

Universidade Federal do ABC
Curso de Pós-graduação em Evolução e Diversidade

Dissertação de Mestrado

Antonio Mollo Neto

VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE *ITAPOTIHYLA LANGSDORFFII* (DUMÉRIL & BIBRON, 1841)
(ANURA: HYLIDAE): ABORDAGENS MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Santo André – SP

2015

Curso de Pós-graduação em Evolução e Diversidade

Dissertação de Mestrado

Antonio Mollo Neto

VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE *ITAPOTIHYLA LANGSDORFFII* (DUMÉRIL & BIBRON, 1841)
(ANURA: HYLIDAE): ABORDAGENS MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Trabalho apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Evolução e
Diversidade sob orientação da Prof^a. Dr^a. Vanessa
Kruth Verdade.

Santo André – SP

2015

A meus pais e minha mulher, com carinho.

Agradecimentos

Ao longo do meu projeto contei com a ajuda de pessoas dispostas a acrescentar e contribuir com meu crescimento. É difícil lembrar todos que influenciaram direta ou indiretamente minha vida acadêmica, portanto, vou agradecer os que influenciaram este trabalho em particular.

Agradeço à Universidade Federal do ABC e a Capes pelas bolsas disponibilizadas.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação e os técnicos administrativos pelo apoio logístico.

A minha co-orientadora Prof^ª. Márcia Sperança, que me possibilitou conhecer uma área completamente nova para mim e tremendamente importante na atualidade.

À minha orientadora Prof^ª. Vanessa Verdade, desde 2008, sempre presente e participativa. Muito obrigado pelos ensinamentos, correções e contribuições.

Ao Prof. Arlei Marcili que colaborou com material, verba, além de contribuir com análises e discussão de resultados.

Ao Prof. Miguel Trefaut Rodrigues, que em 2008 nos disse sim, quando poderia ter dito não, e desde então permitiu que eu trabalhasse com o que gosto. Por sempre colaborar com nossos trabalhos e nesse trabalho em especial ter cedido espaço, material e verba para que fosse concluído.

À Aline Diniz, Sabrina Baroni e aos alunos, por todo o auxílio nos laboratórios de genética molecular na UFABC e evolução molecular no IBUSP.

Agradeço os curadores, técnicos e estagiários de museus e coleções que disponibilizaram material para as análises morfológicas e moleculares. Sem esse material esse trabalho não seria possível. Muito obrigado ao Prof. Jaime Bertoluci (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), Thiago Silva-Soares (Museu de Biologia Mello Leitão), Prof. Renato Feio (Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa), Alberto Carvalho, Prof. Taran Grant e Prof. Hussam Zaher (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo), Prof^ª. Luciana Barreto Nascimento (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais), Gláucia Pontes (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Nadya Pupin e Prof. Célio Haddad (Universidade Estadual Paulista – Rio Claro), Lucas Silva e Prof. Marcelo Napoli (Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia) e Prof. Paulo Garcia (Universidade Federal de Minas Gerais).

À Renata Amaro e Antoine Fouquet pelas contribuições com a abordagem molecular.

Ao Francisco Dal Vechio, José Cassimiro, Marco de Sena e Mauro Teixeira, além de todas as horas que já passamos coletando juntos, por sempre estarem dispostos a me ajudar, me ensinar técnicas, usar programas e recomendar bibliografia.

Sou grato a Vivian e ao Diego, pelas contribuições diversas com estatística, disciplinas, normas, coletas e divisão de problemas.

Muito obrigado aos amigos Flávio e Fábio por sempre se interessarem pelo meu trabalho, pelos nossos interesses compartilhados, pelos anos procurando bichos no mato comigo e pela confiança depositada em mim.

Agradeço minha sogra, meu sogro e meu cunhado pela confiança e torcida.

Sou grato ao meu pai e minha mãe que nunca mediram esforços para me apoiar, me incentivar na minha carreira e sempre deram um jeito de me manter estudando, mesmo em tempos muito difíceis. Agradeço ao meu irmão, minha vó e a dinda por todo incentivo, compreensão e torcida.

Agradeço à minha mulher por ser minha companheira, por todo o suporte emocional, confiança e incentivo para que eu voltasse a estudar, por sempre falar que meu trabalho ia dar certo e pela paciência enquanto eu terminava essa dissertação. Muito obrigado.

RESUMO

Neste trabalho estudamos a variação geográfica de *Itapotihyla langsdorffii* a partir de duas abordagens: morfológica e molecular. Foram estudados na abordagem morfológica 246 exemplares provenientes de 59 localidades e 76 amostras de tecido pertencentes a indivíduos de 25 localidades foram utilizadas para estudos filogenéticos com três marcadores moleculares, dois nucleares, *recombination activation gene 1* (Rag-1), o gene que codifica a Rodopsina (Rod) e o Citocromo b mitocondrial (Cyt b). Em ambos os casos, as localidades estão distribuídas de maneira a representar a possível diversidade intraespecífica ao longo da área de ocorrência da espécie. Do ponto de vista morfológico, os resultados indicam a existência de variação entre os indivíduos das populações distribuídas no eixo Norte/Sul, somente relacionadas ao comprimento rostro-cloacal, em que aparentemente os indivíduos residentes em áreas mais úmidas apresentam maior comprimento rostro-cloacal. Essa variação parece mais evidente entre os machos, que entre as fêmeas, mas ainda assim é gradual e não justifica a separação das populações de *Itapotihyla langsdorffii* em mais de uma espécie. De modo similar, nas análises de filogenia molecular por Inferência Bayesiana e Máxima Parcimônia com marcadores de genes nucleares não encontramos qualquer indício de separação entre as populações. A mesma análise filogenética realizada com o marcador mitocondrial demonstrou que apesar de existirem indícios de separação entre os indivíduos do Norte e do Sul da Mata Atlântica, não houve significância estatística para separação dos indivíduos em populações diferentes. Os resultados das duas abordagens são congruentes e indicativos de que *Itapotihyla langsdorffii* é uma única espécie de ampla distribuição na Mata Atlântica e não um complexo de espécies crípticas, como poderia se supor.

ABSTRACT

We have studied the geographical variation of *Itapotihyla langsdorffii* based on morphological and molecular approaches. A total of 246 individuals from 59 localities were studied for morphology, and 76 tissue samples from 25 localities were used for phylogenetic analysis with three molecular markers, the recombination activation gene 1 (Rag-1) and Rhodopsin (Rod) encoding nuclear genes, and the mitochondrial Cytochrome b (Cyt b) encoding gene. Our results are indicative of a conservative morphology throughout the distributional range with a cline variation in snout-vent length more prominent in males than in females, with larger specimens apparently living in more humid areas (Northern Atlantic forest or Southern coastal Atlantic forest versus Continental Southern Atlantic Forest). The results obtained with phylogenetic analysis by Bayesian inference or Parsimony were congruent to those of morphology, with no population structure found among nuclear markers and a very weak supported structure within the mitochondrial marker. So far, it seems that *Itapotihyla langsdorffii* operates as a large metapopulation representing a single widely distributed species, and not a complex of cryptic species as commonly expected for Neotropical widely distributed frogs.

Lista de figuras

Figura 1. Mapa com todos os pontos amostrados nesse trabalho, cobrindo a distribuição de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da Mata Atlântica. O ponto amarelo representa a provável localidade tipo da espécie, o município de Petrópolis no estado do Rio de Janeiro.

Figura 2. Mapa da distribuição geográfica de *Itapotihyla langsdorffii* evidenciando as três unidades taxonômicas operacionais (OTU) utilizadas: OTU 1 em amarelo, OTU 2 em rosa e OTU 3 em vermelho. O ponto com o sinal de interrogação em cima, no estado do Mato Grosso, representa Rio das Mortes, localidade duvidosa.

Figura 3. Gráfico apresentando a variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da distribuição geográfica, com as localidades organizadas no eixo Norte – Sul, usando machos e fêmeas. A medida do CRC é apresentada em mm.

Figura 4. Gráfico apresentando a variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da distribuição geográfica, com as localidades organizadas no eixo Norte – Sul, usando machos (A) e fêmeas (B). A medida do CRC é apresentada em mm.

Figura 5. Gráficos da análise discriminante realizada a partir de medidas brutas e medidas de proporção de machos (A) e fêmeas (B) de *Itapotihyla langsdorffii*.

Figura 6. Topologia da Inferência Bayesiana realizada com as sequências de um fragmento do gene que codifica o citocromo b mitocondrial (Cyt b) dos indivíduos de *Itapotihyla langsdorffii*. Os valores de Probabilidade Posterior estão representados acima dos nós. O clado em vermelho representa os indivíduos do Norte da Mata Atlântica.

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista dos exemplares de *Itapotihyla langsdorffii*, associados às OTUs utilizadas neste trabalho, com os marcadores moleculares sequenciados. OTU 1, Mata Atlântica Norte, OTU 2, Mata Atlântica Sul porção interior, OTU 3, Mata Atlântica Sul porção litoral.

Tabela 2. Exemplos e marcadores utilizados nas análises moleculares provenientes do Gen Bank (Em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>).

Tabela 3. Primers usados nesse estudo.

Tabela 4. Valores das medidas morfométricas (em mm) para machos e fêmeas de *Itapotihyla langsdorffii*. As medidas são apresentadas como Média \pm Desvio Padrão.

Tabela 5. Valores de comprimento rostro-cloacal (CRC) em mm de machos, fêmeas e jovens (= sexo indeterminado) de *Itapotihyla langsdorffii*. As medidas são apresentadas como Média \pm Desvio Padrão (mínimo–máximo).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. ARTIGO	18
Introdução	19
Materiais e Métodos	23
<i>Abordagem morfológica</i>	23
<i>Abordagem Molecular</i>	25
Resultados	27
<i>Abordagem morfológica</i>	28
<i>Abordagem molecular</i>	31
Discussão	32
Referências Bibliográficas	35
Tabelas	43
Figuras	47
Apêndice I	52
3. CONCLUSÃO	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Os Hylidae formam uma família de anfíbios amplamente distribuídos pelo planeta. As espécies que constituem esse agrupamento normalmente apresentam adaptações ao estilo de vida arbóreo, incluindo olhos virados para frente e discos adesivos nos dedos, que conferem visão de profundidade e boa capacidade de escalar. Embora esse seja o padrão geral, também existem hylídeos terrestres e semi-aquáticos, nos quais essas características podem estar reduzidas ou ausentes (Duellman & Trueb, 1994; Faivovich *et al.*, 2005).

A família é considerada monofilética, bem sustentada em propostas baseadas em dados moleculares e compartilha a presença de falanges terminais em formato de garra, três áreas de articulação no metacarpal III e discos bem desenvolvidos nos dígitos (Lutz, 1973, Faivovich *et al.*, 2005). É a família com o maior número de espécies (948 spp.) dentre os Anura, e encontra-se subdividida em três subfamílias: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hyalinae (Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2015).

Atualmente, *Itapotihyla langsdorffii* pertence à subfamília Hyalinae, tribo Lophiohylini, junto a outras 75 espécies. A tribo Lophiohylini inclui 11 gêneros (Jungfer *et al.*, 2013; Frost, 2015), dentre eles *Osteocephalus* Steindachner, 1862, o mais diverso (23 spp), onde *I. langsdorffii* estava alocada anteriormente.

Segundo Faivovich e colaboradores (2005), *Itapotihyla* apresenta-se como grupo irmão do clado formado por todos os outros gêneros da tribo Lophiohylini, exceto o gênero *Phyllodytes*, que é o mais basal. A definição desses grupos encontra-se baseada principalmente em sinapomorfias moleculares e poucos apresentam características fenotípicas únicas. Dentre os grupos estabelecidos na tribo, o gênero *Osteocephalus* foi recentemente redefinido por Jungfer e colaboradores (2013) e apresenta como sinapomorfia fenotípica a alteração ontogenética marcante na cor dos olhos e do padrão de coloração corporal dos jovens em relação aos adultos. *Itapotihyla langsdorffii* não compartilha essa característica com *Osteocephalus* e nem o dimorfismo sexual acentuado na textura da pele que algumas espécies do gênero também apresentam. Faivovich e colaboradores (2005) sugeriram a presença de uma aba subcloacal como possível autapomorfia de *I. langsdorffii*.

Os indivíduos da espécie apresentam grande porte (comprimento rostro-cloacal máximo de 70,7 mm nos machos e 88,9 mm nas fêmeas, Duellman, 1974) e crânio bastante ossificado (o que justificava do ponto de vista morfológico seu posicionamento anterior no gênero *Osteocephalus*). Sabe-se que *Itapotihyla langsdorffii* exhibe hábitos noturnos, sendo

encontrada geralmente em áreas florestadas empoleirada em arbustos, bambus e galhos de árvores próximas a poças e lagoas (Aquino *et al.*, 2004; Vrcibradic *et al.*, 2009), embora Thomé e colaboradores (2007) tenham relatado a presença de um adulto de *I. langsdorffii* aquecendo-se completamente exposto ao sol em um penhasco na Estação Ecológica Juréia-Itatins. Alimenta-se de insetos variados, aracnídeos, pequenos anuros e até penas foram encontradas em seu trato digestório (Vrcibradic *et al.*, 2009; Sales Aquino *et al.*, 2012). A reprodução ocorre de modo explosivo, sendo observados mais de uma centena de indivíduos no mesmo agregado, que podem permanecer em atividade durante toda à noite e inclusive durante o dia, com vocalizações, amplexos e interações agressivas ocorrendo nos dois períodos (Vrcibradic *et al.*, 2009; Maffei *et al.*, 2010).

Itapotihyla langsdorffii foi descrita para o Rio de Janeiro (Duméril & Bibron, 1841) a partir de exemplares oriundos provavelmente do município de Petrópolis (Lutz, 1973) e distribui-se por toda a Mata Atlântica, do estado de Sergipe (Arzabe & Loebmann, 2006) ao Rio Grande do Sul (Lingnau *et al.*, 2006), inclusive em direção ao interior do continente por áreas de mata do Cerrado nos estados de Minas Gerais e São Paulo (*e.g.* Feio *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2009; Kleinsorge *et al.*, 2009; Maffei, 2011; Cazelli & Moura, 2012), chegando até a região Leste do Paraguai e Nordeste da Argentina (*e.g.* Duellman, 1974; Aquino *et al.*, 2004; Lingnau *et al.*, 2006; Jowers *et al.*, 2008; Frost, 2015) (Figura 1).

No que diz respeito à vocalização, embora o canto seja conhecido (Haddad *et al.*, 2006; Straneck *et al.*, 1993), não foi formalmente descrito. O girino de *I. langsdorffii* foi originalmente descrito por Duellman (1974) que desenhou e fez observações sobre a coloração e fileiras de dentículos de espécimes preservados provenientes de Guarujá, São Paulo, mas não fez uma descrição detalhada das medidas das larvas e da morfologia externa. Mais recentemente, Pimenta e Canedo (2007) descreveram e ilustraram o girino de *I. langsdorffii* baseados em uma série de girinos em diferentes estágios de desenvolvimento de uma população de Santa Teresa, Espírito Santo.

A morfologia externa dos adultos foi descrita brevemente por Heyer e colaboradores (1990) e Duellman (1974), que apresentaram breves descrições para indivíduos de *I. langsdorffii* do sudeste do Brasil diferenciando-os da taxocenose local, porém não realizaram medidas de morfologia externa que permitam comparação entre as proporções corporais de indivíduos de diferentes populações ao longo da distribuição geográfica da espécie.

Itapotihyla langsdorffii é um caso clássico de espécie de ampla distribuição para a qual não existem indícios marcantes de variações fenotípicas. Pautados por estudos recentes

(e.g. Jungfer *et al.*, 2013), muitos autores advogam que uma grande quantidade de diversidade biológica pode ser mascarada pela similaridade fenotípica em complexos de espécies crípticas (e.g. McLeod, 2010). Tais complexos estariam mais comumente ocultos sob a égide de espécies amplamente distribuídas. A ideia que tantas espécies de anfíbios tenham uma ampla distribuição estaria em desacordo com a baixa capacidade de migração e alta filopatria observada na maioria dos táxons do grupo, condições que podem promover diferenciação e consequentemente especiação (Berven & Grudzien, 1990; Fouquet *et al.*, 2007 a e b).

Com o objetivo de maximizar as respostas a essas questões taxonômicas, o uso de métodos morfológicos e análise de filogenia molecular em conjunto, tem surgido mais frequentemente como uma abordagem efetiva para a identificação de espécies crípticas e esclarecimento de incertezas taxonômicas (Stuart *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2007 b; Inger *et al.*, 2009; Bruschi *et al.*, 2014), visto que o processo de especiação pode nem sempre ser acompanhado de mudanças morfológicas, que evoluem de maneira mais lenta e conservada (Fouquet *et al.*, 2007 b; Bruschi *et al.*, 2014).

No que diz respeito a disponibilidade de sequências genômicas de *I. langsdorffii* em bases de dados públicas como o GenBank, as poucas sequências disponíveis foram obtidas em estudos que visavam relações filogenéticas entre grandes grupos (e.g. Faivovich *et al.*, 2005; Jungfer *et al.*, 2013) e não em estudos filogeográficos intraespecíficos.

Estudos sobre a variabilidade genética de espécies ou grupos de espécies próximas de ampla distribuição na Mata Atlântica tem aumentado (e.g. Thome *et al.*, 2010; Clemente-Carvalho *et al.*, 2011; Canedo & Haddad, 2012; Fouquet *et al.*, 2012; Gehara *et al.*, 2013) e revelado padrões de diversificação genética dentro de um mesmo bioma. No entanto, sabe-se que as áreas de maior diversidade genética para espécies diferentes nem sempre são congruentes e nem sempre correspondem a áreas de refúgios florestais propostas a partir de modelos paleoclimáticos (Carnaval *et al.*, 2009; Porto *et al.*, 2012).

Conhecer as possíveis variações genéticas entre as populações de *I. langsdorffii*, além de trazer informações sobre a relação entre as áreas de ocorrência e proximidade de subpopulações, pode auxiliar na delimitação e compreensão de possíveis variações nos parâmetros morfológicos, objetos desse estudo, e outros, cujo registro de variação podem ser mais raros dada a dificuldade na coleta de dados (como bioacústicos, comportamentais e de morfologia larval).

Além disso, espécies de ampla distribuição tem recebido pouca atenção do ponto de vista da conservação por estarem presentes em áreas amplas e, portanto, supostamente sujeitas

a ameaças locais, que em um contexto mais amplo não levariam a espécie à extinção. No entanto, a depleção do ambiente localmente pode afetar o fluxo gênico e a dinâmica entre as subpopulações envolvidas e trazer efeitos deletérios em longo prazo. *Itapotihyla langsdorffii*, por exemplo, encontra-se classificada na categoria de menor preocupação (*Least Concern*) nas categorias de risco de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), mas sabe-se que pode estar localmente ameaçada devido à perda de habitat e construção de barragens (Aquino *et al.*, 2004).

O estudo das variações na morfologia externa e em sequências que codificam diferentes produtos gênicos de espécies com ampla distribuição, bem como dos padrões de congruência entre essas variações e como estão relacionados à história biogeográfica e às variações ambientais da área de distribuição da espécie é extremamente importante, pois permite a detecção de maior/menor variabilidade genética, com identificação de áreas prioritárias para conservação. Independentemente de estarmos lidando com uma ou várias espécies que ainda se encontram sob o mesmo nome, conhecer a variabilidade genética dessas populações permite escolher estratégias adequadas de manejo das áreas envolvidas e também a proteção de subpopulações que possam estar ameaçadas localmente e que contribuem grandemente para a manutenção da variabilidade geral observada na espécie (McLeod, 2010; Gehara *et al.*, 2013; Bruschi *et al.*, 2014).

Assim sendo, apresentamos a seguir o estudo da variação morfológica e genética das populações de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo de sua distribuição geográfica. Os resultados obtidos estão apresentados na forma de manuscrito, que deverá ser submetido ao periódico Plos One (<http://www.plosone.org/>) após a incorporação das sugestões feitas pela banca.

2. ARTIGO

VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE *ITAPOTIHYLA LANGSDORFFII* (DUMÉRIL & BIBRON, 1841) (ANURA: HYLIDAE): ABORDAGENS MORFOLÓGICA E MOLECULAR

Antonio Mollo Neto¹, Marcia A. Sperança¹, Miguel T. Rodrigues², Arlei Marcili¹, Vanessa K. Verdade¹

¹ Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, CEP 09210-580, Santo André, SP, Brasil

² Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

We have studied the geographical variation of *Itapotihyla langsdorffii* based on morphological and molecular approaches. A total of 246 individuals from 59 localities were studied for morphology, and 76 tissue samples from 25 localities were used for phylogenetic analysis with three molecular markers, the recombination activation gene 1 (Rag-1) and Rhodopsin (Rod) encoding nuclear genes, and the mitochondrial Cytochrome b (Cyt b) encoding gene. Our results are indicative of a conservative morphology throughout the distributional range with a cline variation in snout-vent length more prominent in males than in females, with larger specimens apparently living in more humid areas (Northern Atlantic forest or Southern coastal Atlantic forest versus Continental Southern Atlantic Forest). The results obtained with phylogenetic analysis by Bayesian inference or Parsimony were congruent to those of morphology, with no population structure found among nuclear markers and a very weak supported structure within the mitochondrial marker. So far, it seems that *Itapotihyla langsdorffii* operates as a large metapopulation representing a single widely distributed species, and not a complex of cryptic species as commonly expected for Neotropical widely distributed frogs.

Key words: Atlantic Forest, taxonomy, molecular, morphology, widespread.

Introdução

Atualmente, *Itapotihyla langsdorffii* pertence à subfamília Hyliinae, tribo Lophiohyliini que inclui 11 gêneros (Jungfer *et al.*, 2013; Frost, 2015). *Itapotihyla* apresenta-se como grupo irmão do clado formado por todos os outros gêneros da tribo Lophiohyliini, exceto o gênero *Phyllodytes*, que é o mais basal (Faivovich *et al.*, 2005). A definição desses grupos encontra-se baseada principalmente em sinapomorfias moleculares e poucos apresentam características fenotípicas únicas. O gênero *Osteocephalus* foi recentemente redefinido por Jungfer e colaboradores (2013) e apresenta como sinapomorfia fenotípica a alteração ontogenética marcante na cor dos olhos e do padrão de coloração corporal dos jovens em relação aos adultos. *Itapotihyla langsdorffii* não compartilha essa característica com *Osteocephalus* e nem o dimorfismo sexual acentuado na textura da pele que algumas espécies do gênero também apresentam. Faivovich e colaboradores (2005) sugeriram a presença de uma aba subcloacal como possível autapomorfia de *I. langsdorffii*.

Os indivíduos da espécie apresentam grande porte e crânio bastante ossificado (o que justificava do ponto de vista morfológico seu posicionamento anterior no gênero *Osteocephalus*). Sabe-se que *Itapotihyla langsdorffii* exibe hábitos noturnos, sendo encontrada geralmente em áreas florestadas próxima a poças e lagoas (Aquino *et al.*, 2004; Vrcibradic *et al.*, 2009). Alimenta-se de insetos variados, aracnídeos, pequenos anuros e provavelmente pequenas aves (Vrcibradic *et al.*, 2009; Sales Aquino *et al.*, 2012). A reprodução é explosiva, com agregados de dezenas de indivíduos que podem permanecer em atividade durante a noite e o dia, com vocalizações, amplexos e interações agressivas ocorrendo nos dois períodos (Vrcibradic *et al.*, 2009; Maffei *et al.*, 2010).

Itapotihyla langsdorffii foi descrita para o Rio de Janeiro (Duméril & Bibron, 1841) a partir de exemplares oriundos provavelmente do município de Petrópolis (Lutz, 1973) e distribui-se por toda a Mata Atlântica, do estado de Sergipe (Arzabe & Loebmann, 2006) ao Rio Grande do Sul (Lingnau *et al.*, 2006), inclusive em direção ao interior do continente por áreas de mata do Cerrado nos estados de Minas Gerais e São Paulo (*e.g.* Feio *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2009; Kleinsorge *et al.*, 2009; Maffei, 2011; Cazelli & Moura, 2012), chegando até a região Leste do Paraguai e Nordeste da Argentina (*e.g.* Duellman, 1974; Aquino *et al.*, 2004; Lingnau *et al.*, 2006; Jowers *et al.*, 2008; Frost, 2015) (Figura 1).

Embora o canto seja conhecido (Haddad *et al.*, 2006; Straneck *et al.*, 1993), não foi formalmente descrito. O girino de *I. langsdorffii* foi originalmente descrito por Duellman

(1974) para espécimes provenientes do Guarujá, São Paulo e posteriormente, Pimenta e Canedo (2007) descreveram e ilustraram o girino de *I. langsdorffii* de uma população de Santa Teresa, Espírito Santo.

A morfologia externa dos adultos foi descrita brevemente por Lutz (1973), Heyer e colaboradores (1990) e Duellman (1974), que apresentaram breves descrições para indivíduos de *I. langsdorffii* do sudeste do Brasil diferenciando-os da taxocenose local, porém não realizaram medidas de morfologia externa que permitam comparação entre as proporções corporais de indivíduos de diferentes populações ao longo da distribuição geográfica da espécie.

Até onde se sabe, *Itapotihyla langsdorffii* é um caso clássico de espécie de ampla distribuição, para a qual não existem indícios marcantes de variações fenotípicas. Pautados por estudos recentes (*e.g.* Fouquet *et al.*, 2007 a e b; Geurgas *et al.*, 2008; Fouquet *et al.*, 2012; Jungfer *et al.*, 2013), muitos autores advogam que uma grande quantidade de diversidade biológica pode estar mascarada pela similaridade fenotípica em complexos de espécies crípticas (*e.g.* McLeod, 2010). Tais complexos estariam mais comumente ocultos sob a égide de espécies amplamente distribuídas. A ideia que tantas espécies de anfíbios tenham uma ampla distribuição estaria em desacordo com a baixa capacidade de migração e alta filopatria observada na maioria dos táxons do grupo, condições que podem promover diferenciação e conseqüentemente especiação (Berven & Grudzien, 1990; Fouquet *et al.*, 2007 b).

Com o objetivo de maximizar as respostas a essas questões taxonômicas, o uso de métodos morfológicos e de marcadores moleculares em conjunto, tem surgido mais frequentemente como uma abordagem efetiva para a identificação de espécies crípticas (Stuart *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2007 a e b; Inger *et al.*, 2009; Bruschi *et al.*, 2014), visto que o processo de especiação, pode nem sempre ser acompanhado de mudanças morfológicas, que evoluem mais comumente de maneira mais lenta e conservada (Fouquet *et al.*, 2007 b; Bruschi *et al.*, 2014).

No Brasil, espécies amplamente distribuídas são aquelas que frequentemente ocorrem em mais de um bioma, cuja distribuição seja coincidente com toda a extensão de um determinado bioma, ou até que ocorram em pelo menos metade da porção de biomas extensos, como é relativamente frequente na Mata Atlântica (*e.g.* Fouquet *et al.*, 2007 b). Algumas dessas espécies foram alvo de revisões taxonômicas pautadas em morfologia na década de setenta (*e.g.* Lutz, 1973; Heyer, 1978) e posteriormente, motivadas pelo aumento

de amostras disponíveis ao longo do gradiente geográfico e o advento das ferramentas e marcadores moleculares, foram rearranjadas a partir de estudos exclusivamente morfológicos, exclusivamente moleculares e que utilizaram as duas abordagens de maneira complementar (e.g. Napoli, 2000; Verdade & Rodrigues, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Thomé *et al.*, 2010; Amaro *et al.*, 2012; Gehara *et al.*, 2014).

O resultado desses estudos mais recentes, principalmente aqueles baseados em abordagens moleculares, tem revelado padrões de diversificação genética dentro do bioma. No entanto, as áreas de maior diversidade genética para espécies diferentes nem sempre são congruentes e nem sempre correspondem a áreas de refúgios florestais, propostas a partir de modelos paleoclimáticos (Carnaval *et al.*, 2009; Porto *et al.*, 2012).

A Mata Atlântica apresenta-se em um eixo Norte – Sul, percorrendo um longo gradiente latitudinal que corta o Trópico de Capricórnio (paralelo 23° S). Na região Nordeste o relevo é mais plano e as formações serranas encontram-se mais interiorizadas. Na região Sudeste e Sul o relevo é mais complexo e formado por complexos serranos. Considerando-se, portanto, as variações do relevo e clima (Clapperton, 1973), componentes abióticos que exercem papel importante na determinação também da vegetação, espera-se que algumas dessas variações funcionem como barreiras ao fluxo gênico entre as populações e promovam ao longo do tempo diferenciação genética que possa culminar em especiação. Essas variações nos componentes abióticos, bem como questões biogeográficas relacionadas às conexões com componentes amazônicos, refletem-se nos padrões de diversidade observados na Mata Atlântica, com uma troca de espécies bastante evidente e que ocorre em diversos grupos de organismos nas proximidades do Trópico de Capricórnio e resulta em padrões diferenciados de diversidade β no Norte e Sul da Mata Atlântica (e.g. Costa, 2003).

Estudos com abordagens moleculares frequentemente revelam os padrões esperados de diversificação de componentes Norte e Sul, não só em anuros, como em *Hypsiboas faber* (Carnaval *et al.*, 2009), *Rhinella* gr. *crucifer* (Thomé *et al.*, 2010), *Phyllomedusa* gr. *burmeisteri* (Brunes *et al.*, 2010), *Proceratophrys boiei* (Amaro *et al.*, 2012) e *Ischnocnema guentheri* (Gehara *et al.*, 2013), mas também em lagartos (Pellegrino *et al.*, 2005) e serpentes (Grazziotin *et al.*, 2006).

Outros padrões de diversificação são menos frequentes, mas também ocorrem, como no caso do gênero *Thoropa*, em que existem dois componentes na Mata Atlântica, um que percorre a costa (*T. taophora*) e outro a Mata Atlântica mais ao norte, no estado do Rio de Janeiro e que se interioriza (*T. miliaris*) (Feio *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2009). Em

Proceratophrys boiei os indivíduos dos estados do Espírito Santo e Minas Gerais formam um agrupamento e os indivíduos do Sul de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro formam outro (Amaro *et al.*, 2012).

Nos estudos de variação fenotípica os componentes Norte e Sul também estão presentes, mas não totalmente diferenciados, com clinas de variações de tamanho do corpo e padrões de coloração que se apresentam mais uniformes nos extremos Norte e Sul e mais heterogêneos na região da Bacia do Rio Doce. Tais variações são observadas entre anuros (Pombal & Haddad, 1992; Verdade & Rodrigues, 2007) e entre lagartos, por exemplo (Jackson, 1978).

Embora sejam esperados padrões de diferenciação genética entre os componentes Norte e Sul da Mata Atlântica, é evidente que a ocorrência e intensidade do processo de diversificação depende de muitos fatores, entre eles a biologia das espécies envolvidas.

Conhecer as possíveis variações genéticas entre as populações de *I. langsdorffii*, além de trazer informações sobre a relação entre as áreas de ocorrência e proximidade de subpopulações pode auxiliar na delimitação e compreensão de possíveis variações nos parâmetros morfológicos, objetos desse estudo, e outros, cujo registro de variação podem ser mais raros dada a dificuldade na coleta de dados (como bioacústicos, comportamentais e de morfologia larval).

Além disso, espécies de ampla distribuição tem recebido pouca atenção do ponto de vista da conservação por estarem presentes em áreas amplas e, portanto, supostamente sujeitas a ameaças locais, que em um contexto mais amplo não levariam a espécie à extinção. No entanto, a depleção do ambiente localmente pode afetar o fluxo gênico e a dinâmica entre as subpopulações envolvidas e trazer efeitos deletérios em longo prazo. *Itapotihyla langsdorffii*, por exemplo, encontra-se classificada na categoria de menor preocupação (*Least Concern*) nas categorias de risco de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), mas sabe-se que pode estar localmente ameaçada devido à perda de habitat e construção de barragens (Aquino *et al.*, 2004).

O estudo das variações na morfologia externa e em sequências que codificam diferentes produtos gênicos de espécies com ampla distribuição, bem como dos padrões de congruência entre essas variações e como estão relacionados à história biogeográfica e às variações ambientais da área de distribuição da espécie é extremamente importante, pois permite a detecção de maior/menor variabilidade genética, com identificação de áreas prioritárias para conservação. Independentemente de estarmos lidando com uma ou várias

espécies que ainda apresentam o mesmo nome, conhecer essa variação permite escolher estratégias adequadas de manejo das áreas envolvidas e proteção de subpopulações que possam estar ameaçadas localmente e contribuem grandemente para a manutenção da variabilidade geral observada na espécie (McLeod, 2010; Gehara *et al.*, 2013; Bruschi *et al.*, 2014).

Assim sendo, apresentamos a seguir o estudo da variação morfológica e genética das populações de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo de sua distribuição geográfica.

Materiais e Métodos

Abordagem morfológica

Com a finalidade de cobrir a distribuição geográfica da espécie foram utilizados 246 exemplares de 59 localidades, distribuídas ao longo da Mata Atlântica, preservados em nove coleções. A lista completa do material examinado e das localidades encontra-se no Apêndice 1. Os acrônimos das coleções herpetológicas consultadas e apresentadas ao longo do texto são apresentados a seguir: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Museu de Biologia Prof. Mello Leitão (MBML), Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNAM), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro (CFBH), Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Estudamos a morfologia externa dos exemplares com base em dados qualitativos e quantitativos. Na análise qualitativa foi observada a aparência geral, robustez, formato da cabeça, padrões de coloração, textura da pele, presença de tubérculos nas pálpebras, nos membros e no entorno da cloaca, presença de apêndices ou franjas, extensão da membrana interdigital e aba subcloacal.

Na análise quantitativa foram tomadas com paquímetro digital, as medidas descritas abaixo: comprimento rostro-cloacal (CRC); largura da cabeça (LC), medida à altura da margem posterior do olho; comprimento da cabeça (CC), medido dorsalmente, da extremidade do focinho até a reta imaginária que liga as margens posteriores esquerda e direita da articulação da mandíbula; distância internasal (DIN), medida entre a margem

interna das narinas; distância narina-olho (DNO), medida entre a margem posterior da narina e a margem anterior do olho; diâmetro do olho (DO), medido como o maior comprimento da órbita, no eixo crânio-caudal; distância interorbital (DIO), medida entre os limites internos das pálpebras superiores; diâmetro do tímpano (DT), medido como o maior comprimento, no eixo crânio-caudal; comprimento do braço (CBR), medido ventralmente, da articulação do úmero até o cotovelo; comprimento do antebraço (CAB), medido ventralmente, do cotovelo até a articulação do punho; comprimento da mão (CM), medido ventralmente, da articulação do pulso até a extremidade do dedo 3; comprimento dos dedos 1, 2, 3 e 4 (CD1, CD2, CD3 e CD4), medido ventralmente, da base até a extremidade dos dedos; diâmetro do disco adesivo do dedo 3 (DF3), medido ventralmente, perpendicularmente ao eixo crânio-caudal; comprimento da coxa (CCX), medida do fêmur, ventralmente, da cloaca até a articulação do joelho; comprimento da tíbia (CT), medida da tíbia-fíbula, ventralmente, do joelho até a articulação do pé; comprimento do pé (CP), medido ventralmente, da articulação entre tíbia-fíbula com os tarsais, até a extremidade do artelho 4 e comprimento dos artelhos 1, 2, 3, 4 e 5 (CT1, CT2, CT3, CT4 e CT5), medido ventralmente, da base até a extremidade dos artelhos.

Todas as medidas foram tomadas nos membros do lado esquerdo do animal, salvo excepcionalmente em caso de mutilações ou má formações. Além dos dados brutos, foram também calculadas as seguintes proporções corporais: razão entre LC/CRC, CC/LC, DIN/LC, DNO/LC, DO/DT, CBR/CRC, CAB/CRC, CM/CRC, CCX/CRC, CT/CRC, CCX/CT, CP/CRC, CF1/CF2, DT/DF3, CT2/CT5.

Cada indivíduo foi sexado com base na presença ou não de sacos vocais, calosidades, braços hipertrofiados, CRC em relação aos demais da mesma localidade e observação dos ovócitos por transparência da pele na região abdominal. Quando a determinação do sexo era incerta, o indivíduo foi considerado jovem.

O estudo das variações morfológicas deu-se inicialmente sem a associação dos indivíduos a sua localidade de origem. Na ausência de diferenças óbvias em grupos de indivíduos, foram tratados então associados às suas localidades de origem, organizadas de Norte para Sul e de Leste para Oeste da área de ocorrência. Na ausência de diferenças qualitativas claras entre os exemplares, ainda que organizados em adultos ou jovens e machos ou fêmeas, partiu-se para as análises quantitativas.

Em todas as análises quantitativas foram considerados somente machos e fêmeas adultos, e estes tratados separadamente por haver dimorfismo sexual. O dimorfismo sexual foi

estudado com mais detalhes posteriormente, após a determinação de possíveis variações geográficas, através de um teste t-Student.

As análises quantitativas foram inicialmente realizadas de maneira exploratória, já que diferenças nas medidas corporais não eram óbvias e nem padrões claros surgiram do estudo qualitativo. Os resultados obtidos foram considerados em conjunto com as lacunas de distribuição geográfica e padrões de distribuição de chuvas, vegetação e bacias hidrográficas ao longo da Mata Atlântica. Assim, análises mais detalhadas foram realizadas com base nas localidades agrupadas em três unidades taxonômicas operacionais (OTU):

A OTU 1 (Norte), é formada por indivíduos provenientes de populações dos estados de Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais, exceto o município de Rio Novo. A OTU 2 (Sul interior) é formada por indivíduos provenientes das populações do município de Rio Novo no estado de Minas Gerais, dos municípios localizados a oeste da Serra do Mar no estado de São Paulo e de Salto del Guairá, no departamento de Canindeyú, Paraguai. Por fim, a OTU 3 (Sul litoral) é formada por indivíduos provenientes das populações dos municípios do estado do Rio de Janeiro, os municípios localizados a leste da Serra do Mar no estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As três OTUs estão na Figura 2.

Após a determinação das OTUs acima realizamos análises discriminantes para as medidas corporais (dados brutos) e para as razões corporais (proporções), na tentativa de encontrar agrupamentos que não tivessem sido detectados nas observações iniciais. A discriminante foi realizada através do método *stepwise*, no primeiro caso usando matriz de covariância intragrupo e no segundo caso matriz de correlação intragrupo. As funções discriminantes foram salvas e plotadas em gráfico para a análise dos agrupamentos.

Abordagem Molecular

Estudos filogenéticos com utilização de dois marcadores nucleares e um marcador mitocondrial foram utilizados com a finalidade de verificar as relações entre os indivíduos de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da distribuição geográfica da espécie, a partir de amostras de tecido disponíveis. Foram sequenciados fragmentos do gene mitocondrial que codifica o citocromo b (Cyt b), e dos genes nucleares que codificam o gene ativador de recombinação 1 (Rag 1) e Rodopsina (Rod) de 76 amostras de tecido de 25 localidades, distribuídas ao longo da Mata Atlântica, provenientes de três coleções, além de amostras provenientes do GenBank, utilizadas para formar o grupo externo. Como grupo externo a *Itapotihyla langsdorffii*, foram

selecionadas sequências de *Aplastodiscus leucopygius*, *Bokermannohyla hylax*, *Hypsiboas faber*, e também de membros da tribo Lophiohylini como *Aparasphenodon brunoi*, *Corythomantis greeningi*, *Osteocephalus cabrerai*, *O. lepriurii*, *O. oophagus*, *O. taurinus*, *Phyllodytes luteolous*, *Phyllodytes sp.* e *Trachycephalus mesophaeus*, *T. nigromaculatus*, *T. resinifictrix*, *T. venulosus*, disponíveis online na base de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A lista completa do material examinado e das localidades encontra-se nas Tabelas 1 e 2.

As amostras de tecido (fígado ou músculo) preservados em etanol 100% foram utilizadas para a extração do DNA (Fetzner, 1999). Foram utilizados três marcadores gênicos para as análises, sendo um mitocondrial, Citocromo b (Cyt b) (Bickham *et al.*, 1995; Palumbi, 1996), e dois nucleares, Rodopsina (Rod) (Bossuyt & Milinkovitch, 2000) e gene ativador de recombinação 1 (Rag1) (Faivovich *et al.*, 2005) (Tabela 3). Os fragmentos foram purificados seguindo o protocolo de PCR: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos (95°C por 30 segundos; X°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto) e um ciclo final de extensão de 72°C por 5 minutos e 4°C ∞, onde X representa a temperatura de anelamento de 48,5°C para Cyt b, 53°C para Rodopsina e 52°C para Rag1.

O Produto da PCR foi purificado com Exonuclease I e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (USB ou Fermentas) e utilizado na reação de Big Dye Terminator v 3.1 seguindo o protocolo sugerido pelo kit (Applied Biosystems).

As amostras foram sequenciadas utilizando sequenciador automático ABI Prism 3700, presente no instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e as sequências resultantes foram manualmente editadas utilizando o programa CodonCode Aligner v. 3.7.1.1 disponível em (<http://www.codoncode.com>) e alinhadas sobre algoritmo MUSCLE implementado no programa MEGA v. 6., com parâmetros padrão (Tamura *et al.*, 2011). Após isso, os três fragmentos gênicos codificadores de proteína, Cyt b, Rodopsina e Rag1 foram transformados em cadeias de aminoácidos para conferir o alinhamento.

O programa jModelTest v. 2.1.3 foi utilizado para gerar o melhor modelo de evolução para cada marcador gênico, sob o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion), resultando nos modelos GTR+I+G para Cyt b na matriz para o fragmento mitocndrial; HKY+I para Cyt b e Rod e GTR+G para Rag1 na matriz dos fragmentos concatenados.

Foram utilizadas duas estratégias para reconstrução filogenética com base nos fragmentos gênicos: 1. Produzir árvore única para o fragmento mitocondrial Cyt b; e 2. Concatenar todos os fragmentos gênicos em uma única matriz. Essas diferentes estratégias

foram escolhidas, devido à diferença entre as taxas de evolução (mutação) que os marcadores mitocondriais e nucleares apresentam, sendo os mitocondriais muito mais variáveis.

O alinhamento concatenado dos três marcadores, gerou uma matriz com 1449 pares de base (pb), sendo 744 pb para Cyt b, 315 pb para Rodopsina e 390 pb para Rag1.

As estratégias utilizadas para a reconstrução das relações filogenéticas foram:

Inferência Bayesiana (IB). Utilizada tanto para a árvore única para o fragmento gênico mitocondrial, quanto para a árvore produzida com os fragmentos gênicos concatenados. As análises foram rodadas no programa MrBayes v. 3.2. (Ronquist *et al.*, 2012), disponível *on line* no site Cipres Science Gateway – <http://www.phylo.org/> (Miller *et al.*, 2010). Para cada uma das duas estratégias de reconstrução filogenéticas adotadas, foram incluídas partições referentes ao modelo de evolução selecionado e à quantidade de genes utilizados. Em cada análise foram geradas duas corridas Bayesianas independentes com quatro cadeias de Markov cada, iniciando com uma árvore aleatória. Cada corrida consistiu de 10.000.000 gerações, com árvores amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores; com 25% das árvores iniciais descartadas como *burn in*; a convergência das corridas independentes e escores para ESS foram observados utilizando o programa Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). As árvores de consenso, assim como as Probabilidades Posteriores (PP) para os nós foram visualizadas no programa FigTree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>), sendo considerados significantes valores superiores ou iguais a 0,95 para PP.

Máxima Parcimônia (MP). Utilizada tanto para a árvore única como para o fragmento gênico mitocondrial, como para a árvore produzida com os fragmentos gênicos concatenados. As análises foram geradas com o algoritmo de busca heurística *tree bisection reconnection* (TBR) e 1000 *bootstraps* para suporte nos nós (Felsenstein, 1985), no programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008; disponível em <<http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/>>), recuperando uma única árvore, originada das mais parcimoniosas submetidas ao consenso estrito.

Resultados

Todas as localidades amostradas neste trabalho estão incluídas no Domínio Tropical Atlântico (Ab'Saber, 1977), exceto um exemplar, aparentemente coletado no estado de Mato Grosso, que será apresentado e discutido adiante (Figura 1). Existem duas lacunas ao longo da distribuição geográfica da espécie. No eixo Norte-Sul a primeira lacuna aparece por volta do

paralelo 23° S e a segunda ao longo da Serra do Mar, sendo bem evidente no estado de São Paulo, dividindo as amostras entre litoral e interior. A terceira lacuna ocorre entre as localidades amostradas no litoral da região sul do Brasil e a província de Misiones na Argentina, uma separação de cerca de 700 Km.

Um indivíduo de *Itapotihyla langsdorffii* coletado em 1949 por Werner C. A. Bokermann, pertencente a coleção do MZUSP, tem sua localidade registrada como São Domingos, Rio das Mortes, MT. O livro tombo foi consultado para verificar se não houve erro de impressão do rótulo, mas a informação coincide. Parece mais provável que tenha havido um erro de atribuição da localidade, já que nenhum outro exemplar de *I. langsdorffii* foi coletado até hoje fora de áreas de Mata Atlântica. Mas são necessárias pesquisas históricas mais aprofundadas que não foram realizadas até o momento para resolver a questão. O exemplar apresenta morfologia indistinguível dos demais e nas análises exploratórias realizadas aparece agrupado com as demais populações.

Abordagem morfológica

Os dados qualitativos não indicaram variações discretas ou congruentes com padrões geográficos. Em relação à aparência geral e robustez, não foram detectadas populações passíveis de serem separadas de prontidão com base na morfologia externa. Existem diferenças graduais com uma tendência a exemplares mais robustos pertencerem às OTU 1 (Norte) e 3 (Sul litoral), e os exemplares mais esguios pertencerem à OTU 2 (Sul interior).

O padrão de coloração dorsal assemelha-se a líquens sobre um fundo de pedra (daí o nome do gênero, Faivovich *et al.*, 2005). A cor de fundo varia entre verde claro, marrom claro e cinza claro nos indivíduos preservados, com os tons verdes normalmente ficando esmaecidos pela ação do tempo no preservativo. As bandas ao longo dos membros e manchas dorsais podem ser verde escuro e marrom escuro. O ventre é creme, a região inferior próxima à cloaca e parte inferior das coxas pode ser amarela e laranja claro, principalmente quando em vida. As faces internas dos membros anteriores e posteriores podem aparecer azuladas em exemplares preservados a pouco tempo ou em vida. Alguns indivíduos de Sergipe (OTU 1), apresentaram o padrão de manchas dorsais mais disforme em comparação com as grandes manchas mais definidas de outras populações.

A pele apresenta grânulos irregulares dispersos ao longo de toda superfície do dorso, faces aparentes dos membros e ao longo da linha da mandíbula, normalmente de cor mais

clara do que a do fundo em que estão presentes. A parte externa dos pés e braços apresenta uma franja irregular de cor creme, apresentam membrana interdigital desenvolvida nos pés e nas mãos. A aba subcloacal pode ser mais ou menos desenvolvida, variando entre indivíduos dentro de uma mesma população ou entre populações de maneira heterogênea.

Análises quantitativas

A Tabela 4 apresenta as medidas tomadas para todos os indivíduos de *Itapotihyla langsdorffii*. O sexo pode ser determinado em 186 exemplares: machos (n=121) e fêmeas (n=65). Outros 60 exemplares disponíveis para estudo foram considerados jovens, por não terem tido sexo determinado. A variação do CRC entre machos e fêmeas é congruente com o dimorfismo sexual reconhecido na literatura, com machos sendo em média 22 mm menores que as fêmeas (Tabela 5).

Para explorar a possível variação geográfica associada ao tamanho (CRC) detectada durante as observações dos exemplares, plotamos em gráficos os valores médios do CRC de machos e fêmeas de nossa amostra por localidade, estas organizadas no eixo x da esquerda para a direita em um eixo Norte Sul (Figura 3). Ainda que sutilmente, foi possível enxergar conjuntos de localidades que apresentam médias de CRC ligeiramente diferentes. Aparentemente, entre as localidades 24 (Rio Novo, MG) e a localidade 29 (Rio Claro, SP), existe um indício de divisão, mesmo com sobreposição, com os exemplares distribuídos mais ao Norte apresentando em média o CRC ligeiramente maior.

Em seguida, levando-se em conta o dimorfismo sexual relacionado ao CRC na espécie, a mesma representação foi feita separadamente para os machos e fêmeas (Figura 4). Nesses gráficos é possível enxergar mais claramente conjuntos de localidades em que os exemplares apresentam média de CRC ligeiramente diferentes. E os subconjuntos aparecem em pontos similares do eixo Norte Sul, na localidade 28 (Gália, SP), tanto no caso dos machos, como das fêmeas. Ainda observando os gráficos e diante das observações feitas anteriormente com os exemplares à mão, é possível observar uma variação sutil de média de CRC nos indivíduos da porção Sul do eixo, essa variação é mais evidente entre os machos (Figura 4A). Quando checadas as localidades com indivíduos com médias de CRC menores, verifica-se tratar-se de localidades do interior de São Paulo. Assim sendo, parece haver uma variação clinal no CRC dos indivíduos que aparece nos gráficos como deslocamento das médias de tamanho para cima nas localidades mais ao Norte da Mata Atlântica, a partir do estado de Minas Gerais e Espírito Santo, e para baixo na porção Sul interiorizada da Mata

Atlântica no estado de São Paulo. Indivíduos da porção Sul da Mata Atlântica litorânea apresentam média de CRC mais similar à dos indivíduos da porção Norte. Essa variação não é discreta e aparentemente é mais intensa nos machos.

O resultado das análises discriminantes exploratórias considerando todas as localidades, dados brutos e proporções corporais calculadas para machos e fêmeas mostrou consistentemente um único aglomerado de pontos. De mesma forma, as análises discriminantes realizadas para machos e fêmeas isoladamente utilizando-se medidas brutas e proporções corporais, com indivíduos separados em três OTUs, resultou em subconjuntos de pontos com grande sobreposição (Figura 5). Para os machos, considerando-se as medidas brutas, a variável que mais contribuiu para a variação entre as OTUs no eixo x foi comprimento do artelho 4 (CT4) e a variável que mais contribuiu para a variação entre as OTUs no eixo y foi o comprimento da tíbia (CT); considerando-se as proporções corporais, a variável que mais contribuiu para as variações no eixo x foi a razão entre a largura da cabeça e o comprimento rostro-cloacal (LC/CRC) e a variável que mais contribuiu para a variação no eixo y foi a razão entre o comprimento da tíbia e o comprimento rostro-cloacal (CT/CRC). Para as fêmeas, considerando-se as medidas brutas, a variável que mais contribuiu para a variação entre as OTUs no eixo x foi o comprimento da mão (CM) e a variável que mais contribuiu para a variação entre as OTUs no eixo y foi a distância da narina ao olho (DNO); considerando-se as proporções corporais, a variável que mais contribuiu para as variações no eixo x foi a razão entre o diâmetro do tímpano e o diâmetro da expansão digital do dedo 3 (DT/DF3) e a variável que mais contribuiu para a variação no eixo y foi a razão entre a distância entre a narina e o olho e a largura da cabeça (DNO/LC).

O estudo do dimorfismo sexual de *Itapotihyla langsdorffii* realizado através do teste t-Student de comparação de médias considerando toda a amostra de adultos revelou diferença entre as médias de CRC de machos e fêmeas na nossa amostra ($t = -17,942$, $p = 0,000$). Nos testes realizados com as razões corporais foram detectadas diferenças nas razões LC/CRC ($t = 3,028$, $p = 0,003$), CC/LC ($t = 5,673$, $p = 0,000$), DIN/LC ($t = 2,792$, $p = 0,006$), CF1/CF2 ($t = 1,986$, $p = 0,049$) e CT2/CT5 ($t = 6,732$, $p = 0,000$), indicativas de diferenças nas proporções da largura da cabeça em relação ao comprimento total de machos e fêmeas e no comprimento dos dedos e artelhos. Segundo os resultados, machos apresentam cabeça proporcionalmente mais larga e, embora sutil, dedo 1 proporcionalmente mais longo. Nas fêmeas, o artelho 5 é aparentemente mais longo que o dos machos, quando comparado ao artelho 2. Quando testado dentro de cada OTU o resultado do estudo do dimorfismo sexual foi similar ao resultado

considerada a amostra total, com exceção da proporção dos artelhos, que não difere entre machos e fêmeas da OTU 2. Cabe ressaltar que a diferença no CRC de machos e fêmeas é bastante evidente e que a diferença na proporção da cabeça também pode ser visualizada por olhos treinados. As diferenças nas proporções dos dedos e artelhos são sutis e podem ter ocorrido devido a desvios na tomada das medidas. Mesmo assim, ainda que reais e significativas, não servem para a sexagem dos exemplares quando examinados à mão.

Abordagem molecular

As análises filogenéticas utilizando o marcador mitocondrial (Cyt b) e mitocondrial + nucleares (Cyt b + Rod + Rag1), tanto por inferência Bayesiana como por máxima parcimônia, recuperaram topologias similares e que indicam que *Itapotihyla langsdorffii* constitui um grupo monofilético. A Figura 6 apresenta a árvore mais resolvida e com melhores suportes obtida através de inferência Bayesiana construída somente a partir dos dados provenientes do marcador mitocondrial. Nas demais hipóteses obtidas a resolução sempre foi menor, resultando em maior número de politomias.

É possível observar na Figura 6 *Itapotihyla langsdorffii* recuperada como um clado monofilético com suporte 0,52 que não inclui estruturação evidente entre as diferentes populações. Existe uma grande politomia na base que inclui indivíduos provenientes da porção sul da Mata Atlântica, com uma única exceção – um indivíduo proveniente de Linhares, ES e um clado com suporte 0,91 formado por todas as outras amostras, que são provenientes da porção Norte da Mata Atlântica, incluindo as amostras de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. Outros agrupamentos geograficamente congruentes aparecem, por exemplo, amostras de Bertioga, SP ou amostras de Ubatuba, SP e Parati, RJ unidas ou amostras de Cananéia, SP e Ilha do Cardoso, SP unidas em um mesmo clado, mas sem suporte. O resultado geral sugere uma divisão incipiente no eixo Norte e Sul, o clado Norte (OTU1), formando possivelmente (dada a presença de um indivíduo de Linhares na politomia) um grupo monofilético. Infelizmente, a topologia da árvore permite diversos outros cenários, o que impede discussões mais detalhadas nesse momento.

Discussão

Itapotihyla langsdorffii distribui-se amplamente pelo Domínio Morfológico Tropical Atlântico, mas aparentemente, não apenas as áreas florestadas determinam sua ocorrência. Algumas das lacunas na distribuição das populações parecem ser reais, como no caso da grande faixa de registros ausentes na região dos complexos serranos do estado de São Paulo. Essa região foi amplamente trabalhada (*e.g.* Verdade *et al.*, 2011) e dificilmente trata-se de desvio amostral. É possível que o relevo exerça influência importante na distribuição de *Itapotihyla langsdorffii* juntamente à vegetação, dada a reprodução explosiva em poças temporárias formadas em meandros abandonados de rios (Pavan & Verdade, 1999). A lacuna presente entre os registros no estado do Paraná e Misiones no Paraguai não se justifica com base no tipo de vegetação e relevo, no entanto pode ser problema amostral ou uma ausência mais recente, decorrente da destruição das matas dessa região para plantação de lavouras de café no século XVIII.

Os resultados das análises morfológicas tanto qualitativas como quantitativas não mostram evidências de variações na morfologia externa dos exemplares que justifique separação entre populações. As variações encontradas são incongruentes com padrões geográficos e os fenótipos variam intrapopulacionalmente ou, formam uma clina, como no caso do CRC, com deslocamento das médias no comprimento rostro-cloacal dos indivíduos, com sobreposição na distribuição das medidas.

Indivíduos com média de CRC maior são encontrados aparentemente em localidades de áreas mais úmidas, possivelmente um reflexo do padrão de atividade desses animais. Nas áreas mais ao Norte da Mata Atlântica e no litoral, o volume de chuvas cai durante o inverno, mas a seca não é tão pronunciada como nas porções mais interiorizadas. No interior, nas áreas de mata mais secas, o inverno é extremamente seco e esses animais devem passar a maior parte do tempo em refúgios. Na localidade de Buri, SP, jovens dessa espécie foram encontrados no fundo da axila de bromélias no mês de junho (Marianna Dixo, comunicação pessoal). Passando menos tempo em atividade, espera-se que a captura de alimentos seja menor e, portanto, o aporte de energia para ser investida no crescimento dos exemplares também. Variação similar de tamanho associada aparentemente a diferenças de umidade foi detectada também por Verdade e Rodrigues (2007), com as populações de *Allobates* (Dendrobatidae) com maiores indivíduos presentes no sul da Bahia.

Os resultados obtidos para o dimorfismo sexual são concordantes com aqueles da literatura (*e.g.* Lutz, 1973; Duellman, 1974; Heyer *et al.*, 1990). A presença de dimorfismo

sexual no tamanho, com fêmeas maiores que os machos, é comum entre os anuros e aparentemente está relacionada com a capacidade de carregar ovos, pois existe uma correlação positiva entre o tamanho corporal da fêmea e tamanho da desova (Shine, 1979; Duellman & Trueb, 1994). A cabeça proporcionalmente maior e mais larga nos machos de *I. langsdorffii* do que nas fêmeas, e o dedo 1 proporcionalmente mais longo, são novidades, não mencionadas na literatura. A cabeça mais robusta é uma característica típica dos machos de muitos organismos, entre eles lagartos das famílias Agamidae e Teiidae, por exemplo, quase sempre associada a *displays* comportamentais para defesa de território ou disputa de fêmeas. Finalmente, o comprimento do dedo 1 poderia estar associado ao amplexo axilar, embora a ocorrência de desvios na tomada das medidas não esteja totalmente descartada.

As variações na média do CRC nesse trabalho, embora não sejam discretas, são coerentes com propostas de subdivisões de componentes geográficos presentes na literatura e concordam com resultados anteriores obtidos em trabalhos morfológicos (*e. g.* Pombal & Haddad, 1992; Verdade & Rodrigues, 2007). Aparentemente existe uma diferenciação, possivelmente em curso, entre um componente Norte (OTU1), que inclui as populações de *I. langsdorffii* de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Sergipe, e um componente Sul (OTUs 2 e 3) que inclui as populações de *I. langsdorffii* do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Vale ressaltar que as variações encontradas parecem mais evidentes entre machos do que entre fêmeas. E isso pode ser resultado de desvio amostral, foram estudados praticamente duas vezes mais exemplares machos que fêmeas, ou, pode significar que quaisquer que sejam as pressões atuantes, afetem mais intensamente machos do que fêmeas. De qualquer maneira, os resultados obtidos na abordagem morfológica condizem com o esperado para esse tipo de dado, nenhuma evidência clara e discreta da existência de espécies novas sendo tratadas sob o mesmo epíteto específico.

No que diz respeito a abordagem molecular, o resultado obtido foi diferente dos resultados mais gerais apresentados na literatura para diversos grupos de anuros (*e.g.* Amaro *et al.*, 2012; Gehara *et al.*, 2013; Gehara *et al.*, 2014). Esperávamos diversos clados entre as populações estudadas, dada a ampla distribuição da espécie, a grande variação latitudinal e a heterogeneidade ambiental da Mata Atlântica, ou no mínimo uma estruturação entre um componente Norte e outro Sul da Mata Atlântica. E pautados nos resultados da abordagem morfológica, quem sabe, subdivisões adicionais no componente Sul.

Já no momento do alinhamento das sequências ficou evidente a homogeneidade da amostragem com poucas substituições nucleotídicas e o resultado das análises filogenéticas

realizadas corroboraram a observação. Infelizmente a hipótese obtida, pouco resolvida, torna discussões fundamentalmente especulativas. A presença de um clado monofilético reunindo as populações do Norte da Mata Atlântica não está excluída. Esse componente é concordante com o refúgio da Bahia proposto por Carnaval e Moritz (2008) e Carnaval e colaboradores (2009), em que os autores propõem que a região tenha exercido um papel de refúgio das espécies desde o Pleistoceno. Existem evidências também de áreas estáveis mais ao Sul da Mata Atlântica que são coerentes com esse cenário (Thomé *et al.*, 2010). Porém, a topologia da árvore também permite que as populações de *Itapotihyla langsdorffii* que ocorrem mais ao sul, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo sejam basais em relação às populações ao norte. Uma especulação é que as populações da BA, MG e ES, tenham ficado isoladas e acumulado mutações mais recentemente, visto que praticamente não existem variações nos genes nucleares e mitocondrial. Esse cenário é menos esperado do ponto de vista biogeográfico, já que as linhagens mais basais da tribo Lophiohylini distribuem-se pela região norte da Mata Atlântica e Venezuela (Faivovich *et al.*, 2005; Pyron & Wiens, 2011; Frost, 2015).

É sempre possível que o acréscimo de amostras altere o cenário encontrado e que os marcadores moleculares escolhidos tenham falhado em registrar a variação entre as populações estudadas, no entanto estudamos marcadores moleculares classicamente utilizados e reconhecidos como reveladores de padrões de estruturação dentro de espécies de anuros consideradas únicas. Além disso, trabalhamos com abordagens diferentes que revelaram resultados congruentes. É mais provável que os processos que estejam levando as populações de *I. langsdorffii* à diversificar sejam mais recentes e ainda não estejam claramente fixados entre as populações. Parece-nos claro que, no momento, não existem evidências para separar *Itapotihyla* em mais de uma espécie, embora o início de diversificação na metapopulação em três componentes, um no Norte e dois no Sul deva ser considerado em discussões futuras sobre áreas prioritárias para conservação e diversidade genética.

Agradecimentos

Agradecemos o financiamento fornecido pela Universidade Federal do ABC, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para A.M.N. e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para A.M., M.A.S. e M.T.R. Somos gratos a Antoine Fouquet e Renata Cecília Amaro pelas informações referentes a abordagem molecular. Francisco Dal Vechio, José Cassimiro, Marco de Sena e Mauro

Teixeira Jr. pela ajuda com a utilização de programas e discussões. Aline Diniz e Sabrina Baroni colaboraram com apoio técnico. Somos gratos aos técnicos e curadores das instituições pela colaboração com material.

Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A.N. 1977. Domínios morfoclimáticos e províncias fitogeográficas do Brasil. Orientação. Departamento de Geografia da Universidade de São Paulo. 3: 45–48.
- Amaro, R.C. et al. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic Rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 880–888.
- Aquino, L., et al. 2004. *Itapotihyla langsdorffii*. *IUCN Red List of Threatened Species*. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 26 de junho de 2015.
- Araújo, O.G.S., et al. 2009. The amphibians of São Paulo State, Brazil amphibians of São Paulo. *Biota Neotrop*. 9(4): 197–209.
- Arzabe, C. and Loebmann, D. 2006. Amphibia, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii*: Distribution extension. *Check List* 2(2): 33–34.
- Berven, K.A. and Grudzien, T.A. 1990. Dispersal in the wood frog (*Rana sylvatica*): implications for the genetic population structure. *Evolution* 44(8): 2047–2056.
- Bickham, J.W., Wood, C.C. and Paton, J.C. 1995. Biogeographic implications of cytochrome b sequences and allozymes in sockeye (*Onchorhynchus nerka*). *Journal of Heredity*. 86: 140–144.
- Bossuyt, F. and Milinkovitch, M.C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *PNAS*. 97(12): 6585–6590.

- Brunnes, T.O., Sequeira, F., Haddad, C.F.B. and Alexandrino, J. 2010. Gene and species tree of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 1120–1133.
- Bruschi, D.P., et al. 2014. Molecular and morphological evidence reveals a new species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Hylidae, Phyllomedusinae) from the Atlantic Forest of the highlands of Southern Brazil. *Plos One*. 9(8): 1–13.
- Carnaval, A.C., et al. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*. 323: 785–789.
- Carnaval, A.C. and Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J. Biogeogr.* 35: 1187–1201.
- Cazelli, H. and Moura, M.R. 2012. First record of *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril e Bibron, 1841) (Amphibia: Hylidae) from a Cerrado region in Minas Gerais state, Brazil. *CheckList* 8(3): 510–512.
- Clapperton, C.M. 1973. *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Elsevier. Amsterdam. 713 pp.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 30: 71–86.
- Duellman, W.E. 1974. A reassessment of the taxonomic status of some neotropical hylid frogs. *Occasional papers of the Museum of Natural History The University of Kansas*. 27: 1–27.
- Duellman, W.E. and Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 670 pp.

- Duméril, A.M.C. and Bibron, G. 1841. *Erpétologie générale ou histoire naturelle complete des reptiles. Librairie Encyclopédique de Roret. Tome huitième. Paris. 824 pp.*
- Faivovich, J., et al. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 240 pp.
- Feio, R.N., et al. 2006. Anfíbios das áreas prioritárias dos Rios Jequitinhonha e Mucuri. 94–119 in *Biodiversidade e Conservação nos Vales dos Rios Jequitinhonha e Mucuri*. Ministério do Meio Ambiente.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fetzner, J. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: a simplified method. *Bio Techniques*, 26: 1052–1054.
- Fitzpatrick, S.W., et al. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*. 18: 2877–2896.
- Fouquet, A., 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.
- Fouquet, A., et al. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *Plos One*. 10: 1–10.
- Fouquet, A., et al. 2012. From Amazonia to the Atlantic Forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65: 547–561.
- Frost, D. R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.2. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em:

<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em 15 de setembro de 2015.

- Gehara, M., et al. 2013. From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conserv. Genet.*
- Gehara, M., 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(9).
- Geurgas, S.R., Trefaut, M.T. and Moritz, C. 2008. The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revisited: A molecular phylogenetic perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 92–101.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S. & Nixon, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774–786.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. and Bonato, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15: 3969–3982.
- Haddad, C.F.B., et al. 2006. Guia Sonoro dos Anfíbios Anuros da Mata Atlântica. NovoDisc Mídia Digital da Amazônia Ltda. 1 CD.
- Heyer, W.R. 1978. Systematics of the *fuscus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin*, 29: 1–85.
- Heyer, W.R., et al. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 31(4): 237–332.

- Inger, R.F., Stuart, B.L. and Iskandar, D.T. 2009. Systematics of a widespread Southeast Asian frog, *Rana chalconata* (Amphibia: Anura: Ranidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155: 123–147.
- Jackson, J.F. 1978. Differentiation in the genus *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): Implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil. *Arq. Zool.* 30(1): 1–79.
- Jowers, M.J., Downie, J.R. and Cohen, B.L. 2008. The golden tree frog of Trinidad, *Phyllodytes auratus* (Anura: Hylidae): systematic and conservation status. *Studies on Neotropical fauna and Environment* 43(3): 181–188.
- Jungfer, K.H., et al. 2013. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: *Osteocephalus*): an Amazonian puzzle. *Zoologica Scripta* 30 pp.
- Kleinsorge, J.M.D., et al. 2009. Amphibia, Anura, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril e Bibron, 1841): Correction of older record and distribution extension. *Check List* 5(4): 876–878.
- Lingnau, R., Zank, C., Colombo, P. and Vinciprova, G. 2006. Amphibia, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii*: distribution extension. *Check List* 2(1): 38–39.
- Lutz, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. *University of Texas Press*. Austin and London. 264 pp.
- Maffei, F., 2010. Diversidade e uso do habitat de comunidades de anfíbios anuros em Lençóis Paulista, Estado de São Paulo. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, 74 pp.
- Maffei, F., Ubaid, F.K. and Jim, J. 2011. *Itapotihyla langsdorffii*, male combat. *Herpetological Bulletin* 116: 35–37.
- McLeod, D. 2010. Of least concern? Systematics of a cryptic species complex: *Limnonectes kuhlii* (Amphibia: Anura: Dicroglossidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(3): 991–1000.

- Miller, M.A., Pfeiffer, W. and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 November 2010. New Orleans, LA, 1–8.
- Napoli, M.F. 2000. Taxonomia, variação morfológica e distribuição geográfica das espécies do grupo de *Hyla circumdata* (Cope, 1870) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Tese de Doutorado*. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ. Rio de Janeiro. 208 pp.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. *In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (Eds). Molecular Systematics. Sinauer & Associates, Sunderland, MA, 205–247.*
- Pavan, D. e Verdade, V.K. 1999. Sobre o papel do relevo na distribuição de *Osteocephalus langsdorffii* Duméril e Bibron 1841 (Anura: Hylidae). *in: V Congresso Latinoamericano de Herpetologia, Public. extra Mus. Nac. Montevideo. 50: 118.*
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. and Sites Jr., J.W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society. 85: 13–26.*
- Pimenta, B.V.S. and Canedo, C. 2007. Description of the tadpole of *Itapotihyla langsdorffii* (Anura: Hylidae). *Zootaxa 1387: 39–46.*
- Pombal-Jr, J.P e Haddad, C.F.B. 1992. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Rev. Brasil. Biol. 52(2): 217–229.*
- Pyron, R.A. and Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species and a revised classification of extant frogs, salamanders and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution. 61: 543–583.*

- Rambaut, A and Drummond, A.J. 2009. MCMC Trace Analysis Tool version 1.5.0. Institute of Evolutionary Biology. University of Edimburgh and Department of Computer Science, University of Auckland. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>. Acessado em Julho de 2015.
- Ronquist, F. et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*. 61: 1–4.
- Sales Aquino, D.C.P., et al. 2012. Predation of *Aparasphenodon arapapa* (Hylidae) by *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae). *Herpetology Notes* 5: 437–438.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*. 2: 297–306.
- Straneck, R., Olmedo, E.V. e Carrizo, G.R. 1993. *Catálogo de voces de anfibios argentinos*. Parte I L.O.L.A. Buenos Aires. 98–99.
- Stuart, B.N., Inger, R.F. and Voris, H.K. 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biol. Lett.* 2: 470–474.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Thomé, M.T.C., et al. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55(3): 1018–1031.
- Verdade, V.K. and Rodrigues, M.T. 2007. Taxonomic review of *Allobates* (Anura: Aromobatidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Journal of Herpetology*. 41(4): 566–580.

- Verdade, V.K. et al. 2011. Decline of Amphibians in Brazil. *in*: Barrio-Amorós, C.L. and Wilkinson, J.W. (Org). *Amphibian Biology. Status of Amphibians: Western Hemisphere: Uruguay and Brazil*. Baulkhlan Hills: Surrey Beatty and sons.
- Vrcibradic, D., Teixeira, R.L. and Borges-Júnior, V.N.T. 2009: Sexual dimorphism, reproduction and diet of the casque-headed treefrog *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae: Lophiohyliini). *Journal of Natural History* 43 (35–36): 2245–2256.

Tabela 1. Lista dos exemplares de *Itapotihyla langsdorffii*, associados às OTUs utilizadas neste trabalho, com os marcadores moleculares sequenciados. OTU 1, Mata Atlântica Norte, OTU 2, Mata Atlântica Sul porção interior, OTU 3, Mata Atlântica Sul porção litoral.

Núm. coleção	Núm. nesse trabalho	Localidade	OTU	Cytb	Rod	Rag1
UFBA T 614	0	Ilhéus - BA	1		X	X
UFBA T 605	1	São Sebastião do Passé - BA	1	X		X
UFBA T 534	2	Mata de São João - BA	1		X	X
UNIBAN 2549	3	Biritiba Mirim - SP	2	X	X	X
MTR 12112	4	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 12101	5	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 17636	6	Marliéria - MG	1	X	X	X
MTR 17635	7	Marliéria - MG	1	X	X	X
MTR 12099	8	Linhares - ES	1	X	X	
MTR 12371	9	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 17577	10	Marliéria - MG	1	X	X	
MTR 17512	11	Marliéria - MG	1		X	X
MTR 17593	12	Marliéria - MG	1	X	X	X
MTR 12100	13	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 12371	14	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 12101	15	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 17588	16	Marliéria - MG	1	X	X	X
MTR 12251	17	Linhares - ES	1	X		X
MTR 12251	18	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 11959	19	Rio Claro - SP	2		X	
MTR 12112	20	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 12100	21	Linhares - ES	1	X	X	X
MTR 17513	22	Marliéria - MG	1	X	X	
MTR 12099	23	Linhares - ES	1	X	X	
H 333	24	Buri - SP	2	X	X	X
H 303	25	Buri - SP	2	X	X	X
H 405	26	Buri - SP	2	X	X	X
CFBHT 304	27	Rio Claro - SP	2	X	X	
CFBHT 10706	28	Ilhéus - BA	1	X	X	
CFBHT 8472	29	Rio Claro - SP	2		X	X
CFBHT 15715	30	Linhares - ES	1		X	X
CFBHT 3683	31	Americana - SP	2		X	X
CFBHT 1471	32			X	X	X
CFBHT 16663	33	Uruçuca - BA	1	X	X	X
CFBHT 2494	34	Bertioga - SP	3	X	X	X
CFBHT 5915	35	Sooretama - ES	1	X	X	X

Continuação Tabela 1.

CFBHT 8126	36	São José do Rio Pardo - SP	2		X	
CFBHT 10681	37	Cananéia - SP	3	X	X	X
CFBHT 305	38	Rio Claro - SP	2	X	X	X
CFBHT 12792	39	Mata de São João - BA	1	X	X	X
CFBHT 16270	40	Uruçuca - BA	1		X	X
CFBHT 10530	41	São Paulo - SP	2	X	X	X
CFBHT 15678	42	Linhares - ES	1	X	X	
CFBHT 11551	43	Santos - SP	3	X	X	
CFBHT 9091	44	Santa Teresa - ES	1	X	X	X
CFBHT 12791	45	Mata de São João - BA	1	X	X	
CFBHT 52	46	Ubatuba - SP	3		X	X
CFBHT 289	47	Rio Claro - SP	2	X	X	X
CFBHT 15679	48	Linhares - ES	1		X	X
CFBHT 10667	49	Ilha do Cardoso	3	X	X	X
CFBHT 17946	50	Ilhéus - BA	1	X	X	X
CFBHT 8581	51	Cananéia - SP	3	X	X	X
CFBHT 775	52	Rio Claro - SP	2	X	X	
CFBHT 6944	53	Lorena - SP	2	X	X	X
CFBHT 16271	54	Uruçuca - BA	1	X	X	X
CFBHT 14617	55	Botucatu - SP	2		X	X
CFBHT 563	56	Itirapina - SP	2	X	X	X
CFBHT 8224	57	Ubatuba - SP	3	X	X	X
CFBHT 14	58	Ubatuba - SP	3	X	X	X
CFBHT 774	59	Rio Claro - SP	2	X	X	X
CFBHT 79	60	Parati - RJ	3	X	X	X
CFBHT 2757	61	Cananéia - SP	3	X	X	X
CFBHT 2758	62	Cananéia - SP	3	X	X	X
CFBHT 8990	63	Santa Teresa - ES	1	X	X	X
CFBHT 8989	64	Santa Teresa - ES	1	X	X	X
CFBHT 5974	65	Santa Teresa - ES	1	X	X	X
CFBHT 284	66	Ubatuba - SP	3	X	X	
CFBHT 350	67	Parati - RJ	3	X	X	
CFBHT 5973	68	Santa Teresa - ES	1	X	X	
CFBHT 2493	69	Bertioga - SP	3	X	X	X
CFBHT 15476	70	Parati - RJ	3	X	X	X
CFBHT 8111	71	Araçoiaba da Serra - SP	2		X	X
CFBHT 10705	72	Ilhéus - BA	1	X	X	X
CFBHT 2759	73	Cananéia - SP	3	X	X	X
CFBHT 17696	74	Itanhaém	3	X	X	X
CFBHT 2760	75	Cananéia - SP	3	X	X	X

Tabela 2. Exemplos e marcadores utilizados nas análises moleculares provenientes do Gen Bank (Em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>).

Espécie	Cyt b	Rod	Rag 1	Localidade
<i>Aparasphenodon brunoi</i>	AY843789	AY844541	AY844364	Brasil: ES: Aracruz
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	AY843954			Brasil: SP: próx. Salesópolis E.B.B.
<i>Bokermannohyla hylax</i>	AY549391			Brasil: SP: próx. Salesópolis E.B.B.
<i>Corythomantis greeningi</i>	AY843800	AY844551	AY844374	Brasil: AL: Represa de Xingó
<i>Hypsiboas faber</i>	AY843857	AY844607		Argentina: Misiones
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	AY843951			Argentina: Misiones
<i>Osteocephalus cabrerai</i>	AY843950			Brasil: Acre: Porto Walter
<i>Osteocephalus leprieurii</i>	AY843952			Venezuela: Amazonas
<i>Osteocephalus oophagus</i>	AY843953			Guiana Francesa: Kaw Road
<i>Osteocephalus taurinus</i>			KP011060	Las Claritas, Bolívar, Venezuela
<i>Osteocephalus taurinus</i>	AY843954			Venezuela: Amazonas
<i>Phyllodytes auratus</i>	DQ403740			Trinidad e Tobago: El tucuche
<i>Phyllodytes luteolus</i>	AY843966	AY844708	AY844374	Brasil: ES: Guarapari
<i>Phyllodytes sp.</i>	AY843967			Brasil: BA: Uruçuí-Una
<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	AY843963			Brasil: RJ: Parati
<i>Trachycephalus nigromaculatus</i>	AY844016			Brasil: ES: Guarapari
<i>Trachycephalus resinifictrix</i>	AY843964			Venezuela: Amazonas
<i>Trachycephalus venulosus</i>	AY843965	AY844707	AY844493	Guiana: Berbice River

Tabela 3. Primers usados nesse estudo.

Primer	Sequência	Autor
LGL 765	5'-GAAAAACCA YCGTTGTWATTCAACT-3'	Bickham et al. (1995)
Cytb V	5'-GGCGAATAGGAAGTATCATTC-3'	Palumbi (1996)
Rhod 1A	5'-ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC-3'	Bossuyt e Milinkovitch (2000)
Rhod 1D	5'-GTAGCGAAGAARCCTTCAAMGTA-3'	Bossuyt e Milinkovitch (2000)
R1-GFF	5'-GAGAAGTCTACAAAAVGGCAAAG-3'	Faivovich et al. 2005
R1-GFR	5'-GAAGCGCCTGAACAGTTTATTAC-3'	Faivovich et al. 2005

Tabela 4. Valores das medidas morfométricas (em mm) para machos e fêmeas de *Itapotihyla langsdorffii*. As medidas são apresentadas como Média \pm Desvio Padrão.

Medida	Machos (n=121)	Fêmeas (n=66)
CRC	74,5 \pm 6,2	95,9 \pm 8,5
LC	22,6 \pm 1,7	28,5 \pm 2,4
CC	22,1 \pm 1,7	27 \pm 2,2
DIN	6 \pm 0,6	7,2 \pm 0,7
DNO	7,1 \pm 0,9	9 \pm 0,9
DO	7,3 \pm 0,6	8,1 \pm 0,6
DIO	8,7 \pm 1,1	11 \pm 1,2
DT	4,3 \pm 0,4	5,2 \pm 0,6
CBR	19,5 \pm 2,2	25,1 \pm 2,5
CAB	16,3 \pm 1,6	21 \pm 7,1
CM	23,4 \pm 3,6	30 \pm 2,9
CF1	11,9 \pm 1,2	15,6 \pm 1,6
CF2	14,7 \pm 1,5	19,5 \pm 2
CF3	18,6 \pm 2	24,5 \pm 2,7
CF4	14 \pm 1,6	18,6 \pm 2,1
DF3	4,5 \pm 0,6	5,7 \pm 0,8
CCX	37,6 \pm 4,6	50,3 \pm 6
CT	41,7 \pm 3,6	54,6 \pm 6,4
CP	51,1 \pm 4,2	66,7 \pm 7
CT1	12 \pm 1,3	16,5 \pm 3,9
CT2	14,2 \pm 1,5	19 \pm 4,1
CT3	19,7 \pm 2	26,5 \pm 4,4
CT4	23,5 \pm 2,5	31,8 \pm 5
CT5	18,2 \pm 2,5	16,1 \pm 4,7

Tabela 5. Valores de comprimento rostro-cloacal (CRC) em mm de machos, fêmeas e jovens (= sexo indeterminado) de *Itapotihyla langsdorffii*. As medidas são apresentadas como Média \pm Desvio Padrão (mínimo–máximo).

	N	Média \pm Desvio Padrão (Mínimo–Máximo)
Machos	121	74,5 \pm 6,2 (60,9–90,1)
Fêmeas	66	96,1 \pm 8,5 (76,7–112,3)
Jovens	60	60,5 \pm 19,7 (22,9–93,2)

Figuras

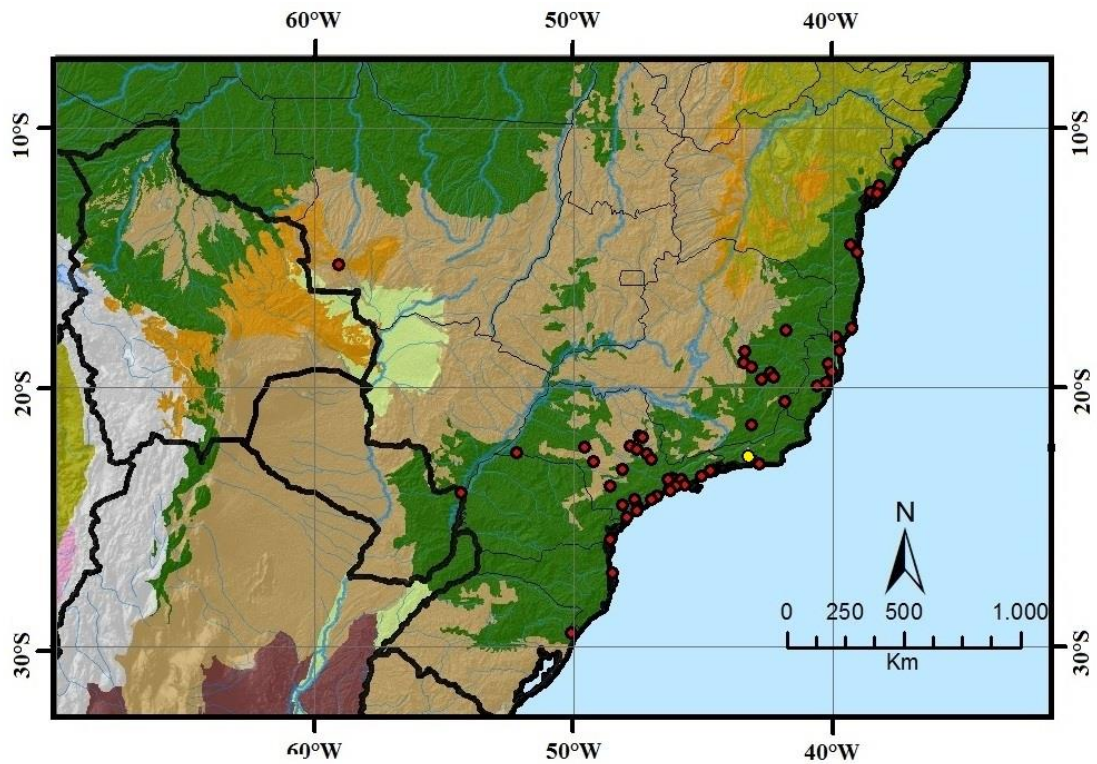


Figura 1. Mapa com todos os pontos amostrados nesse trabalho, cobrindo a distribuição de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da Mata Atlântica. O ponto amarelo representa a provável localidade tipo da espécie, o município de Petrópolis no estado do Rio de Janeiro.

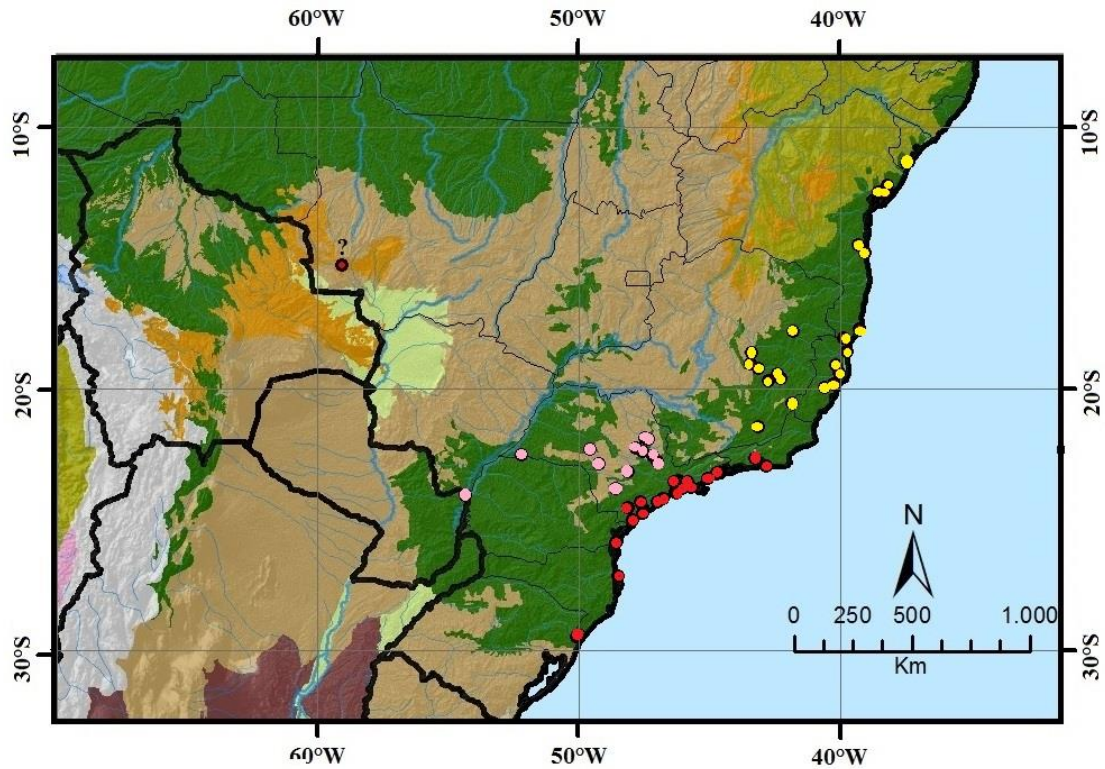


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica de *Itapotihyla langsdorffii* evidenciando as três unidades taxonômicas operacionais (OTU) utilizadas: OTU 1 em amarelo, OTU 2 em rosa e OTU 3 em vermelho. O ponto com o sinal de interrogação em cima, no estado do Mato Grosso, representa Rio das Mortes, localidade duvidosa.

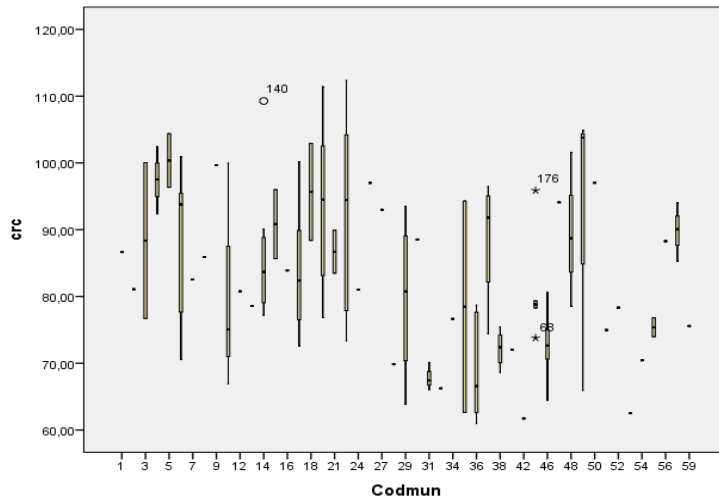


Figura 3. Gráfico apresentando a variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da distribuição geográfica, com as localidades organizadas no eixo Norte – Sul, usando machos e fêmeas. A medida do CRC é apresentada em mm.

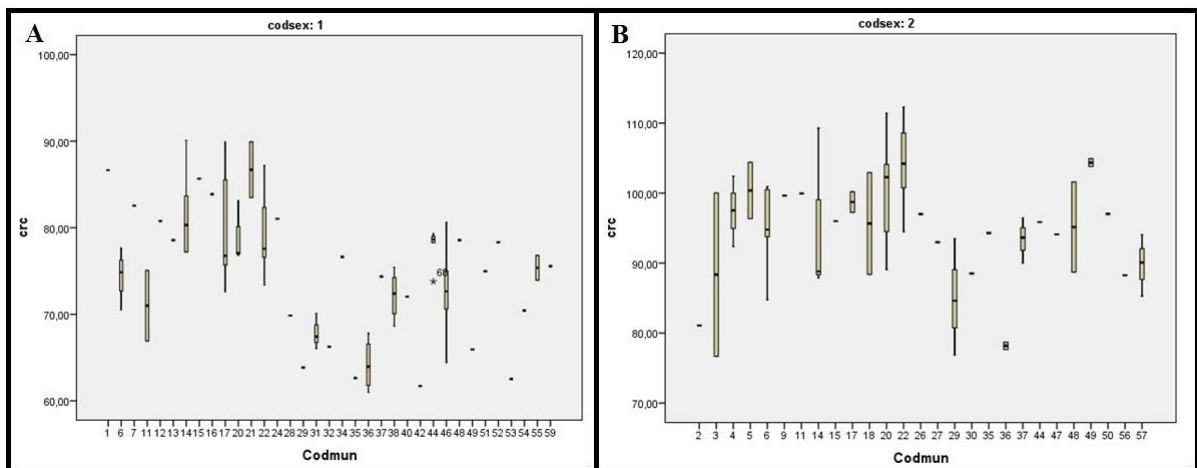


Figura 4. Gráfico apresentando a variação do comprimento rostro-cloacal (CRC) de *Itapotihyla langsdorffii* ao longo da distribuição geográfica, com as localidades organizadas no eixo Norte – Sul, usando machos (A) e fêmeas (B). A medida do CRC é apresentada em mm.

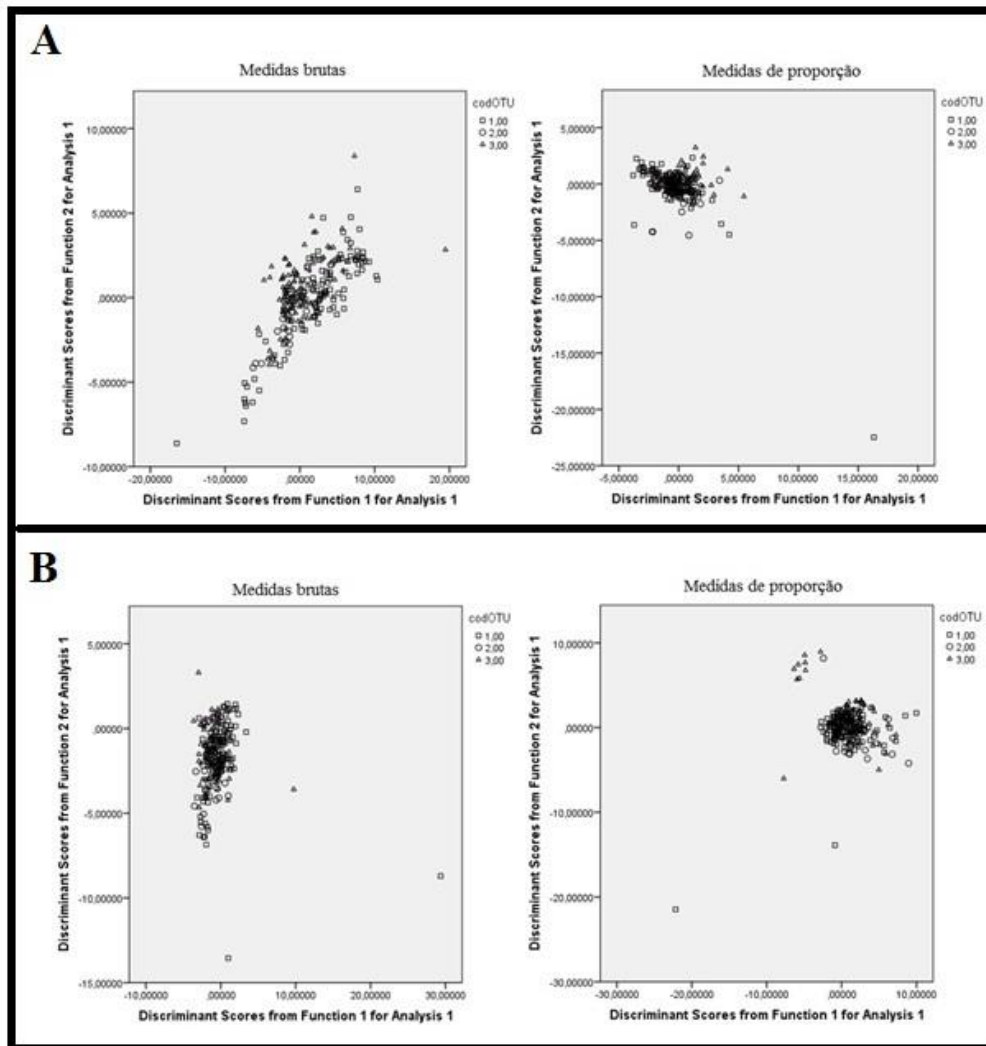


Figura 5. Gráficos da análise discriminante realizada a partir de medidas brutas e medidas de proporção de machos (A) e fêmeas (B) de *Itapotihyla langsdorffii*.

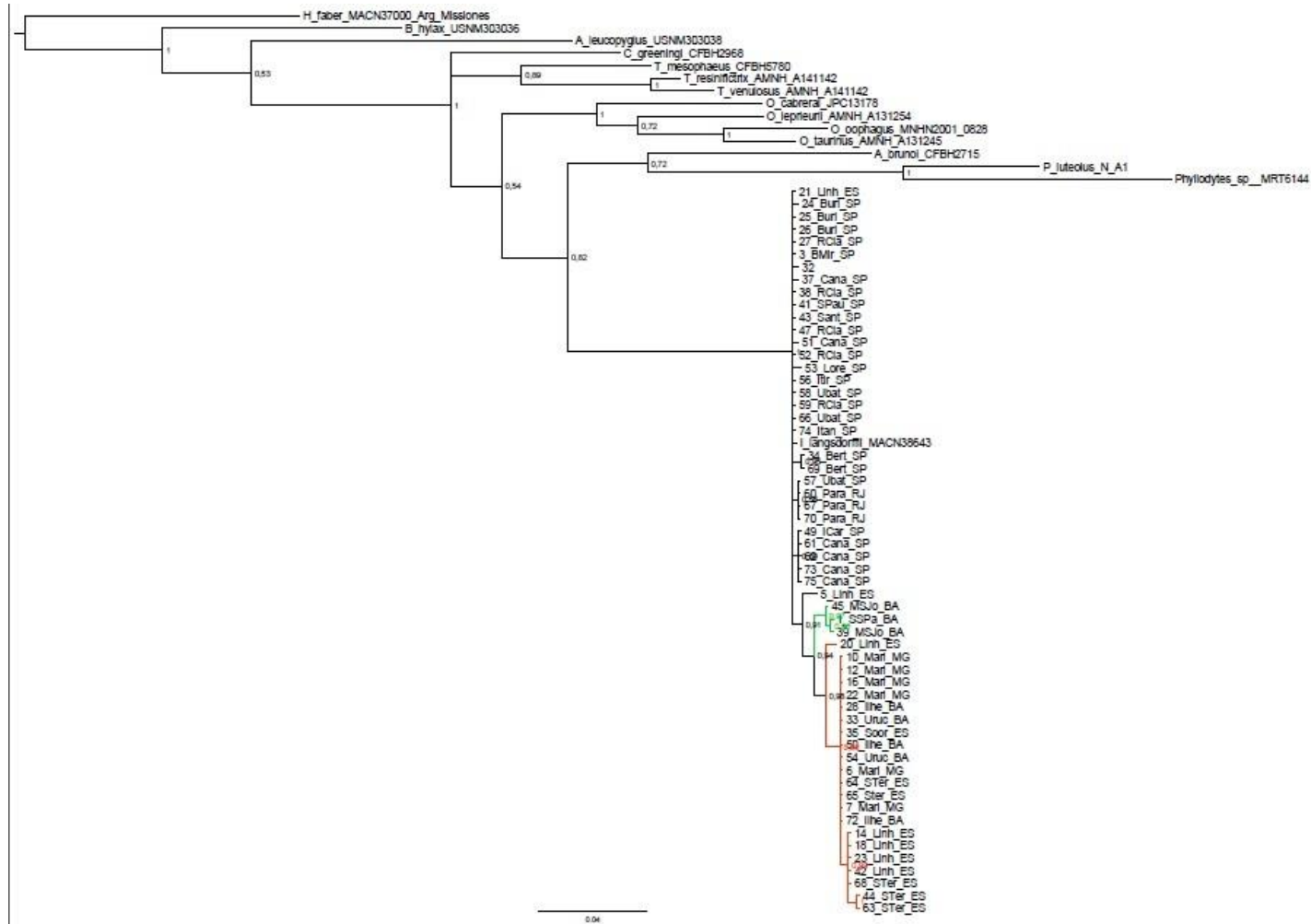


Figura 6. Figura 6. Topologia da Inferência Bayesiana realizada com as sequências de um fragmento do gene que codifica o citocromo b mitocondrial (Cyt b) dos indivíduos de *Itapotihyla langsdorffii*. Os valores de Probabilidade Posterior estão representados acima dos nós. O clado em vermelho representa os indivíduos do Norte da Mata Atlântica.

Apêndice I

Lista do material examinado: Os números entre parênteses ao lado dos municípios correspondem ao código utilizado nas análises morfológicas.

Itapotihyla langsdorffii: **Brasil: Bahia: Araçás (2)**: UFBA 10103, **Caravelas (9)**: CFBH 33275, **Ilhéus (6)**: CFBH 22369-70, 27709, 36097, 37968, MZUSP 95404, 95495, UFBA 9081, 10825-31, **Mata de São João (4)**: CFBH 27794-95, UFBA 4446-50, 9044, **Mucuri (11)**: CFBH 1443, MBML 2629, 4901, **São José da Vitória (7)**: MZUSP 63544, **São Sebastião do Passé (3)**: UFBA 10101-02, **Uruçuca (5)**: CFBH 32446-47, **Espírito Santo: Aracruz (21)**: MBML 7480-81, **Conceição da Barra (12)**: CFBH 4158, 32038, 33139, MBML 4959, **Linhares (17)**: CFBH 25153, 26242, 26542, 32000-01, 33212, MBML 1332, 1385, 1692, 1974-75, 2247-48, 2375-76, 4847, 6964-65, **Pedra Menina (23)**: CFBH 35173, **Santa Teresa (22)**: CFBH 4178, 14987-88, 18005-07, UFMG 13052-57, 13109-10, MBML 4719, 4809-10, 5498-5500, 6007, 6305-06, 6337, 6340, 6342, **Sooretama (15)**: CFBH 14927, 33219, **Mato Grosso: São Domingos (8)**: MZUSP 1084, **Minas Gerais: Conceição do Mato Dentro (14)**: MCNAM 9906, 12367, 14713, 15395-99, 15445, 15615, 17851, 18224, 18241, **Ipaba (18)**: MZUFV 5035, UFMG 13161, **Marliéria (20)**: MZUFV 1426, 1509, 1549, 7020-21, MZUSP 149837-42, **Poté (10)**: MZUFV 5720-21, **Rio Novo (24)**: MCNAM 7469, MZUFV 4317, **Serro (13)**: UFMG 12558, MZUFV 13321, **Sobralia (16)**: MCNAM 11086, **Vargem Alegre (19)**: MZUSP 1014, 1589, **Paraná: Guaratuba (58)**: CFBH 4210, **Matinhos (56)**: CFBH 7570, 7571, **Rio de Janeiro: Barro Branco (32)**: MZUSP 92470, **Duque de Caxias (33)**: MZUSP 32439, **Maricá (35)**: MCNAM 7292-93, **Parati (37)**: CFBH 4531, 5784, 30640, MZUSP 92854, **Rio Grande do Sul: Itati (60)**: MCP 8581, **Santa Catarina: Bombinhas (59)**: MCP 1844, **São Paulo: Águas de Santa Bárbara (34)**: MZUSP 151083, **Arthur Nogueira (31)**: MZUSP 143893-95, **Bertioga (45)**: MZUSP 13233, 70450, 136202-05, 138891, 10568, 134018, **Buri (44)**: MZUSP 128490-92, **Caiobá (57)**: MZUSP 31270, **Cananéia (55)**: ESALQ 465, CFBH 22305, MZUSP 141728, **Eldorado (52)**: MZUSP 152893, **Cachoeira de Emas (26)**: MZUSP 34443, **Gália (28)**: ESALQ 419, **Guaratuba: MZUSP 54288, 92447, Guarujá (47)**: MZUSP 60854, 97819-41, 134333-52, **Iguape (53)**: CFBH 35132, **Ilha Comprida (54)**: CFBH 19070, **Itanhaém (49)**: CFBH 32726, MZUSP 153649-50, **Itirapina (27)**: CFBH 2980, **Juqueí (43)**: MZUSP 84623, **Juquiá (51)**: MZUSP 2006, **Mogi das Cruzes (39)**: ESALQ 63, 114, **Peruíbe (50)**: CFBH 29713, MZUSP 37804, **Piassaguera: MZUSP 187, Poá (42)**: MZUSP 14174-75, 34279, **Porangaba (36)**: MZUSP 128297, 128334-40, **Porto Ferreira (25)**: MZUSP 92458, **Rio Claro (29)**: CFBH 2982,

5701-02, 30973, **Salesópolis (41):** MZUSP 137320, **Santos (46):** CFBH 23927, **Teodoro Sampaio (30):** CFBH 10089, **Ubatuba (38):** CFBH 847-8, ESALQ 561, 714, 880, 936, 966, MZUSP 71143, **Sergipe: Santa Luzia do Itanhy (1):** MZUSP 71047, **Paraguai: Canindeyú: Salto del Guairá (48):** MZUSP 37301.

3. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e apresentados em detalhe na seção referente ao manuscrito, as principais conclusões desse trabalho são:

- 1- Não existem variações na morfologia externa dos indivíduos de *Itapotihyla langsdorffii* que justifiquem a separação das populações em mais de uma espécie;
- 2- As variações morfológicas encontradas na espécie *Itapotihyla langsdorffii* estão relacionadas principalmente a variações no comprimento rostro-cloacal (CRC) que parecem obedecer a um gradiente geográfico, com indivíduos com maiores valores médios de CRC provenientes de populações localizadas em áreas mais úmidas da Mata Atlântica, sejam elas a Mata Atlântica porção Norte, localizada a partir da 23° S e a Mata Atlântica Sul, porção litorânea. Indivíduos provenientes de populações da Mata Atlântica Sul, porção interior, apresentam média de CRC menor. Embora a variação no CRC exista, ocorre com sobreposição, indicando variação clinal;
- 3- A variação dos marcadores nucleares utilizados não é capaz de revelar estruturação entre as populações de *Itapotihyla langsdorffii*;
- 4- A variação do marcador mitocondrial estudado não revela estruturação das populações estudadas de *Itapotihyla langsdorffii* bem suportada. Existem indícios de um início de separação de um componente Norte e outro Sul ao longo da distribuição da espécie na Mata Atlântica;
- 5- As abordagens morfológica e molecular são congruentes e não oferecem subsídios para a separação de *Itapotihyla langsdorffii* em mais de uma espécie, caracterizando-a de fato como uma espécie de ampla distribuição na Mata Atlântica e não como um complexo de espécies crípticas como poderia se supor.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber, A.N. 1977. Domínios morfoclimáticos e províncias fitogeográficas do Brasil. *Orientação*. Departamento de Geografia da Universidade de São Paulo. 3: 45–48.
- Amaro, R.C. et al. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic Rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 880–888.
- Aquino, L., et al. 2004. *Itapotihyla langsdorffii*. *IUCN Red List of Threatened Species*. Disponível em <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 26 de junho de 2015.
- Araújo, O.G.S., et al. 2009. The amphibians of São Paulo State, Brazil amphibians of São Paulo. *Biota Neotrop*. 9 (4): 197–209.
- Arzabe, C. and Loebmann, D. 2006. Amphibia, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii*: Distribution extension. *Check List* 2 (2): 33–34.
- Berven, K.A. and Grudzien, T.A. 1990. Dispersal in the wood frog (*Rana sylvatica*): implications for the genetic population structure. *Evolution* 44 (8): 2047–2056.
- Bickham, J.W., Wood, C.C. and Paton, J.C. 1995. Biogeographic implications of cytochrome b sequences and allozymes in sockeye (*Onchorhynchus nerka*). *Journal of Heredity*. 86: 140–144.
- Bossuyt, F. and Milinkovitch, M.C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *PNAS*. 97 (12): 6585–6590.
- Brunnes, T.O., Sequeira, F., Haddad, C.F.B. and Alexandrino, J. 2010. Gene and species tree of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 1120–1133.

- Bruschi, D.P., et al. 2014. Molecular and morphological evidence reveals a new species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Hylidae, Phyllomedusinae) from the Atlantic Forest of the highlands of Southern Brazil. *Plos One*. 9 (8): 1–13.
- Canedo, C. and Haddad, C.F.B. 2012. Phylogenetics relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65: 610–620.
- Carnaval, A.C., et al. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*. 323: 785–789.
- Carnaval, A.C. and Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J. Biogeogr.* 35: 1187–1201.
- Cazelli, H. and Moura, M.R. 2012. First record of *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril e Bibron, 1841) (Amphibia: Hylidae) from a Cerrado region in Minas Gerais state, Brazil. *CheckList* 8 (3): 510–512.
- Clapperton, C.M. 1973. *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Elsevier. Amsterdam. 713 pp.
- Clemente-Carvalho, R.B.G., et al. 2011. Molecular phylogenetics relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 79–89.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 30: 71–86.
- Duellman, W.E. 1974. A reassessment of the taxonomic status of some neotropical hylid frogs. *Occasional papers of the Museum of Natural History The University of Kansas*. 27: 1–27.

- Duellman, W.E. and Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. *The Johns Hopkins University Press*. Baltimore and London. 670 pp.
- Duméril, A.M.C. and Bibron, G. 1841. Erpétologie générale ou histoire naturelle complete des reptiles. *Librairie Encyclopédique de Roret*. Tome huitième. Paris. 824 pp.
- Faivovich, J., et al. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 240 pp.
- Feio, R.N., et al. 2006. Anfíbios das áreas prioritárias dos Rios Jequitinhonha e Mucuri. 94-119 in *Biodiversidade e Conservação nos Vales dos Rios Jequitinhonha e Mucuri*. Ministério do Meio Ambiente.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fetzner, J. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: a simplified method. *Bio Techniques*, 26: 1052–1054.
- Fitzpatrick, S.W., et al. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*. 18: 2877–2896.
- Fouquet, A., 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.
- Fouquet, A., et al. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *Plos One*. 10: 1–10.
- Fouquet, A., et al. 2012. From Amazonia to the Atlantic Forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65: 547–561.
- Frost, D. R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.2. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em:

<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em 15 de setembro de 2015.

- Gehara, M., et al. 2013. From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conserv. Genet.*
- Gehara, M., 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 (9).
- Geurgas, S.R., Trefaut, M.T. and Moritz, C. 2008. The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revisited: A molecular phylogenetic perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 92–101.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S. & Nixon, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774–786.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. and Bonato, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15: 3969–3982.
- Haddad, C.F.B., et al. 2006. Guia Sonoro dos Anfíbios Anuros da Mata Atlântica. NovoDisc Mídia Digital da Amazônia Ltda. 1 CD.
- Heyer, W.R. 1978. Systematics of the *fuscus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin*, 29: 1–85.
- Heyer, W.R., et al. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 31 (4): 237–332.
- Inger, R.F., Stuart, B.L. and Iskandar, D.T. 2009. Systematics of a widespread Southeast Asian frog, *Rana chalconata* (Amphibia: Anura: Ranidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155: 123–147.

- Jackson, J.F. 1978. Differentiation in the genus *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): Implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil. *Arq. Zool.* 30 (1): 1–79.
- Jowers, M.J., Downie, J.R. and Cohen, B.L. 2008. The golden tree frog of Trinidad, *Phyllodytes auratus* (Anura: Hylidae): systematic and conservation status. *Studies on Neotropical fauna and Environment* 43 (3): 181–188.
- Jungfer, K.H., et al. 2013. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: *Osteocephalus*): an Amazonian puzzle. *Zoologica Scripta* 30 pp.
- Kleinsorge, J.M.D., et al. 2009. Amphibia, Anura, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril e Bibron, 1841): Correction of older record and distribution extension. *Check List* 5 (4): 876–878.
- Lingnau, R., Zank, C., Colombo, P. and Vinciprova, G. 2006. Amphibia, Hylidae, *Itapotihyla langsdorffii*: distribution extension. *Check List* 2 (1): 38–39.
- Lutz, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. *University of Texas Press*. Austin and London. 264 pp.
- Maffei, F., 2010. Diversidade e uso do habitat de comunidades de anfíbios anuros em Lençóis Paulista, Estado de São Paulo. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, 74 pp.
- Maffei, F., Ubaid, F.K. and Jim, J. 2011. *Itapotihyla langsdorffii*, male combat. *Herpetological Bulletin* 116: 35–37.
- McLeod, D. 2010. Of least concern? Systematics of a cryptic species complex: *Limnonectes kuhlii* (Amphibia: Anura: Dicroglossidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56 (3): 991–1000.

- Miller, M.A., Pfeiffer, W. and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 November 2010. New Orleans, LA, pp 1-8.
- Napoli, M.F. 2000. Taxonomia, variação morfológica e distribuição geográfica das espécies do grupo de *Hyla circumdata* (Cope, 1870) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Tese de Doutorado*. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. UFRJ. Rio de Janeiro. 208 pp.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids. II. The polymerase chain reaction. *In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (Eds). Molecular Systematics. Sinauer & Associates, Sunderland, MA, 205–247.*
- Pavan, D. e Verdade, V.K. 1999. Sobre o papel do relevo na distribuição de *Osteocephalus langsdorffii* Duméril e Bibron 1841 (Anura: Hylidae). *in: V Congresso Latinoamericano de Herpetologia, Public. extra Mus. Nac. Montevideo. 50: 118.*
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. and Sites Jr., J.W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society. 85: 13–26.*
- Pimenta, B.V.S. and Canedo, C. 2007. Description of the tadpole of *Itapotihyla langsdorffii* (Anura: Hylidae). *Zootaxa 1387: 39–46.*
- Pombal-Jr, J.P e Haddad, C.F.B. 1992. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Rev. Brasil. Biol. 52 (2): 217–229.*
- Pyron, R.A. and Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species and a revised classification of extant frogs, salamanders and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution. 61: 543–583.*

- Rambaut, A and Drummond, A.J. 2009. MCMC Trace Analysis Tool version 1.5.0. Institute of Evolutionary Biology. University of Edimburgh and Department of Computer Science, University of Auckland. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>. Acessado em Julho de 2015.
- Ronquist, F. et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*. 61: 1–4.
- Sales Aquino, D.C.P., et al. 2012. Predation of *Aparasphenodon arapapa* (Hylidae) by *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae). *Herpetology Notes* 5: 437–438.
- Shine, R. 1979. Sexual selection and sexual dimorphism in the Amphibia. *Copeia*. 2: 297–306.
- Straneck, R., Olmedo, E.V. e Carrizo, G.R. 1993. *Catálogo de voces de anfibios argentinos*. Parte I L.O.L.A. Buenos Aires. 98–99.
- Stuart, B.N., Inger, R.F. and Voris, H.K. 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biol. Lett.* 2: 470–474.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Thomé, M.T.C., et al. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55 (3): 1018–1031.
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R. and Greene, H. 2007. *Itapotihyla langsdorffii*, diurnal basking. *Herpetological Review* 38 (2): 186–187.

- Verdade, V.K. and Rodrigues, M.T. 2007. Taxonomic review of *Allobates* (Anura: Aromobatidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Journal of Herpetology*. 41 (4): 566–580.
- Verdade, V.K. et al. 2011. Decline of Amphibians in Brazil. *in*: Barrio-Amorós, C.L. and Wilkinson, J.W. (Org). *Amphibian Biology. Status of Amphibians: Western Hemisphere: Uruguay and Brazil*. Baulkhlan Hills: Surrey Beatty and sons.
- Vrcibradic, D., Teixeira, R.L. and Borges-Júnior, V.N.T. 2009: Sexual dimorphism, reproduction and diet of the casque-headed treefrog *Itapotihyla langsdorffii* (Hylidae: Lophiohylini). *Journal of Natural History* 43 (35–36): 2245–2256