

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS (UNIFAL-MG)

Elias Granato Neto

**ANÁLISE DO DNA *BARCODE* DE ESPÉCIES DOS CLADOS *SCINAX ruber* E
SCINAX catharinae (ANURA, HYLIDAE) DO SUDESTE BRASILEIRO**

Alfenas/MG
2016

Elias Granato Neto

**ANÁLISE DO DNA *BARCODE* DE ESPÉCIES DOS CLADOS *SCINAX ruber* E
SCINAX catharinae (ANURA, HYLIDAE) DO SUDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Diversidade Biológica e conservação.
Orientadora: Profa. Dra Vanessa Roma Moreno Cotulio.
Co-orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Orlando.
Colaborador: Prof. Dr. Vinícius Xavier da Silva.

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Granato Neto, Elias.

Análise do DNA barcode de espécies dos clados *Scinax ruber* e *Scinax catharinae* (Anura, Hylidae) do sudeste brasileiro / Elias Granato Neto. – Alfenas - MG, 2016.

55 f.

Orientadora: Vanessa Roma Moreno Cotulio.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Anfíbios. 2. Biodiversidade. 3. Biologia Molecular. I. Cotulio, Vanessa Roma Moreno. II. Título.

CDD-578.012

ELIAS GRANATO NETO

**Análise do DNA *barcode* de espécies dos clados *Scinax ruber* e *Scinax catharinae*
(Anura, Hylidae) do sudeste brasileiro**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Diversidade Biológica e conservação.


Profa. Dra Vanessa Roma Moreno Cotulio

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG




Profa. Dra Vanessa Kruth Verdade

Instituição: Universidade Federal do ABC



Dra Renata Cecília Amaro

Instituição: Universidade de São Paulo



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado durante estes anos de estudo, dando-me sabedoria, paciência, perseverança e mantendo-me firme na fé. À minha família, principalmente meus pais, Hélio e Eunice, meu irmão e minha cunhada, Lucas e Lucienne, meu sobrinho, André e minha tia Ana. Sem o apoio destes certamente não teria conseguido ir tão longe.

Agradeço também a minha família alfenense, principalmente a Carla Pereira Rosa, pelo companheirismo, amizade, paciência, apoio e cuidado. Aos amigos da IPI e da ABU, que também se tornaram parte da minha família. Cada um destes foi fundamental nessa etapa da minha vida e certamente me marcaram eternamente.

À professora Vanessa R. Moreno Cotúlio pela orientação, a professora Tereza Cristina Orlando pela coorientação e ao professor Vinícius X. da Silva pela colaboração, pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho. Também não posso me esquecer de Marinete e Bruna, que sempre estiveram prontas a ajudar para que o trabalho no laboratório fosse possível. À Cinthia B. de Abreu pelo companheirismo, amizade e ajuda no laboratório, à Lucas Maure pela amizade e companheirismo nos estudos e aos estagiários Lucas Canuto e Isabela Dias.

Aos companheiros de república, Higor, João, Érika, Grazi, Rafael, José e Patrick, que me proporcionaram histórias que certamente me lembrarei pelo resto da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e à Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio por meio do Programa BIOTA MINAS APQ 0354909.

À banca avaliadora pelas considerações e disposição em contribuir com esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que tornaram possível a realização desta dissertação e que de alguma forma fazem parte da minha vida. Muito obrigado!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(NEWTON et al., 1687)

RESUMO

Anfíbios em geral têm sofrido um forte declínio populacional, sendo extremamente necessário o conhecimento de sua biodiversidade para a criação de estratégias de manejo mais eficientes. O Brasil possui a maior riqueza de espécies destes animais, porém com poucos estudos se comparado a essa grande biodiversidade. Dentre os anfíbios encontra-se o gênero *Scinax* (Anura, Hylidae), que se apresenta com uma história taxonômica complexa, incluindo um grande número de espécies, algumas destas consideradas complexos de espécies. Para ajudar a revelar novas peças desse quebra-cabeças taxonômico e filogenético nós caracterizamos o DNA *barcode* de algumas espécies de dois clados do gênero - *S. catharinae* e *S. ruber* e os haplótipos de espécies com maior número de amostras – *S. fuscovarius* e *S. perereca*. Para *S. fuscovarius* foram encontrados 21 haplótipos e para *S. perereca* 7 haplótipos. Nós levantamos a possibilidade de um complexo de espécies dentro de *S. perereca*, sendo encontrada grande diversidade genética e haplotípica entre indivíduos vivendo em simpatria. Também detectamos alguns haplótipos compartilhados por espécimes de *S. fuscovarius* distantes aproximadamente 700 km e caracterizamos pela primeira vez a região COI de *S. longilineus*, *S. perereca*, *S. skaios* e *S. x-signatus*, o que ajudará em futuros estudos de taxonomia molecular.

Palavras-chave: Anfíbios. Biodiversidade. Biologia Molecular.

ABSTRACT

As amphibians in general have suffered a strong population decline, it is extremely necessary to know its biodiversity for creating more efficient handling strategies. Brazil has the largest species richness of these animals, however with few studies compared to this great biodiversity. Among the amphibians the *Scinax* genus (Anura, Hylidae), presents a puzzling taxonomic history and a large number of species, some of them considered species complex. In this paper we characterized the DNA barcode of some species of two clades of the genus - *S. catharinae* and *S. ruber* and the haplotypes of the species with the highest number of samples – *S. fuscovarius* and *S. perereca*. For *S. fuscovarius* we found 21 haplotypes and for *S. perereca* 7 haplotypes. We brought up the possibility of a species complex within *S. perereca*, being found a high genetic and haplotype diversity among individuals living in sympatry. Also we detected the same haplotype shared by specimens of *S. fuscovarius* as far as 700 km and we characterized the first COI region of *S. longilineus*, *S. perereca*, *S. skaios* and *S. x-signatus*, which will help in future studies of molecular taxonomy.

Key-words: Amphibians. Biodiversity. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema do DNA mitocondrial de anfíbios representando os maiores genes e a região controle.....13
- Figura 2 Modelo esquemático demonstrando o local de associação dos *primer* universais e de replicação do material genético.....15

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	09
1.1	ANFÍBIOS.....	09
1.2	GÊNERO <i>SCINAX</i>	10
1.3	FERRAMENTAS MOLECULARES APLICADAS À TAXONOMIA.....	12
1.4	DIVERSIDADE CRÍPTICA EM ANUROS.....	17
	REFERÊNCIA.....	20
2	Artigo.....	29

1. REVISÃO DA LITERATURA

Os anfíbios formam um grupo extremamente diverso e possuem muitos animais com uma difícil classificação quanto à morfologia. As ferramentas moleculares apresentam bons resultados quanto a esta problemática e estão sendo cada vez mais utilizadas.

1.1 ANFÍBIOS

Os anfíbios são um dos grupos mais diversos dentre os vertebrados (SMITH; POYARKOV; HEBERT, 2008), porém estes vêm sofrendo declínios populacionais em diferentes regiões do globo e, por isso, compreendem um dos grupos de vertebrados mais ameaçados do planeta (BERGER et al., 1998; DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2003; HOULAHAN et al., 2000; STUART et al., 2004; VENCES et al., 2005a). Várias causas têm sido levantadas para esses declínios como: poluição e destruição de habitats, quitridiomicose, aquecimento global, introdução de espécies, super-exploração e rarefação da camada de ozônio (ALFORD; RICHARDS, 1999; KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDEN, 2001; STUART et al., 2004). A sensibilidade a tais impactos pode ser decorrente de uma série de fatores que também tornam algumas espécies deste grupo bioindicadoras clássicas: baixa capacidade de dispersão, alta filopatria, pele permeável devido à respiração cutânea e dependência da água para reprodução devido ao ciclo de vida bifásico (fase larval aquática e adulto terrestre) (ALFORD; RICHARDS, 1999; ARAÚJO; PETERSON, 2005; SHOEMAKER; NEGY 1977; WAKE, 1991).

Em um contexto mais amplo o declínio dos anfíbios evidencia o atual colapso da biodiversidade geral e pode servir como um modelo para entender melhor esta crise (CAREY et al., 2001; STORFER, 2003; STUART et al., 2004). Assim, para a realização de estratégias eficientes de conservação e manejo da biodiversidade é fundamental o conhecimento da taxonomia do grupo, pois a não delimitação correta de espécies pode levar a interpretações errôneas (SITER; MARSHALL, 2003). Este grupo, contudo, apresenta muitas espécies de identificação morfológica difícil e com pouquíssimo conhecimento sobre as relações

filogenéticas entre elas. Nessas circunstâncias, o uso de ferramentas genéticas como o DNA barcode descrito por Hebert, Cywinska e Ball (2003) e a análise dos haplótipos (EVANS et al., 1997) pode contribuir muito.

1.2 GÊNERO *SCINAX*

Dentro da Classe Amphibia são conhecidas três Ordens: Gymnophiona, com 205 espécies; Caudata, com 680 espécies; e Anura, com 6584 espécies. Os representantes desta última Ordem são conhecidos como sapos, rãs e pererecas (AMPHIBIAWEB, 2015). A América do Sul possui a fauna de anfíbios mais rica do planeta segundo Duellman (1999), sendo que Matavelli e colaboradores (2015) afirmam que o Brasil apresenta a maior riqueza absoluta de anuros: 988 espécies distribuídas em 19 famílias (SEGALLA et al., 2015). Destas espécies, 534 são endêmicas, ou seja, ocorrem única e exclusivamente no Brasil, e 116 são ameaçadas em algum grau (AQUINO et al., 2015).

Uma das 19 famílias de anuros brasileiros é Hylidae, com ampla distribuição nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia. Esta família é dividida por Faivovich e colaboradores (2005) em três subfamílias: Pelodyadianae, Phyllomedusinae e Hylinae, que compreendem 949 espécies e 50 gêneros (AMPHIBIAWEB, 2015). Um desses gêneros é *Scinax* Wagler, 1830. Este gênero é o segundo maior dentro dos hílideos de acordo com Faivovich e colaboradores (2005), com 115 espécies já reconhecidas, 93 delas encontradas no Brasil. Muitas dessas espécies, porém, são de identificação difícil pela grande quantidade e morfologia parecida (POMBAL; BASTOS; HADDAD, 1995).

Este gênero passou por profundas transformações ao longo dos anos, demonstrando a grande complexidade existente. Em 1977, quando o gênero ainda era conhecido por *Hyla*, o grupo *Hyla rubra* foi transferido por Fouquette e Delahoussaye para o gênero *Ololygon*, porém, Pombal e Gordo (1991) demonstraram que o gênero *Scinax* tinha preferência sobre *Ololygon*. Nos grupos *Scinax ruber* (antigo grupo *Scinax rubra*), *Scinax staufferi* e *Scinax x-signatus* não foi encontrado suporte para monofiletismo segundo Duellman e Wiens (1992) e todas as espécies do grupo *S. x-signatus* foram realocadas para o grupo *S. ruber* (POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995). De modo similar, os membros do grupo *S. rizibilis*

passaram para o grupo *S. catharinae* (POMBAL; BASTOS; HADDAD, 1995). Entretanto, a falta de evidências para o monofilétismo de muitos grupos permaneceu na análise filogenética morfológica do gênero (FAIVOVICH, 2002). Dos cinco grupos reconhecidos de *Scinax* (*ruber*, *rostratus*, *catharinae*, *staufferi* e *perpusillus*), apenas *catharinae* e *rostratus* foram confirmados como monofiléticos. Os grupos *staufferi* e *ruber* mostraram-se polifiléticos e *perpusillus*, com uma única espécie, saiu como irmão do grupo *catharinae*. Assim, os grupos *staufferi* e *ruber*, como anteriormente propostos, não foram mais reconhecidos (FAIVOVICH, 2002).

Em 2005, Faivovich e colaboradores fizeram uma análise filogenética mais ampla de Hylidae, e *Scinax* passou a ser sustentado por dois grandes clados monofiléticos de espécie: clado *Scinax catharinae* e o clado *Scinax ruber*. O clado *S. catharinae* contém os grupos *S. catharinae* (33 espécies) e *S. perpusillus* (13 espécies) e o clado *S. ruber*, os grupos *S. rostratus* (10 espécies) e *S. uruguayus* (duas espécies). Entretanto, a posição filogenética destes grupos de espécies ainda é incerta (NUNES-DE-ALMEIDA; TOLEDO, 2012). Atualmente existem 56 espécies do clado *S. ruber* não atribuídas a nenhum grupo, particularmente as dos antigos grupos *S. ruber* e *S. staufferi* (FAIVOVICH et al., 2005; FROST, 2015): *S. acuminatus* (Cope, 1862), *S. altae* (Dunn, 1933), *S. alter* (Lutz, 1973), *S. auratus* (Wied-Neuwied, 1821), *S. baumgardneri* (Rivero, 1961), *S. blairi* (Fouquette & Pyburn, 1972), *S. boesemani* (Goin, 1966), *S. cabralensis* Drummond, Baêta & Pires, 2007, *S. caldarum* (Lutz, 1968), *S. campossebrai* (Bokermann, 1968), *S. cardosoi* (Carvalho-e-Silva & Peixoto, 1991), *S. castroviejoi* De La Riva, 1993, *S. chiquitanus* (De La Riva, 1990), *S. cretatus* Nunes & Pombal, 2011, *S. crospeospilus* (Lutz, 1925), *S. cruentommus* (Duellman, 1972), *S. curicica* Pugliese, Pombal & Sazima, 2004, *S. cuspidatus* (Lutz, 1925), *S. danae* (Duellman, 1986), *S. dolloi* (Werner, 1903), *S. duartei* (Lutz, 1951), *S. elaeochrous* (Cope, 1875), *S. eurydice* (Bokermann, 1968), *S. exiguus* (Duellman, 1986), *S. funereus* (Cope, 1874), *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925), *S. fuscovarius* (Lutz, 1925), *S. granulatus* (peters, 1871), *S. hayii* (Barbour, 1909), *S. ictericus* Duellman & Wiens, 1993, *S. imbegue* Nunes, Kwet & Pombal, 2012, *S. iquitorum* Moravec, Tuanama, Pérez-Peña & Lehr, 2009, *S. juncae* Nunes & Pombal, 2010, *S. karenanneae* (Pyburn, 1993), *S. lindsayi* Pyburn, 1992, *S. madeirae* (Bokermann, 1964), *S. manriquei* Barrio-Amorós, Orellana & Chacón-Ortiz, 2004, *S. maracaya* (Cardoso & Sazima, 1980), *S. montivagus* Juncá, Napoli, Nunes, Mercês & Abreu, 2015, *S. nasicus* (Cope, 1862), *S. oreites* Duellman & Wiens, 1993, *S. pachycrus*

(Miranda-Ribeiro, 1937), *S. perereca* Pombal, Haddad & Kasahara, 1995, *S. quinquefasciatus* (Fowler, 1913), *S. rogerioi* Pugliese, Baêta & Pombal, 2009, *S. ruber* (Laurenti, 1768), *S. rupestris* Araujo-Vieira, Brandão & Faria, 2015, *S. sateremawe* Sturaro & Peloso, 2014, *S. similis* (Cochran, 1952), *S. squalirostris* (Lutz, 1925), *S. staufferi* (Cope, 1865), *S. tigrinus* Nunes, Carvalho & Pereira, 2010, *S. tymbamirim* Nunes, Kwet & Pombal, 2012, *S. villasboasi* Brusquetti, Jansen, Barrio-Amorós, Segalla & Haddad, 2014, *S. wandae* (Pyburn & Fouquette, 1971) e *S. x-signatus* (Spix, 1824).

1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES APLICADAS À TAXONOMIA

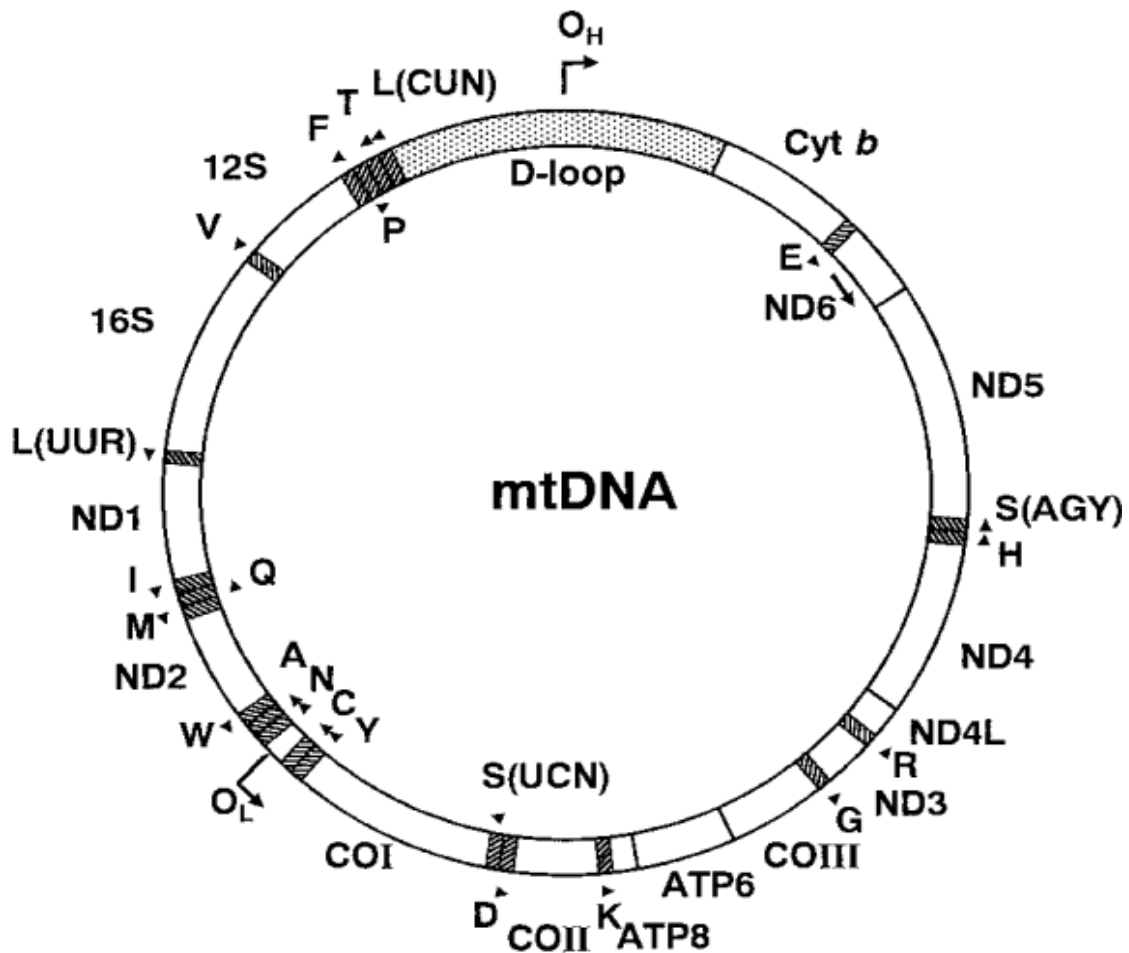
Atualmente ferramentas de Biologia Molecular têm sido utilizadas para a detecção de espécies novas. Essas metodologias estão sendo utilizadas devido às dificuldades encontradas na identificação unicamente morfológica, tais como variações ontogenéticas, dimorfismo sexual e possível plasticidade fenotípica (PACKER et al., 2009). Dentre as espécies que habitam o planeta, apenas uma parte ínfima, cerca de 0,01%, já foi identificada por métodos mais tradicionais. Essa taxonomia mais clássica e conservadora exige um grande número de taxonomistas dedicando um tempo enorme à análise e descrição de novas espécies (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003). Como a maior parte da diversidade ainda não foi descrita, este modelo tradicional já se mostrou inviável. Já com uso de métodos moleculares é necessário um pequeno pedaço de tecido contendo DNA bem conservado e conhecimento das técnicas moleculares (CRAWFORD; PAZ; GONZALEZ, 2011).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), os avanços na biologia molecular proporcionaram novos métodos de estudos que possibilitam aprofundar nossos conhecimentos a respeito do genoma. Outro ponto que deve ser levado em questão é que há diminuição do número de taxonomistas e um aumento da quantidade de espécies descritas, assim as ferramentas moleculares ganham cada vez mais espaço e tornam-se fundamentais em estudos taxonômicos (PEČNIKAR; BUZAN, 2014). O DNA mitocondrial (mtDNA), em especial, vem sendo usado em vários estudos devido a suas peculiaridades, como o fato de possuir um pequeno tamanho (aproximadamente 16-20 kb), ser circular, de herança materna, raramente sofrendo recombinação e a maioria das substituições de bases é simples (inserções ou

deleções de um ou poucos nucleotídeos) (AVISE; ELLIS, 1986; AVISE et al., 1987; ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003). Essas características tornam os genes deste genoma bons marcadores.

O genoma mitocondrial dos vertebrados (mtDNA) é composto por 37 genes codificadores (13 genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial, 22 RNA de transferência e 2 rRNAs) e uma região controle não codificadora (AVISE et al., 1987) (Figura 1).

Figura 1: Esquema do DNA mitocondrial de anfíbios representando os maiores genes e a região controle.



Fonte: Adaptado de Sumida et al., 2001.

Uma das técnicas que utiliza o DNA mitocondrial e que vem ganhando espaço nas duas últimas décadas é o DNA *barcode*, que foi utilizado pela primeira vez em 1993

(ARNOT; ROPER; BAYOUMI, 1993). Há cerca de 13 anos, foi proposto o uso de DNA *barcode* ou código de barras do DNA como uma ferramenta rápida e relativamente fácil para a detecção de espécies animais e espécies crípticas por Hebert, Cywinska e Ball (2003), assim, a integração desta análise às ferramentas taxonômicas tradicionais pode produzir resultados mais confiáveis. Desde então, milhões de sequências da região de aproximadamente 1100 espécies foram amplificadas, segundo Joly (2014) e depositadas em bancos de dados como *Barcode of Life Data (BOLD)* (<http://www.barcodinglife.org>) e *GenBank*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

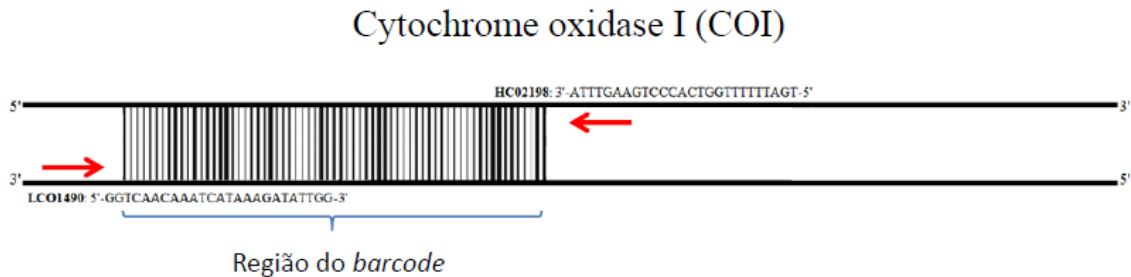
O banco de dados BOLD é uma plataforma que permite associar diversos tipos de dados das sequências amostradas (fotos do espécime, informações de campo, número de tomo, coleção científica na qual o material se encontra depositado, dados taxonômicos e ecológicos, e informações moleculares - eletroferogramas das sequências e quais *primers* foram utilizados na amplificação e no sequenciamento). Este tem como finalidade compilar sequências de DNA *barcode* de todas as espécies existentes (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Há ainda outras iniciativas similares relacionadas a diversos grupos específicos de animais, como o Fish Barcode of Life (Fish-BOLD), All Birds Barcoding Initiative (ABBI), MammaliaBOL, Bee-BOL, HealthBOL, Mar-BOL, PolarBOL, SharkBOL e SpongeBOL (MURPHY et al., 2013). Em 2013, Murphy e colaboradores propuseram o Cold Code, uma iniciativa global com a finalidade de construir um banco de dados sobre o DNA *barcode* destinado às espécies de vertebrados conhecidos como “animais de sangue frio” (anfíbios e répteis).

Em animais, a região comumente utilizada corresponde à região 5' da sequência do gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI), que contém cerca de 650 pares de bases (pb) (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003) (Figura 1). Nessa região já foi detectada uma grande taxa de substituição nucleotídica, acarretando em grandes variações nas sequências mesmo dentro de um mesmo gênero (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003). Assim, este marcador molecular possui uma grande capacidade discriminatória (HOLLINGSWORTH et al., 2011).

Uma das facilidades da técnica destacada por Alves e colaboradores (2014) é o fato do DNA *barcode* utilizar *primers* universais para a amplificação via *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Figura 2). Porém, para amplificação da região em anfíbios a alta variabilidade nucleotídica nos sítios reconhecidos pelos *primer* dificulta a padronização de um *primer*

universal comum a todas as espécies (SMITH; POYARKOV; HEBERT, 2008). Por isso, alguns trabalhos encontraram dificuldades para amplificação com os *primers* universais (VENCES, et al., 2005; SMITH; POYARKOV; HEBERT, 2008; HAWKINS; SITES; NOONAN, 2007).

Figura 2: Modelo esquemático demonstrando o local de associação dos *primer* universais.



Fonte: Do Autor, 2016.

Outra característica importante é o fato desta ser uma região de codificação de proteína. Sendo assim é esperado que não haja variações drásticas no comprimento, microinversões ou frequentes repetições mononucleotídicas (HOLLINGSWORTH; GRAHAM; LITTLE, 2011). O COI possui uma amplitude de sinais filogenéticos maior que qualquer outro gene (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003), o que o torna melhor que outros genes como o 12S e o 16S (XIA et al., 2012). Deste modo, o uso dessa abordagem para delimitação de espécies representa um primeiro passo importante na exploração da biodiversidade, principalmente para grupos taxonômicos ainda pouco estudados (DINCĂ et al., 2015) ou aqueles que apresentem uma difícil taxonomia.

Por outro lado Vences e colaboradores (2005b) sugerem o gene 16S como um marcador complementar ao COI, devido a ter uma maior facilidade de amplificação, com 100% de taxa de amplificação, e alta eficiência na identificação de grandes vertebrados. Assim, estes autores apontam o 16S como o gene a ser usado como DNA barcode universal para anfíbios.

Os resultados utilizando a análise do DNA *barcode* têm se mostrado eficientes com uma taxa superior a 95% de discriminação de espécies para grupos como aves, peixes e anfíbios (FAZEKAS et al., 2009). Para cada posição, há apenas quatro nucleotídeos possíveis,

porém com a variação destes em uma sequência de apenas 15 nucleotídeos seria possível a criação de 1 bilhão de códigos, aproximadamente 100 vezes mais que o necessário para discriminar cada táxon de forma exclusiva (HEBERT et al., 2003). Em um estudo com 200 espécies de lepidópteros, o marcador foi eficiente para diferenciar 100% dos casos (HEBERT et al., 2003).

A discriminação de espécies com base no DNA *barcode* se baseia no mesmo princípio da análise puramente morfológica: distinguir entre variação intra e interespecífica. Mas, existem outras abordagens genéticas, além do *barcode*, para se analisar a variabilidade genética. Uma delas é a análise dos haplótipos e formação gráfica da rede de haplótipos. Esta rede corresponde a um agrupamento gênico herdado a partir de um ancestral comum, com um conjunto único de polimorfismo de nucleotídeos (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*), que são alterações individuais na posição dos nucleotídeos na sequência de DNA (EVANS et al., 1997). Essas alterações podem ser geradas por mutações, alterações no material genético que podem afetar apenas a sequência ou também a organização, regulação ou função de um gene (HOY, 2003), ou por recombinação.

Observando o conjunto de SNPs dos haplótipos de diferentes indivíduos é possível saber se há uma correlação entre estes e, assim, inferir o grau de proximidade genética. A diversidade de haplótipos é controlada por uma série de processos, tais como uma nova mutação que aumenta em frequência devido à deriva genética e à recombinação (STUMPF, 2004; CLARK, 2004). O uso desse método tem sido utilizado em genética da conservação para analisar a variabilidade genética entre diferentes populações (FITZPATRICK et al., 2009; DIXO et al., 2009).

Considerando o conceito reprodutivo de espécie biológica, se os indivíduos pertencem a uma mesma espécie, deve haver troca de alelos entre populações simpátricas (FRANKHAM et al., 2008). Assim, o número de alelos compartilhados proporciona evidências definitivas para determinar o limite que existe entre as populações (SEEBECK; JOHNSON, 1980). Deste modo, a ausência de fluxo gênico indicará a possibilidade de espécies diferentes. Um dos parâmetros que indica se existe ou não fluxo gênico é o F_{ST} (SHAFFER et al., 2000). Valores de F_{ST} inferiores a 0,05 indicam pequena diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15, diferenciação genética moderada, de 0,15 a 0,25, grande diferenciação genética e acima de 0,25, diferenciação genética muito grande (WRIGHT, 1978; HARTL; CLARK, 2010).

A disponibilidade de maior quantidade de dados moleculares ajuda a gerar melhores planos de manejo e de conservação da biodiversidade, diz Francis e colaboradores (2010), Vernooy e colaboradores (2010) e Joly e colaboradores (2014), a detectar espécies invasoras segundo Crawford, Paz e Gonzales (2011), a melhorar o conhecimento da diversidade segundo Porco e colaboradores (2014) e Lees e colaboradores (2014) e a diagnosticar novas espécies (CRAWFORD; PAZ; GONZALEZ, 2011; PRAMUAL; ADLER, 2014; ALVES et al., 2014). Conhecer o material genético de uma espécie e como ele se estrutura (se é diverso ou não), Segundo Galetti (2008), é importante para a conservação dessa espécie e para sabermos sobre o seu potencial adaptativo, assim qualquer alteração na sua taxonomia e qualquer melhoria do conhecimento serão positivas.

Esse tipo de informação pode ser extrapolado para futuros estudos de grandes filogenias, variações intraespecíficas e diversidade críptica, permitindo compreender melhor processos macroevolutivos, ecofilogenias, interações ecológicas, seleção, diversificação, além de outras aplicações (JOLY et al., 2014). Usar a genética como ferramenta para análise da estrutura populacional e como diagnóstico de novas espécies é ainda mais necessário em grupos pouco conhecidos do ponto de vista taxonômico.

1.4 DIVERSIDADE CRÍPTICA EM ANUROS

Os anfíbios são morfologicamente conservados e apresentam poucos caracteres externos que permitem sua identificação (FOUQUET et al., 2007). Além disso, muitas descrições de espécies deste grupo são deficientes e várias apresentam ampla distribuição geográfica, o que parece contraditório para um grupo considerado altamente filopátrico e, em geral, com baixa capacidade de dispersão (SMITH; GREEN, 2005; VÁSQUEZ et al., 2013). Na verdade, o que é teoricamente esperado, é que muitas dessas espécies amplamente distribuídas, provavelmente, representem complexos de espécies (FOUQUET et al., 2007).

Espécies crípticas são duas ou mais espécies classificadas nominalmente como uma única espécie, em geral como resultado de uma identificação apenas morfológica e, às vezes, os caracteres morfológicos ainda não divergiram o suficiente (BICKFORD et al., 2007).

Quantificar espécies assim frequentemente subestima a diversidade, principalmente da anurofauna (ELMER; DÁVILA; LOUGHEED, 2007).

Os anfíbios neotropicais possuem profundas divergências genéticas, mas precisam de muito tempo para que diferenças fenotípicas possam evoluir (LOUGHEED et al., 1999; LOUGHEED et al., 2006). Cada vez mais trabalhos comprovam, por meio de dados moleculares, que a evolução morfológica em anfíbios gera espécies crípticas (FOUQUET et al., 2007; PADIAL; DE LA RIVA, 2009).

Segundo o site *Web of Science* (webofscience.com/), nos últimos 50 anos há 393 artigos que correlacionam espécies crípticas e anfíbios, a maioria publicada na última década, sendo o primeiro trabalho o de Bogart e Wasserman (1972). Ainda existe a possibilidade do número de espécies crípticas ser bem maior, pois, segundo Bickford e colaboradores (2007), existem muitas espécies não estudadas devido ao baixo valor econômico ou por ocorrerem em habitats inacessíveis. Exemplo de como este número pode aumentar ainda mais é o estudo de Meegaskumbura e colaboradores (2002) sobre *hotspot* de anfíbios, ampliando de 18 para mais 100 espécies do grupo no Sri Lanka. Neste estudo, esses autores utilizaram dados de morfologia, acústica, ecologia e genética.

Os anuros neotropicais apresentam uma grande diversidade de espécies e o relacionamento ecológico e filogenético entre e dentro de grupos taxonômicos ainda não são claros (DE-LA-RIVA; MÁRQUEZ; BOSCH, 1996a, b; FAIVOVICH et al., 2005; FROST et al., 2006). Estudos do DNA *barcode* têm detectado espécies crípticas e grandes distâncias genéticas dentro de espécies reconhecidas como únicas (BIKFORD et al., 2007; EVANS et al., 2011; PRADO; HADDAD; ZAMUDIO, 2012). Stuart, Inger e Voris (2006) revelaram a presença de 14 espécies que eram descritas como apenas duas na Ásia. Na região Neotropical não foi diferente: o uso de dados moleculares também demonstrou uma diversidade críptica em *Scinax ruber*, *Rhinella margaritifera* no estudo de Fouquet e colaboradores (2007), *Thoropa miliaris* no estudo de Fitzpatrick e colaboradores (2009), *Oophaga pumilio* no estudo de Hauswaldt e colaboradores (2011) e *Hypsiboas albopunctatus* (PRADO; HADDAD; ZAMUDIO, 2012).

Mais recentemente um trabalho realizado com 52 espécies nominais de anfíbios, dentre elas *Scinax cf. kennedyi*, *Scinax rostratus*, *Scinax ruber* e *Scinax wandae*, demonstrou a presença de espécies crípticas devido a uma forte divergência genética causada por barreiras geográficas (GUARNIZO et al., 2015). Assim, essa grande diversidade críptica ou de

complexos de espécies é uma constante na literatura em gêneros de ampla distribuição, como no gênero *Scinax* (HEYER et al., 1990; HADDAD; SAZIMA, 1992; POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995; DE-LA-RIVA et al., 2000; FOUQUET et al., 2007; MAGRINI et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de espécies dos clados *S. ruber* e *S. catharinae* e testar a congruência entre dados genéticos e atual classificação de amostras do sudeste do Brasil. No próximo capítulo é apresentado um manuscrito com esta abordagem que foi submetido ao periódico *Zoologica Scripta* e com o qual contribuímos um pouco para a maior compreensão sobre a taxonomia deste gênero.

REFERÊNCIAS

ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual review of Ecology and Systematics**, p. 133-165 1999.

ALVES, S. et al. Species discrimination in *Sisyrinchium* (Iridaceae): assessment of DNA barcodes in a taxonomically challenging genus. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 2, p. 324-335, 2014.

AMPHIBIAWEB, B. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2015.

AQUINO, L. et al. *Scinax fuscovarius*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2014.3, 2015.

ARAÚJO, M. B.; PEARSON, R. G. Equilibrium of species' distributions with climate. **Ecography**, v. 28, n. 5, p. 693-695, 2005.

ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. D. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELLO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, p. 305-309, 2003.

ARNOT, D. E.; ROPER, C.; BAYOUMI, R. A. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 15-24, 1993.

AVISE, J.; ELLIS, D. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 312, n. 1154, p. 325-342, 1986.

AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, p. 489-522, 1987.

BERGER, L. et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036, 1998.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, p148-155, 2007.

BOGART, James P.; WASSERMAN, A. O. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 11, n. 1, p. 7-24, 1972.

CAREY, C. et al. Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. **Conservation Biology**, v. 15, n. 4, p. 903-913, 2001.

CLARK, A. G. The role of haplotypes in candidate gene studies. **Genetic epidemiology**, v. 27, n. 4, p. 321-333, 2004.

CRAWFORD, A. J.; PAZ, A.; GONZALEZ, M. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. **Acta Biológica Colombiana**, v. 16, n. 3, p. 161-176, 2011.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 141-150, 2003.

DE-LA-RIVA, I. et al. Ten years of research on Bolivian amphibians: updated checklist, comprehensive literature, taxonomic problems, distribution, and iconography. **Revista Española de Herpetología**, v. 14, p. 19-164, 2000.

DE-LA-RIVA, I.; MÁRQUEZ, R.; BOSCH, J. The advertisement calls of three South American poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae), with comments on their taxonomy and distribution. **Journal of Natural History**, v. 30, n. 9, p. 1413-1420, 1996.

DE-LA-RIVA, I.; MARQUEZ, R.; BOSCH, J. Advertisement calls of four microhylid frogs from Bolivia (Amphibia, Anura). **American Midland Naturalist**, p. 418-422, 1996.

DINCĂ, et al. DNA barcode reference library for *Iberian butterflies* enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

DIXO, M. et al. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biological Conservation**, v. 142, n. 8, p. 1560-1569, 2009.

DUELLMAN, W. E. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. **The Johns Hopkins University Press**, 1999.

DUELLMAN, W. E.; WIENS, J. J. The status of the hylid frog genus *Ololygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. **University of Kansas**, 1992.

ELMER, K. R.; DÁVILA, J. A.; LOUGHEED, S.C. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 247, 2007.

EVANS, B. J. et al. Comparative molecular phylogeography of two *Xenopus* species, *X-gilli* and *X-laevis*, in the south-western Cape province, South Africa. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 4, p. 333-343, 1997.

EVANS, B. J. et al. Description of a new octoploid frog species (Anura: Pipidae: *Xenopus*) from the Democratic Republic of the Congo, with a discussion of the biogeography of african clawed frogs in the Albertine Rift. **Journal of Zoology**, v. 283, n. 4, p. 276-290, 2011.

FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). **Cladistics**, v. 18, n. 4, p. 367-393, 2002.

FAIVOVICH, J. et al. 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**, p. 1-240, 2005.

FAZEKAS, et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. s1, p. 130-139, 2009.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 1996.

FITZPATRICK, S. W. et al. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877-2896, 2009.

FOUQUETTE JR, M.; DELAHOUSSEY, A. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. **Journal of Herpetology**, p. 387-396, 1977.

FOUQUET, A. et al. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 43, n. 2, p. 567-582, 2007.

FRANCIS, C. M. et al. The role of DNA barcodes in understanding and conservation of mammal diversity in Southeast Asia. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12575, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de genética da conservação. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2008.

FROST, D. R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, 1-291, 2006.

GALETTI, JR, P. M. et al. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de Genética da Conservação. **Ribeirão Preto, SP, Editora SBG**, 2008, Cap.10, p.244-274.

GUARNIZO, C. E. et al. DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. **PLoS ONE** 10(5): p. e0127312 , 2015.

HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I.; MORELLATO, L. P. C. Anfíbios anuros da Serra do Japi. **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**, 1992, p. 188-211.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Endocruzamento, subdivisão populacional e migração. In: _____. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 6, p. 271-330.

HAUSWALDT, J. S. et al. Widespread co-occurrence of divergent mitochondrial haplotype lineages in a Central American species of poison frog (*Oophaga pumilio*). **Journal of Biogeography**. p711-726, 2011.

HAWKINS, M. A.; SITES JR, J. W.; NOONAN, B. P. *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) of the Guiana Shield: using DNA barcodes to assess identity and diversity. **Zootaxa**, v. 1540, p. 61-67, 2007.

HEBERT, P. D. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HEYER, W. R. et al. Frogs of Boracéia. **Arquivos de zoologia**, v. 31, n. 4, p. 231-410, 1990.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. e19254, 2011.

HOULAHAN, J. E. et al. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752-755, 2000.

HOY, Marjorie A. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. **Academic Press**, 2003.

JOLY, S. et al. Ecology in the age of DNA barcoding: the resource, the promise and the challenges ahead. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 221-232, 2014.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R.; BELDEN, L. K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 681-684, 2001.

LAMBERT, M. Environmental effects of heavy spillage from a destroyed pesticide store near Hargeisa (Somaliland) assessed during the dry season, using reptiles and amphibians as bioindicators. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 80-93, 1997.

LEES, D. C. et al. DNA barcoding reveals a largely unknown fauna of Gracillariidae leaf-mining moths in the Neotropics. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 286-296, 2014.

LOUGHEED, S. C. et al. Ridges and rivers: A test of competing hypotheses of amazonian diversification using a dart-poison frog (*epipedobates femoralis*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 266, p. 1829-1835, 1999.

LOUGHEED, S. C. et al. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 1, p. 23, 2006.

MAGRINI, L. et al. Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura: Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. **Zootaxa**, v. 3066, p. 37-51, 2011.

MATAVELLI, R. et al. Occurrence of anurans in Brazilian caves. Pojavljanje brezrepnih dvoživk v Brazilskih jamah. **Acta Carsologica**, v. 1, n. 108, p. 44, 2015.

MEEGASKUMBURA, M. et al. Sri Lanka: an amphibian hot spot. **Science**, v. 298, n. 5592, p. 379-379, 2002.

MURPHY, R. W. et al. Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 2013.

NEWTON, Isaac et al. **Philosophiae naturalis principia mathematica**. excudit G. Brookman; impensis TT et J. Tegg, Londini, 1833.

NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; TOLEDO, L. F. A new species of *Elachistocleis* Parker (Anura, Microhylidae) from the state of Acre, northern Brazil. **Zootaxa**, v. 3424, p. 43-50, 2012.

PACKER, L. et al. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. s1, p. 42-50, 2009.

PADIAL, J. M.; DE-LA-RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 1, p. 97-122, 2009.

PEČNIKAR, Ž. F.; BUZAN, E. V. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 1, p. 43-52, 2014.

POMBAL, J. P. JR.; BASTOS, R. P.; HADDAD, C. F. B. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. **Naturalia**, São Paulo, v. 20, p. 213-225, 1995.

POMBAL, J. P. JR.; GORDO, M. Duas novas espécies de hyla da floresta atlântica no estado de São Paulo (Amphibia, Anura). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53.1, p. 144, 1991.

POMBAL, J. P. JR.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. **Journal of Herpetology**, p. 1-6, 1995.

PORCO, D. et al. Barcoding the Collembola of Churchill: a molecular taxonomic reassessment of species diversity in a sub-Arctic area. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 249-261, 2014.

PRADO, C., HADDAD, C. F.; ZAMUDIO, K. R. Cryptic lineages and pleistocene population expansion in a Brazilian cerrado frog. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 921-941, 2012

PRAMUAL, P.; ADLER, P. H. DNA barcoding of tropical black flies (Diptera: Simuliidae) of Thailand. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 262-271, 2014.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

SEGALLA, M. V. et al. Brazilian amphibians—List of species. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>> Acessado em: 29 de Dezembro de 2015), 2015.

SEEBECK, J. H.; JOHNSTON, P. G. *Potorous longipes* (Marsupialia: Macropodidae); a New Species from Easter Victoria. **Australian Journal of Zoology**, v. 28, n. 1, p. 119-134, 1980.

SHAFFER, H. B. et al. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 245-257, 2000.

SHOEMAKER, V.; NAGY, K. A. Osmoregulation in amphibians and reptiles. **Annual Review of Physiology**, v. 39, n. 1, p. 449-471, 1977.

SITES, J. W.; MARSHALL, J. C. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 9, p. 462-470, 2003.

SMITH, A.M.; GREEN, D. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. **Ecography**, v. 28, n. 1, p. 110-128, 2005.

SMITH, M.; POYARKOV, N. A.; HEBERT, P. D. DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 2, p. 235-246, 2008.

STORFER, A. Amphibian declines: future directions. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 151-163, 2003.

STUART, B. L.; INGER, R. F.; VORIS, Harold K. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. **Biology Letters**, v. 2, n. 3, p. 470-474, 2006.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004..

STUMPF, M. P. H. Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, n. 6, p. 469-477, 2004.

SUMIDA, M. et al. Complete nucleotide sequence and gene rearrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. **Genes & genetic systems**, v. 76, n. 5, p. 311-325, 2001.

VÁSQUEZ, D. et al. Low phylogeographic structure of *Rhinella arunco* (Anura: Bufonidae), na endemic amphibian from the Chilean Mediterranean hotspot. **Zoological Studies**. Vol 52, p. 35, 2013.

VENCES, M. et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1859-1868, 2005.

VENCES, M. et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 1, p. 5, 2005.

VERNOOY, R. et al. Barcoding life to conserve biological diversity: beyond the taxonomic imperative. **PLoS Biol**, v. 8, n. 7, p. e1000417, 2010.

XIA, et al. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2012.

WAKE, D. B. Declining amphibian populations. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 860, 1991.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Vol. 4. **University of Chicago press**, Chicago, IL, USA, 1978.

2. Artigo

(Conforme Regras da revista Zoologica Scripta)

GRANATO-NETO, E. et al. (2016) **DNA barcode of *Scinax ruber* and *Scinax catharinae* clades (Anura, Hylidae) from southeastern Brazil reveals puzzle pieces for the genus.** Zoologica Scripta, 00, 000-000.

Abstract

The *Scinax* genus has a puzzling taxonomic history and a large number of species, some of them considered species complex. In this paper we characterized the DNA barcode of some species of two clades of the genus - *S. catharinae* and *S. ruber* and the haplotypes of the species with the highest number of samples – *S. fuscovarius* and *S. perereca*. We brought up the possibility of a species complex within *S. perereca* and detected the same haplotype shared by specimens of *S. fuscovarius* as far as 700 km.

Elias Granato-Neto, Institute of Nature Sciences, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Brazil. E-mail: eliasg_net@hotmail.com

Tereza C. Orlando, Institute of Nature Sciences, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Brazil. E-mail: tecris@unifal-mg.edu.br

Vinícius X. SILVA, Institute of Nature Sciences, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Brazil. E-mail: vxsilva@gmail.com

Vanessa R. Moreno-Cotulio, Institute of Nature Sciences, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Brazil. E-mail: biovanessa@gmail.com

Introduction

Amphibians are suffering a steep decline, and one of the most endangered vertebrate groups (Berger *et al.* 1998). To better know the taxonomy of a group is fundamental to preserve it. Among the three orders of amphibians, Anura is the biggest, with 88% of the species (Frost *et al.* 2006). Among the 6,554 anurans species described (Frost, 2015), Brazil is the country with the highest amount (Matavelli *et al.* 2015): 988 species distributed in 87 genera (Segalla *et al.* 2015).

One of these genera is *Scinax* Wagler, 1830, the second largest of Hylidae (Faivovich *et al.* 2005), with 115 recognized species, with 93 of them found in Brazil. The geographical distribution of this genus extends from Mexico to Argentina and Uruguay, including the Caribbean Islands, Trinidad and Tobago and St. Lucia (Frost 2015). In 1977, this genus, still referred to as *Hyla* genus, had the group called *Hyla rubra* transferred to the genus *Ololygon* (Fouquette & Delahoussaye 1977). In 1991, Pombal and Gordo showed that *Scinax* genus had preference over *Ololygon*. The *Scinax* review did not found support for the monophyly of *Scinax ruber* groups (old group *Scinax rubra*), *Scinax staufferi* and *Scinax x-signatus* (Duellman & Wiens, 1992) and all species of *S. x-signatus* group were reallocated to the *S. ruber* group (Pombal *et al.* 1995a). Similarly, members of the *S. rizibilis* group was passed to *S. catharinae* group (Pombal *et al.* 1995b). However, the lack of evidence for the monophyly of many groups remained in the phylogenetic analysis using morphological characters (Faivovich 2002). Of the five known *Scinax* groups (*ruber*, *rostratus*, *catharinae*, *staufferi* and *perpusillus*) only *S. catharinae* and *S. rostratus* were confirmed. The *S. staufferi* group showed polyphyletic, *S. perpusillus* had only one species and came out as sister group of *S. catharinae* group. *S. ruber* group came out as paraphyletic. Thus, *S. staufferi* and *S. ruber* groups as previously proposed were not more recognized (Faivovich 2002).

In 2005, Faivovich *et al.* made a broad phylogenetic analysis of the Hylidae. Thereafter, *Scinax* came to be supported by two big monophyletic clades of species (Faivovich *et al.* 2005): *Scinax catharinae* clade and the *Scinax ruber* clade. The *S. catharinae* clade contain the *S. catharinae* (33 species) and *S. perpusillus* groups (13 species) and the *S. ruber* clade, the *S. rostratus* (10 species) and *S. uruguayus* groups (two species). But, even so, there are 56 species of *S. ruber* clade not assigned to any group, particularly those belonging to the old groups *S. ruber* and *S. staufferi* (Faivovich *et al.* 2005, 2010; Frost

2015): *S. acuminatus* (Cope, 1862), *S. altae* (Dunn, 1933), *S. alter* (Lutz, 1973), *S. auratus* (Wied-Neuwied, 1821), *S. baumgardneri* (Rivero, 1961), *S. blairi* (Fouquette & Pyburn, 1972), *S. boesemani* (Goin, 1966), *S. cabralensis* Drummond, Baêta & Pires, 2007, *S. caldarum* (Lutz, 1968), *S. campossebrai* (Bokermann, 1968), *S. cardosoi* (Carvalho-e-Silva & Peixoto, 1991), *S. castroviejoii* De La Riva, 1993, *S. chiquitanus* (De La Riva, 1990), *S. cretatus* Nunes & Pombal, 2011, *S. crosposedospilus* (Lutz, 1925), *S. cruentommus* (Duellman, 1972), *S. curicica* Pugliese, Pombal & Sazima, 2004, *S. cuspidatus* (Lutz, 1925), *S. danae* (Duellman, 1986), *S. dolloi* (Werner, 1903), *S. duartei* (Lutz, 1951), *S. elaeochrous* (Cope, 1875), *S. eurydice* (Bokermann, 1968), *S. exiguus* (Duellman, 1986), *S. funereus* (Cope, 1874), *S. fuscomarginatus* (Lutz, 1925), *S. fuscovarius* (Lutz, 1925), *S. granulatus* (peters, 1871), *S. hayii* (Barbour, 1909), *S. ictericus* Duellman & Wiens, 1993, *S. imbegue* Nunes, Kwet & Pombal, 2012, *S. iquitorum* Moravec, Tuanama, Pérez-Peña & Lehr, 2009, *S. juncae* Nunes & Pombal, 2010, *S. karenanneae* (Pyburn, 1993), *S. lindsayi* Pyburn, 1992, *S. madeirae* (Bokermann, 1964), *S. manriquei* Barrio-Amorós, Orellana & Chacón-Ortiz, 2004, *S. maracaya* (Cardoso & Sazima, 1980), *S. montivagus* Juncá, Napoli, Nunes, Mercês & Abreu, 2015, *S. nasicus* (Cope, 1862), *S. oreites* Duellman & Wiens, 1993, *S. pachycrus* (Miranda-Ribeiro, 1937), *S. perereca* Pombal, Haddad & Kasahara, 1995, *S. quinquefasciatus* (Fowler, 1913), *S. rogerioi* Pugliese, Baêta & Pombal, 2009, *S. ruber* (Laurenti, 1768), *S. rupestris* Araujo-Vieira, Brandão & Faria, 2015, *S. sateremawe* Sturaro & Peloso, 2014, *S. similis* (Cochran, 1952), *S. squalirostris* (Lutz, 1925), *S. staufferi* (Cope, 1865), *S. tigrinus* Nunes, Carvalho & Pereira, 2010, *S. tymbamirim* Nunes, Kwet & Pombal, 2012, *S. villasboasi* Brusquetti, Jansen, Barrio-Amorós, Segalla & Haddad, 2014, *S. wandae* (Pyburn & Fouquette, 1971) and *S. x-signatus* (Spix, 1824).

The taxonomic complexity of *Scinax* is due to the large number of species morphologically conserved and similar. Increasingly undescribed species are being discovered (Nunes-De-Almeida & Toledo 2012). This great cryptic diversity or species complex is a constant in literature of this widely distributed genus (Fouquet *et al.* 2007; Heyer *et al.* 1990; Magrini *et al.* 2011). The difficulty in species identification of these groups by traditional methods (Pombal *et al.* 1995a) make them strong candidates for analysis of their diversity by genetic viewpoint (Bickford *et al.* 2007; Prado *et al.* 2012). Two tools for this kind of study are the DNA barcode (Hebert *et al.* 2003a) and haplotype analysis. The lack of

haplotype sharing indicates a reproductive isolation (Crochet 2000; Hebert *et al.* 2003b) and can be a clue that there are different species.

The detection of cryptic species complexes and large genetic distances in amphibians classified as a single species has been a constant (Bickford *et al.* 2007; Evans *et al.* 2011; Gehara *et al.* 2014; Prado *et al.* 2012). The use of these molecular tools reinforces that evolution in amphibians generally occurs forming cryptic species (Elmer *et al.* 2007; Padial & De-la-Riva 2009).

The neotropical amphibians exhibit deep genetic divergences, but they need a long time for phenotypic differences to evolve (Lougheed *et al.* 1999, 2006), thus some species can not be diagnosed by morphological characters due to the recent speciation (Bickford *et al.* 2007; Fouquet *et al.* 2007). In this context, the DNA barcode is a good tool to detect intra and interspecific variability, including pointing out cryptic species. In animals the DNA barcoding system could be based in the 5' region of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COI) (Hebert *et al.* 2003b). Studies using DNA barcode demonstrated efficiency superior to 95% in the discrimination of species for birds, fish and amphibians (Fazekas *et al.* 2009; Smith *et al.* 2008). However, until January 2016 in the Genbank database there are COI sequences for only 13 *Scinax* species.

Not only the COI gene, but studies with other genes within *Scinax* are rare. In 2007, Fouquet and collaborators built molecular phylogenies with nuclear and mitochondrial markers, besides phylogeographic and haplotype analysis of species of *S. ruber* clade for French Guiana. Among other discoveries, they confirmed the polyphyly of *S. ruber* clade and found evidence of hybridization between *S. ruber* and *S. x-signatus*. Mitochondrial markers and microsatellite were used in the comparison between continental and island populations of *S. perpusillus* group, confirming new species described for those islands (Bell *et al.* 2012). One of the few recent works with the COI gene in *Scinax* was the review of *S. fuscomarginatus*, that demonstrated that genus diversity is not always crescent by virtue of the discovery of cryptic species but some species were synonymized (Brusquetti *et al.* 2014).

The aim of this study was to characterize the genetic variability of species of *S. ruber* and *S. catharinae* clades and to test the congruence between genetic data and the current classification for samples from southeast Brazil. To date no work has done an extensive analysis with all species of the clade and covering wide geographic area. Therefore, at the

moment, the more viable alternative is a geographically approach more localized and, in this case, combining two different analyzes (DNA barcode and haplotypes).

Materials and Methods

Samples

A total of 59 tissue samples of amphibians species including *Scinax fuscovarius*, *S. skaios*, *S. perereca*, *S. x-signatus* and *S. longilineus* already deposited in the Coleção Herpetológica Alfred Russel Wallace (CHARW) of Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) and Coleção Herpetológica of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) . These samples are from 14 locations in the south of Minas Gerais state, Brazil (see Supporting information. Table S1). Additionally, we analyzed 38 sequences available in the GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), identified as *S. fuscovarius* (JQ627313-JQ627316, JQ627318- JQ627330 and JQ627332), *S. squalirostris* (KJ004283), *S. fuscomarginatus* (KJ004268, KJ004262 and KJ004261), *S. ruber* (KP149243, KP149255, KP149149, KP149177 and KP149236), *S. wandae* (KP149250 and KP149225), *S.cf kennedyi* (KP149224, KP149253 and KP149203), *S. alter* (KT236275), *S. rostratus* (KP149089), *S. nasicus* (KJ004280), *S. berthae* (KJ004284), *S. acuminatus* (KJ004281) and *S. nebulosus* (KJ004282).

Molecular analysis

Total DNA was extracted using the protocol described by Fetzner (1999) or using the Animal Genomic DNA Extraction Kit (BioBasic). We analysed the quantity of the DNA extracted by agarose gel electrophoresis 0,8%, ethidium bromide stained and Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer. The COI partial DNA region was amplified using the primers LCO 1490 and HCO 2198, described by Folmer *et al.* (1994).

The PCR reactions were performed in 25 µL volumes according to Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase protocol (Thermo Fisher Scientific). The amplification reactions were: initial denaturation step at 95°C for 3 min, 35 PCR cycles (95°C for 30s, 55°C for 30s, 72°C for 30s) and a final extension step at 72°C for 10 min. The primer

annealing temperature was specific for each species (*S. fuscovarius*, *S. skaios* and some of *S. perereca* 55°C, *S. perereca*, and *S. longilineus* 52.5°C, *S. squalirostris* and *S. x-signatus* 49°C). PCR products were verified by 1.2% agarose gel electrophoresis and purified directly with Exonuclease I (Exo I, Fermentas) and Alkaline Phosphatase (SAP, Fermentas) prior to sequencing. Sanger sequencing reactions were performed by Genomic Company – Molecular Engineering (São Paulo, Brazil), using “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” kit, in Applied Biosystems, model ABI 3130xl.

Consensus sequences were obtained using direct and reverse traces using Chromas Lite version 2.1 (Technelysium 2012) and aligned using Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) in MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). We translated all sequences to confirm that none contained premature stop codons, what could indicate pseudogenes. DNA sequences in this article were in GenBank under accession numbers KU359476 - KU359534. To compare with GenBank we utilized the BLAST search tool (Camacho *et al.* 2009), for the p-distance divergences and the Neighbor-Joining (NJ) tree we used MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

We used the uncorrected p-distance method to generate evolutionary divergence among species as it is as much as or more accurate than K2P for intraspecific identification and NJ tree (Barros-García *et al.* 2015; Nei & Kumar 2000; Srivathsan & Meier 2012). For amphibians the p-distance method has proved to be efficient (Gehara *et al.* 2014). Besides this, it is important to use the same method to enable comparison of our results. For this p-distance method, genetic distances greater than 10% were considered indicative of different species (Vences *et al.* 2005).

In the DnaSP version 5.10 (Rozas *et al.* 2003) we determined the number of haplotypes (h), the number of different haplotypes among sampled sequences, haplotype diversity (Hd), variation into populations (F_{ST}) and nucleotide diversity (π). To generate the TCS haplotype network (Clement *et al.* 2002) we utilized the program PopART (Leigh & Bryant 2014). These analyzes were developed for only the species with the highest number samples (*S. fuscovarius* and *S. perereca*).

Results

The COI sequences of 59 samples of six species of the genus *Scinax* totaled 658bp with an amplification rate of about 70% of the samples. Not amplified species were *S.*

centralis, *S. maracaya*, *S. constrictus*, *S. granulatus*, *S. tigrinus*, *S. crospeospilus*, *S. flavoguttatus*, *S. ranki* and *S. cabralensis*. The final alignment for calculation of genetic divergences and NJ tree was 549bp, since some of Genbank samples had smaller size.

The groupings defined among sequenced samples of *Scinax* in the NJ tree, as well as haplotype networks for species previously identified as *S. fuscovarius* and *S. perereca* are shown in the Figures 1 and 2. The *S. catharinae* clade was recovered as monophyletic with high bootstrap value (97%, Figure 1). Among representative species of this clade, *S. berthae* was the most basal. *S. longilineus* and *S. skaios* appeared as sister groups. The genetic divergences within this clade ranged from 11.1 to 18.3% (data not shown).

The *S. ruber* clade came out as polyphyletic in relation to the *S. catharinae* clade (Figures 1 and 2). The genetic divergence rates within this clade have ranged from 13.4 to 24% (data not shown). Two species of this clade without defined group showed greater affinity with *S. rostratus* group with other species of the *S. ruber* clade: *S. wandae* and *S. acuminatus*. However, these relationships were not very supported by bootstrap values. *S. wandae* appears as sister of *S. rostratus* group. *S. acuminatus* came out within the own *S. rostratus* group, making it polyphyletic. Within the *S. rostratus* group, *S. nebulosus* was the most basal, followed by *S. acuminatus* (no defined group) and the sister groups *S. rostratus* and *S. cf kennedyi* (Figure 2).

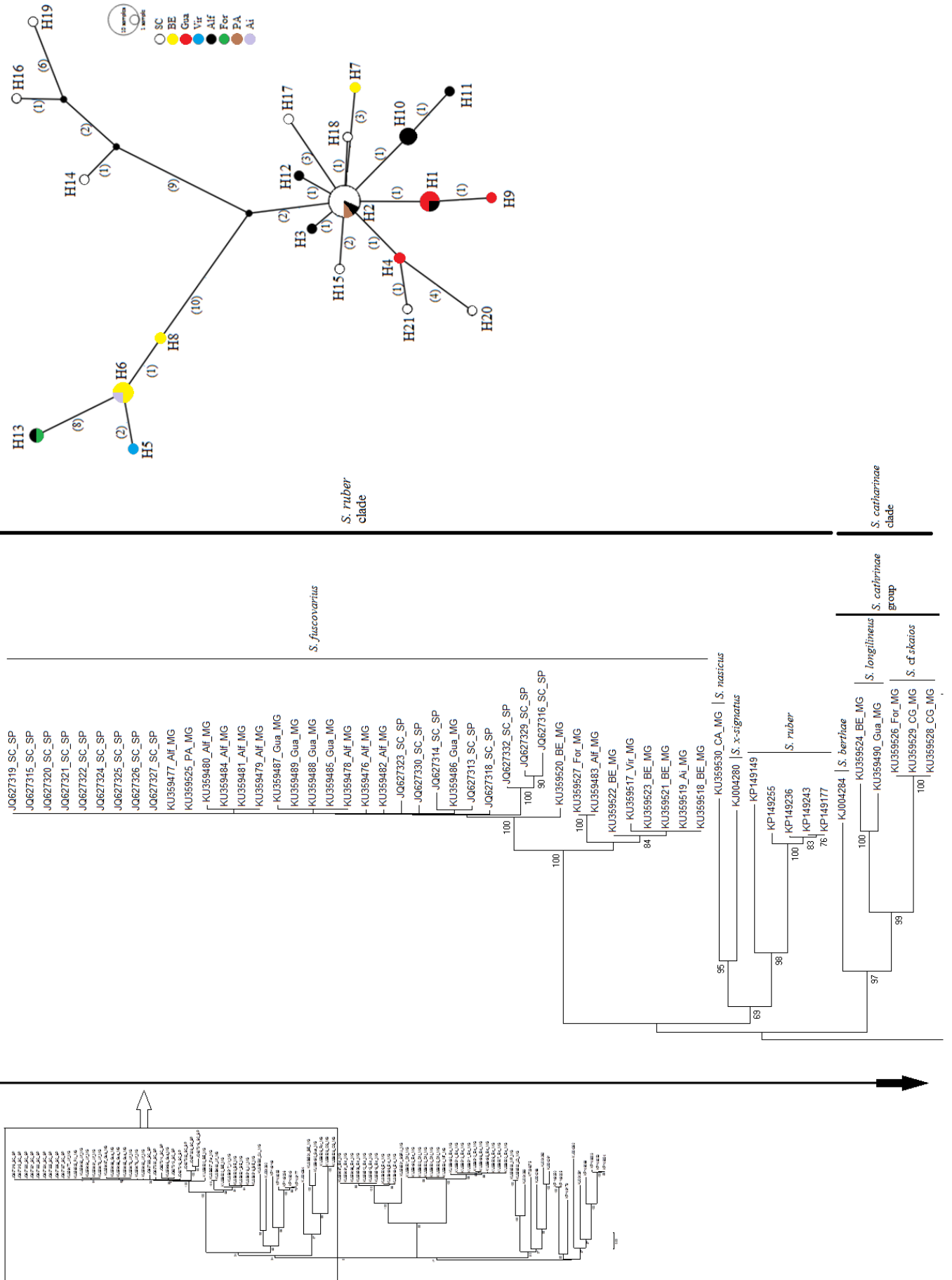


Fig 1: Neighbor-Joining Tree for COI gene sequences of some species of *S. ruber* and *S. catharinae* clades of southeastern Brazil including Genbank sequences. Beside the name of each species type is the Genbank number and locations of each sample, as well as the separation of groups (when there is this classification) and clades according Faivovich *et al.* (2005). Bootstrap values below 70% were omitted. On the right side is represented the haplotype network for *S. fuscovarius*. Numbers refer to the haplotype and the size of the vertices, the haplotype frequency. Legend of the locations: SC – São Carlos ; BE – Boa Esperança; Gua - Guaxupé; Vir - Virgínia; Alf - Alfenas; For - Formoso; PA – Pouso Alegre; Ai – Aiuruoca; And MG – Minas Gerais state; SP – São Paulo state.

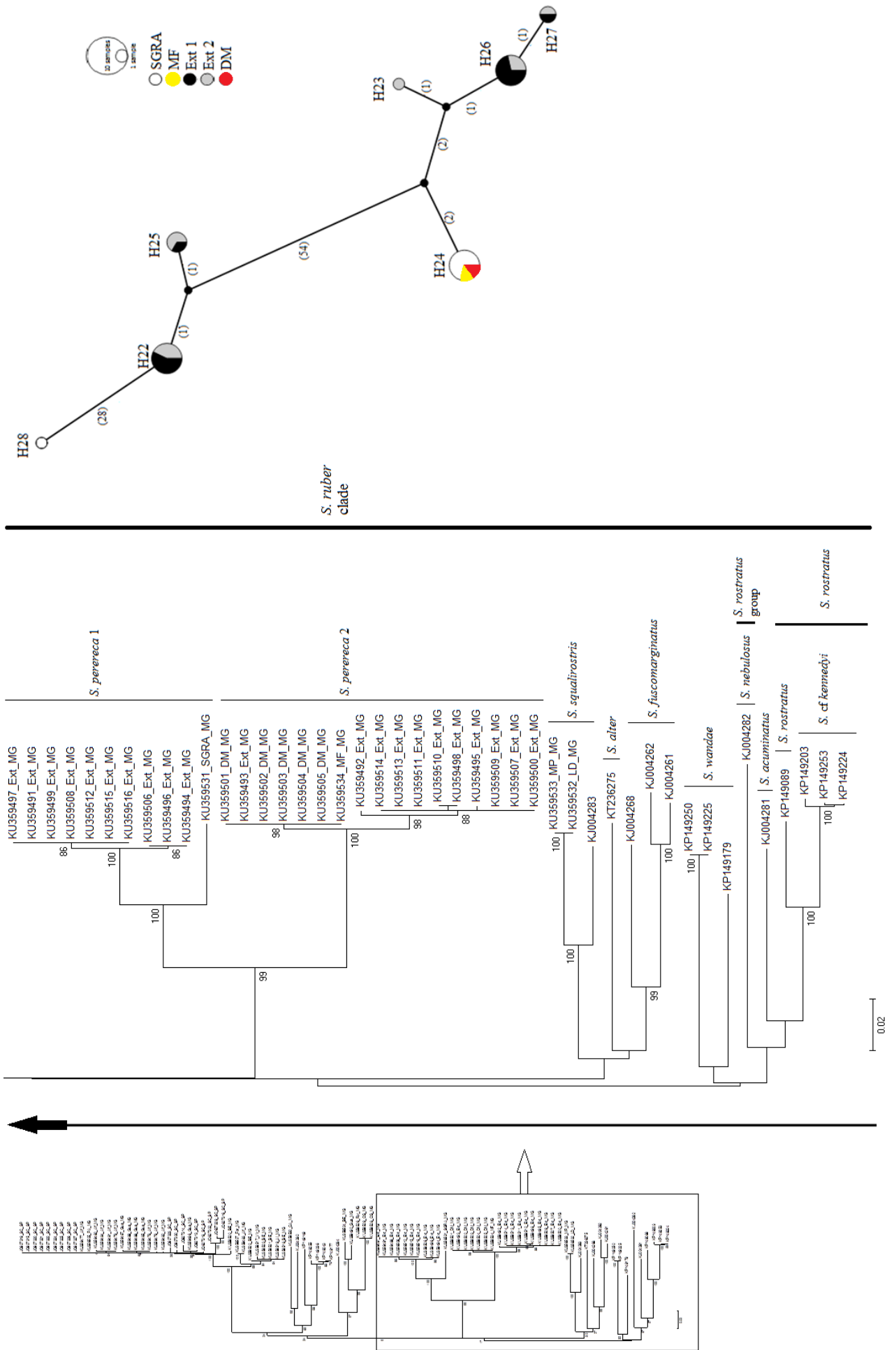


Fig 2: Neighbor-Joining Tree for COI gene sequences of some species of *S. ruber* clade of southeastern Brazil including Genbank sequences. Beside the name of each species type is the Genbank number and locations of each sample, as well as the separation of groups (when there is this classification) and clades according Faivovich *et al.* (2005). Bootstrap values below 70% were omitted. On the right side is represented the haplotype network for *S. perereca*. Numbers refer to the haplotype and the size of the vertices, the haplotype frequency. Legend of the locations: SGRA – São Gonçalo do Rio Abaixo; MF – Maria da Fé; Ext 1 – Extrema location 1; Ext 2 Extrema location 2; DM – Delfim Moreira; And MG – Minas Gerais state.

The remaining species of the *S. ruber* clade without defined group were divided into three subgroups. Two of these with low bootstrap values: one with *S. fuscovarius*, *S. ruber*, *S. nasicus* and *S. x-signatus* (Figure 1) and other with *S. squalirostris*, *S. alter* and *S. fuscomarginatus* (Figure 2). The third subgroup, this rather well supported by bootstrap, was composed of samples previously identified as *S. perereca*. These samples, in turn, were divided into two branches equally well supported by the bootstrap values (99%, Fig. 2), the average genetic divergence rate of 10.8% (see Supporting information. Table S2), with an extent of 10.6 to 11.6% (data not shown) and haplotype network. All this evidences were considered to separate the individuals of these two branches as different species (*S. perereca* 1 and *S. perereca* 2) (Figure 2). The genetic distance between these two species into *S. perereca* was greater than those reported, for example between *S. rostratus* and *S. cf kennedyi*, with 7.5% (see Supporting Information. Table 2).

The haplotype diversity and nucleotide diversity of *S. perereca* and *S. fuscovarius* are presented in the Table 1. The analysis of haplotypes indicated that the two clades of *S. perereca* do not share haplotypes and occur in sympatry in the locality of Extrema-MG and syntopy, as they were collected in the same lakes. Samples identified as *S. perereca* in this study are also out of the occurrence area known for the species (Figure 3). The F_{ST} value calculated between *S. perereca* 1 and *S. perereca* 2 was 0.934. But, for individuals of *S. fuscovarius* it were observed other haplotypes and the same haplotype shared in different locations as far as 700km (Figure 3). The value of F_{ST} calculated between northern populations (state of Minas Gerais, MG) and south (state of São Paulo, SP) of *S. fuscovarius* was 0.178.

Table 1: Haplotype analyzes for *S. fuscovarius* and two species of *S. perereca* from southeastern Brazil.

Species	Nucleotide Diversity (π)	Number of Haplotypes	Haplotype Identification	Haplotype Diversity (Hd)
<i>S. fuscovarius</i>	0.0149	21	1-21	0.909
<i>S. perereca</i> 1	0.0110	3	22-24	0.564
<i>S. perereca</i> 2	0.0050	4	25-28	0.684

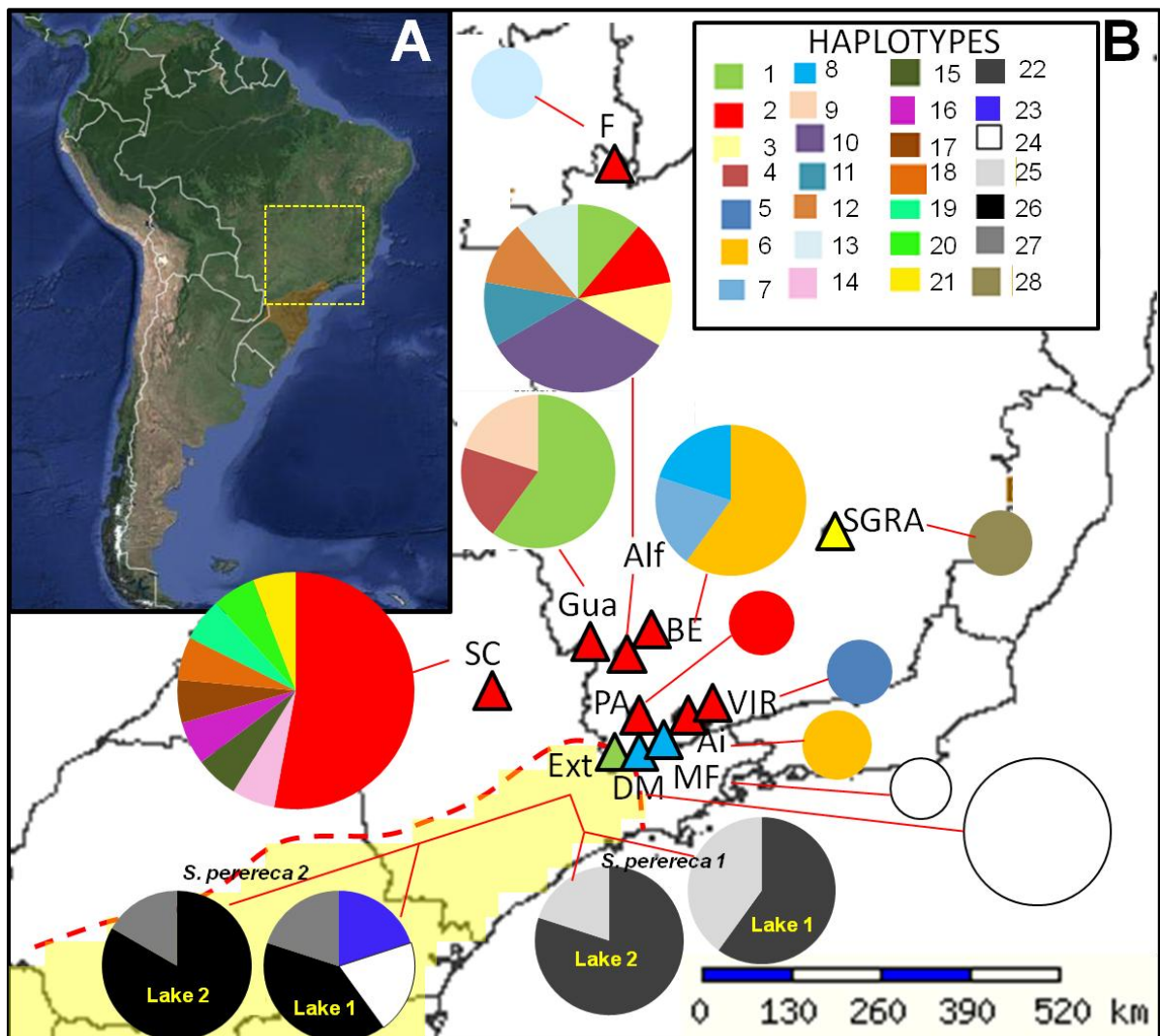


Fig. 3: A) Study area in Southeastern Brazil where samples identified as *Scinax fuscovarius* and *S. perereca* were analyzed by haplotypes. Detail of the geographic distribution of *S. perereca* by AmphibiaWeb (2015). B) Distribution of the analyzed samples of *S. fuscovarius* and *S. perereca* with frequencies of haplotypes. The size of the graphics shows the number of individuals of each sample. Red triangles: *S. fuscovarius* samples. Yellow triangle: only *S. perereca* 1. Blue triangles: only *S. perereca* 2. Green triangle: sympatric *S. perereca* 1

and 2. Dashed red line shows northern boundary of *S. perereca* distribution by AmphibiaWeb (2015). Ai: Aiuruoca-MG, Alf: Alfenas-MG, BE: Boa Esperança-MG, DM: Delfim Moreira-MG, Ext: Extrema-MG, F: Formoso-MG, Gua: Guaxupé-MG, MF: Maria da Fé-MG, PA: Pouso Alegre-MG, SC: São Carlos-SP, SGRA: São Gonçalo do Rio Abaixo, VIR: Virgínia-MG

Discussion

In the present work we amplified the DNA barcode of six species, increasing the amount of molecular data on the genus *Scinax*. For four of these species until this moment there were no data of this marker. The analysis of this region indicated the monophyly of *S. catharinae* group, while the *S. ruber* group came out polyphyletic. Individuals previously identified as *S. perereca* apparently belong to two different species, suggesting a species complex. The same was not observed in samples of *S. fuscovarius*, all grouped into a single cluster, besides sharing the same haplotype at distances of up to 700 km.

The 70% rate of amplification for the COI region found in different species of clades *S. ruber* and *S. catharinae* is common in amphibians, mainly using the universal primers (Hawkins *et al.* 2007; Smith *et al.* 2008; Vences *et al.* 2005). Some factors, however, can contribute to this difficulty, such as samples with degraded DNA (from roadkill animals) and the use of only universal primers. However, we don't find problems related to the samples age, since we amplified and sequenced normally samples with more than 6 years. In general, samples preserved for a long time may present problems for amplification, as described by Smith *et al.* (2008).

The DNA barcode data points out both the monophyly in *S. catharinae* clade and the polyphyly in *S. ruber* clade, corroborating the hypothesis of Faivovich *et al.* (2005) and Wiens *et al.* (2010). However, phylogenetic inferences from only the COI gene and a tree obtained by NJ could be seen with caution by many authors (Goto & Kimura 2001; Hajibabaei *et al.* 2006; Min & Hickey 2007).

Among these clades the two species with the greatest number of amplified samples were *S. fuscovarius* (23 specimens) and *S. perereca* (28 specimens). Individuals previously identified as *S. perereca* were captured in five locations in the Minas Gerais state – Brasil: Extrema (two different lakes), Delfim Moreira, Maria da Fé and São Gonçalo do Rio Abaixo (Fig. 3). This was the first work to register this species in this state. Until now, its distribution was limited, in Brazil, to some localities in the states of São Paulo and Rio Grande do Sul and

some parts of Argentina and Paraguay (Frost, 2015). This seemingly disconnect distribution, the advertisement call similar to other species (Pombal *et al.* 1995a), the difficulty of purely morphological identification (Faivovich 2002, 2005) and the morphological similarity with *S. hayii* e *S. dolloi* (Caramaschi *et al.* 2013) already indicated the possibility of *S. perereca* to be a species complex.

In addition to unpublished data from geographical distribution, our study also provides the first data of the *S. perereca* barcode region, with genetic divergences of up to 11.6% among individuals. Literature data demonstrate that divergences in the region above 10%, calculated by p-distance method, are considered sufficient to differentiate species in amphibians (Vences *et al.* 2005). To Crawford *et al.* (2010), values of 8% calculated with K2P algorithm is enough for this distinction. Gehara *et al.* (2014), working with another Brazilian Hylidae, *Dendropsophus minutus*, and using p-distance to compare the samples, obtained maximum genetic diversity values of 12%, which was considered evidence of a species complex. The same magnitude of difference (11.1%) was observed in this study between individuals of *S. skaios* and *S. longilineus* (see Supporting information, Table 3), the two closest taxa within the *S. catharinae* group. Among some individuals of *S. perereca* the value of divergence was even higher (11.6%).

Due to this high divergence, *S. perereca* individuals were divided in two groups, which may be displayed in the NJ tree (Fig. 2). Within each group, the maximum divergence found was 5.3%. These data are also supported by the TCS network (Fig. 2), being possible to observe two haplotype groups, which were distant due to the high rate of mutations between them (up to 54, Fig. 2). When constructed the haplotype network in the program TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) (data not shown), this disruption in the places indicating high mutations rates, forming three separated haplotypes networks: in addition to two groups suggested here, there was also the isolation of the haplotype related to the sample from São Gonçalo do Rio Abaixo-MG. In this program, the haplotypes are connected when the number of differences among them does not exceed 95% parsimony probability threshold (Templeton *et al.* 1992). We tested with a 90% value and still there was the rupture, indicating the possibility of more than one species. This is also reinforced by the value of F_{ST} (Table 1), which also indicates separation estrangement between the two groupings of *S. perereca*. F_{ST} values close to 0 indicate populations sharing haplotypes (Wright 1978), as observed among samples of *S. fuscovarius* (Table 1). The smaller nucleotide diversities and haplotype of the two species of

S. perereca when compared with *S. fuscovarius* (Table 1) may be a result of the somewhat lower number of samples of the latter.

When analyzed the two species of *S. perereca* separately, the nucleotide diversity is about 5 to 10 times smaller than *S. perereca* 1 and 2, respectively, than that analyzed as a single group. Furthermore, some of these specimens of *S. perereca* live in sympatric, in distant lakes less than 600m, and syntopy, some captured in the same lake, and even so there is not haplotypes shared between the two groups. As for *S. fuscovarius* haplotypes were shared even among individuals from distant locations (Alfenas-MG and Formoso-MG, Fig. 3).

Thus, the two groupings observed in *S. perereca* were considered distinct species. However, this hypothesis needs the support of more studies with more samples, broadgeographical coverage and more species of the genus. Two hypotheses were developed based on the results of this study: I) presence of species complex in *S. perereca* with at least one or two new species or II) possibly identification mistake of samples, because this study does not include all species of the genus, so it is possible that such samples grouped in another cluster if a more complete set of species were considered.

Scinax fuscovarius also features reason to be considered a species complex (Aquino *et al.* 2015; Dixo & Verdade 2006), with wide geographical distribution and relative phenotypic variability. The data from this study, however, did not corroborate this hypothesis. The samples of different locations relatively distant formed a single cluster in the NJ tree, the low rates of genetic divergence (data not shown) and the haplotypes shared among individuals in distant locations (Fig. 3) may be a reflection that this species is quite generalist and an aggressive colonizer. For being extremely common and plentiful, being commonly found in bathrooms, drains and plumbing installations, *S. fuscovarius* receives the popular name of "Snouted Treefrog" (Ribeiro *et al.* 2005), which indicates that it has adapted very well to anthropized environments. We didn't find in the literature values for the distance that these animals can dislocate, but for amphibians with similar sizes to *S. fuscovarius* it is known that these distances are reduced (Zug *et al.* 2001). This species, however, may be an exception, with extremely high dispersibility for a frog of this size, or, as a minimum, with a great dispersal capacity of their genes. One of the hypotheses to explain this great dispersion is known as "Stepping Stones" (Decout *et al.* 2012), in which these amphibians do not have to go the total distance, but migrate shorter distances and they would reproduce at intermediate

locations, that would maintain gene flow between the most extreme points. This does not mean, however, that the addition of more samples and more distant locations will not indicate in this case the occurrence of other species complex. Two other species present results contrary to those of *S. perereca*. Contradicting the expected, *S. rostratus* and *S. cf kennedy* exhibit relatively low genetic distance (7.5%, data not shown). Even for individuals belonging to the same group (*S. rostratus*), this value is compatible with individuals of the same species (Crawford *et al.* 2010; Vences *et al.* 2005) This was considered as an indication that these two formal species also justify a taxonomic revision, or as a minimum, the sample material deserves re-examination, especially those determined as "cf". There is the possibility that the species would have suffered differentiation a small time ago and this justified the small genetic diversity.

These data contributed to a better understanding the *Scinax* genus taxonomy, in particular *S. ruber* clade. Even not being conclusive about various species of the genus and with no expressive geographical coverage, this study reinforces the need for more detailed review in some taxa and the possibility of complexes of cryptic species as well as synonymization in this genus. This is fundamental for future research of phylogeography and phylogenetic analysis of neotropical amphibians.

Conclusion

The two genetic approaches (analysis of DNA barcode divergences and haplotype analysis) broadened the understanding of *Scinax* genus and its scrambled taxonomic history. In the present work it was characterized the first COI region of *S. longilineus*, *S. perereca*, *S. skaios* and *S. x-signatus*, which will help in future studies of molecular taxonomy. The study indicated the possibility of a species complex in *S. perereca* and that samples identified as *S. rostratus* and *S. cf. kennedyi* may belong to the same species. We also reported that *S. fuscovarius*, contrary to what is expected for most amphibians (low dispersion capacity), apparently achieve long distances, or at least, keeps some gene flow between populations to such long distances.

Acknowledgements

This work was conducted during a scholarship supported by CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education to E.G.N.. This project was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Program BIOTA MINAS APQ 0354909, Project “Inventory and Establishment of Collections from the Aquatic and Terrestrial Biodiversity of Southern Minas Gerais”). To Paulo C.A. Garcia and Rafael Magalhães of Coleção Herpetológica of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) by giving and sending of part of samples analyzed in this study. To Josiane da Silva Ricardino, Joice Paiva Vidigal Martins, Adriele Aparecida Pereira, Leonardo dos Santos Gedraite and Paula Leão Ferreira by the samples collected in the Parque Nacional Grande Sertão Veredas under license IBAMA/SISBIO No. 29422. To Lucas Santos Canuto and Isabela Spido Dias by the help in the laboratory. To Paul Hartzhberg for English revision.

References

- Aquino, L., Bastos, R., Reichle, S., Silvano, D., Baldo, D., & Langone, J. 2015. *Scinax fuscovarius*. The iucn red list of threatened species. Version 2014.3.
- Barros-García, D., Bañón, R., Arronte, J. C., Fernández-Peralta, L., García, R., & Carlos, A. (2015). DNA barcoding of deep-water notacanthiform fishes (Teleostei, Elopomorpha). *Zoologica Scripta*, 00, 000–000.
- Bell, R. C., Brasileiro, C. A., Haddad, C. F., & Zamudio, K. R. (2012). Evolutionary history of *Scinax* treefrogs on land-bridge islands in south-eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, 39, 1733-1742.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., et al. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9031-9036.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148-155.
- Brusquetti, F., Jansen, M., Barrio-Amorós, C., Segalla, M., & Haddad, C. F. (2014). Taxonomic review of *Scinax fuscomarginatus* (Lutz, 1925) and related species (Anura; Hylidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171, 783-821.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). Blast+: Architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10, 421.
- Caramaschi, U., Nunes, I., Nascimento, L. B., & Carvalho Jr, R. R. (2013). The type locality of *Scinax dolloi* (Werner, 1903)(Anura, Hylidae). *Zootaxa*, 3691, 299-300.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). Tcs: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657-1659.

- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. 2002. Tcs: Estimating gene genealogies *ipdps* (p. 0184): IEEE.
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 13777-13782.
- Crochet, P. A. (2000). Genetic structure of avian populations—allozymes revisited. *Molecular Ecology*, 9(10), 1463-1469.
- Decout, S., Manel, S., Miaud, C., & Luque, S. (2012). Integrative approach for landscape-based graph connectivity analysis: A case study with the common frog (*Rana temporaria*) in human-dominated landscapes. *Landscape ecology*, 27, 267-279.
- Dixo, M., & Verdade, V. K. (2006). Herpetofauna de serrapilheira da Reserva Florestal de Morro Grande, Cotia (SP). *Biota Neotropica*, 6, 1-20.
- Duellman, W. E., & Wiens, J. J. (1992). The status of the hylid frog genus *Oloolygon* and the recognition of *Scinax wagneri*, 1830: *University of Kansas*.
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Lougheed, S. C. (2007). Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 247.
- Evans, B., Greenbaum, E., Kusamba, C., Carter, T., Tobias, M., Mendel, S., et al. (2011). Description of a new octoploid frog species (Anura: Pipidae: *Xenopus*) from the Democratic Republic of the Congo, with a discussion of the biogeography of African clawed frogs in the Albertine rift. *Journal of Zoology*, 283, 276-290.
- Faivovich, J. (2002). A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18, 367-393.
- Faivovich, J., Gasparini, J. L., & Haddad, C. F. (2010). A new species of the *Scinax perpusillus* group (Anura: Hylidae) from Espírito Santo, Brazil. *Copeia*, 2010, 97-102.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae:

Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 1-240.

Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Burgess, K. S., Percy, D. M., Graham, S. W., Barrett, S. C., et al. (2009). Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources*, 9, 130-139.

Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M.-D., Meyer, A., Marty, C., Blanc, M., et al. (2007). Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43, 567-582.

Fouquette Jr, M., & Delahoussaye, A. (1977). Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. *Journal of Herpetology*, 387-396.

Frost, D. 2015. *Amphibian species of the world: An online reference, ver. 6.0, american museum of natural history*, New York.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F., et al. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 1-291.

Gehara, M., Crawford, A. J., Orrico, V. G., Rodriguez, A., Loetters, S., Fouquet, A., et al. (2014). High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: Continental phylogeography of the neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE* 9(10): e111829. doi: 10.1371/journal.pone.0111829.

Goto, S. G., & Kimura, M. T. (2001). Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 18, 404-422.

Hajibabaei, M., Singer, G. A., & Hickey, D. A. (2006). Benchmarking DNA barcodes: An assessment using available primate sequences. *Genome*, 49, 851-854.

Hawkins, M. A., Sites Jr, J. W., & Noonan, B. P. (2007). *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) of the Guiana shield: Using DNA barcodes to assess identity and diversity. *Zootaxa*, 1540, 61-67.

- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, S96-S99.
- Heyer, W. R., Rand, A. S., da Cruz, C. A. G., Peixoto, O. L., & Nelson, C. E. (1990). Frogs of boracéia. *Arquivos de Zoologia*, 31, 231-410.
- Leigh, J., & Bryant, D. 2014. Popart: Full-feature software for population genetics.
- Lougheed, S., Gascon, C., Jones, D., Bogart, J., & Boag, P. (1999). Ridges and rivers: A test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266, 1829-1835.
- Lougheed, S. C., Austin, J. D., Bogart, J. P., Boag, P. T., & Chek, A. A. (2006). Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 23.
- Magrini, L., Carvalho-e-Silva, S., Beda, A. F., & Giaretta, A. A. (2011). Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura: Hylidae) clade from Brazil with comments on their taxonomy. *Zootaxa*, 3066, 37-51.
- Matavelli, R., Campos, A. M., Feio, R. N., & Ferreira, R. L. (2015). Occurrence of anurans in brazilian caves pojavljanje brezrepih dvoživk v brazilskih jamah. *Acta Carsologica*, 1, 44.
- Min, X. J., & Hickey, D. A. (2007). Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes*, 7, 365-373.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford University Press.
- Nunes-De-Almeida, C. H. L., & Toledo, L. F. (2012). A new species of *Elachistocleis parker* (Anura, Microhylidae) from the State of Acre, Northern Brazil. *Zootaxa*, 3424, 43-50.

- Padial, J. M., & De la Riva, I. (2009). Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 97-122.
- Pombal Jr, J. P., Bastos, R. P., & Haddad, C. F. B. (1995). Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. *Naturalia*, São Paulo, 20, 213-225.
- Pombal Jr, J. P., Haddad, C. F., & Kasahara, S. (1995). A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from Southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 1-6.
- Prado, C., Haddad, C. F., & Zamudio, K. R. (2012). Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular ecology*, 21, 921-941.
- Fetzner, J. W. Jr. (1999). Extracting High-Quality DNA from Shed Reptile Skins: A Simplified Method. *Biotechniques*, 26, 1052-1054.
- Ribeiro, R. d. S., Egito, G. T. B. T. d., & Haddad, C. F. B. (2005). Chave de identificação: Anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*, 5, 235-247.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
- Segalla, M. V., Caramaschi, U., Cruz, C. A., Garcia, P. C. A., Grant, T., Haddad, C. F. B., et al. (2015). Brazilian amphibians—list of species. *Sociedade Brasileira de Herpetologia*: <http://www.sbherpetologia.org.br> (último acesso em 29/12/2015).[Links].
- Smith, M., POYARKOV, N. A., & Hebert, P. D. (2008). DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: Take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*, 8, 235-246.
- Srivathsan, A., & Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28, 190-194.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., & Kumar, S. (2013). Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. Iii. Cladogram estimation. *Genetics*, 132, 619-633.

Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M., & Vieites, D. R. (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1859-1868.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S RNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2, 5.

Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.

Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., Hua, X., & Moen, D. S. (2010). An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 871-882.

Wright, S. (1978). Genetic variability in natural populations: Methods. Evolution and the genetics of populations. *The University of Chicago Press*, Chicago, USA, 79-103.

Zug, G. R., Vitt, L., & Caldwell, J. P. (2001). Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles: *Academic Press*.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1: relationship between samples, Genbank code, location and clades.

Table S2: Genetic divergence between species using the p-distance method.

Table 1: Relationship between samples, Genbank code, location and clades.

Samples	Genbank	Haplotype	Location	Spicies	Clade
CT142	KU359476	3	Alfenas – MG (21°25'29"S, 46°07'31"W)	<i>S. fuscovarius</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i>
CT143	KU359477	2			
CT144	KU359478	1			
CT1778	KU359479	10			
CT1819	KU359480	11			
CT1886	KU359481	10			
CT1993	KU359482	12			
CT2145	KU359483	13			
CT2263	KU359484	10			
CT415	KU359485	1			
CT416	KU359486	4			
CT1745	KU359487				
CT1746	KU359488				
CT1747	KU359489				
CT667	KU359490		Guaxupé – MG (21°20'06"S, 46°39'54"W)	<i>S. longilineus</i> (LUTZ, 1968)	<i>S. catharinae</i>
CT464	KU359491		Extrema - Lago próximo – MG (22°53'42"S, 46°19'59"W)	<i>S. perereca</i> (POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995)	<i>S. ruber</i>
CT465	KU359492				
CT466	KU359493				
CT478	KU359494				
CT479	KU359495				
CT490	KU359496				
CT491	KU359497				
CT492	KU359498				
CT493	KU359499	22			
CT494	KU359500	26			
CT616	KU359501	24	Delfim Moreira – MG (22°31'32"S, 45°14'07"W)	<i>S. perereca</i> (POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995)	<i>S. ruber</i>
CT617	KU359502	24			
CT618	KU359503	24			
CT619	KU359504	24			
CT620	KU359505	24			
CT649	KU359506	25			
CT650	KU359507	26			
CT652	KU359508	22			
CT654	KU359509	26			
CT655	KU359510	27			
CT656	KU359511	26			
CT658	KU359512	22			
CT659	KU359513	26			
CT660	KU359514	26			
CT661	KU359515	22			

CT662	KU359516	22			
CT736	KU359517	5	Virginia – MG (22°19'49"S, 45°07'01"W)	<i>S. fuscovarius</i> LUTZ, 1925	<i>S. ruber</i>
CT746	KU359534	24	Maria da Fé – MG (22°16'28"S, 45°22'25"W)	<i>S. perereca</i> (POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995)	<i>S. ruber</i>
CT886	KU359518	6	Aiuruoca – MG (22°16'28"S, 45°22'25"W)	<i>S. fuscovarius</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i>
CT887	KU359519	6			
CT905	KU359520	7	Boa Esperança – MG (21°05'39"S, 45°34'29"W)	<i>S. fuscovarius</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i>
CT906	KU359521	6			
CT907	KU359522	8			
CT908	KU359523	6			
CT958	KU359524	-----	Boa Esperança - MG (21°05'39"S, 45°34'29"W)	<i>S. longilineus</i> (LUTZ, 1968)	<i>S. catharinae</i>
CT1770	KU359525	2	Pouso Alegre – MG (22°13'21"S, 45°58'02"W)	<i>S. fuscovarius</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i>
CT2157	KU359526	-----	Formoso (14°56'48"S, 46°13'55"W)	<i>S. skaios</i> (POMBAL et al., 2010)	<i>S. catharinae</i>
CT2146	KU359527	13	Formoso (14°56'48"S, 46°13'55"W)	<i>S. fuscovarius</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i>
CT1649	KU359528	-----	Chapada Gaucha (15°28'6"S, 45°25'6"W)	<i>S. skaios</i> (POMBAL et al., 2010)	<i>S. catharinae</i>
CT 1650	KU359529	-----			
UFMG347	KU359530	-----	Catas Altas (20°7'30"S, 43°23'21"W)	<i>S. x-signatus</i> (SPIX, 1824)	<i>S. ruber</i>
UFMG496	KU359531	28	São Gonçalo do Rio Abaixo (19°49'41"S, 43°22'55"W)	<i>S. perereca</i> (POMBAL; HADDAD; KASAHARA, 1995)	<i>S. ruber</i>
UFMG1061	KU359532	-----	Lima Duarte (21°40'54"S, 43°52'22"W)	<i>S. squalirostris</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i> clade
UFMG1533	KU359533	-----	Morro do Pilar (19°09'48"S, 43°31'43"W)	<i>S. squalirostris</i> (LUTZ, 1925)	<i>S. ruber</i> clade

Table S2: Genetic divergence between species using the p-distance method. The number of base differences per site from averaging over all sequence pairs between groups are shown. The analysis involved 97 nucleotide sequences and there were a total of 549 positions in the final dataset

Especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1- <i>S. perereca_1</i>																	
2- <i>S. perereca_2</i>	0.108																
3- <i>S. fuscovarius</i>	0.187	0.203															
4- <i>S. longilineus</i>	0.205	0.188	0.200														
5- <i>S. cf. skaios</i>	0.217	0.203	0.208	0.111													
6- <i>S. fuscocomarginatus</i>	0.206	0.197	0.202	0.221	0.217												
7- <i>S. squalirostris</i>	0.201	0.213	0.192	0.209	0.203	0.187											
8- <i>S. ruber</i>	0.199	0.192	0.173	0.189	0.184	0.211	0.192										
9- <i>S. wandae</i>	0.187	0.185	0.186	0.198	0.194	0.181	0.182	0.200									
10- <i>S. cf. kennedyi</i>	0.225	0.218	0.214	0.206	0.196	0.210	0.211	0.214	0.199								
11- <i>S. alier</i>	0.170	0.183	0.199	0.195	0.200	0.181	0.175	0.202	0.183	0.202							
12- <i>S. nasicus</i>	0.195	0.193	0.183	0.178	0.185	0.198	0.196	0.153	0.178	0.199	0.191						
13- <i>S. berthae</i>	0.189	0.190	0.183	0.150	0.139	0.207	0.210	0.189	0.183	0.180	0.200	0.185					
14- <i>S. acuminatus</i>	0.201	0.180	0.192	0.212	0.211	0.193	0.208	0.203	0.175	0.151	0.202	0.209	0.198				
15- <i>S. nebulosus</i>	0.240	0.214	0.228	0.217	0.204	0.227	0.209	0.222	0.199	0.194	0.235	0.215	0.222	0.206			
16- <i>S. rostratus</i>	0.229	0.206	0.206	0.194	0.187	0.204	0.210	0.204	0.190	0.075	0.189	0.196	0.187	0.147	0.176		
17- <i>S. x. siegenius</i>	0.189	0.196	0.188	0.202	0.207	0.201	0.187	0.176	0.187	0.219	0.213	0.134	0.196	0.194	0.226	0.202	

