

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Programa de Pós-Graduação em Genética

**Filogeografia de *Bokermannohyla saxicola* (Bokermann, 1964),  
anuro endêmico da Cadeia do Espinhaço**

Autor: Augusto Cesar Alves do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos

Belo Horizonte,

2013

Augusto Cesar Alves do Nascimento

**Filogeografia de *Bokermannohyla saxicola*  
(Bokermann, 1964), anuro endêmico da Cadeia do  
Espinhaço**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

Nascimento, Augusto Cesar Alves do.

Filogeografia de *Bokermannohyla saxicola* (Bokermann, 1964), anuro endêmico da Cadeia do Espinhaço. [manuscrito] / Augusto Cesar Alves do Nascimento. – 2013.

62 f. : il. ; 29,5 cm

Orientador: Fabrício Rodrigues dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Genética de populações - Teses. 2. Anfíbio – Espinhaço, Serra do (MG) – Teses. 3. Anfíbio – Teses. 4. Genética – Teses. 5. Herpetologia – Teses. 6. DNA mitocondrial. I. Santos, Fabrício Rodrigues dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. III. Título.

CDU: 575.17

## **AGRADECIMENTOS**

Meu muito obrigado a:

- meu orientador Fabrício Rodrigues dos Santos por ter me dado a oportunidade de participar dos projetos realizados por seu grupo de pesquisa.
- Anderson Vieira Chaves pela convivência e parceria em diversos projetos durante estes anos. Agradeço-o também pelo papel importante na realização deste projeto.
- aos colaboradores Felipe Leite e Paula Eterovick pela idéia do projeto, discussões sobre a realização do projeto e pelas amostras sem as quais este trabalho não poderia ser realizado.
- aos membros do Laboratório de Herpetologia da UFMG por serem sempre receptivos e dispostos a ajudar. Agradeço especialmente ao Hans e ao Fernando pela coleta de material biológico.
- todos os colegas do LBEM (passado e presente) por fazerem do laboratório um ótimo ambiente de convívio.
- aos colegas do LDGH e Genepop pela boa vizinhança e convivência.
- aos meus pais por garantirem todas as condições para que eu estudasse e por me incentivarem nesse caminho
- à CAPES pela bolsa concedida
- a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>Bokermannohyla saxicola</i> .....	10
1.2 Cadeia do Espinhaço e habitats de altitude .....	11
1.3 Diversidade e biogeografia dos anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço .....	12
1.4 DNA mitocondrial .....	13
1.5 Filogeografia .....	14
1.6 Filogeografia e genética da conservação de anfíbios.....	15
1.7 Hipóteses .....	17
2. OBJETIVOS.....	19
Artigo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Abstract .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Introduction.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Materials and methods .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Results .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Discussion .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Conclusion .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
References .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Supplementary Information.....	30
3 CONCLUSÕES .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Sample sites across the Espinhaço Range. The Southern Espinhaço region is indicated inside the dotted line. The continuous zone is delimited by black bars. The sample points in the marginal areas are circulated..... 46
- Figure 2. Bayesian phylogenetic tree of *B. saxicola* haplotypes. All nodes except the the Rio Preto sub-clade have posterior probability values above 0.99. Divergence dates are indicated with 95% CI in parenthesis..... 47
- Figure 3. Median joining haplotype network of the southern clade. Legend for the colors of locations are indicated in the map. Number of mutation events in branches with more than 1 mutation are indicated with red numbers..... 48
- Figure 4. Mantel test results. Correlation coefficient values and p-values for the null hypothesis of  $r \leq 0$  are indicated below the graphics. a)Entire southern clade. b)Continuous region ..... 49
- Figure 5. Barrier results. Voronoi tessellation and Dealuney triangulation superimposed to the sample map. The five barriers are identified by alphabetical order at the edges of each barrier. .... 50

## LISTA DE TABELAS

Table1 Primers used in the study.....	42
Table2 Sample size, estimates of haplotype (H) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), Tajima's D and Fu's Fs results for the sample sites with six or more individuals.....	43
Table3 Upper diagonal shows absolute distance values in Km. Lower diagonal shows pairwise $\Phi_{ST}$ values between sample sites with more than six individuals in the southern clade. Non-significant values are shown in bold .....	44
TableS1 Individuals used in the study. Localities and coordinates in decimal degrees are indicated. ....	51

## RESUMO

*Bokermannohyla saxicola* é uma espécie de anuro endêmica da porção mineira da Cadeia do Espinhaço, situada no leste brasileiro, onde habita regiões conhecidas como campos rupestres. Estes habitats encontrados geralmente acima de 1000 m de altitude apresentam afloramentos rochosos em meio a solos rasos e vegetação aberta, composta principalmente de gramíneas e arbustos. Os campos rupestres apresentam distribuição disjunta, sendo compostos de diferentes unidades separadas por áreas baixas de clima, solo e composição de espécies distinta. No entanto, ao sul da distribuição da espécie observa-se uma região relativamente contínua que vai da Serra do Cipó à Serra dos Ferreira. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a variabilidade genética e padrões de estruturação filogeográfica da espécie ao longo de sua distribuição geográfica, testando hipóteses de cunho histórico e ecológico. A partir do sequenciamento de 1001 pb do genoma mitocondrial, pertencentes aos genes Cytb (505 pb) e COI (496 pb), foram conduzidas análises filogenéticas, construção de redes de haplótipos, avaliação de estrutura populacional usando-se análises de  $\Phi$ ST, testes de isolamento por distância utilizando-se testes de Mantel, avaliação de diversidade genética dentro de populações e entre populações ao longo das diferentes áreas da distribuição e ainda testes de dinâmica demográfica ao longo da distribuição. Foram encontradas quatro linhagens mitocondriais principais na espécie. Estas se encontram separadas por milhões de anos entre si e apresentam alta correlação geográfica, restritas a unidades geográficas distintas separadas por áreas abaixo de 1000 m de altitude. O clado encontrado mais ao sul apresentou a maior extensão de distribuição, sendo representado pela maioria dos pontos amostrados. Dentro desta região observou-se uma maior diversidade genética na sua área mais central e contínua em relação às populações marginais. A área contínua apresentou também um alto índice de correlação entre distâncias genéticas e geográficas, quando comparado à região como um todo. Os testes de expansão populacional obtiveram resultados não significativos para a maioria das populações.



## ABSTRACT

*Bokermannohyla saxicola* is an endemic anuran species to the portion of the Espinhaço Range located at Minas Gerais State, in eastern Brazil. It is found in the areas above 1000m in the habitat known as Campos Rupestres. These regions present rocky outcrops with shallow soils and open vegetation comprised of grass and shrubby species. The habitat is composed of a series of units separated by lowlands that present distinct climate, soil and species composition. Nevertheless, in the southern part of the distribution there is a relatively continuous region ranging from Serra do Cipó to Serra do Ferreira. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and phylogeographical patterns in the species throughout its distribution, and test ecological and historic hypothesis. We sequenced 1001 bp from the mitochondrial genome belonging to the Cytb(505 bp) and COI(496 bp) genes. We conducted phylogenetic analysis, constructed haplotype networks, evaluated population structure using  $\Phi_{ST}$ , tested isolation by distance using Mantel tests, compared the genetic diversity between the continuous and marginal areas and evaluated the demographic dynamics along the species range. We found four main lineages in the species. These are separated by millions of years and present strong geographical correlation, being each of them restricted to distinct units separated by areas below 1000 m. The southernmost clade presented the largest distribution area and comprised most of the sample sites. In this region, the core areas present significantly greater diversity than the marginal areas. This continuous area also showed higher values of the correlation between genetic and geographic distances than the analysis of the full region. The tests for population expansion did not present significant results for most of the populations.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Bokermannohyla saxicola*

*Bokermannohyla saxicola* é uma espécie de anfíbio anuro pertencente à família Hylidae. A espécie foi originalmente descrita como *Hyla saxicola* (Bokermann, 1964). Devido a semelhanças morfológicas, foi sinonimizada com *Hyla pseudopseudis* por Lutz, que propôs a existência de duas subespécies: *Hyla pseudopseudis pseudopseudis* e *Hyla pseudopseudis saxicola* (Lutz, 1973). Posteriormente, os dois grupos foram novamente separados por Pombal e Caramaschi (Pombal & Caramaschi, 1995). Recentemente, Faivovich e colaboradores propuseram a criação do gênero *Bokermannohyla*, para o qual foram movidas ambas as espécies. Neste mesmo estudo, as espécies revelaram-se pertencente a um agrupamento monofilético dentro do gênero, que foi denominado Grupo *Bokermannohyla pseudopseudis* (Faivovich, *et al.*, 2005).

A espécie se encontra restrita à Cadeia do Espinhaço, se distribuindo da região centro-sul de Minas Gerais, no município de Barão de Cocais, até a divisa entre Minas Gerais e Bahia, em áreas acima de 1000 m de altitude. Sendo assim, a espécie é considerada endêmica da porção mineira da Cadeia do Espinhaço (Bokermann, 1964; Pombal & Caramaschi, 1995; Leite *et al.* 2008). Dentro dessa distribuição, a espécie habita áreas de vegetação aberta onde se encontram geralmente afloramentos rochosos quartzíticos conhecidas como campos rupestres, mas também matas de galeria (Leite *et al.*, 2008).

Os machos cantam em riachos permanentes, ou, mais raramente, em riachos temporários durante a estação chuvosa. As desovas são compostas de massas de aproximadamente 200 ovos que são presas a rochas nos riachos (Eterovick & Sazima, 2004). Os filhotes permanecem no estado de girino por pelo menos cinco meses, período em que habitam profundidades de 5 a 45 cm, entre a vegetação aquática no fundo rochoso de riachos (Eterovick & Sazima, 2004).

O *status* de conservação é considerado como de menor preocupação (“least concern”) (IUCN, 2011). No entanto, o habitat ocupado pela espécie se encontra sujeito a impactos causados por turismo e ocupação humana (Eterovick *et al.*, 2009).

## 1.2 Cadeia do Espinhaço e habitats de altitude

O Brasil apresenta apenas 17% de sua área ocupada por formações montanhosas. Dentre as formações geográficas de maior altitude presentes no território brasileiro, a Cadeia do Espinhaço é reconhecida como o cinturão orogênico mais extenso e que apresenta maior continuidade (UNESCO Biosphere Reserve Information, 2013)

O Espinhaço se encontra organizado no sentido norte-sul, desde a região centro-sul de Minas Gerais até a divisa entre o estado da Bahia e os estados de Piauí e Pernambuco. Apesar disso, a cadeia não se configura como totalmente contínua, pois se observa uma longa área de descontinuidade ao norte de Minas Gerais que a divide em dois principais segmentos, um localizado em Minas Gerais e outro no estado da Bahia (Almeida-abreu & Renger, 2002; UNESCO Biosphere Reserve Information, 2013).

Ao longo dos seus aproximadamente 1200 km de extensão, a formação compreende regiões de largura que varia de alguns quilômetros até 100 km. Ao longo de sua extensão também são observadas elevações de diferentes níveis atingindo até 2033 metros de altitude, o que propicia a ocorrência de uma grande variedade de condições climáticas e habitats (Almeida-abreu & Renger, 2002; UNESCO Biosphere Reserve Information, 2013).

A cadeia do Espinhaço ocupa áreas correspondentes a diferentes biomas ao longo de sua extensão como a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga. No entanto, o habitat predominante na região é o campo rupestre, que conjuntamente com os campos de altitude representam os habitats típicos da Cadeia do Espinhaço (UNESCO Biosphere Reserve Information, 2013).

Os campos rupestres e de altitude ocorrem principalmente nas regiões acima de 900m do leste brasileiro e são reconhecidos como importantes centros de endemismo da fauna e da flora neotropical (Benites et al., 2003; Jacobi et al., 2008; Rapini et al., 2008; Vasconcelos, 2011). Representam uma série de formações abertas e restritas a áreas frias (Heyer, 1999; Safford, 2007; Silva & Bates, 2002; Vasconcelos, 2011)

Estes ambientes de altitude vêm sendo classificados de maneiras diferentes desde o século XIX por diferentes pesquisadores, seja por sua composição florística e faunística, ou por sua constituição rochosa. Dentre as classificações, a de Ferri (1980) é a mais comumente citada pelos botânicos e fitogeógrafos (Vasconcelos, 2009). Nesta classificação os campos sobre afloramentos quartzíticos são considerados como “campos rupestres” e aqueles sobre rochas ígneas ou metamórficas são denominados de “campos de altitude”.

Suas comunidades vegetais são predominantemente herbáceo-arbustivas que variam em função do relevo, microclima, profundidade do solo e natureza do substrato, o que dá um caráter de mosaico a estes tipos de vegetação. Afloramentos rochosos e áreas brejosas também ocorrem nessas vegetações, que abrigam diversas espécies de plantas

típicas e endêmicas como bromélias, sempre-vivas, orquídeas, canelas-de-ema, além de taquaras e capins (Safford, 1999; Vasconcelos, 2009). Relativamente, pouco se conhece sobre a ecologia, biogeografia e a história do desenvolvimento dessas formações altimontanas.

### 1.3 Diversidade e biogeografia dos anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço

São conhecidas cerca de 105 espécies de anfíbios anuros de ocorrência na Cadeia do Espinhaço, sendo que a família Hylidae é a mais abundante, representando 48% das espécies encontradas. Os anfíbios anuros apresentam um alto grau de endemismo nesta região, sendo reconhecidas 28 espécies endêmicas, o que representa cerca de 30% da anurofauna regional. Essas espécies endêmicas encontram-se desigualmente distribuídas entre os estados de Minas Gerais e Bahia, de forma que a maior parte das espécies endêmicas é encontrada exclusivamente na porção mineira e apenas 5 espécies estão restritas à porção baiana. O gênero *Bokermannohyla* possui o maior número de espécies endêmicas, 7 no total (Leite et al., 2008).

A grande amplitude latitudinal e altitudinal, a localização na região tropical e a localização entre biomas distintos são provavelmente fatores importantes para se explicar a grande diversidade de anfíbios anuros na Cadeia do Espinhaço. Além disso, é importante ressaltar as relações históricas e ecológicas entre os habitats típicos da Cadeia e os biomas adjacentes, já que a fauna encontrada na região também apresenta alguns elementos típicos de Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Leite et al., 2008).

Apesar do *status* atual do conhecimento sobre os anfíbios anuros do Espinhaço não permitir uma análise refinada de padrões biogeográficos, algumas relações interessantes são observadas. Uma relação evidente é mostrada entre pares de espécies filogeneticamente próximas que estão separadas em diferentes porções da cadeia. Os pares de espécies *Bokermannohyla alvarengai/B. itapoty* e *B. saxicola/B. oxente* apresentam cada um, uma espécie endêmica do Espinhaço mineiro e outra endêmica da Chapada Diamantina (Lugli & Haddad, 2006). Isso sugere uma conexão entre as duas regiões no passado, havendo a hipótese que o processo de especiação teria sido gerado por um processo vicariante entre as duas regiões.

São também observados táxons como *Bokermannohyla martinsi* e *Scinax pinima*, cujos parentes mais próximos se encontram em formações no sul do Brasil e em outros países do sul da América Latina (Frost, 2007), e táxons de linhagens tipicamente da Mata Atlântica que são, provavelmente, espécies relictuais de períodos em que o Espinhaço encontrava-se inserido no bioma Mata Atlântica (Leite et al., 2008). Foi ainda sugerido que

as espécies endêmicas *Bokermannohyla saxicola* e *Hypsiboas cipoensis* teriam se originado em refúgios de vegetação aberta campestre em períodos com muita umidade, quando essas áreas foram isoladas por florestas (Colli, 2005).

#### 1.4 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) dos eucariotos remonta a uma linhagem de proteobactérias intracelulares vivendo em endossimbiose com uma célula pré-eucariótica há milhões de anos no passado. Atualmente o DNA mitocondrial de células animais é representado por aproximadamente 37 genes em um cromossomo circular de cerca de 17.000 pares de bases. Dois destes genes são transcritos em RNAs ribossomais, 22 especificam diferentes RNAs transportadores e apenas 13 codificam subunidades de proteínas envolvidas na geração de energia na forma de ATP. Além disso, existe uma região não codificadora relacionada à replicação do cromossomo mitocondrial e chamada de região controle. O genoma mitocondrial é altamente compacto, não ocorrendo íntrons nem extensas regiões intergênicas (Yang *et al.*, 2008).

Apesar de o genoma mitocondrial estar restrito do ponto de vista seletivo pela produção de enzimas necessárias a um processo tão importante como a respiração celular, o mtDNA animal apresenta altas taxas de substituição nucleotídica em relação ao genoma nuclear (Nabholz *et al.*, 2007). Isto se reflete em uma grande variação na sequência de nucleotídeos na maioria das espécies animais, o que é um pré-requisito importante para estudos evolutivos intraespecíficos (Avice., 2009).

Outra propriedade importante do mtDNA é a transmissão materna. Os gametas masculinos e femininos apresentam contribuições distintas para a formação do citoplasma do zigoto. Como a maior parte do citoplasma do zigoto é herdada do óvulo, somente uma pequena parte, senão nenhuma, das mitocôndrias paternas é herdada (Griffiths *et al.*, 2006). Portanto, o mtDNA tem herança uniparental e suas moléculas raramente, senão nunca, podem sofrer recombinação entre si, comportando-se efetivamente como um sistema haplóide e assexual (Hare, 2001).

Estas características têm um importante efeito quanto à dinâmica populacional das sequências mitocondriais quando comparadas ao DNA nuclear, por exemplo, no tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ). O  $N_e$  é uma medida que estima o número de indivíduos presente em uma população teórica que perderia diversidade por deriva genética equivalente à população real (Hartl, 2008). Este número é distinto do censo populacional e varia de acordo com o *locus* estudado. Isto ocorre devido ao fato de haverem diferenças tanto no número de sequências apresentados por indivíduo entre diferentes *loci* (haplóide ou diplóide) quanto

nas diferenças no modo de transmissão destes *loci* (Hartl, 2008). Uma população idealizada de espécie diplóide, dióica, com machos e fêmeas igualmente abundantes (de tamanho infinito) e com variância igual no sucesso reprodutivo possui *loci* mitocondriais com  $N_e$  quatro vezes menor do que *loci* nucleares. Isto significa que em um modelo de evolução neutra os *loci* mitocondriais sofrem um efeito quatro vezes maior da deriva genética, que leva, por exemplo, a uma divergência mais rápida entre linhagens isoladas (Hare, 2001).

## 1.5 Filogeografia

A maioria das espécies apresenta algum nível de estruturação populacional que pode ser interpretado em termos espaciais (geográficos) e cronológicos (históricos). Decifrar os componentes espaciais e temporais da estruturação populacional e interpretá-los de acordo com os fatores evolutivos e ecológicos são os principais objetivos da filogeografia (Beheregaray, 2008).

A filogeografia é um campo interdisciplinar que se utiliza da informação variável contida no genoma dos indivíduos, da distribuição geográfica destes e das variações temporais nos ambientes físicos e bióticos para decifrar a dinâmica evolutiva das linhagens genealógicas de seres vivos no espaço e no tempo, para entender os fatores que determinaram sua distribuição atual (Beheregaray, 2008). Estes estudos são usados especialmente para avaliar populações pertencentes a uma mesma espécie ou um complexo de espécies intimamente relacionadas (Avice *et al.*, 1987).

A partir de uma amostragem adequada de indivíduos ao longo de sua distribuição geográfica e do uso de marcadores moleculares apropriados, os estudos filogeográficos são capazes de testar hipóteses biogeográficas, detectar e datar o isolamento reprodutivo entre unidades populacionais e também inferir os processos responsáveis pela origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (Beheregaray, 2008). Devido ao fato de a estrutura populacional atual das linhagens filogenéticas ser influenciada pela história demográfica das populações, os estudos filogeográficos podem também fazer inferências sobre as mudanças no ambiente físico e biótico ao longo do tempo geológico usando dados genéticos atuais. Por esta razão, os estudos filogeográficos foram capazes de prover importantes informações a diferentes áreas de estudo. Estas contribuições são notadas, não somente em campos de estudos pertencentes à área biológica como a biogeografia histórica e especiação, evolução humana, biologia da conservação, taxonomia e paleoecologia, mas também em áreas das ciências da Terra como a paleoclimatologia (Beheregaray, 2008).

Até o ano de 2008, a maior parte dos estudos filogeográficos (81%) foi feita utilizando-se somente marcadores citoplasmáticos (mtDNA e cpDNA). Apesar disso, a

proporção de estudos baseados apenas em marcadores de herança uniparental caiu de aproximadamente 90% para 62% entre 1998 e 2008. Esta queda se deu, em parte, devido ao aumento dos estudos baseados em sequências nucleares desde os anos 1990. Além disso, houve mudanças quanto à combinação de marcadores utilizados. Até 2008, 89% dos estudos utilizaram-se apenas de um tipo de marcador. Mas se considerarmos apenas os últimos cinco anos deste período a frequência cai para 80%. Isto se deve ao aumento do número de estudos fazendo uso de mais de um tipo de marcador simultaneamente. Entre estes, a combinação mais frequente foi a de marcadores citoplasmáticos e sequências nucleares ou SNP's, que representam 10% de todos os estudos realizados de 2003 a 2008 (Beheregaray, 2008).

Desde os primeiros estudos nos anos 1980, e da cunhagem e definição do termo por *Avise et al.* em 1987, o campo tem apresentado crescimento exponencial medido pelo número crescente de artigos publicados a cada ano (Knowles, 2009). Apesar deste crescimento, existe uma representação desigual no que se refere à origem geográfica dos táxons estudados. Enquanto espécies pertencentes à América do Norte e à Europa são objetos de estudo de 61% dos artigos de filogeografia, a América do Sul, continente conhecido por conter talvez os biomas mais ricos em biodiversidade do mundo, responde por apenas 6,3% do total de artigos, ocupando a última posição entre os continentes ocupados por populações humanas (Beheregaray, 2008).

## **1.6 Filogeografia e genética da conservação de anfíbios**

Estudos filogeográficos utilizando o mtDNA, desde quando propostos há mais de 20 anos (*Avise et al.*, 1987), provaram ser uma ferramenta importante para avaliar influências históricas sobre a distribuição de plantas e animais, ajudando a revelar e desvendar uma série de processos biogeográficos que moldaram a distribuição da biodiversidade sobre o planeta (Beheregaray, 2008). Neste contexto, estudos filogeográficos em anfíbios anuros são particularmente interessantes devido a algumas características apresentadas pelo grupo como a grande diversidade, distribuição ampla por quase todos os continentes e facilidade de amostragem (Beebee, 2005).

Além destas características, destaca-se a baixa mobilidade geralmente apresentada pelas espécies de anuros e, conseqüentemente, alta filopatria. Isso faz com que as populações tendam a apresentar alto grau de estruturação geográfica, mesmo em curtas distâncias e retenham com alta resolução os sinais históricos que determinaram sua distribuição atual (Zeiset & Beebee, 2008). Logo, os anfíbios anuros se tornam um grupo importante para o entendimento da história dos biomas e regiões biogeográficas do planeta.

Sendo assim, o estudo filogeográfico de espécies de anuros pode ser uma ferramenta importante para se desvendar a biogeografia da Cadeia do Espinhaço, já que esta apresenta uma grande diversidade de espécies endêmicas de anuros, número este que tende a aumentar com novas espécies sendo descritas (Leite *et al.*, 2008). É importante ressaltar também a escassez de estudos genéticos feitos com espécies de anuros das regiões altas e de vegetação aberta do leste brasileiro (Eterovick *et al.*, 2009), quando comparados a estudos feitos em biomas como a Mata Atlântica (Carnaval & Bates, 2007; Carnaval *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009) e Cerrado (Prado *et al.*, 2012; Telles *et al.*, 2007).

Além disso, é importante ressaltar também a situação em que se encontra a conservação de anfíbios no presente momento. Sabe-se que este é atualmente um dos grupos de vertebrados mais ameaçados, o que se reflete nas altas taxas de declínios populacionais observadas ao redor do mundo. Várias hipóteses foram sugeridas nos últimos anos para explicar esse processo, como sensibilidade à poluição de habitats e o avanço do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* que causa a doença Chytridiomicose em anfíbios (Blastein *et al.*, 2011).

Neste contexto, os marcadores moleculares têm sido importantes para avaliar diversos parâmetros biológicos relevantes para a conservação. Medidas de tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ), por exemplo, são amplamente reconhecidas como indicadores de viabilidade populacionais melhores que o número absoluto (censo) de indivíduos de uma população, por estarem intimamente relacionados ao processo de perda de diversidade por deriva genética. Estudos genéticos podem também definir o grau de estruturação populacional e o grau de fluxo gênico em diferentes escalas geográficas. Portanto, dados genéticos são importantes para a delimitação de populações e da conexão existente entre estas. Estas mesmas ferramentas permitem a detecção de dispersão diferencial entre sexos e o nível de parentesco entre indivíduos em diferentes unidades de uma área de reprodução. Os marcadores moleculares podem também revelar processos de hibridização causados pela translocação de espécies e outras interferências humanas no habitat, que podem levar à descaracterização da população e perda de um dos fenótipos e/ou adaptações parentais. Outra importante contribuição da genética à conservação das espécies é a detecção de genes relacionados à adaptação ao meio e determinação da relação entre diversidade e plasticidade fenotípica, que podem determinar a capacidade de sobrevivência a mudanças climáticas e condições extremas atípicas (Beebee, 2005).

O conhecimento da distribuição da diversidade genética das espécies ao longo do Espinhaço pode levar a uma melhor compreensão das possíveis ameaças que mudanças climáticas ou outros fatores poderiam trazer para a diversidade e sobrevivência dessas populações. Logo, este conhecimento poderia ser usado para delinear estratégias de



conservação que considerem a persistência destas populações em diferentes cenários futuros.

## 1.7 Hipóteses

Considerando-se algumas características da distribuição populacional, tais como a continuidade e a área das massas de terra habitadas, bem como os efeitos prováveis das alterações climáticas passadas na configuração do meio ambiente no Brasil oriental, algumas hipóteses sobre a configuração histórica e atual da diversidade genética da espécie *B. saxicola* podem ser consideradas.

Primeiramente, consideramos questões ecológicas levantadas pela configuração das áreas elevadas do Espinhaço. Na sua região sul, a cadeia apresenta uma zona relativamente contínua, de grande área e acima de 1000 m de altitude, que vai desde a Serra do Cipó até a Serra do Ferreira. As outras áreas em que a espécie é encontrada são, em geral, mais estreitas, curtas e descontínuas. Estas áreas marginais também são separadas entre si por áreas baixas de hábitat distinto. Aqui se levanta a hipótese de que as regiões baixas funcionariam como barreiras para a dispersão da espécie. Se esta suposição for verdadeira, áreas separadas por regiões abaixo de 1000 m de altitude apresentariam linhagens distintas ou ao menos uma composição de haplótipos diferente, gerando altos valores de diferenciação genética.

Outra hipótese é de que a região relativamente contínua apresenta isolamento por distância, mas não a distribuição como um todo. Se isso for verdadeiro, a região contínua deverá apresentar correlação entre a distância geográfica e genética, enquanto a distribuição como um todo não apresentaria correlação, ou, pelo menos, um menor índice de correlação. Isto seria esperado se as áreas contínuas de Campos Rupestres se comportassem como unidades pan-míticas independentes.

Outra hipótese pode ser facilmente levantada a partir da anterior. As populações da região contínua maior pode apresentar uma maior área de habitat apropriado. Se as terras baixas são barreiras, supõe-se que as populações localizadas nas áreas contínuas apresentem maiores taxas de migração entre elas. Juntos, esses fatores levam á hipótese de que as populações localizadas na região contínua central apresentam níveis mais altos de diversidade genética quando comparadas com as áreas menores, isoladas ou marginais nas bordas da distribuição (Eckert et al, 2008;. Guo, 2012).

Consideramos também os possíveis efeitos das glaciações do Pleistoceno na conectividade entre áreas atualmente separadas. Análises palinológicas de sedimentos que datam da última glaciação, amostradas de áreas elevadas no sudeste do Brasil, mostram a

predominância de gramíneas até o final da última glaciação no limite Pleistoceno / Holoceno (Behling, 2002; Safford, 2007;. Barros et al, 2011). Junto com dados de toda a América do Sul, isso sugere um clima mais frio e seco durante a glaciação, tendendo a um clima mais quente rumo ao presente desde o início do Holoceno (11.400 anos atrás). Portanto, há uma forte evidência para a expansão dos habitats elevados de vegetação aberta durante a última glaciação. Essas áreas atualmente isoladas foram, neste período, provavelmente ligadas por ambientes semelhantes (Safford, 2007). Como é sabido que o período do Pleistoceno foi marcado por vários ciclos de glaciação, a alternância de cenários repetidos provavelmente forneceu muitas oportunidades para a dispersão, fluxo gênico e recolonização, assim como eventos de vicariância. Aqui nós testamos a hipótese de que a diferenciação entre populações de *B. saxicola* localizadas em unidades de habitats distintos ocorreu nos períodos interglaciais do Pleistoceno.

As mudanças climáticas levantam também questões sobre a estabilidade demográfica das populações. As áreas marginais da distribuição de uma espécie tendem a ter menos habitats adequados, podendo ser submetidas a um processo de frequente extinção e recolonização. A recolonização é muitas vezes feita por poucos indivíduos migratórios (efeito fundador) e é seguida, de um modo geral, por um evento de expansão populacional quando os indivíduos atingem o habitat apropriado. Por outro lado, as populações centrais ou de áreas contínuas maiores tendem a ter uma dimensão estável ao longo do tempo, determinada por sua capacidade de suporte. Dado o provável impacto climático nas áreas elevadas do Sudeste do Brasil durante e após a última glaciação, levantamos a hipótese de que algumas áreas podem ter sofrido um processo recente de colonização, ou recolonização, o que levaria a sinais de expansão demográfica.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivos gerais

O objetivo do estudo é descrever a distribuição da variabilidade genética e revelar padrões de estruturação geográfica da espécie *Bokermannohyla saxicola* a partir de dados de sequências provenientes do DNA mitocondrial, considerando seus componentes espaciais e temporais e testando hipóteses de cunho histórico e ecológico.

### Objetivos específicos

- Testar a hipótese de que diferentes unidades separadas por regiões baixas representam linhagens distintas.
- Testar a hipótese que as populações de diferentes unidades se separaram durante o período do Pleistoceno.
- Avaliar diferentes parâmetros de diversidade genética intrapopulacional e divergências interpopulacionais.
- Testar a diferenciação dos valores de diversidade genética entre a grande região contínua central e as regiões descontínuas marginais.
- Avaliar a presença de isolamento por distância.
- Testar a hipótese de expansão populacional em diferentes regiões ou demes.



Table1 Primers used in the study.

Primer	sequence (5' – 3')	References
<b>Cyt-b</b>		
CYTB2F	ATCTCATCATGATGAAACTTTGGCTC	
CB3-H	TAGCAATACACTACACMGC	(Palumbi, 1996)
<b>COI</b>		
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	(Folmer et al., 1994)
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	(Folmer et al., 1994)
Chmf4	TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG	(Che et al., 2012)
Chmr4	ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA	(Che et al., 2012)

Table2 Sample size, estimates of haplotype (H) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), Tajima's D and Fu's Fs results for the sample sites with six or more individuals

Sample site	Sample size	H	$\pi$	Tajima's D	p-value	FS	p-value	$\theta$
Ambrósio	20	0.6632	0.001935	-0.0604	0.525	0.60012	0.668	0.00289
Barão de Cocais	10	0.6	0.000666	-0.18393	0.361	-0.27178	0.32	0.00129
Botumirim	19	0.8889	0.003762	-1.02385	0.144	-1.13845	0.276	0.007
Serra do Cipó	7	0.9524	0.003806	-0.81948	0.246	-1.69576	0.097	0.01106
Congonhas1	10	0.8889	0.003907	0.02622	0.51	-0.18799	0.437	0.00949
Congonhas2	10	0.9333	0.006682	-0.84021	0.215	-1.23689	0.191	0.01101
Itamarandiba1	7	0.5238	0.001713	-1.52412	0.034	1.01423	0.73	0.00396
Itamarandiba2	16	0.8667	0.002564	-1.69314	0.022	-4.48941	0.006	0.00894
Lapinha	13	0.9359	0.003894	-1.02552	0.16	-2.57562	0.069	0.01067
Rio Preto1	9	0.8889	0.002498	-1.49216	0.072	-1.6034	0.103	0.00814
Rio Preto2	9	0.8333	0.002941	-1.28067	0.116	-1.20619	0.156	0.00124
Itacambira	20	0.9263	0.003804	-1.03898	0.146	-3.83766	0.026	0.0005
Rio Pardo de Minas	6	0.6	0.002198	1.75324	0.986	1.93787	0.82	0.00089
Santo Antônio do Retiro	20	0	0	0	1	0	N.A.	0.0015
Serranópolis	10	0.8	0.004518	-0.01324	0.508	-0.12561	0.438	0.00148

Table3 Upper diagonal shows absolute distance values in Km. Lower diagonal shows pairwise  $\Phi$ ST values between sample sites with more than six individuals in the southern clade. Non-significant values are shown in bold.

Ambrósio	0	203.68	138.58	148.27	113.93	118.7	46.29	20.09	133.58	38.47	38.87
Barão de Cocais	0.7845	0	340.43	63.74	119.23	111.67	239.59	213.6	82.24	182.71	187
Botumirim	0.5527	0.6035	0	281.48	236.03	242.67	118.35	174.76	264.69	159.13	155.37
Serra do Cipó	0.7106	0.1637	0.5387	0	55.75	48.27	178.86	151.46	18.69	122.36	126.31
Congonhas1	0.6103	0.237	0.4312	0.1548	0	7.61	159.33	131.22	37.52	79.73	82.41
Congonhas2	0.5103	0.1827	0.3417	0.1242	<b>-0.06</b>	0	163.65	135.46	30.18	85.52	88.44
Itamarandiba1	0.5724	0.8242	0.4733	0.6548	0.5261	0.3769	0	28.22	171.77	84.48	84.3
Itamarandiba2	0.4986	0.708	0.4477	0.615	0.491	0.3795	<b>-0.023</b>	0	143.75	58.33	58.95
Lapinha	0.6459	0.1097	0.4798	<b>0.0615</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.0254</b>	0.5747	0.5472	0	105.58	109.32
Rio Preto1	0.5452	0.6739	0.2645	0.5221	0.3715	0.225	0.489	0.3784	0.42	0	4.91
Rio Preto2	0.4963	0.6453	0.259	0.5016	0.3354	0.201	0.401	0.3001	0.4082	<b>-0.021</b>	0

## Figure description

Figure 1. Sample sites across the Espinhaço Range. The Southern Espinhaço region is indicated inside the dotted line. The continuous zone is delimited by black bars. The sample points in the marginal areas are circulated

Figure 2. Bayesian phylogenetic tree of *B. saxicola* haplotypes. All nodes except the the Rio Preto sub-clade have posterior probability values above 0.99. Divergence dates are indicated with 95% CI in parenthesis.

Figure 3. Median joining haplotype network of the southern clade. Legend for the colors of locations are indicated in the map. Number of mutation events in branches with more than 1 mutation are indicated with red numbers.

Figure 4. Mantel test results. Correlation coefficient values and p-values for the null hypothesis of  $r \leq 0$  are indicated below the graphics. a)Entire southern clade. b)Continuous region.

Figure 5. Barrier results. Voronoi tessellation and Dealuney triangulation superimposed to the sample map. The five barriers are identified by alphabetical order at the edges of each barrier.



Fig1

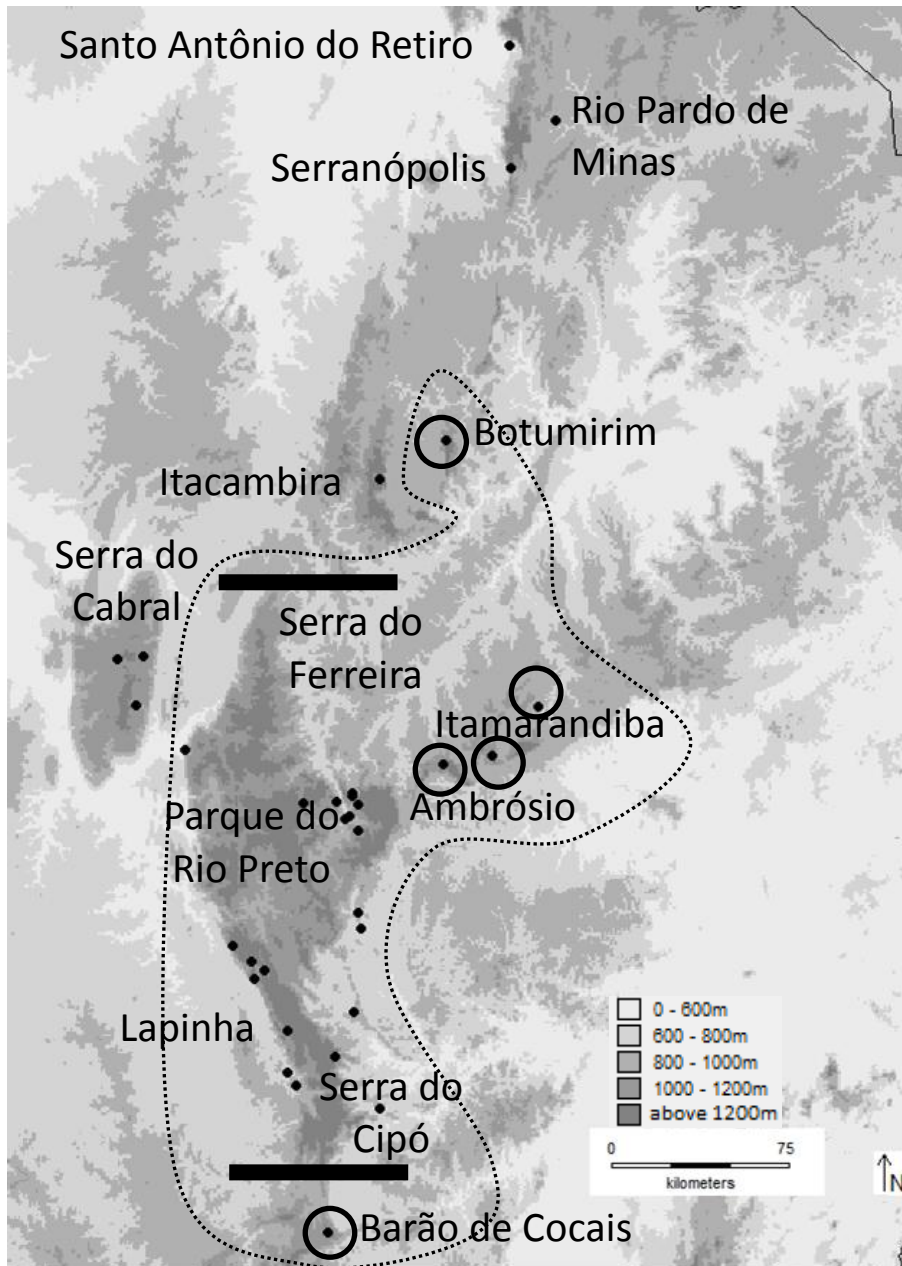


Fig2

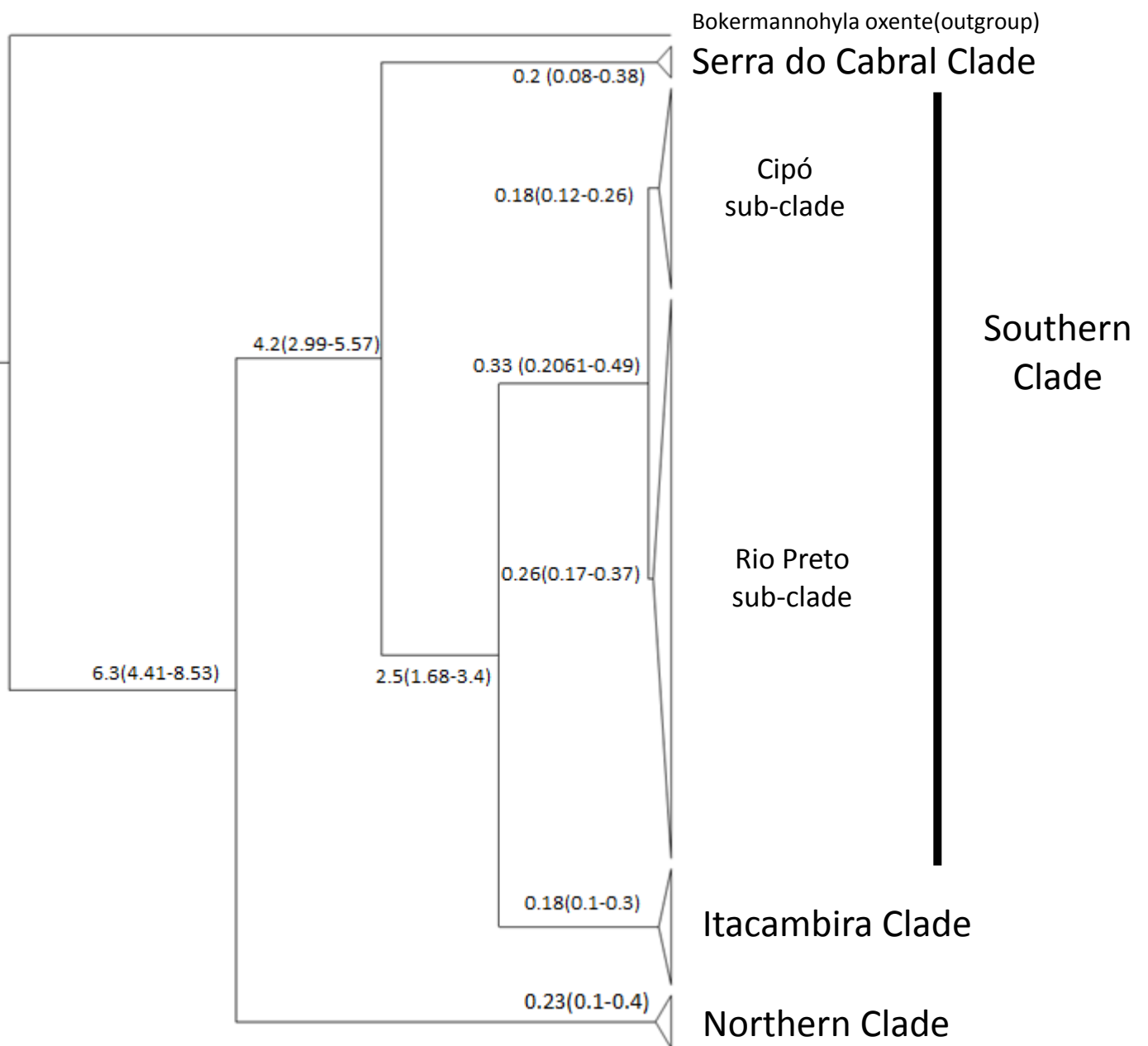


Fig3

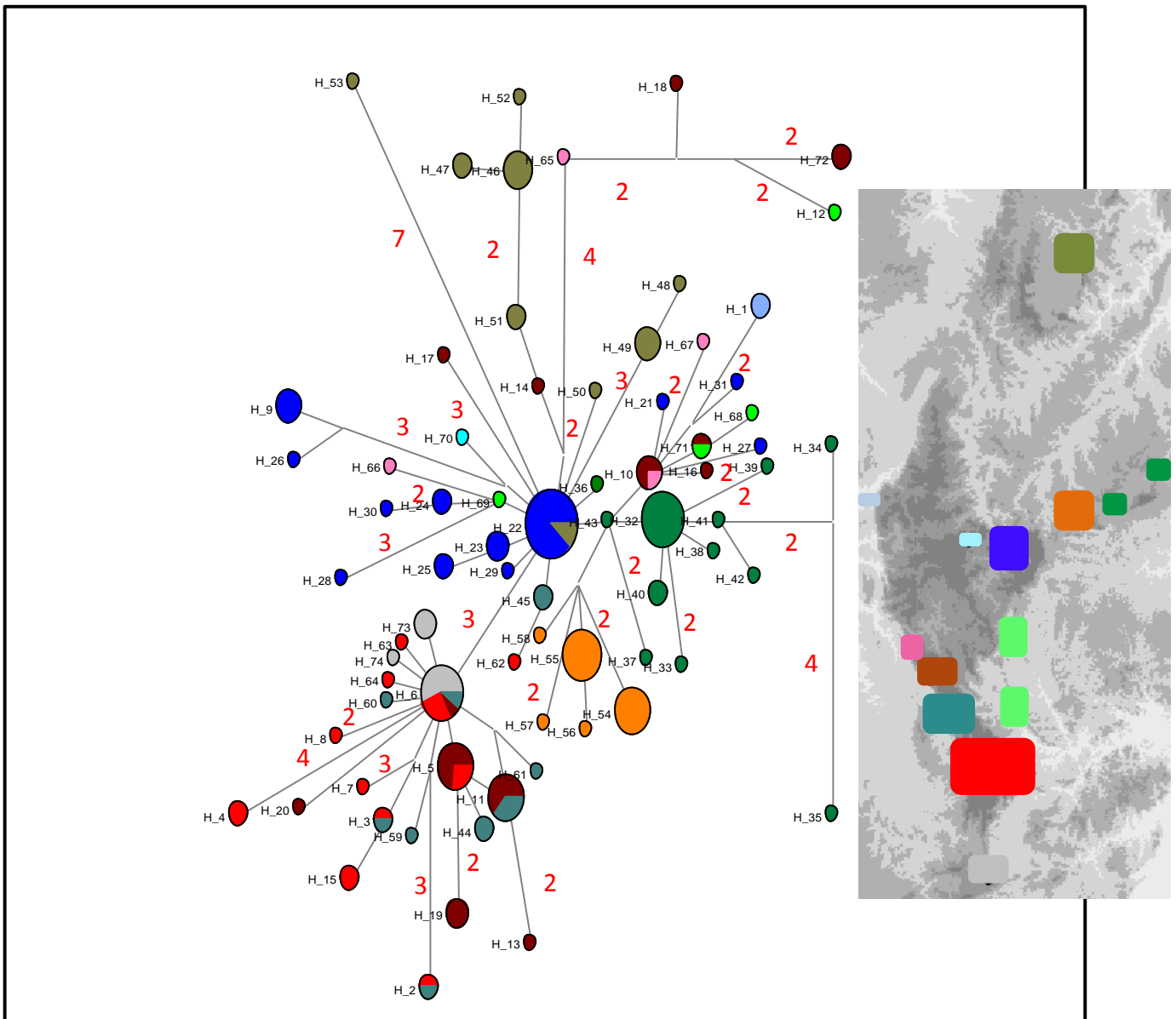
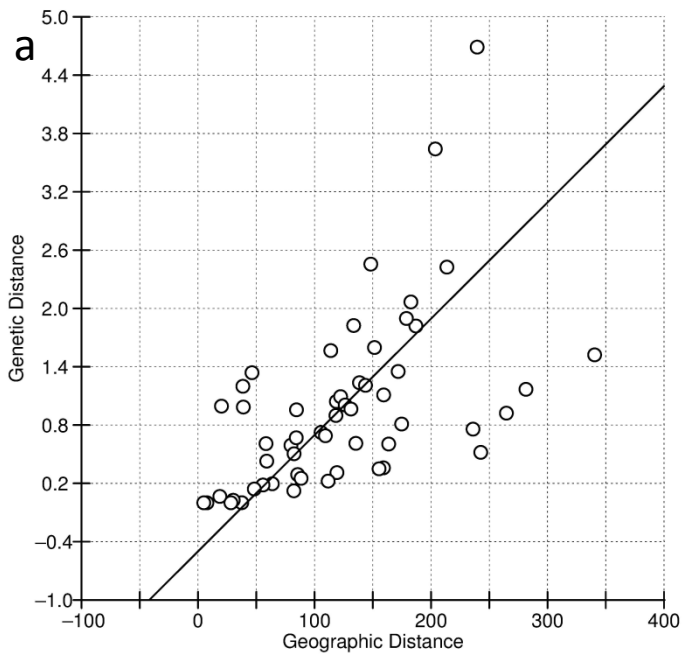
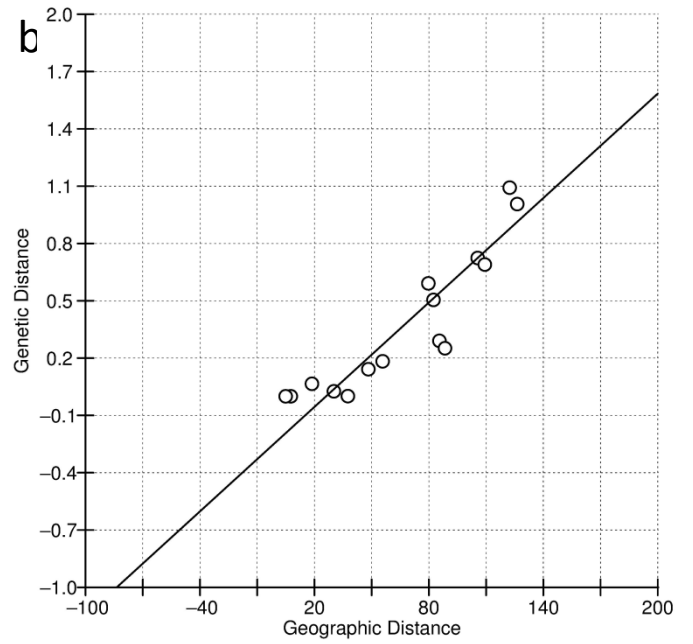


Fig4

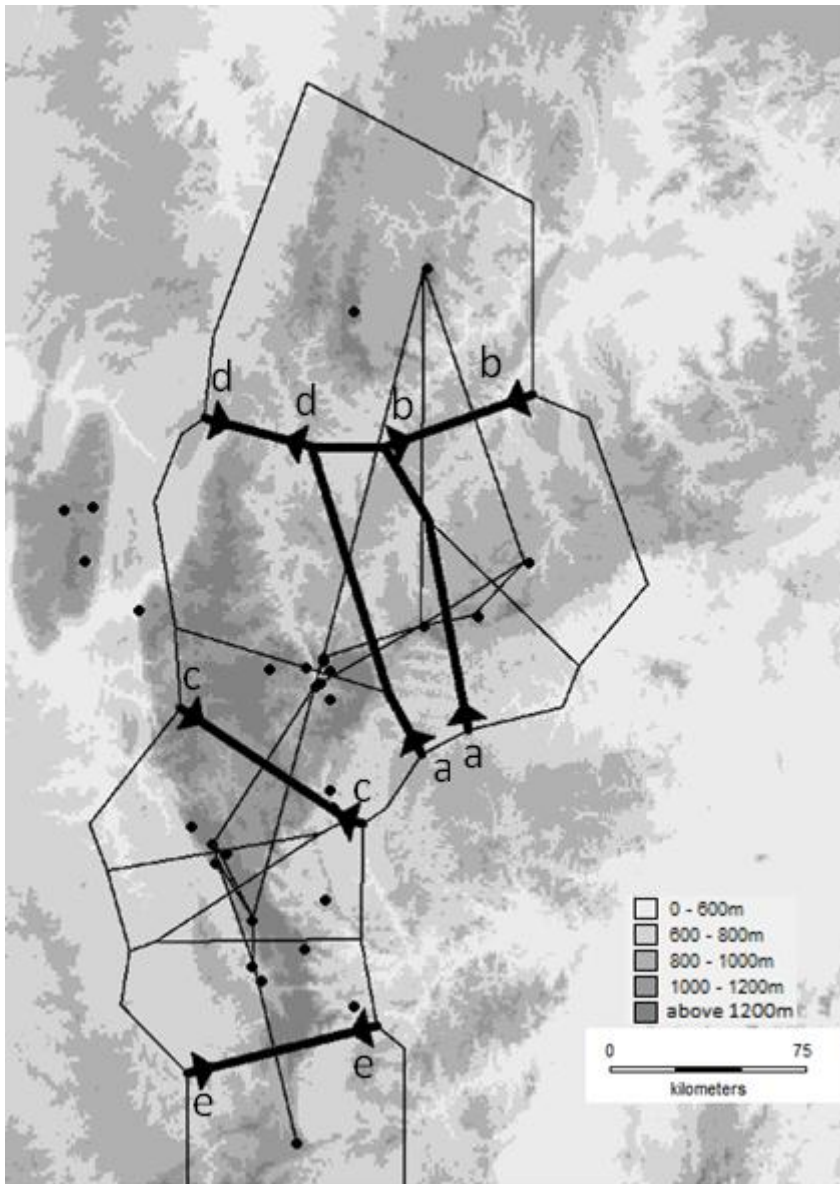


$Z = 8426.0384$   $r = 0.5436$   $p = 0.0040$



$Z = 567.5001$   $r = 0.9131$   $p = 0.0070$

Fig5



Supplementary Information

Individual	Locality	Latitude	Longitude
T1335 <i>Bokermannohyla oxente</i> , outgroup	Mucugê, Bahia	-13.005	-41.3705
AML974	Serra do cabral	-17.685	-44.323
LMP103	Serra do cabral	-17.685	-44.323
T420	Serra do cabral	-17.860	-44.250
TLP273a	Serra do cabral	-17.672	-44.225
TLP273b	Serra do cabral	-17.672	-44.225
TLP832	Serra do cabral	-17.672	-44.225
HTA303	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA304	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA305	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA307	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA308	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA309	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA314	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA318	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA319	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA320	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA321	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA323	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA333	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA334	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA336	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA340	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA343	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA363	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA367	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
HTA393	Serra de Itacambira	-16.991	-43.317
BS120	Santo Antônio do Retiro	-15.320	-42.814
BS121	Santo Antônio do Retiro	-15.320	-42.814
BS123	Santo Antônio do Retiro	-15.320	-42.814
BS127	Santo Antônio do Retiro	-15.320	-42.814

<b>BS130</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS132</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS133</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS134</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS135</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS138</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS139</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS142</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS145</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS146</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS148</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS150</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS154</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>BS155</b>	<b>Santo Antônio do Retiro</b>	<b>-15.320</b>	<b>-42.814</b>
<b>T179</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T212</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T213</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T214</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T215</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T216</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T370</b>	<b>Rio Pardo de Minas</b>	<b>-15.610</b>	<b>-42.640</b>
<b>T421</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T422</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T423</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T424</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T425</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T426</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T427</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T428</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>T429</b>	<b>Serranópolis</b>	<b>-15.790</b>	<b>-42.810</b>
<b>AML976</b>		<b>-18.031</b>	<b>-44.063</b>
<b>BS001</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.266</b>	<b>-43.182</b>
<b>BS002</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.266</b>	<b>-43.182</b>
<b>BS003</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.266</b>	<b>-43.182</b>
<b>BS004</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.266</b>	<b>-43.182</b>

<b>BS005</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.266</b>	<b>-43.182</b>
<b>BS006</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.268</b>	<b>-43.581</b>
<b>BS007</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.257</b>	<b>-43.544</b>
<b>BS008</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.257</b>	<b>-43.544</b>
<b>BS009</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.257</b>	<b>-43.544</b>
<b>BS010</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.178</b>	<b>-43.328</b>
<b>BS011</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.178</b>	<b>-43.328</b>
<b>BS012</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.178</b>	<b>-43.328</b>
<b>BS013</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS014</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS015</b>	<b>Serro</b>	<b>-18.660</b>	<b>-43.400</b>
<b>BS016</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS019</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS020</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS021</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS022</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS023</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS024</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS026</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.267</b>	<b>-43.547</b>
<b>BS027</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.267</b>	<b>-43.547</b>
<b>BS031</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS035</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS039</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS041</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS044</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS059</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS062</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS064</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS066</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS068</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.811</b>	<b>-43.755</b>
<b>BS070</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.218</b>	<b>-43.333</b>
<b>BS071</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.218</b>	<b>-43.333</b>
<b>BS073</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS074</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS075</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.218</b>	<b>-43.333</b>



<b>BS077</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS078</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS079</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS080</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS081</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS083</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS086</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS087</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.218</b>	<b>-43.333</b>
<b>BS088</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.199</b>	<b>-43.340</b>
<b>BS091</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.199</b>	<b>-43.340</b>
<b>BS096</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS101</b>	<b>Congonhas do Norte</b>	<b>-18.760</b>	<b>-43.771</b>
<b>BS104</b>	<b>Serra do Cipó</b>	<b>-19.267</b>	<b>-43.547</b>
<b>BS105</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS106</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS107</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS108</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS109</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS110</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS111</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.225</b>	<b>-43.330</b>
<b>BS112</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS113</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.129</b>	<b>-43.370</b>
<b>BS114</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS116</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.126</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS117</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.126</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS118</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.126</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS119</b>	<b>Parque do Rio Preto</b>	<b>-18.125</b>	<b>-43.357</b>
<b>BS158</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS159</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS161</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS162</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS163</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS164</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS165</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-17.806</b>	<b>-42.656</b>
<b>BS166</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>

<b>BS168</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS171</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS172</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS173</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS174</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS175</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS176</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS177</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS178</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS180</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS181</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS182</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS183</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS184</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>BS185</b>	<b>Itamarandiba</b>	<b>-18.005</b>	<b>-42.748</b>
<b>FL496</b>	<b>Lapinha</b>	<b>-19.110</b>	<b>-43.670</b>
<b>FL497</b>	<b>Lapinha</b>	<b>-19.110</b>	<b>-43.670</b>
<b>FL498</b>	<b>Lapinha</b>	<b>-19.110</b>	<b>-43.670</b>
<b>FL527</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL601</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL604</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL612</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL620</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL636</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL639</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL672</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL684</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL688</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL690</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL691</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL692</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL693</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL694</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL695</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>
<b>FL703</b>	<b>Botumirim</b>	<b>-16.843</b>	<b>-43.063</b>

FL704	Botumirim	-16.843	-43.063
FL708	Botumirim	-16.843	-43.063
FL759	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL780	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL794	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL797	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL811	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL820	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL875	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL877	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL879	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL883	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL886	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL893	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL895	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL899	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL902	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL906	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL908	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL910	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL912	Ambrósio	-18.089	-43.072
FL915	Ambrósio	-18.089	-43.072
FLG20	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG21	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG22	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG23	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG24	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG25	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG26	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG27	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG28	Lapinha	-19.110	-43.670
FLG29	Serra do Cipó	-19.210	-43.489
FLG30	Serra do Cipó	-19.210	-43.489
FLG31	Serra do Cipó	-19.210	-43.489
FLG32	Serra do Cipó	-19.210	-43.489

HTA002	Fechados	-18.786	-43.878
HTA003	Fechados	-18.786	-43.878
HTA004	Fechados	-18.786	-43.878
HTA005	Fechados	-18.786	-43.878
LMP102		-18.031	-44.063
PPGT136	Lapinha	-19.110	-43.670
T104	Conceição do Mato Dentro	-19.042	-43.418
T105	Conceição do Mato Dentro	-19.042	-43.418
T419	Diamantina	-18.238	-43.611
T70	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
T71	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
T72	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
T73	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
T75	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
T77	Congonhas do Norte	-18.880	-43.760
TLP792	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP793	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP794	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP795	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP796	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP797	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLP798	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLPG256a	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLPG256b	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
TLPG256c	Barão de Cocais	-19.887	-43.516
UFMGG547b	Alvorada de minas	-18.720	-43.390

**TableS1** Individuals used in the study. Localities and coordinates in decimal degrees are indicated.

### 3 CONCLUSÕES

- A espécie *Bokermannohyla saxicola* é formada por quatro linhagens principais restritas a diferentes unidades de habitat e separadas por regiões de baixa altitude com ambientes distintos.
- A divergência entre as linhagens datam, na sua maioria, de um período anterior ao Pleistoceno, logo sua causa não pode ser totalmente atribuída aos ciclos de glaciações ocorridas neste período.
- As divergências entre populações dentro das linhagens principais (clados) ocorreram no fim do Pleistoceno
- As áreas de baixa altitude são fortes barreiras para a dispersão da espécie.
- As populações das regiões de Itacambira e Itamarandiba são provavelmente originárias de eventos de colonização recente
- No espinhaço sul, as populações apresentam correlação entre distância genética e geográfica, principalmente na sua porção contínua.
- No espinhaço sul, as populações da área central contínua apresentam maior diversidade genética do que as áreas marginais e descontínuas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-abreu, P.A.; Renger F.E. 2002. Serra do Espinhaço meridional: um orógeno de colisão do mesoproterozóico. **32**, 1–14.

Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball JR. R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18:489-522

Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography* 36, 3-15

Barros L.; Lavarini C.; Lima L. & Júnior A. 2011 Synthesis of the Late-Quaternary palaeobioclimatic scenarios in Minas Gerais State/Southeastern Brazil Luiz. .

Beebee, T.J.C. 2005. Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, 95(6), 423–7. doi:10.1038/sj.hdy.6800736

Beheregaray, L.B. 2008 Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17, 3754-3774

Behling, H. 2002 South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**, 19–27.

Benites, V.; Caiafa A.; Mendonça E.; Schaefer C. 2003 Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da mantiqueira e do espinhaço. 76–85.

Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.J.; Buck, J.C.; Gervasi, S.S.; Kats, L. B. 2011 The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses *Annals of the New York Academy of Sciences* Issue: The Year in Ecology and Conservation Biology

Bokermann, W.C.A. 1964. Dos nuevas especies de Hyla de Minas Gerais y notas sobre Hyla alvarengai bok. (amphibia, Salientia, hylidae). *Neotropica* 32: 67-76.

Carnaval, A.C.; Bates, J.M. 2007 Amphibian DNA shows marked structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern *Evolution*

Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C. F. B.; Rodrigues, M. T.; Moritz, C. 2009 Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot *Science* 6 February 2009: Vol. 323 no. 5915 pp. 785-789

Colli, G.R. 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do cerrado. in: a. Scariot, j.c. Souza-Silva & J.M. Felfili (eds.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. pp. 247-264. Ministério do Meio Ambiente. Brasília.

Eckert, C.G.; Samis, K.E.; Loughheed, S.C. 2008 Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular ecology*, **17**, 1170–88.

Eterovick, P.C.; I. Sazima. 2004. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais - Amphibians from the Serra do cipó, minas gerais. 1. ed. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil.

Eterovick, P.C.; Yazbeck, G.M.; Dergam, J.A.; Kalapothakis, E. 2009 Small Scale population Structure in the treefrog Bokermannohyla saxicola (Bokermann, 1964) (anura, hylidae) *South American Journal of herpetology*, 4(3), 2009, 235-244

Faivovich, J.; Haddad C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A.; Wheeler, W.C.. 2005. Systematic review of the frog family hylidae, with special reference to hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-240.

Ferri, M.G. 1980. Vegetação brasileira. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fitzpatrick, S.W.; Brasileiro, C.A; Haddad, C.F.B.; Zamudio, K.R. 2009 Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular ecology*, 18(13), 2877–96. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04245.x

Frost, D.R. 2007 Amphibian Species of the World: an online reference. version 5.0 (1 february, 2007). electronic database disponível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of natural history, New York, USA.

Guo Q. 2012 Incorporating latitudinal and central-marginal trends in assessing genetic variation across species ranges. *Molecular ecology*, **21**, 5396–403.

Giffiths, A.J.F.; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C.; Gelbart, W.M.; Suzuki, D.T.; Miller, J. H. 2006 Introdução á Genética Oitava Edição. p100-102

HARE, M.P. 2001 Prospects for nuclear gene phylogeography. *TRENDS in Ecology & Evolution* Vol.16 No.12

Hartl, D. L.; Clarck, A.G. 2006 Princípios de genética de populações Quarta Edição. p135

Heyer, W.R. 1999 A new genus and species of frog from Bahia, Brazil (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) with comments on the zoogeography of the Brazilian campos rupestres. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 112:19- 39.

IUCN. 2011 IUCN Red List Categories and Criteria: version 3.1. IUCN Species Survival commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Jacobi, C.M. 2008 Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. *Megadiversidade* Volume 4 | No 1-2 | Dezembro 2008

Knowles, L.L. 2009 Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40: 593-612.



Lugli, L.; Haddad, C.F. 2006 A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from central bahia, brazil (amphibia, hylidae). *Herpetologica* 62: 453-465.

Lutz, B. 1973. Brazilian Species of *Hyla*. Austin: University of Texas Press.

Leite, F.S.F.; Juncá, F. A; Eterovick, P.C. 2008 Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil *Megadiversidade* Volume 4 | No 1-2 | Dezembro 2008

Nabholz, B.; Glemin, S.; Galtier, N. 2007 Strong Variations of Mitochondrial Mutation Rate across Mammals—the Longevity Hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* 25:120–130. 2008. doi:10.1093

Pombal, J.P.; Caramaschi, U. 1995 Posição taxonômica de *Hyla pseudopseudis* Miranda-Ribeiro, 1937 e *Hyla saxicola* Bokermann, 1964 (Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia* 363: 1–8

Prado, C.P.A.; Haddad, C.F.B.; Zamudio, K. R.; 2012 Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular ecology*, 21(4), 921–41. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05409.x

Rapini, A.; Ribeiro, P.; Lambert, S.; Pirani, J. 2008 A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **4**,

Safford, H.D. 2007 Brazilian Paramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, 34:1701-1722

Silva, J.M.C.; Bates, J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52:225-233.

Telles, M.P.C.; Diniz-Filho, J.A.F.; Bastos, R.P.; Soares, T.N.; Guimarães, L.D.; Lima, L.P. 2007 Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado:

Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss *Biological Conservation* 39 (2007) 37–46

UNESCO BIOSPHERE RESERVE INFORMATION, 2010. Disponível em <<http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?mode=all&code=BRA+06>> Acesso em 14.01.2013

Vasconcelos, M. F. 2009 Avifauna dos campos rupestres e dos campos de altitude do Brasil: levantamento, padrões de distribuição geográfica, endemismo e conservação Tese de Doutorado. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Vasconcelos, M.F. 2011 Point of view / Coluna opinião O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? *Vegetatio*, 241–246.

Yang, L.; Wei, Z.; Hong, G.; Jiang, S.; Wen, L. 2009 The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Phthonandria atrilineata* (Lepidoptera: Geometridae). *Mol Biol rep* 36:1441–1449