANCISCO ADOLFO BRUSQUETTI ESTRADA

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).

JANEIRO - 2016

FRANCISCO ADOLFO BRUSQUETTI ESTRADA

DIVERSIFICAÇÃO DE ANUROS NO CHACO SUL-AMERICANO

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

ORIENTADOR: CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD

**RIO CLARO
2016**

597.8 Estrada, Francisco Adolfo Brusquetti
E82d Diversificação de anuros no chaco sul-americano /
Francisco Adolfo Brusquetti Estrada. - Rio Claro, 2016
155 f. : il., figs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad

1. Anuro. 2. Bioma chaco. 3. *Lepidobatrachus*. 4.
Leptodactylus bufonius. I. Título.

FRANCISCO ADOLFO BRUSQUETTI ESTRADA

DIVERSIFICAÇÃO DE ANUROS NO CHACO SUL-AMERICANO

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus 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

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad - Orientador

Profa. Dra. Cyntia Peralta de Almeida Prado

Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

Profa. Dra. Cinthia Aguirre Brasileiro

Profa. Dra. Mariana Morando

Rio Claro, 28 de janeiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço muito aos meus pais, Cristina e Francisco (Nancho), pois sem o apoio deles nunca teria conseguido seguir meus sonhos. Também às minhas irmãs Ale, Fati e Silvi, as quais considero verdadeiras amigas.

Ao meu orientador, Célio, que me abriu as portas do seu laboratório e confiou em mim desde o mestrado. Pela constante ajuda em todos os aspectos do trabalho, pelos conselhos e ensino constante.

Ao pessoal do Jacarezário que me ofereceu amizade e ajuda em todo momento desde que cheguei a Rio Claro, incluídos os que não estão mais aqui, muito obrigado por tudo! Olívia Araújo, Lucas Bandeira, Danilo Barea Delgado, Bianca Berneck, Tuliana Brunes, Clarissa Canedo, Carla Cassini, Luiza Cholak, Thais Condez, Victor Dill, Eliziane Garcia, Luis Giassom, Michelle Gonçalves, Daniel Loebmann, Vinicius Loredan, Mariana Lyra, Leo Ramos Malagoli, Vanessa Marcelino, Dina Maria, Vitor Hugo Mendonça, Fabio Perin de Sá, Paulo Pinheiro, Nadya Pupin, Ricardo Ribeiro, Ariadne Sabbag, Amanda Santiago, André Tacioli, Pedro Taucce, Laryssa Teixeira, Tereza Thomé, Anyelet Valencia, Marina Walker e Juliana Zina.

A todas as pessoas que disponibilizaram material: Flavia Netto do Instituto de Investigación Biológica del Paraguay (IIBP), Asunción, Paraguay; Diego Baldo do Laboratório de Genética y Evolución (LGE), Universidad Nacional de Posadas, Misiones, Argentina; Gustavo Graciolli, Franco Souza e Gabriel Faggioni da Coleção Zoológica de Referência da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ZUFMS), Corumbá, Brasil, muito obrigado a todos.

Aos companheiros de campo: Diego Baldo, Juan Boeris, Jimena Grosso, Flavia Netto e Tereza Thomé. Também aproveito para agradecer aos proprietários, administradores e demais empregados das Fazendas do Chaco Paraguaio que permitiram a coleta de material em suas propriedades: fazendas Teniente Prieto, Aguada Siete e Chaco Boef, e em especial ao pessoal das fazendas Salazar, Montana, Cotorrita e Toro Reta, que além de permitir o acesso forneceram alojamento durante os dias de trabalho, e a Luís Vargas, Alejandra Brusquetti e Nancho Brusquetti que

fizeram os contatos. Também expressei meu agradecimento aos administradores e guarda-parques dos parques nacionais do Paraguai, Defensores del Chaco e Teniente Enciso onde fomos cordialmente recebidos e sempre ajudados. A Secretaría del Ambiente del Paraguay (SEAM) pelas licenças de coleta no Paraguay.

Aos meus amigos do IIBP com quem compartilho o sonho de fazer ciência no Paraguay: Flavia Netto, Humberto Sánchez, Pier Cacciali e Monica Rumbo. Também quero expressar meu mais sincero agradecimento a Thais Condez, Flavia Netto e Zunilda Sisa por suas grandes contribuições ao presente trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro, que através do programa PEC-PG sustentou minha estadia no Brasil durante o Doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq que através da Chamada Universal financiou o presente projeto quase na sua totalidade assim como o Programa Nacional de Incentivo a Investigadores (PRONII) do Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Paraguay). Esta pesquisa tornou-se possível graças aos recursos computacionais disponibilizados pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Estarei eternamente agradecido a todas essas pessoas e espero ter a oportunidade de poder retribuir tudo o que fizeram por mim durante este período.

RESUMO

Os processos de diversificação biológica na América do Sul têm sido foco de vários estudos nos últimos tempos; porém, nota-se um marcado viés para os biomas florestados como a Amazônia e a Mata Atlântica. Nesse contexto, o Chaco é um dos biomas que tem recebido menor atenção. Nesta tese apresentamos o primeiro esforço por entender quais eventos e processos têm sido responsáveis pela diversificação de anuros endêmicos deste bioma, incluindo *Lepidobatrachus asper*, *Lepi. laevis*, *Lepi. llanensis* e *Leptodactylus bufonius*. Para atingir esse objetivo utilizamos sequências de DNA mitocondrial e nuclear de uma ampla amostragem de cada uma das espécies. Nos primeiros dois capítulos investigamos a diversificação do gênero *Lepidobatrachus*, sendo que no primeiro deles nossos objetivos foram analisar a estrutura genética e delimitar um período de tempo de diversificação que nos permita associá-la com eventos históricos e assim gerar as primeiras hipóteses sobre diversificação de anuros no Chaco. A estrutura genética identificada corresponde à distribuição geográfica dos espécimes analisados, assim como também revela algumas quebras ao longo da paisagem. A principal dessas barreiras corresponde à área central do Chaco, que por sua extrema aridez poderia estar atuando como uma barreira climática para a dispersão desses animais. Por outro lado, a dinâmica histórica dos rios da região poderia ter influenciado na estrutura genética das espécies do gênero *Lepidobatrachus*. Sugerimos uma antiga e rápida radiação para este gênero, com introgressões marinhas e períodos de alta temperatura e aridez como os principais responsáveis por sua diversificação. No segundo capítulo, aprofundamos no estudo da estrutura genética usando frequência alélica. Investigamos a história demográfica e usamos modelos de isolamento com migração para testar as hipóteses propostas no primeiro capítulo e entender os processos que resultaram na diversidade que hoje conhecemos dentro do gênero *Lepidobatrachus*. Nossos resultados sugerem que as antigas formações continentais estáveis, como os arcos estruturais e os crátons, tiveram um importante papel na diversificação do gênero *Lepidobatrachus*, atuando como refúgios durante as introgressões marinhas. A barreira climática do Chaco central é confirmada para uma das espécies do gênero. Adicionalmente, encontramos que os rios exerceram diferentes efeitos nas diferentes espécies do gênero, o que pode estar relacionado ao tempo de persistência de cada uma das espécies na área de influência desses rios. A maior persistência de *Lept. llanensis* resultou num padrão

genético modelado pela dinâmica desses rios alóctones. No terceiro e último capítulo analisamos a estrutura genética e demografia histórica de *Lept. bufonius*, uma espécie de ampla distribuição, para ter acesso a história evolutiva mais recente do Chaco. Os resultados suportam eventos de expansão recente e constante fluxo gênico entre as populações. As expansões estão relacionadas aos períodos interglaciais, enquanto o fluxo gênico é mantido por dispersões curtas que seguem um modelo “stepping-stone”, permitindo assim uma alta conectividade, inclusive entre as populações mais distantes. Esse mesmo padrão foi registrado em anuros de outras regiões semiáridas pelo mundo.

ABSTRACT

Diversification processes in South America have been the focus of several studies in recent times; however, with a marked bias towards the forested biomes such as the Amazon and the Atlantic Forest. In this context, the Chaco has been one of the biomes that have received less attention. In this thesis we present the first effort to understand the events and processes that have been responsible for the diversification of endemic frogs in this biome, including *Lepidobatrachus asper*, *Lepi. laevis*, *Lepi. llanensis*, and *Leptodactylus bufonius*. For this purpose we used DNA sequences, both mitochondrial and nuclear, of a large sample of each species. In the first two chapters we investigate the diversification of the genus *Lepidobatrachus*. In the first one, our goals were to assess genetic structure and to delimit a diversification timeframe, which allow us to do associations with historical events and, thereby, generate the first hypotheses about diversification within the Chaco. The identified genetic structure is concordant with the geographic distribution of sampled specimens as well as shows some breaks along the landscape. The most important of these breaks matches with the central area of the Chaco, which due to the extreme aridity may act as a climatic barrier for the dispersal of these animals. On the other hand, the historical dynamics of the rivers of this region has influenced the genetic structure of these species. We suggest an old and rapid radiation for *Lepidobatrachus*, with marine introgressions and periods of high temperature and aridity as the main responsible in the genus diversification. In the second chapter, we deepen the genetic structure using allele frequency, we investigated the demographic history and used isolation-with-migration models to test hypotheses proposed in the first chapter and to

understand the processes that resulted in the current diversity of the genus *Lepidobatrachus*. Our results support that old and stable continental formations, such as structural arches and cratons, have played an important role in the genus diversification, acting as refuges during marine introgressions. The central Chaco climatic barrier is confirmed for one species of the genus. Additionally, we find different effects of the rivers on the species of the genus, related to the time of persistence of each one in the area of influence of these rivers. The longer persistence of *Lepi. llanensis* resulted in a genetic pattern shaped by dynamics of allochthonous rivers. In the third and last chapter we analyzed the genetic structure and historical demography of the widely distributed species *Lept. bufonius* in order to access the recent evolutionary history of this biome. Our results support recent expansion events and current gene flow among populations. The expansions are related to interglacial periods. Gene flow is maintained by short dispersions that follow a "stepping-stone" model enabling high connectivity, even among the most remote populations. The same pattern was registered in frogs in other semiarid regions of the world.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	10
Capítulo 1: What happened in the Chaco? Miocene events as main drivers of diversification of the endemic frog genus <i>Lepidobatrachus</i> (Ceratophryidae: Anura)	
Abstract	17
Introduction	18
Material and methods	20
Results	26
Discussion	30
Conclusions	36
References	37
Appendix 1	45
Appendix 2	51
Capítulo 2: Diversification of the Chacoan endemic frog genus <i>Lepidobatrachus</i> (Anura, Ceratophryidae): the role of marine introgression, old highs and cratons, climatic barriers, and allochthonous rivers	
Abstract	56
Introduction	57
Material and methods	59
Results	65
Discussion	76
Conclusions	82
References	84
Appendix 1	91
Appendix 2	97
Supporting information	101
Capítulo 3: Middle-Pleistocene expansion and current gene flow on the Chaco Vizcacheras' White-lipped Frog, <i>Leptodactylus bufonius</i> Boulenger, 1894 (Anura, Leptodactylidae)	
Abstract	106
Introduction	107
Material and methods	109

Results	114
Discussion	122
Conclusions	130
References	131
Appendix 1	141
Appendix 2	149
CONCLUSÕES GERAIS	154

INTRODUÇÃO GERAL

A diversificação de espécies nos Neotrópicos não está associada a apenas um espaço de tempo ou evento (RULL, 2011), mas sim a diversos eventos e processos que vêm acontecendo desde o Eoceno superior / Oligoceno inferior até o Pleistoceno (RULL, 2008). A orogênese dos Andes no Mioceno, o fechamento do Istmo do Panamá, e as introgressões marinhas, juntamente com as mudanças climáticas do Quaternário, são os principais eventos deste período de tempo (NORES, 2004; GARDA & CANATELLA, 2007). Na América do Sul, eventos associados à diversificação têm sido muito mais estudados em florestas tropicais como a Amazônia e a Mata Atlântica (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013), deixando um pouco de lado as formações mais abertas.

Os biomas abertos da América do Sul ocupam atualmente uma grande superfície de áreas subúmidas a semiáridas que atingem em conjunto uma extensão de aproximadamente 4.6 milhões de km² (DUELLMAN, 1999). Essas formações se estendem desde o centro da Argentina até o norte do Brasil, incluindo grande parte do Paraguai e o sudeste da Bolívia, correspondendo aos biomas do Chaco, Cerrado e Caatinga. Este conjunto de biomas já foi denominado de diversas maneiras: “corredor de savanas”, “cadeia de savanas desde o Chaco paraguaio e Mato Grosso até Ceará e Pernambuco” (SCHMIDT & INGER, 1951) e, por fim, como “diagonal de formações abertas” (VANZOLINI, 1963). Historicamente, estas formações têm sido associadas erroneamente à baixa diversidade de espécies e poucos endemismos. Caatinga, Cerrado e Chaco foram muitas vezes considerados parte de uma única formação, mas análises fitogeográficas suportam a existência de três biomas floristicamente distintos e bastante peculiares (CABRERA & WILLINK, 1973; RIZZINI, 1979).

Entre estes biomas, o Chaco é o mais negligenciado em termos de conhecimento sobre sua história evolutiva (WERNECK, 2011), uma vez que carece de estudos sobre possíveis promotores da diversificação de espécies, como barreiras de dispersão ou eventos históricos. O Chaco ocorre desde o sudeste da Bolívia até o centro da Argentina, ocupando grande parte do Paraguai e uma pequena porção no sul do Brasil, no estado do Mato Grosso do Sul. Tem uma superfície aproximada de 1 milhão de km², estando principalmente representado na Argentina (62% da sua

extensão) e no Paraguai (25%). O Chaco encontra-se limitado pelas formações pré-Andinas a oeste (Yungas e Montes), pelo Espinal ao sudeste, pelos rios Paraguai e Paraná assim como pela Mata Atlântica Interior (Floresta Estacional Semidecidual) ao leste, e pela Chiquitanía Boliviana e o Cerrado ao norte. O Chaco é considerado como uma unidade biogeográfica distinta, mas sua composição vegetal suporta o reconhecimento de duas formações: o Chaco Seco e o Chaco Úmido (ADAMOLI *et al.*, 1990).

Devido à sua situação geográfica, o bioma Chaco está associado a diversos eventos históricos, como introgressões marinhas, glaciações e as mudanças climáticas associadas (HERNANDEZ *et al.*, 2005; ORTIZ-JAUGUERIZAR & CLADERA, 2006). As introgressões marinhas do Mioceno têm sido apontadas como possíveis promotores da diversificação para alguns vertebrados no sul da América do Sul (CANDELA *et al.*, 2012; MORANDO *et al.*, 2014). Pelo menos três importantes introgressões marinhas têm sido registradas para essa região (OTTONE, *et al.*, 2013). A mais importante em extensão, conhecida como mar Paranense, ocorreu entre 15 e 13 milhões de anos atrás, cobrindo quase toda a superfície do atual Chaco (HERNANDEZ, *et al.*, 2005; CANDELA *et al.*, 2012; OTTONE, *et al.*, 2013). Este mar interno se estendeu através de uma grande superfície de terra, inundando todas as terras baixas compreendidas entre as antigas formações continentais estáveis, como os arcos estruturais e os crátons (HERNANDEZ *et al.*, 2005). Outros importantes eventos que fazem parte da história do bioma Chaco são as glaciações do Quaternário. Mesmo que as geleiras não tenham avançado mais que as latitudes mais austrais do sul da América do Sul e que tenham persistido apenas nos Andes, as mudanças climáticas e ambientais associadas a estes eventos resultaram em deslocamentos cíclicos dos biomas do sul, assim como dos mais próximos a estes, como o Chaco (COSACOV *et al.*, 2010; ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006).

O Chaco é uma grande planície aluvial (PENNINGTON *et al.*, 2000), historicamente considerada como um continuum, carente de barreiras geográficas para a dispersão de organismos (BUCHER, 1982). Porém, a influência de possíveis barreiras como os rios que atravessam a região nunca foi formalmente testada. Os principais rios que irrigam o Chaco são os rios Pilcomayo, Bermejo, Salado, Dulce e Paraguay. Com a exceção do Paraguay, esses rios são todos alóctones com suas

cabeceiras nos Andes. Esses rios atravessam o Chaco na direção oeste-leste até confluírem com os rios Paraguay e Paraná. Estes rios mantêm águas correntes apenas na temporada chuvosa. No resto do ano os canais perdem suas águas por infiltração (IRIONDO, 1993), principalmente nas regiões mais afastadas das cabeceiras, além disso, esses rios carregam grandes quantidades de sedimento que eventualmente enchem os canais fazendo com que os rios mudem seus cursos, formando grandes sistemas de leques aluviais.

Historicamente o Chaco tem sido associado com baixa diversidade e endemismos (VANZOLINI, 1963). Porém, até agora ao redor de 100 espécies de anuros foram registradas no Chaco, sendo 21 espécies e dois gêneros endêmicos (TNC *et al.*, 2005). Entre estes habitantes do Chaco o gênero *Lepidobatrachus* é um interessante modelo para o estudo e o teste de hipóteses sobre possíveis promotores de diversificação neste bioma. Este gênero de ceratophryídeos contém três espécies (*Lepi. asper*, *Lepi. laevis*, and *Lepi. llanensis*) com distribuição geográfica restrita ao Chaco (FAIVOVICH *et al.*, 2014), que apresentam certas características que poderiam ser associadas à baixa vagilidade. Estas espécies, quando ativas, são quase totalmente aquáticas, habitando poças temporárias. Quando as poças estão secando, estes sapos se enterram no solo úmido e produzem um casulo de pele morta que os ajuda na proteção contra a dessecação durante o período de estivação (FAIVOVICH *et al.*, 2014). A baixa vagilidade faz deste gênero um candidato ideal para o estudo da diversificação no Chaco. Os ceratophryídeos têm diversificado em ambientes semiáridos (FAIVOVICH *et al.*, 2014) e *Lepidobatrachus* especificamente no Chaco, tendo assim uma longa história dentro deste bioma. Isso nos permite ter acesso à história antiga do Chaco. Outro habitante do Chaco, porém com uma história mais recente dentro do bioma e diferente história de vida é *Lept. bufonius*. Esta espécie é menos dependente de corpos d'água, utilizando-os apenas para a reprodução, e não se enterra durante o período seco do ano. O fato de ter uma história mais curta dentro do Chaco faz desta espécie um modelo interessante para estudar a história evolutiva mais recente do bioma, permitindo também comparar se espécies com biologias distintas são diferentemente influenciadas pelos fatores e eventos históricos que fazem parte da história do Chaco.

Esta tese está organizada em três capítulos que investigam desde os eventos e processos mais antigos até os mais recentes que têm atuado como promotores da diversificação das espécies do gênero *Lepidobatrachus* e da espécie *Lepto. bufonius*, assim propondo hipóteses sobre a diversificação no bioma Chaco. Os dois primeiros capítulos tratam sobre a diversificação do gênero *Lepidobatrachus*. No primeiro deles investigamos a estrutura genética e delimitamos o período de tempo de diversificação dentro do gênero, com o objetivo de correlacionar com eventos históricos que poderiam ter influenciado na história evolutiva do gênero e gerar assim hipóteses sobre a diversificação no Chaco. No segundo capítulo aprofundamos nas hipóteses geradas no primeiro capítulo com o propósito de esclarecer os mecanismos que têm gerado a diversidade atual dentro de *Lepidobatrachus*, assim como também testamos com maior robustez as possíveis barreiras de dispersão e a influência dos rios na estrutura genética das diferentes espécies do gênero. No último capítulo focamos na história mais recente do Chaco, investigando a estrutura genética e a demografia histórica da espécie de ampla distribuição *Lepto. bufonius*.

REFERÊNCIAS

- Adamoli, J., Sennhauser, E., Acero, J.M. & Rescia, A. (1990) Stress and disturbance: vegetation dynamics in the Dry Chaco region of Argentina. *Journal of Biogeography*, **17**, 491–500.
- Bucher, E.H. (1982) Chaco and Caatinga – South American arid savannahs, woodland and thickets. In: *Ecology of Tropical Savannahs*. Huntley, B.J. & Walker, B.H. (eds.). Ecological Studies, 42, 48–79. Springer-Verlag, New York.
- Cabrera, A.L. & Willink, A. (1973) *Biogeografía de América Latina*. Monografía 13, Serie de Biología. OEA, Washington D. C.
- Candela A.M., Bonini, R. & Noriega, J.I. (2012) First continental vertebrates from the marine Paraná Formation (late Miocene, Mesopotamia, Argentina): chronology, biogeography and palaeoenvironments. *Geobios*, **45**, 515–526.
- Cosacov, A., Sérsic, A.N., Sosa, V., Johnson, L.A. & Cocucci, A.A. (2010) Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography*, **37**, 1463–1477.
- Duellman, W.E. (1999) Distribution patterns of amphibians in South America W. E. Duellman, editor. *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective*. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Faivovich, J., Nicoli, L., Blotto, B.L., Pereyra, M.O., Baldo, D., Barrionuevo, J.S., Fabrezi, M., Wild, E.R. & Haddad, C.F.B. (2014) Big, bad, and beautiful: phylogenetic relationships of the Horned Frogs (Anura: Ceratophryidae). *South American Journal of Herpetology*, **9**, 207–227.
- Garda, A.A. & Cannatella D.C. (2007) Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 104–114.
- Hernandez, R.M., Jordan, T.E., Farjat, A.D., Echavarria, L., Idleman, B.D. & Reynolds, J.H. (2005) Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in southern Bolivia and Argentina. *Journal of South American Earth Sciences*, **19**, 495–512.

- Iriondo, M. (1993) Geomorphology and late quaternary of the Chaco (South America). *Geomorphology*, 7, 289–303.
- Morando, M., Medina, C.D., Avila, L.J., Perez, C.H.F., Buxton, A. & Sites Jr., J.W. (2014) Molecular phylogeny of the New World gecko genus *Homonota* (Squamata: Phyllodactylidae). *Zoologica Scripta*, 43, 249–260.
- Nores, M. (2004) The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13: 149–161.
- Ortiz-Jaureguizar, E. & Cladera, G.A. (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*, 66, 498–532.
- Ottone, E.G., Reinarte Mazurier, S.M.E. & Salinas, A. (2013) Palinomorfos Miocenos del subsuelo de Santiago del Estero, Argentina. *Ameghiniana*, 50(5), 509–521.
- Pennington, R.T., Prado, D.E. & Pendry, C.A. (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27, 261–273.
- Rizzini, C.T. (1979) *Tratado de fitogeografia do Brasil*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 508–513.
- Schmidt, K.P. & Inger R.F. (1951) Amphibians and reptiles of the Hopkins-Branner expedition to Brazil. *Fieldiana Zoology*, 31 (42), 439–465.
- TNC, FVSA, WCS & DesdelChaco (2005) *Evaluación ecoregional del Gran Chaco Americano*. The Nature Conservancy (TNC), Fundación Vida Silvestre Argentina (FVSA), Wildlife Conservation Society (WCS) & Fundación para el Desarrollo Sustentable del Chaco (DeSdel Chaco), Buenos Aires.

- 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.
- Vanzolini, P.E. (1963) Problemas faunísticos do Cerrado. In: simpósio sobre o Cerrado. S. Paulo 13, 147.
- Werneck, F. (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30, 1630–1648.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) Identificamos certo grau de estruturação genética nas espécies do gênero *Lepidobatrachus* que pode estar relacionado a algumas quebras ao longo da paisagem. *Lepi. llanensis* foi a espécie que apresentou maior estruturação.
- 2) A principal quebra identificada corresponde a uma área extremamente árida localizada no centro do Chaco que estaria atuando como uma barreira climática para as populações de *Lepi. llanensis*, resultando na distribuição disjunta desta espécie. Não encontramos evidência de migrações entre as populações do norte e sul dessa barreira desde a sua separação no Pleistoceno médio.
- 3) Os rios Pilcomayo e Bermejo influenciaram mais na estrutura genética de *Lepi. llanensis* do que na de *Lepi. laevis* que poderia estar associado ao fato de *Lepi. llanensis* ter um tempo de persistência bem maior na área de influência desses rios. Devido a sua dinâmica histórica, esses rios alóctones promoveram eventos vicariantes curtos e intermitentes permitindo conexões temporais entre as populações de ambas margens desses rios.
- 4) De acordo com nossas datações, o gênero *Lepidobatrachus* diversificou-se entre o Mioceno médio e o Mioceno superior. Os principais eventos associados a esse período são as introgressões marinhas e as mudanças climáticas do Mioceno superior.
- 5) Durante as introgressões marinhas do Mioceno médio as antigas formações continentais estáveis (arcos estruturais e crátons) poderiam ter atuado como refúgios isolando populações do *Lepidobatrachus* ancestral dando origem as diferentes espécies do gênero.
- 6) As mudanças climáticas do Mioceno superior favoreceram a expansão de áreas abertas, levando à fragmentação do habitat florestal que as espécies do gênero *Lepidobatrachus* estão associadas. Esta fragmentação, ao igual que as introgressões marinhas, poderia ter provocado o isolamento de populações em áreas florestadas levando à divergência destas espécies.

7) A baixa estrutura genética apresentada por *Leptodactylus bufonius* já foi registrada para espécies de anuros de outros ambientes áridos e semiáridos do mundo e poderia ser o resultado da combinação de eventos de expansão recente e de um constante fluxo gênico entre as populações.

9) Os eventos de expansão estariam relacionados aos períodos interglaciais das principais glaciações Pleistocênicas. Essas glaciações tiveram uma forte influência na distribuição do Chaco, principalmente ao sul deste bioma devido a expansões da Estepa Patagônica e à formação de corredores de extrema aridez desde a costa atlântica até a base dos Andes.

10) O fluxo gênico em *Lept. bufonius* segue um modelo de “stepping-stone” com alto grau de dispersão entre populações próximas, permitindo assim uma alta conectividade, inclusive entre populações distantes.