

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/05/2020.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

**REVISÃO TAXONÔMICA E ESTUDO FILOGENÉTICO
DA SÉRIE DE *ISCHNOCNEMA GUENTHERI* (ANURA:
BRACHYCEPHALIDAE)**

PEDRO PAULO GOULART TAUCCE

RIO CLARO – SP

2018



PEDRO PAULO GOULART TAUCCE

**REVISÃO TAXONÔMICA E ESTUDO FILOGENÉTICO DA SÉRIE DE
ISCHNOCNEMA GUENTHERI (ANURA: BRACHYCEPHALIDAE)**

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).

Orientador: Dr. Célio F. B. Haddad
Co-orientadora: Dra. Clarissa C. Canedo

RIO CLARO – SP

2018

597.8 Taucce, Pedro Paulo Goulart
T224r Revisão taxonômica e estudo filogenético da série de
Ischnocnema guentheri / Pedro Paulo Goulart Taucce. - Rio
Claro, 2018
249 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

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

1. Anuro. 2. Bioacústica. 3. Brachycephaloidea. 4.
Sistemática. 5. Taxonomia. 6. Terrarana. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

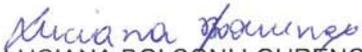
TÍTULO DA TESE: Revisão taxônômica e Estudo Filogenético da série de *Ischnocnema guentheri* (Anura: Brachycephalidae)

AUTOR: PEDRO PAULO GOULART TAUCCE
ORIENTADOR: CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
COORIENTADORA: CLARISSA COIMBRA CANEDO

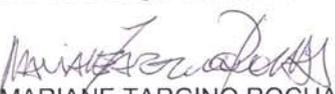
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO
Departamento de Biologia Celular / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Profª. Drª. MARIANE TARGINO ROCHA
Departamento de Zoologia / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Prof. Dr. DÉLIO PONTES BAÊTA DA COSTA
Departamento de Zoologia / Unesp/ Câmpus de Rio Claro



Prof. Dr. BORIS LEONARDO BLOTTO ACUNA
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

Rio Claro, 18 de maio de 2018

AVISO DE RESPONSABILIDADE NOMENCLATORAL

As alterações taxonômicas apresentadas neste documento, incluindo novos taxa, combinações e sinonímia, são rejeitadas como atos nomenclaturais e não estão disponíveis, de acordo com o Artigo 8.3 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.

NOMENCLATORAL DISCLAIMER

The taxonomic changes presented herein, including new taxa, combinations, and synonymy, are disclaimed as nomenclatural acts and are not available, in accordance with Article 8.3 of the International Code of Zoological Nomenclature.

Dedico esta tese aos meus familiares, professores, amigos, e aos sapos, todos partes importantes de mim e partes essenciais na confecção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Célio F. B. Haddad, pelos seus ensinamentos, pelas saudáveis conversas acerca da tese, por ter aberto as portas do seu laboratório e por ter atendido tão prontamente às minhas necessidades acadêmicas ao longo desses mais de quatro anos. Obrigado também pela confiança depositada, pelos momentos de descontração e pelo exemplo.

À minha co-orientadora, Profª. Clarissa Canedo, pelos ensinamentos, pelas conversas e pelos conselhos (talvez ela não saiba que foi graças a um desses conselhos que eu resolvi pedir uma bolsa para sair do país). Também por ter confiado a mim a responsabilidade de defender uma tese com um tema que eu sei que ela tanto gosta. Obrigado por ter sido presente, mesmo com todos os problemas que um cenário político como o atual acarreta para as universidades e o claro impacto desse cenário na sua instituição, a UERJ. **#UERJresiste!**

Ao Prof. Michael J. Hickerson, por ter me recebido em seu laboratório na City College of New York, Nova Iorque, NY, USA de portas abertas e ter me proporcionado o conhecimento e a estrutura necessários para que eu pudesse lidar com um problema tão novo na minha vida acadêmica. Agradeço também pelos inúmeros *Happy Hours* e por ter me apresentado um pouco da música folclórica estadunidense e de várias outras partes do globo.

Aos funcionários da UNESP, principalmente os da Seção Técnica de Pós-Graduação, sem os quais seguramente esta tese não poderia ter sido concluída.

Às agências de fomento que me proporcionaram a bolsa de doutorado e auxílios financeiros para pesquisa. No primeiro ano minha bolsa foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo **165852/2013-5** e no restante do doutorado pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em convênio com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) processos **FAPESP 2014/05772-4** e **FAPESP (BEPE) 2016/22450-6**. Outros auxílios foram proporcionados pelo projeto temático **FAPESP 2013/50741-7**, ao qual meu projeto de doutorado é vinculado.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pelas licenças de coleta concedidas.

Aos curadores e técnicos por terem me recebido sempre de portas abertas nas coleções as quais são os responsáveis e por terem fornecido a ajuda e a estrutura necessárias para que eu pudesse trabalhar. Também aos amigos que ajudaram nas saídas de campo e com as

análises. Existe um agradecimento individualizado a cada um de vocês em cada capítulo da tese.

Um agradecimento especial a Mariana Lyra, que desde o princípio me ajudou com a parte molecular deste trabalho, e me ensinou um montão! Fico feliz que essa parceria vai resultar em alguns trabalhos. Muito obrigado! Aproveito para agradecer ao centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS, UNESP) por permitir o uso de suas dependências para as reações moleculares necessárias para a confecção desta tese e à Macrogen pelas reações de sequenciamento.

Ao Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao CIPRES Science Gateway (www.phylo.org) pelos recursos computacionais disponibilizados para as análises moleculares. Sem este apoio seguramente esta tese demoraria muito mais pra ficar pronta.

Aos colegas do Laboratório de Herpetologia da UNESP pela amizade, pelos momentos de descontração, por terem ouvido meus lamentos e por sempre estarem dispostos a ajudar. Infelizmente a maioria das pessoas está apenas de passagem por este laboratório, assim como eu, mas ficam em nossas lembranças os bons momentos, as parcerias e a saudade!

Aos colegas do Hickerlab, do Departamento de Biologia da CCNY e do American Museum of Natural History, pelos momentos agradáveis, os passeios, as reuniões semanais, as conversas e por me apresentarem um mundo onde eu nunca havia estado. No começo foi muito difícil, mas vocês tornaram essa jornada muito mais simples e agradável. Obrigado!

A todos os amigos que moraram comigo por terem me aguentado por tanto tempo, alguns por anos até! Desculpa qualquer coisa! Obrigado também aos amigos que fiz nessa Rio Claro e aos que tenho carregado ao longo destes anos! A vida é muito melhor com vocês!

Aos meus pais, Pedro Paulo e Zezé, meu irmão, João e minha cunhada, Mirella: obrigado pelo amor, pela dedicação e pelos excelentes momentos que temos passado ao longo de todos esses anos.

“A saudade é uma estrada longa
Nem é boa e nem é ruim
Vou seguindo sempre adiante
Nunca volto,
Eu sou mesmo assim”.

(Almir Sater e Paulo Simões)

RESUMO

O gênero *Ischnocnema* compreende 33 espécies divididas em quatro séries. Dentre elas, a série de *I. guentheri* conta com 10 espécies que se distribuem principalmente pela Mata Atlântica brasileira. Dentro desta série, algumas espécies têm status taxonômico bastante complexo e sua posição filogenética, mesmo tendo sido testada de maneira robusta, tem se mostrado bastante instável. Assim, o presente trabalho faz uma revisão taxonômica dos membros da série de *I. guentheri* baseando-se em dados bioacústicos, morfológicos e moleculares, além de testar o monofiletismo da série de *I. guentheri* como hoje é conhecida. Como resultado, são descritas duas espécies relacionadas a *I. oea* dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo e duas espécies relacionadas a *I. venancioi* e *I. hoehnei* dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro com base em dados morfológicos, bioacústicos e moleculares. O posicionamento filogenético dessas espécies também é inferido utilizando-se marcadores moleculares, e um novo arranjo de séries dentro do gênero é proposto. Além disso, dados de sequenciamento de alto rendimento aliados a dados bioacústicos revelam que, como suspeitado anteriormente, há pelo menos seis espécies diferentes sendo tratadas sob o nome de *I. guentheri* ou *I. henselii*. Estas espécies, apesar de serem morfológicamente indistinguíveis entre si, são linhagens que possuem fluxo gênico nulo ou muito pequeno. Por fim, o genoma mitocondrial de cinco espécies de *Ischnocnema* da série de *I. guentheri* é construído utilizando-se os dados crus do sequenciamento de alto rendimento.

Palavras-chave: Bioacústica, Brachycephaloidea, Sistemática, Taxonomia, Terrarana.

ABSTRACT

The *Ischnocnema* genus comprises 33 species divided into four series. Among them, the *I. guentheri* series houses 10 species distributed mainly through the Brazilian Atlantic Forest. This phylogenetic position of this species series, even though it has been robustly tested, has been shown to be quite unstable and some of its species have a very complex taxonomic status. Thus, in the present thesis we make a careful taxonomic review of the members of the *I. guentheri* series based on bioacoustic, morphological and molecular data, and to test its monophyly as it is known today. We describe two species related to *I. oea* from the states of Minas Gerais and Espírito Santo and two species related to *I. venancioi* and *I. hoehnei* from the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro based on morphological, bioacoustic, and molecular data. We also propose a new phylogenetic hypothesis for *Ischnocnema* using molecular markers, and based on this hypothesis we propose a new arrangement of species series. In addition, high-throughput sequencing coupled with bioacoustic data reveal that, as previously suspected, there are at least six different species being treated under the names *I. guentheri* or *I. henselii*. These species, although morphologically indistinguishable from each other, are lineages that show no or very little gene flow. Finally, we construct the mitochondrial genome of five *Ischnocnema* species from the *I. guentheri* series using raw high-throughput sequencing data.

Keywords: Bioacoustics, Brachycephaloidea, Sistematics, Taxonomy, Terrarana.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	13
Histórico Taxonômico	13
Literatura citada	17
Two New Species of <i>Ischnocnema</i> Reinhardt & Lütken, 1862 (Anura: Brachycephalidae) from Southeastern Brazil and their Phylogenetic Position within the <i>I. guentheri</i> Series	20
Material and Methods	24
Taxon and Gene Sampling	24
Laboratory Procedures	24
Alignment, Partition Schemes, and Nucleotide Substitution Model Selection.....	25
Genetic Distance and Phylogenetic Analyses	25
Morphological Analyses	26
Call Analyses.....	27
Results.....	28
Alignment, Partition Schemes, and Nucleotide Substitution Model Selection.....	28
Genetic Distance and Phylogenetic Analyses	29
Morphological Analyses	29
Call Analyses.....	30
Species Accounts.....	30
Discussion.....	48
Tree Topology and Genetic Distance.....	49
The <i>Ischnocnema guentheri</i> Series	50
Literature Cited	53
Appendix I	62
Appendix II.....	64
Appendix III.....	65
Appendix IV	67
Molecular phylogeny of <i>Ischnocnema</i> (Anura: Brachycephalidae) with the redefinition of its series and the description of two new species	84
Introduction.....	86
Material and Methods	90
Taxon and Gene Sampling	90
Laboratory procedures.....	91
Molecular analyses.....	91
Morphological analyses.....	93

Call analyses.....	94
Results.....	95
Molecular analyses.....	95
Morphological analyses.....	97
Call analyses.....	98
Taxonomic accounts.....	99
Discussion.....	132
Phylogenetic relationships.....	132
Systematics within <i>Ischnocnema</i>	134
The nuptial pad.....	135
Conclusions.....	137
References.....	139
Appendix A	170
Appendix B.....	173
Appendix C.....	176
Species limits within the <i>Ischnocnema guentheri</i> species complex (Anura: Brachycephalidae) revealed by an integrative approach using high-throughput sequencing	178
Introduction.....	182
Material and Methods	184
Taxon sampling, species hypothesis, and species recognition.....	184
Laboratory procedures.....	185
Phylogenetic analyses	185
Gene Flow Inference	187
Phenotypic analyses	188
Results.....	191
Species Tree Analyses.....	191
Gene Flow Inference	192
Phenotypic analyses	193
Discussion.....	195
Tree topologies.....	195
Species limits within the <i>Ischnocnema guentheri</i> complex	196
Comments about the taxonomic status of <i>Elosia divisa</i> Wandolleck, 1907 and <i>Hylodes nasutus</i> Lutz, 1925	198
Conclusions.....	200
References.....	202
Appendix A	228
Appendix B.....	233
Appendix C.....	235

The mitochondrial genomes of five frog species of the Neotropical genus <i>Ischnocnema</i> (Anura: Brachycephaloidea: Brachycephalidae).....	237
References.....	241
Supplemental Online Material	246
Conclusões Gerais	248

INTRODUÇÃO GERAL

A superfamília Brachycephaloidea Günther, 1858 compreende mais de 1000 espécies (FROST, 2018) de anfíbios anuros neotropicais de desenvolvimento direto e representa boa parte da diversidade dos anfíbios atuais. A taxonomia desta superfamília tem sido bastante discutida nos últimos anos e seu conteúdo pode variar de três (PADIAL; GRANT; FROST, 2014) a cinco famílias (HEINICKE *et al.*, 2018) dependendo do autor. Apesar das diferentes classificações, a validade da família Brachycephalidae Günther, 1858 é senso comum entre os autores e inclui os gêneros *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 e *Ischnocnema* Reinhardt e Lütken, 1862.

O gênero *Ischnocnema* atualmente compreende 33 espécies divididas nas séries de *I. guentheri*, *I. lactea*, *I. parva* e *I. verrucosa* (CANEDO; HADDAD, 2012; PADIAL; GRANT; FROST, 2014). Dentre estas, a série de *I. guentheri* contém 10 espécies: *I. epipeda* (Heyer, 1984), *I. erythromera*, (Heyer, 1984), *I. gualteri* (B. Lutz, 1974), *I. guentheri* (Steindachner, 1864), *I. henselii* (Peters, 1870), *I. hoehnei* (B. Lutz, 1958), *I. izecksohni* (Caramaschi e Kisteumacher, 1989), *I. nasuta* (A. Lutz, 1925), *I. oea* (Heyer, 1984) e *I. venancioi* (B. Lutz, 1958). As espécies da série de *I. guentheri* se distribuem pela Mata Atlântica brasileira, sendo que *I. henselii* chega até a província de Misiones, na Argentina (GEHARA *et al.*, 2013; HEDGES; DUELLMAN; HEINICKE, 2008). Até pouco tempo, *Ischnocnema* era sinônimo júnior do gênero *Eleutherodactylus* Duméril e Bibron, 1841 (CARAMASCHI; CANEDO, 2006) e muito tem se discutido sobre a taxonomia e sobre a posição filogenética do gênero, bem como da série de *I. guentheri* e seus membros nos últimos anos.

HISTÓRICO TAXONÔMICO

Os *Eleutherodactylus* da Mata Atlântica brasileira (hoje pertencentes a três gêneros, incluindo *Ischnocnema*) eram divididos em quatro grupos taxonômicos baseados na morfologia dos dedos e na pele do ventre (LYNCH, 1976). Dentre estes grupos, o de *E. binotatus* continha seis espécies (três delas na atual série de *I. guentheri*): *E. binotatus* (Spix, 1824), *E. gualteri*, *E. guentheri*, *E. nasutus*, *E. octavioi* Bokermann, 1965 e *E. plicifer* (Boulenger, 1888).

Alguns anos mais tarde, o grupo de *E. guentheri* foi criado (no original em inglês foi chamado de “cluster” de *E. guentheri*) para alocar uma parte dos membros do grupo de *E.*

binotatus (HEYER, 1984). Apesar desta hipótese não ter sido testada, o grupo foi considerado como sendo um arranjo natural dentro do grupo de *E. binotatus*. O grupo de *E. guentheri* continha seis espécies, todas na atual série de *I. guentheri*: *E. epipedus*, *E. erythromerus*, *E. gualteri*, *E. guentheri*, *E. nasutus* e *E. oeus*.

Depois de algum tempo foi criado o subgênero *Eleutherodactylus*, que foi dividido em cinco séries de espécies (LYNCH; DUELLMAN, 1997). Uma destas séries era a de *E. binotatus*, que continha o grupo de *E. binotatus* (*sensu* HEYER, 1984) e outros três grupos, totalizando 19 espécies, a maioria da Mata Atlântica brasileira. Ao grupo de *E. binotatus* ainda foram adicionados *E. heterodactylus* (Miranda-Ribeiro, 1937), *E. hoehnei*, *E. izecksohni* (Caramaschi e Kisteumacher, 1989) e *E. juipoca* (Sazima e Cardoso, 1978).

Até recentemente, o gênero *Ischnocnema* possuía apenas uma espécie na Mata Atlântica, *I. verrucosa* (Reinhardt e Lütken, 1862), e as outras cinco espécies do gênero habitavam os Andes e regiões vizinhas (PADIAL *et al.*, 2005). Porém, características osteológicas presentes em *I. verrucosa*, espécie tipo do gênero, fizeram com que o gênero *Ischnocnema* fosse colocado na sinonímia de *Eleutherodactylus* (onde a maioria dos Brachycephaloidea se encontrava na época) e o gênero *Oreobates* Jiménez-de-la-Espada, 1872 fosse revalidado para alocar as outras cinco espécies andinas. Porém, logo um estudo filogenético incluindo diversas espécies de *Eleutherodactylus* (HEINICKE; DUELLMAN; HEDGES, 2007) foi realizado, e o gênero *Ischnocnema* foi revalidado para alocar a maioria das espécies de *Eleutherodactylus* da Mata Atlântica brasileira.

Posteriormente foi feita uma nova classificação baseada em um extensivo estudo filogenético abrangendo inúmeras espécies de anuros do novo mundo que possuíam desenvolvimento direto (atualmente Brachycephaloidea) e *Ischnocnema* foi dividido em cinco séries de espécies, uma delas sendo a série de *I. guentheri* (HEDGES; DUELLMAN; HEINICKE, 2008). Este táxon continha 11 espécies, muitas delas presentes no grupo de *E. guentheri* de classificações anteriores, porém com algumas novidades. São elas: *I. epipeda*, *I. erythromera*, *I. gualteri*, *I. guentheri*, *I. henselii* (que havia sido recentemente retirada da sinonímia de *I. guentheri*; KWET; SOLÉ, 2005), *I. hoehnei*, *I. izecksohni*, *I. nasuta*, *I. octavioi*, *I. oea* e *I. vinhai*. Porém, logo em seguida, *I. octavioi* foi retirada da série de *I. guentheri* e realocada para a série de *I. verrucosa*, com base em características morfológicas (CANEDO *et al.*, 2010).

Uma nova hipótese filogenética, abrangendo diversas espécies de Brachycephaloidea e contando com a maioria das espécies de *Ischnocnema* descritas até então (aproximadamente 80 %), foi realizada e a série de *I. guentheri* sofreu algumas modificações (CANEDO;

HADDAD, 2012). Com base nos resultados da filogenia, *I. vinhai* foi realocada para o gênero *Pristimantis* Jiménez-de-la-Espada, 1870 e *I. venancioi*, anteriormente na série de *I. lactea* (HEDGES; DUELLMAN; HEINICKE, 2008), se tornou parte da série de *I. guentheri*. *Ischnocnema epipeda* e *I. gualteri* não foram testadas, mas com base em similaridades morfológicas foram mantidas na série de *I. guentheri*.

Além da intensa discussão acerca da posição filogenética e da taxonomia da série de *Ischnocnema guentheri* como um todo, o *status* taxonômico de algumas espécies dentro da série tem se mostrado complexo e isso gerou discussão na literatura. *Ischnocnema guentheri* foi considerada durante muito tempo uma espécie de ampla distribuição ao longo da Mata Atlântica (GEHARA *et al.*, 2013; HEYER, 1984). Sua localidade tipo é a Floresta da Tijuca, dentro da cidade do Rio de Janeiro, (HÄUPL; TIEDEMAN; GRILLITSH, 1994) e a espécie era considerada presente em mais seis estados brasileiros (HEYER, 1984): Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. A morfologia da espécie é similar ao longo de toda esta distribuição, mas *I. henselii* foi retirada da sinonímia de *I. guentheri* (KWET; SOLÉ, 2005) com base em bioacústica, posição em que havia sido colocada por estudos anteriores baseados em morfologia (COCHRAN, 1955; HEYER, 1984). Os cantos analisados no estudo que revalidou *I. henselii* eram oriundos dos estados de Santa Catarina, norte do Rio Grande do Sul e província de Misiones, Argentina, o que levou os autores a concluir que esta era a distribuição de *I. henselii*. No mesmo trabalho, também foram comparados cantos de populações de localidades distintas atribuídas a *I. guentheri*. Devido à grande variação nesses cantos, os autores chegaram à conclusão de que *I. guentheri* era provavelmente um complexo de espécies. Mais tarde, um estudo utilizando dados moleculares e bioacústicos e envolvendo inúmeras populações de atribuídas a *I. guentheri* e *I. henselii* dentro da distribuição conhecida dessas espécies, concluiu algo um tanto surpreendente. *Ischnocnema guentheri*, uma espécie até então de distribuição bastante ampla, constituía uma única linhagem que estava restrita à Floresta da Tijuca, um fragmento de mata urbano com cerca de 12.500 ha (GEHARA *et al.*, 2013). Este mesmo estudo também concluiu que, além das duas espécies já descritas, o complexo de *I. guentheri* possuía pelo menos mais quatro espécies, sendo várias delas sintópicas, e que a distribuição de *I. henselii* se estende por pelo menos 600 km ao norte da distribuição até então conhecida para a espécie (chegando até o estado de São Paulo). Entretanto, o trabalho é concluído indicando a necessidade de uma revisão taxonômica e uma avaliação mais detalhada das espécies aparentemente novas para a ciência.

Ischnocnema izecksohni era considerada endêmica do Quadrilátero Ferrífero, porção sul da Cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais (LEITE; JUNCÁ; ETEROVICK, 2008). A espécie, descrita da cidade de Belo Horizonte, tem como espécie mais próxima *I. nasuta* (CARAMASCHI; KISTEUMACHER, 1989) e teve o canto descrito recentemente (TAUCCE *et al.*, 2012). Além disso, com base em morfologia e bioacústica, sua distribuição foi estendida para várias outras localidades no estado de Minas Gerais, todas na Serra da Mantiqueira. Devido às diferenças morfológicas subjetivas entre *I. izecksohni* e *I. nasuta*, também foi constatado que estas espécies poderiam ser sinônimos e mais dados deveriam ser levantados, principalmente com relação a *I. nasuta* em sua localidade tipo, Nova Friburgo, região serrana do estado do Rio de Janeiro (A. LUTZ, 1925), para que o *status* taxonômico dessas duas espécies fosse confirmado (TAUCCE *et al.*, 2012). Na árvore resultante do trabalho de Canedo e Haddad (2012), *I. nasuta* se mostrou parafilética com relação a *I. izecksohni*, porém não foi analisado material de Nova Friburgo, apenas de Minas Gerais e Espírito Santo. Além de toda informação presente na literatura, saídas de campo e visitas às coleções taxonômicas também revelaram espécies ainda não descritas pela ciência (P.P.G. Taucce, dados não publicados).

Tendo tudo isto em vista, o presente trabalho teve como objetivo testar o monofiletismo da série de *Ischnocnema guentheri* como hoje é conhecida, bem como seu relacionamento dentro do gênero *Ischnocnema*. Também se objetivou realizar uma cuidadosa revisão taxonômica dos membros da série de *I. guentheri*, utilizando três fontes de evidência principais: molecular, bioacústica e morfológica. Para isto, esta tese se divide em quatro capítulos. O primeiro deles trata de *I. oea* e duas novas espécies proximalmente relacionadas a ela, e do posicionamento filogenético deste clado dentro da série de *I. guentheri*. O segundo capítulo engloba uma filogenia para o gênero *Ischnocnema*, com a redefinição de suas séries de espécies e a descrição de duas novas espécies relacionadas a *I. hoehnei* e *I. venancioi*. O terceiro capítulo trata de *I. guentheri* e *I. henselii*, utilizando quase 400 marcadores moleculares oriundos de sequenciamento de alto rendimento, aliados a dados bioacústicos e morfológicos, para corroborar a suspeita de que na verdade estas duas espécies são um complexo de espécies morfológicamente crípticas. Este capítulo também trata da série tipo de *I. nasuta* e de *Elosia divisa* Wandolleck, 1907, um nome atualmente sob a sinonímia de *I. guentheri* (COCHRAN, 1955; HEYER, 1984; KWET; SOLÉ, 2005) e que pode ser revalidado. Por último, o quarto capítulo usa técnicas de bioinformática para construir os genomas mitocondriais de cinco espécies da série de *I. guentheri*, utilizando os dados crus do

sequenciamento de alto rendimento utilizado no capítulo anterior. Os capítulos foram formatados segundo modelo dos periódicos científicos os quais foram ou serão submetidos.

LITERATURA CITADA

- BOKERMANN, W. C. A. A new *Eleutherodactylus* from Southeastern Brazil. *Copeia*, v. 1965, n. 4, p. 440–441, 1965.
- BOULENGER, G. A. V. On some reptiles and batrachians from Iguarasse, Pernambuco. *Journal of Natural History Series 6*, v. 2, n. 7, p. 40–43, 1888.
- CANEDO, C. *et al.* New species of *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae) from the state of Minas Gerais, Southeastern Brazil, with comments on the *I. verrucosa* species series. *Copeia*, v. 2010, n. 4, p. 629–634, 2010.
- CANEDO, C.; HADDAD, C. F. B. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frog genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 65, n. 2, p. 610–620, 2012.
- CARAMASCHI, U.; CANEDO, C. Reassessment of the taxonomic status of the genera *Ischnocnema* Reinhardt and Lütken, 1862 and *Oreobates* Jiménez-de-la-Espada, 1872, with notes on the synonymy of *Leiuperus verrucosus* Reinhardt and Lütken, 1862 (Anura: Leptodactylidae). *Zootaxa*, v. 1116, p. 43–54, 2006.
- CARAMASCHI, U.; KISTEUMACHER, G. A new species of *Eleutherodactylus* (Anura : Leptodactylidae) from Minas Gerais , Southeastern Brazil. *Herpetologica*, v. 44, n. 4, p. 423–426, 1989.
- COCHRAN, D. M. Frogs of Southeastern Brazil. *Bulletin of the U.S. National Museum*, v. 206, p. 1–406, 1955.
- DUMERIL, A. M. C.; BIBRON, G. *Erpétologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles. Tome Huitième*. Paris: Librairie Encyclopedique de Roret, 1841.
- FITZINGER, L. J. F. J. *Neue classification der reptilien nach ihren natürlichen verwandtschaften : nebst einer verwandtschafts-tafel und einem verzeichnisse der reptilien-sammlung des K. K. zoologischen museum's zu Wien*. Wien : J. G. Heubner, 1826.
- FROST, D. R. *Amphibian species of the world: an online reference*. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 8 mar. 2018.
- GEHARA, M. *et al.* From widespread to microendemic: Molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conservation Genetics*, v. 14, n. 5, p. 973–982, 2013.

GÜNTHER, A. On the systematic arrangement of the tailless batrachians and the structure of *Rhinophrynus dorsalis*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, v. 26, n. 1, p. 339–352, 1858.

HÄUPL, M; TIEDEMAN, F; GRILLITSH, H. Katalog der Typen der Herpetologischen Sammlung nach dem Stand vom 1. Jänner 1994. Teil I: Amphibia. *Kataloge der Wissenschaftlichen Sammlungen des Naturhistorischen Museums in Wien*, v. 9, p. 1–42, 1994.

HEDGES, S. B.; DUELLMAN, W. E.; HEINICKE, M. P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, v. 1737, p. 1–182, 2008.

HEINICKE, M. P. *et al.* Phylogenomic support for evolutionary relationships of New World direct-developing frogs (Anura: Terraranae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 118,, p. 145–155, 2018.

HEINICKE, M. P.; DUELLMAN, W. E.; HEDGES, S. B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 24, p. 10092–10097, 2007.

HEYER, W. R. Variation, systematics, and zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and closely related species (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Smithonian Contributions to Zoology*, v. 402, p. 1–42, 1984.

JIMÉNEZ-DE-LA-ESPADA, M. Fauna neotropicalis species quaedam nondum cognitae. *Jornal de Ciências, Matemáticas, Physicas e Naturaes*, v. 3, p. 57–65, 1870.

JIMÉNEZ-DE-LA-ESPADA, M. Nuevos Batrácios Americanos. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural*, v. 1, p. 84–88, 1872.

KWET, A.; SOLÉ, M. Validation of *Hylodes henselii* Peters, 1870, from Southern Brazil and description of acoustic variation in *Eleutherodactylus guentheri* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, v. 39, n. 4, p. 521–532, 2005.

LEITE, F. S. F.; JUNCÁ, F. A.; ETEROVICK, P. C. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade*, v. 4, p. 158–176, 2008.

LUTZ, A. Batraciens du Brésil. *Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales*, v. 22, p. 211–214, 1925.

LUTZ, B. Anfíbios novos e raros das Serras Costeiras do Brasil: *Eleutherodactylus venancioi* n. sp., *E. hoehnei* n. sp., *Holoaden bradei* n. sp. e *H. lüderwaldti* Mir. Rib., 1920. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 56, n. 2, p. 372–389, 1958.

LUTZ, B. *Eleutherodactylus gualteri*, a new species from the Organ Mountains of Brazil. *Journal of Herpetology*, v. 8, n. 4, p. 293–295, 1974.

LYNCH, J. D. The species groups of South American frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *Occasional papers of the Museum of Natural History of the University of Kansas*, v. 61, p. 1–24, 1976.

- LYNCH, J. D.; DUELLMAN, W. E. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in western Ecuador biogeography. *Special Publication of the Natural History Museum, The University of Kansas*, v. 23, p. 1–236, 1997.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. Alguns batrachios novos das colleções do Museo Nacional. *O Campo*, v. 8, p. 66–69, 1937.
- PADIAL, J. M. *et al.* New species of *Ischnocnema* (Anura: Leptodactylidae) from the Andes of Bolivia. *Journal of Herpetology*, v. 39, n. 2, p. 186–191, 2005.
- PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, v. 3825, n. 1, p. 1, 26 jun. 2014.
- PETERS, W. C. H. Über neue Amphien (*Hemidactylus*, *Urosaura*, *Tropidolepisma*, *Geophis*, *Uriechis*, *Scaphiophis*, *Hoplocephalus*, *Rana*, *Entomoglossus*, *Cystignathus*, *Hylodes*, *Arthroleptis*, *Phyllobates*, *Cophomantis*) des Königlich Zoologisch Museum. *Monatsberichte der Königlich Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin*, v. 1870, p. 641–652, 1870.
- REINHARDT, J. T.; LÜTKEN, C. F. Bidrag til Kundskab om Brasiliens Padder og Krybdyr. Første Afdeling: Padderne og Öglerne. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kjøbenhavn*, v. 2, n. 3, p. 143–242, 1862.
- SAZIMA, I.; CARDOSO, A. J. Uma espécie nova de *Eleutherodactylus* do sudeste Brasileiro (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira Biologia*, v. 38, p. 921–925, 1978.
- SPIX, J. B. von. *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXVII–MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I.* München: F. S. Hübschmann, 1824.
- STEINDACHNER, F. Batrachologische Mittheilungen. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien*, v. 14, p. 239–288, 1864.
- TAUCCE, P. P. G. *et al.* The advertisement call, color patterns and distribution of *Ischnocnema izecksohni* (Caramaschi and Kisteumacher, 1989) (Anura, Brachycephalidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 52, n. 9, 2012.
- WANDOLLECK, B. Einige neue und weniger bekannte Batrachier von Brasilien. *Abhandlungen und Berichte des Zoologischen und Anthropologisch-Ethnographischen Museums zu Dresden*, v. 11, p. 1–15, 1907.

CONCLUSÕES GERAIS

- A série de *Ischnocnema guentheri* possui um clado que contém *I. oea* e duas novas espécies. Uma das novas espécies, *I. garciai*, é morfologicamente indistinguível de *I. oea* mas possui algumas características acústicas diagnósticas. Já *I. feioi* possui as características acústicas com algum nível de sobreposição com relação às de *I. oea*, mas sua morfologia difere bastante. O apêndice calcâneo mais alto que largo é uma sinapomorfia putativa para o grupo natural que corresponde às três espécies e o calo nupcial dos membros da série de *I. guentheri* parece possuir importantes características morfológicas que explicam a relação próxima entre esta série e a série de *I. parva*.
- A família Brachycephalidae e os gêneros *Brachycephalus* e *Ischnocnema* são arranjos monofiléticos e possuem alto suporte. Estes relacionamentos são recorrentes na literatura e é provável que se mantenham estáveis em análises futuras. Apesar do monofiletismo de *Ischnocnema* e de algumas de suas séries de espécies, alguns relacionamentos dentro do gênero são pouco suportados e outros se mostram instáveis quando analisados sob critérios de otimização distintos. Para que esses relacionamentos possam ser mais bem entendidos, é essencial que espécies cujas posições filogenéticas ainda não foram testadas, bem como novos marcadores moleculares, sejam adicionados à matriz.
- *Ischnocnema nanahallux* se mostrou fora da série de *I. parva*, como espécie irmã dos membros das séries de *I. guentheri*, *I. parva* e *I. venancioi*. Embora este relacionamento contrarie o senso comum devido a semelhança morfológica geral entre *I. nanahallux* e os membros da série de *I. parva*, o calo nupcial grande, conspicuo e glandular parece ser uma sinapomorfia do clado composto pelas séries de *I. guentheri*, *I. venancioi* e *I. parva*, estando ausente em *I. nanahallux*. A recém-proposta série de *I. venancioi* conta com a espécie que dá nome à série, *I. hoehnei* e pelo menos mais duas novas espécies.
- Nossa análise com 388 fragmentos de genes mostrou que as seis espécies do complexo de *Ischnocnema guentheri* e também as populações do norte e do sul dentro de *I. henselii* e *I. sp. CS1* possuem uma estruturação genética bastante forte, além de quase não possuírem fluxo gênico entre as linhagens. Mesmo uma análise tão robusta e com tantos marcadores moleculares não foi capaz de posicionar uma das espécies candidatas de maneira definitiva e a posição filogenética de *I. sp. CS3* ainda é incerta. Isso pode ter ocorrido devido à rápida diversificação de algumas espécies dentro do complexo de *I. guentheri*. A morfologia não se mostrou eficaz na separação das linhagens, mas características bioacústicas foram capazes de separar as espécies putativas do complexo de *I. guentheri*. Apesar de nem todas as espécies possuírem características acústicas

diagnósticas que as separem de todas as outras espécies sem sobreposição, as espécies irmãs são acusticamente diagnosticáveis. Os resultados acústicos e genéticos indicam que cada uma das seis espécies putativas no complexo é uma linhagem que evoluiu separadamente. Porém, recomenda-se cautela acerca das decisões taxonômicas a serem tomadas, pois há nomes disponíveis (um ou dois, dependendo da decisão tomada) para algumas das espécies candidatas.

- Os genomas mitocondriais de *Ischnocnema erythromera*, *I. guentheri*, *I. henselii*, *I. nasuta* e *I. oea* estão de acordo com os mitogenomas encontrados para a maioria dos Neobatrachia sequenciados até agora. Além disso, as relações filogenéticas recuperadas a partir desses dados são consistentes com hipóteses filogenéticas anteriores, com *I. erythromera* como grupo irmão do clado composto pelas outras espécies e *I. guentheri* intimamente relacionada a *I. henselii*.