

Filogeografia em áreas abertas da América do Sul: origem e diversificação de linhagens de *Scinax squalirostris* (Anura, Hylidae)[†]

Rafael Félix de MAGALHÃES^{1*}, Natan Medeiros MACIEL¹, Rodrigo de MELLO¹, Guarino Rinaldi COLLI², Célio Fernando Baptista HADDAD³, Rosane Garcia COLLEVATTI¹

¹ Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio), Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

² Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

³ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Campus Rio Claro)

* Autor para correspondência: rafaelfelixm@gmail.com

[†] Este trabalho foi realizado com auxílio do CNPq, CAPES, FAPESP e FAPDF

INTRODUÇÃO

A filogeografia tem como objetivo analisar os processos históricos e geográficos que influenciaram a formação das linhagens evolutivas atuais. Consiste em análises filogenéticas intraespecíficas baseadas em DNA mitocondrial (mtDNA) e sua associação com a biogeografia e a genética de populações (Avise, 2000). Ela baseia-se na distribuição espacial de genealogias de genes, fornecendo ferramentas para a detecção de correlação entre a distribuição geográfica de haplótipos e a relação genealógica entre os mesmos (Avise, 1987).

A perereca *Scinax squalirostris* A. Lutz (1925) tem ampla distribuição em áreas abertas da região centro-sul da América do Sul, incluindo o centro-sul do Brasil, sul do Paraguai, Uruguai, norte da Argentina e leste da Bolívia (Frost, 2011). A distribuição de *S. squalirostris* é considerada disjunta, uma vez que, apesar de sua distribuição ser contínua nos Pampas e nos Chacos, ela ocorre em manchas isoladas de campos na Mata Atlântica e no Cerrado (e.g. Brandão *et al.*, 1997; Leite *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2009) e, segundo Eterovick & Sazima (2004), algumas populações podem representar unidades evolutivas distintas.

A distribuição disjunta de *S. squalirostris* pode ter sido um resultado de dois cenários alternativos: dispersão a longas distâncias ou vicariância devido à contração da área de distribuição da espécie pelas mudanças nas condições climáticas, o que poderia ter afetado o habitat adequado da espécie. Análises filogeográficas podem contribuir para distinguir entre estes dois modelos, pois cada um tem predições explícitas, que podem ser usadas para determinar qual melhor explica uma distribuição disjunta (Avise, 2000; Karanth, 2003).

Este trabalho visa obter dados para explicar a origem e a diversificação da herpetofauna da América do Sul. Além disso, espera-se que as hipóteses

biogeográficas geradas nele sejam extrapoladas para outras espécies cuja distribuição geográfica seja similar à observada na espécie em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 63 indivíduos de *S. squalirostris* provenientes dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e do Distrito Federal no Brasil e das províncias de Ñembucú e Itapuá no Paraguai. Como grupo externo nas análises filogenéticas, foram utilizadas amostras de indivíduos de uma espécie em processo de descrição do grupo *S. staufferi*.

O DNA dos espécimes foi extraído das amostras de tecido dos quais foram amplificados fragmentos gênicos de mtDNA 12S e citocromo c oxidase subunidade I (COI), utilizando iniciadores e condições de reação previamente descritas (Herbert *et al.*, 2004; Fouquet *et al.*, 2007). As seqüências dos produtos das reações de PCR foram analisadas em um seqüenciador automatizado ABI Prism 3100, em condições padronizadas pelo fabricante. Todos os fragmentos amplificados foram seqüenciados nos dois sentidos (senso e anti-senso). Os programas SeqScape v2.1 (da ABI) e BioEdit 5.09 (Hall, 1999) foram utilizados para análise dos cromatogramas e obtenção da fita consenso. As sequências foram alinhadas no programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), penalizando-se a formação de inserções ou deleções.

Para a obtenção das relações entre os haplótipos nas populações amostradas, foram conduzidas as análises de redes de haplótipos, implementadas no programa NETWORK v. 4.5.1.0 (Fluxus Technology Ltd). Este método utiliza uma matriz de distâncias euclidianas entre as sequências para obter uma árvore de haplótipos com menor distância total. Já a relação entre os indivíduos das populações amostradas foi feita a partir de análises filogenéticas. Métodos baseados em parcimônia e estatística bayesiana foram utilizados para a análise das sequências com o auxílio dos programas TNT (Goloboff *et al.*, 2008) e MrBayes (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). A escolha do modelo evolutivo foi feita com o auxílio do programa jModeltest 0.11 (Posada, 2008). O suporte dos clados foi obtido pelos métodos de reamostragem *bootstrap* e Bremer.

Foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) utilizando o programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000), para testar a diferenciação entre populações e caracterizar a estrutura genética das mesmas. Desta forma, obteve-se o índice de fixação θ (Weir e Cockerham, 1984), que estima a diferenciação entre populações. O teste de Mantel foi feito entre os pares de

populações (pairwise θ) e os pares das matrizes de distâncias geográficas para se testar a hipótese de isolamento por distância (Wright, 1943), no programa Arlequin.

RESULTADOS

A amplificação das regiões 12S e CO1 geraram fragmentos com 409 e 326pb, respectivamente. Na análise combinada dos fragmentos, foram encontrados 36 haplótipos. A diversidade gênica (h) global foi de 0.967 ± 0.009 e a diversidade nucleotídica (π) foi de 0.060 ± 0.029 .

Tanto nas árvores filogenéticas quanto na rede de haplótipos, houve a formação de dois haplogrupos (HG) principais. Contudo, a composição destes HG foi diferente para cada método. Na maioria deles, houve correspondência geográfica. O primeiro haplogrupos da árvore de parcimônia (HG-P) inclui todas as populações dos Pampas, Chacos e a população de Bonito (MS) ((Chacos+Bonito),(Pampas))[*bootstrap* (bt) = 100, Bremer (br) = 10]. O segundo HG-P pode ser subdividido em HG1, com populações exclusivas do Cerrado, incluindo as de Brasília (DF), um indivíduo da Serra da Canastra e as da região meridional da Cadeia do Espinhaço (MG) (Serra do Cipó,((Brasília+Canastra),(Serra do Cabral,(Catas Altas+Ouro Preto)))) (bt = 56, bm = 4). O HG2 inclui todas as populações provenientes da Mata Atlântica, a população da Chapada dos Veadeiros e três indivíduos da Serra da Canastra (Veadeiros,(Canastra,(Mata Atlântica)))(bt = 36, bm = 2).

Na árvore da inferência Bayesiana e na rede de haplótipos, a formação de grupos foi relativamente concordante. No primeiro haplogrupos da inferência bayesiana (HG-B), estão todos os indivíduos das populações da Mata Atlântica. Já o segundo HG-B está pouco resolvido, e há politomia entre as populações da Chapada dos Veadeiros, da Serra da Canastra e as populações do Chaco, Pampa e do Cerrado. Entretanto, há dois clados monofiléticos com correspondência geográfica, um incluindo as populações do Chaco e dos Pampas [probabilidade *a posteriori* (pp) = 1] e outro as populações do Cerrado (pp = 0.85).

No primeiro haplogrupos da análise de rede de haplótipos (HG-N), agrupam-se todos os haplótipos da Mata Atlântica, um haplótipo da Serra da Canastra e o haplótipo da Chapada dos Veadeiros, sendo este o mais basal de todos. Há evidência de expansão populacional recente da população de Campos Novos (SC) para a população de Bom Jesus da Serra (SC). O segundo HG-N inclui todos os

haplótipos do Cerrado, dos Pampas e do Chaco. Contudo, há um haplótipo da Serra da Canastra cuja relação com os dois HG é incerta.

O nível de diferenciação entre as populações foi alto ($F_{ST} = 0.919$), indicando uma estruturação consistente das populações a nível regional. Não detectamos efeito do isolamento por distância entre as populações (coeficiente de correlação = 0.059, $p = 0.338$).

DISCUSSÃO

A atual distribuição de *S. squalirostris* deve estar ligada às mudanças climáticas ocorridas no Quaternário. No último Glacial Máximo, houve uma diminuição da temperatura e da umidade nas áreas de ocorrência da espécie, levando à expansão dos campos. Isto deve ter favorecido a consequente expansão de *S. squalirostris*. Com o aumento da temperatura e da umidade no Holoceno Tardio, houve retração dos campos em favor da expansão das Florestas de *Araucária*, da Mata Atlântica e do Cerrado arbóreo (Behling, 1998). Isso deve ter contribuído para que as populações de *S. squalirostris* da Mata Atlântica e do Cerrado ficassem restritas a ilhas de campos. Tanto a análise de diferenciação quanto o teste de Mantel indicam separação das populações por vicariância, suportando a hipótese. Contudo, só obteremos dados consistentes após realizarmos análises de datação molecular.

Provavelmente o sul do estado de Minas Gerais é uma zona de contato secundário entre as populações da Mata Atlântica e as do Cerrado. Isso explicaria o compartilhamento de haplótipos da população da Serra da Canastra com os haplogrupos do Cerrado e da Mata Atlântica. Já na Chapada dos Veadeiros (CV), uma ilha de altitude no norte do estado de Goiás, há possibilidade de que a relação confusa, ora com o haplogrupo da Mata Atlântica, ora com o do Cerrado, seja decorrente de retenção de polimorfismo ancestral. Além disso, deve haver alguma barreira geográfica entre CV e o restante das áreas altas de Goiás, uma vez que há alto índice de endemismos restritos na CV (e.g. Sazima & Bokermann, 1978; Caramaschi & Cruz, 2000).

Globalmente, há alta diversidade genética na espécie. Localmente, ameaças existem, e isso pode ser evidenciado pelo padrão em estrela encontrado na rede de haplótipos para as populações dos campos ao sul de Santa Catarina que, apesar do alto potencial paisagístico, sofrem com desmatamentos, queimadas, drenagens de áreas úmidas, plantações de monoculturas e implantação de usinas hidrelétricas

(Buckup & Bond-Buckup, 2008). Por fim, a correspondência geográfica dos haplogrupos pode ser um indicativo de que a espécie realmente seja um conjunto de espécies crípticas, como indicado por Eterovick & Sazima (2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. 1 ed. Massachusetts: Harvard University Press.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; VALL, R. M.; BERMIGAN JR, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REBB, C. A.; SAUNDERS, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 18: 489-522.
- BEHLING, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. **Review of Paleobotany and Palynology**. 99: 143-156.
- BRANDÃO, R. A.; DUAR, B. A.; SEBEN, A. 1997. Geographic distribution: *Scinax squalirostris*. **Herpetological Review**. 28: 93.
- BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. 2008. Impactos na natureza. p. 149-153. In: G. Bond-Buckup (org.). *Biodiversidade dos Campos de Cima da Serra, vol. 1*. Porto Alegre: Editora Libretos.
- CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G. 2000. Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu Nacional**. 422: 1-12.
- CRUZ, C. A. G.; FEIO, R. N.; CARAMASCHI, U. 2009. *Anfíbios do Ibitipoca*. Belo Horizonte: Bicho do Mato Editora. 132p.
- ETEROVICK, P. C.; SAZIMA, I. 2004. *Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. Belo Horizonte: Editora PUCMINAS.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. 131: 479-491.
- FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species group. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 43(2): 567-582.
- FROST, D. R. 2010. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**. 24: 774-786.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95-98.
- HERBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**. 101: 14812-14817.
- KARANTH, K. P. 2003. Evolution of disjunct distributions among wet-zone species of Indian subcontinent: testing various hypotheses using a phylogenetic approach. **Current Science**. 85: 1276-1283.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. 23: 2947-2948.
- LEITE, F. S. F.; JUNCÁ, F. A.; ETEROVICK, P. C. 2008. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Megadiversidade**. 4: 158-176.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**. 25: 1253-1256.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. 19: 1572-1574.
- SAZIMA, I.; BOKERMANN, W. C. A. 1978. Cinco novas espécies de *Leptodactylus* do centro e sudeste brasileiro (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**. 38: 899-912.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. 2000. *Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. 38: 1358-1370.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics**. 28: 114-138.