



**Universidade Federal do Pará
Campus Universitário de Altamira
Faculdade de Ciências Biológicas**

JOSÉ OTÁVIO WONGHON COSTA

**SUBESTIMAÇÃO DE ESPÉCIES DE DENDROPSOPHUS (ANURA, HYLIDAE) DO
BAIXO RIO TOCANTINS, LESTE DO PARÁ, BRASIL**

Altamira-PA

2023

JOSÉ OTÁVIO WONGHON COSTA

**SUBESTIMAÇÃO DE ESPÉCIES DE *DENDROPSOPHUS* (ANURA, HYLIDAE) DO
BAIXO RIO TOCANTINS, LESTE DO PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Emil José Hernández Ruz

Altamira-PA

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

W837s Wonghon Costa, José Otávio.
Subestimação de espécies de *Dendropsophus* (Anura, Hylidae)
do baixo Rio Tocantins, Leste do Pará, Brasil / José Otávio
Wonghon Costa. — 2023.
XI, 36 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Emil José Hernández Ruz
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, Faculdade de
Ciências Biológicas, Altamira, 2023.

1. Taxonomia . 2. Marcadores genéticos. 3.
Dendropsophus. 4. Delimitação de espécies. 5. Amazônia. I.
Título.

CDD 591.012

JOSÉ OTÁVIO WONGHON COSTA

**SUBESTIMAÇÃO DE ESPÉCIES DE DENDROPSOPHUS (ANURA, HYLIDAE) DO
BAIXO RIO TOCANTINS, LESTE DO PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas, pela banca examinadora, formado pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Emil José Hernández Ruz
Faculdade de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Dr. Elciomar Araújo de Oliveira
PC, PA

Prof. Dr. Rainério Meireles da Silva
Faculdade de Ciências Agrárias, UFPA

Suplente: Prof. Dr. Rodolfo Salm Faculdade de
Ciências Biológicas, UFPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho (símbolo da minha formação) a minha família, amigos e professores que auxiliaram e apoiaram essa jornada acadêmica.

Dedico!

AGRADECIMENTO

Agradeço especialmente a minha família por estar ao meu lado durante esse processo (Patrícia Wonghon, Otávio Puty, José Costa, Lucas Wonghon, Sarah Wonghon, Daniele Araújo, Hannah Laura e Cristiane Oliveira). Em especial a minha mãe, que é a mulher que mais admiro e a pessoa que conheço que conheço... Amo você e obrigado por tudo que fez e tem feito por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emil José Hernández Ruz, pela orientação, paciência e os momentos cômicos.

Toda a galera do Laboratório de Zoologia Adriano Giorgi, os momentos de descontração e aprendizado proporcionados pelo laboratório serão eternos.

Aos meus amigos/irmão Mayllon Moura e Guilherme Araújo que estavam comigo em praticamente todos os momentos desde o início da graduação e sempre me apoiaram em absolutamente tudo. Essa jornada não seria a mesma sem vocês! Saio com a certeza que nossa irmandade será vitalícia.

Ao “menino Robert” que também se tornou um amigo muito especial.

A minha turma 2019 (que turma sensacional!) e aos meus amigos de outras turmas que também foram muito importantes.

A minha namorada Cristiane Oliveira que está comigo desde o ensino médio, obrigado por todo carinho apoio e amor que você tem me proporcionado em todos esses anos... espero que você consiga me aturar por bastante tempo rrsrs. TE AMO!

A todos que contribuíram o mínimo que seja, OBRIGADO!

*“Os humanos não são a única espécie...
eles apenas agem como se fossem”.*

- One Piece.

RESUMO

O conhecimento da biodiversidade é fundamental para melhor tomada de decisões e ao mesmo tempo se esforça para promover a conservação das espécies. Assim, estudos que visam compreender a diversidade das espécies são essenciais para a biologia da conservação. *Dendropsophus* é o gênero mais diverso dentro da família Hylidae, com diversos estudos apontando incertezas taxonômicas envolvendo o gênero. Com base num fragmento da subunidade I da citocromo oxidase mitocondrial (COI) e análises de delimitação de espécies (GMYC, ABGD), revelamos uma diversidade subestimada de espécies na região do baixo rio Tocantins, no estado do Pará, Brasil. As espécies candidatas ainda podem ser diferenciadas morfológicamente dos demais congêneres. Será novas amostragens e o uso de outros marcadores moleculares como o 16S rRNA, além de dados de vocalização, para validar o status de novas espécies.

Palavras-chave: Amazônia; biodiversidade; taxonomia; GMYC; bGMYC; ABGD.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 -	Mapa contendo a localização de coleta de <i>Dendropsophus</i> sp1 e as localidades das outras espécies de <i>Dendropsophus</i> usados no estudo.....	13
Figura 2 -	Árvore genética de máxima verossimilhança utilizando o marcador COI (596 pb).....	19
Figura 3 -	Árvore máxima de credibilidade mostrando diferentes hipóteses encontradas usando o método Single-locus Species-Discovery.....	22
Figura 4 -	Coloração de <i>Dendropsophus</i> sp1 vivo.....	24
Figura 5 -	Curva de acumulação de espécies descritas de <i>Dendropsophus</i> segundo FROST (2020).....	26
Tabela 1 -	Lista de sequências de <i>Dendropsophus</i> e grupos externos utilizados neste estudo.....	15-16
Tabela 2 -	Distância genética (distância p – COI mtDNA) em % entre as espécies de <i>Dendropsophus</i> analisadas neste estudo.....	20
Tabela 3	Medição de todos os indivíduos <i>Dendropsophus</i> sp1 presente no estudo	25

LISTA DE ABREVIATURAS

D.	<i>Dendropsophus</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação Sobre Biodiversidade
COI	Subunidade I do Citocromo Oxidase
rRNA	RNA ribossômico
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
ML	Máxima Verossimilhança
SLSD	Método de Descoberta de Espécies de Locus Único
GMYC	Modelo Coalescente Geral Misto de Yule
bGMYC	Implementação Bayesiana do Modelo Coalescente Geral Misto de Yule
ABGD	Descoberta Automática de Lacunas de Código de Barras
UCS	Espécie Candidata Não Confirmada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Amostragem	12
3.2 Fixação do material	14
3.3 Análises moleculares	14
3.4 Terminologia e dados morfológicos	17
4. RESULTADOS	19
4.1 Análise filogenética e distância genética	19
4.2 Delimitação de espécies.....	21
4.3 Comparação morfológica	23
5. DISCUSSÃO	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
7. REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE 1	35

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade de uma região é crucial para a tomada de decisões relativas à conservação das espécies (KASSAS, 2002; OLIVEIRA et al. 2017). Nesse sentido, a taxonomia alfa desempenha um papel fundamental na descrição e classificação das espécies, reduzindo o déficit Linneano (BINI et al. 2006; HORTAL et al. 2015). Contudo, um dos maiores desafios colocados na correta identificação de novas espécies é a existência de espécies crípticas (PFENNINGER E SCHWENK 2007; DE SÁ et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2020).

A morfologia conservada, também conhecida como estase morfológica, é comumente encontrada em diversas espécies de rãs, o que pode levar a erros taxonômicos (PFENNINGER E SCHWENK, 2007). A morfologia conservada é um mecanismo evolutivo que mantém a morfologia consistente entre espécies que vivem em ambientes semelhantes (SCHÖNROGGE et al. 2002). Nas rãs, a morfologia conservada resulta em vários problemas para os taxonomistas, especialmente nos inventários de rãs, isso leva a listas de espécies que incluem táxons com nomenclaturas incertas, como *Dendropsophus* sp., *Dendropsophus* cf. e *Dendropsophus* aff. (BERNARDO et al. 2012; VAZ-SILVA et al. 2015; DA SILVA et al. 2020).

Estudos taxonômicos de anfíbios neotropicais têm sido auxiliados pelo uso de marcadores moleculares, que têm se tornado cada vez mais populares na descoberta de espécies crípticas (GRENAT et al. 2002; ACEVEDO et al. 2016; BANG et al. 2020; GIARETTA et al. 2020) e nas descrições de novas espécies (VENCES et al. 2005; FOUQUET et al. 2007; VIEITES et al. 2009; GEHARA et al. 2014; LYRA et al. 2017; OLIVEIRA et al. 2020;).

Valores de limiar interespecíficos, como 3% para 16S rRNA e 6% para mtDNA da subunidade I (COI) do citocromo oxidase, são considerados métricas taxonômicas úteis (LYRA et al. 2017). No entanto, estes valores não podem ser considerados isoladamente, uma vez que outros tipos de evidências (por exemplo, vocalização, distribuição geográfica, ciclo de vida e morfologia) também devem ser avaliados (PADIAL e De La Riva, 2009; PADIAL et al. 2010) ao descrever novas espécies, que podem apresentar marcadores moleculares abaixo dos valores limiares mencionados acima (DE ANDRADE et al. 2016; MÂNGIA et al. 2018).

O gênero *Dendropsophus* Fitzinger 1843, é o mais diverso da família Hylidae Laurenti, 1758, com 108 espécies conhecidas (FROST 2023). Nos últimos treze anos, 19 espécies foram descritas, com taxa de mais de uma espécie por ano. O gênero é dividido em nove grupos de espécies: *Dendropsophus columbianus*, *D. garagoensis*, *D. labialis*, *D. leucophyllatus*, *D.*

marmoratus, *D. microcephalus*, *D. minimus*, *D. minutus*, e *D. parviceps* (FAIVOVICH et al. 2005). O grupo *Dendropsophus microcephalus* é o maior, com 38 espécies descritas (DIAS, 2019).

O estado do Pará abriga 17 espécies de *Dendropsophus*, o que representa 15,7% de todas as espécies conhecidas do gênero e inclui oito espécies do grupo *D. microcephalus*: *D. anataliasi* (BOKERMANN, 1972), *D. cachimbo* (NAPOLI e CARAMASCHI, 1999), *D. cruzi* (POMBAL e BASTOS, 1998), *D. leali* (BOKERMANN, 1964), *D. microcephalus* (COPE, 1886), *D. nanus* (BOULENGER, 1889), *D. walfordi* (BOKERMANN, 1962) e *D. ozzyi* (Orrico, Peloso, Sturaro, Da Silva, Neckel - Oliveira, Gordo, Faivovich, e Haddad, 2014).

Com base em dados moleculares (COI mtDNA) e morfológicos, foi identificado uma espécie candidata não confirmada que difere das demais espécies do gênero *Dendropsophus*, habitando a margem esquerda do baixo rio Tocantins. Atualmente esta linhagem só foi registrada na cidade de Bagre, Pará.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Apresentar possível subestimação de uma espécie do gênero *Dendropsophus* (Anura, Hylidae) do baixo rio Tocantins.

2.2 Objetivos Específicos

1. Mostrar as estimativas de delimitação de espécies do gênero *Dendropsophus* para a região do baixo rio Tocantins;
2. Realizar comparações de características morfológicas entre espécies de *Dendropsophus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Em fevereiro de 2019 na Fazenda Uberlândia (2°59'38,10"S, 50°4'48,57"W), localizada ao sul da cidade de Bagre, baixo rio Tocantins, foram coletados 7 indivíduos identificados como *Dendropsophus* sp1. Os espécimes foram coletados por meio de busca ativa e auditiva (CRUMP, 1994) e estavam localizados sobre palmeiras (*Geonoma* sp.) (Figura 4) ao longo de um igarapé e dentro de uma densa floresta ombrófila em terra firme (IBGE, 2012).

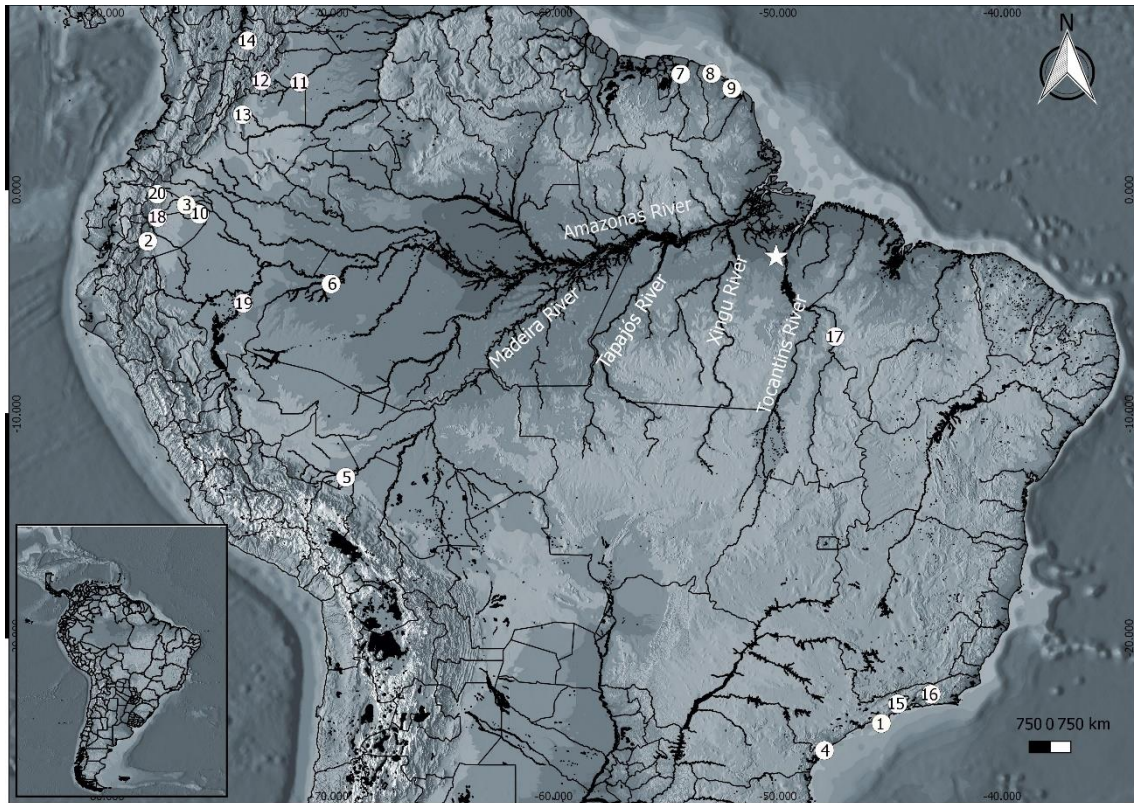


Figura 1. Mapa de *Dendropsophus* na Amazônia Oriental Brasileira. A estrela representa a localização que *Dendropsophus* sp1 foi encontrado. Os números correspondem às localidades e espécies de *Dendropsophus* utilizadas neste estudo: 1) *D. berthaltzae* (São Paulo, Brasil); 2) *D. bifurcus* (Equador); 3) *D. brevifrons* (Equador); 4) *D. decipiens* (São Paulo, Brasil); 5) *D. koechlini* e *D. kamagarini* (Peru); 6) *D. leali* (Colômbia); 7) *D. leucophyllatus* (Apatou, Guiana Francesa); 8) *D. leucophyllatus* (Tartaruga, Guiana Francesa); 9) *D. leucophyllatus* (Vaca, Guiana Francesa); 10) *D. rhodopeplus* e *D. marmoratus* (Equador); 11) *D. mathiassoni* (Orocue, Colômbia); 12) *D. mathiassoni* (Sabanalarga, Colômbia); 13) *D. mathiassoni* (San Juan de Arama, Colômbia); 14) *D. microcephalus* (Colômbia); 15) *D. microps* (São Paulo, Brasil); 16) *D. minutus* (Rio de Janeiro, Brasil); 17) *D. nanus* (Maranhão, Brasil); 18) *D. brevifrons* e *D. parviceps* (Equador); 19) *D. triangulum* e *D. reticulatus* (Peru); 20) *D. sarayacuensis* (Equador).

3.2 Fixação do material

Os sapos coletados foram eutanasiados com aplicação na região torácica ou no coração de solução líquida de cloridrato de lidocaína a 2%, foram então fixados em formol a 10% e transferidos para coleções permanentes em etanol a 70%. Os indivíduos foram depositados na Coleção Adriano Giorgi do Laboratório de Zoologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA) – Campus Altamira, Brasil. Antes da fixação, foram coletados amostras de tecidos (músculo e fígado) e armazenados em etanol absoluto.

As coletas de vouchers estavam estritamente em conformidade com as condições éticas ditadas pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO), uma autoridade ambiental brasileira. Espécimes voucher foram coletados com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio nº 32.401).

3.3 Análises moleculares

Para as análises moleculares, o DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo CTAB a 2% (DOYLE E DOYLE, 1987). Seguidamente foi amplificado um fragmento de mtDNA COI por PCR usando os iniciadores dgLCO 1490 forward e dgHCO 2198 reverso (MEYER, 2003). Detalhes sobre as condições de PCR e reações de sequenciamento estão disponíveis no Apêndice 1. As sequências foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al. 1994) no BioEdit 7.2 (HALL, 1999).

Posteriormente, as sequências foram submetidas ao BLAST (ALTSCHUL et al. 1990) para verificação e comparação com sequências disponíveis no GenBank®; eles foram então GENverificados manualmente quanto a inserções / exclusões e códons de parada usando uma tradução in silico no Geneious 8.1 (KEARSE et al. 2012). O banco de dados alinhado foi editado manualmente e reduzido para 596 pb (pares de base). Em seguida, os conjuntos de dados de sequência foram submetidos ao banco de dados GenBank ® (ver Tabela 1 para números de acesso). As sequências previamente publicadas foram recuperadas do banco de dados GenBank ® e adicionadas ao conjunto de dados (Tabela 1), considerando apenas aquelas com vouchers ou origem geográfica informada.

Com base neste critério, foram adicionadas sequências parciais de COI de 19 espécies congenéricas de rãs: *Dendropsophus brevifrons* (DUELLMAN e CRUMP, 1974), *D. berthaltutzae* (BOKERMANN, 1962), *D. bifurcus* (ANDERSSON, 1945), *D. decipiens* (LUTZ, 1925), *D. koechlini* (DUELLMAN TRUEB, 1989), *D. kamagarini* (RIVADENEIRA, 2018) , *D. leali* (BOKERMANN , 1964), *D. leucophyllatus* (BEEIREIS , 1783), *D. microps* (PETERS,

1872), *D. minutus* (PETERS, 1872), *D. marmoratus* (LAURENTI, 1768), *D. mathiassoni* (COCHRAN e GOIN, 1970), *D. microcephalus* (COPE, 1886), *D. nanus* (BOULENGER, 1889), *D. parviceps* (BOULENGER, 1889), *D. rhodopeplus* (GÜNTHER, 1858), *D. reticulatus* (JIMÉNEZ DE LA ESPADA, 1870), *D. sarayacuensis* (SHREVE, 1935) e *D. triangulum* (GÜNTHER, 1869).

Tabela 1. Lista de sequências de *Dendropsophus* e grupos externos utilizados neste estudo.

GenBank	Espécies	Localidade	Fonte
KP149185	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149254	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149114	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149109	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149086	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149267	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149230	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149108	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149262	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149189	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149113	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149102	<i>D. mathiassoni</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KU494418	<i>D. nanus</i>	Brasil: Maranhão	Lyra et al. 2017
KU494417	<i>D. nanus</i>	Brasil: Maranhão	Lyra et al. 2017
KY406603	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406602	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406598	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406597	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406595	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406591	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406583	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
KY406600	<i>D. leucophyllatus</i>	Guiana Francesa	Caminer et al. 2017
MT560829	<i>Dendropsophus</i> sp1.	Brasil: Pará	Presente estudo
MT560830	<i>Dendropsophus</i> sp1.	Brasil: Pará	Presente estudo
MT560831	<i>Dendropsophus</i> sp1.	Brasil: Pará	Presente estudo
MT560832	<i>Dendropsophus</i> sp1.	Brasil: Pará	Presente estudo
MT560833	<i>Dendropsophus</i> sp1.	Brasil: Pará	Presente estudo
KU494416	<i>D. minutus</i>	Brasil: São Paulo	Lyra et al. 2017
KU494415	<i>D. minutus</i>	Brasil: Rio de Janeiro	Lyra et al. 2017
KU494414	<i>D. minutus</i>	Brasil: São Paulo	Lyra et al. 2017
KP149218	<i>D. microcephalus</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149199	<i>D. microcephalus</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KP149173	<i>D. microcephalus</i>	Colômbia	Guarnizo et al. 2015
KY406684	<i>D. brevifrons</i>	Equador	Camino et al. 2017

KY406683	<i>D. brevifrons</i>	Equador	Camino et al. 2017
KY406682	<i>D. brevifron</i>	Equador	Caminer et al. 2017
KY406672	<i>D. bifurcado</i>	Equador	Caminer et al. 2017
KY406671	<i>D. bifurcado</i>	Equador	Caminer et al. 2017
KU494410	<i>D. decipiens</i>	Brasil: São Paulo	Lyra et al. 2017
MG041886	<i>D. Kamagarini</i>	Peru	Rivadeneira et al. 2018
MG041889	<i>D. Koechlini</i>	Peru	Rivadeneira et al. 2018
MG030722	<i>D. leali</i>	Colômbia	Cruz- Piedrahita et al. 2018
MG041891	<i>D.marmoratus</i> _	Equador	Rivadeneira et al. 2018
KU494411	<i>D. microps</i>	Brasil: São Paulo	Lyra et al. 2017
MG041882	<i>D.parviceps</i> _	Equador	Rivadeneira et al. 2018
KY406643	<i>D. reticulatus</i>	Peru	Caminer et al. 2017
KY406646	<i>D. reticulatus</i>	Peru	Caminer et al. 2017
KY406690	<i>D. rhodopeplus</i>	Equador	Caminer et al. 2017
KY406670	<i>D. sarayacuensis</i>	Equador	Caminer et al. 2017
KY406665	<i>D. triângulolum</i>	Peru	Caminer et al. 2017
KU494408	<i>D. berthaltutzae</i>	Brasil: São Paulo	Lyra et al. 2017
KU494497	<i>Boana wavrini</i>	Brasil: Mato Grosso	Lyra et al. 2017

Uma vez concluído o banco de dados COI, primeiro inferimos filogenias para entender a relação ancestral entre as espécies. As análises filogenéticas foram realizadas usando a abordagem de máxima verossimilhança no RAxML 8.2.X (STAMATAKIS, 2014) devido ao seu algoritmo de busca de árvores de máxima verossimilhança eficiente e rápido que produz árvores com pontuações de verossimilhança confiáveis. Usamos um modelo GTR + G de evolução de sequência, conforme recomendado pelo autor do programa no manual da versão 8.2.X, para pesquisas únicas em árvores completas de ML e 1.000 réplicas do algoritmo de bootstrap rápido do RAxML para levar em conta a incerteza na estimativa da topologia (STAMATAKIS et al. 2008). Uma árvore de bipartição foi obtida como arquivo de saída sem descartar nenhuma das 1.000 réplicas. A topologia em árvore foi visualizada no FigTree 1.4.2 (RAMBAUT, 2014).

Como segunda abordagem para delimitação de espécies, implementamos uma inferência filogenética Bayesiana utilizando BEAST 1.8.0 (DRUMMOND et al. 2012), sob parâmetros que incluíram o modelo HKY+G de evolução molecular inferido em jModelTest (POSADA, 2008), com um "modelo de relógio estrito" e especiação do "processo de nascimento-morte" como modelo de árvore. Os parâmetros restantes foram usados nas configurações padrão. Executamos duas execuções independentes, cada uma com 10 milhões de topologias.

Depois de verificar a convergência das duas execuções no TRACER 1.6 (RAMBAUT et al. 2014), nós as combinamos e subamostramos e gravamos as topologias para produzir um conjunto de dados final de 10.000 topologias usando LOGCOMBINER (DRUMMOND E RAMBAUT, 2007). Em seguida, usamos essas topologias para construir uma árvore de credibilidade máxima no TREEANNOTATOR (DRUMMOND E RAMBAUT, 2007). Usamos sequências de *Boana wavrini* como grupo externo para enraizar a árvore, conforme recomendado por Peloso et al. (2016).

Em seguida, implementamos o método de descoberta de espécies de locus único (SLSD) para subdividir nosso conjunto de dados em supostos clusters semelhantes a espécies, seguindo a abordagem intuitiva desenvolvida por Machado et al. (2008). Utilizamos a árvore construída no BEAST para delimitação de espécies por SLSD, usando três métodos: o modelo coalescente geral misto de Yule (GMYC) (FUJISAWA e BARRACLOUGH 2013) , a implementação bayesiana deste modelo (bGMYC) (REID e CARSTENS 2012) e a descoberta automática de lacunas de código de barras (ABGD) (PUILLANDRE et al. 2012), calculando distâncias “p” entre todos os táxons irmãos e espécies delimitadas usando as funções locMin e tclust , que consiste numa otimização de limite de distância SPIDER e abordagem de agrupamento (BROWN et al. 2012).

As análises foram realizadas usando ape_5.0 (BROWN et al. 2012), phangorn 2.3.1 (SCHLIEP e PHANGORN, 2011), spider 1.5.0 (BROWN et al. 2012) e splits_1.0-19 (FUJISAWA e BARRACLOUGH, 2013) pacotes. Todas as análises foram realizadas no R 3.4.1 (TEAM, 2011). Os resultados foram visualizados em ggtree (YU et al. 2017). Finalmente, a distância média não corrigida entre pares (distâncias-p) entre as espécies de *Dendropsophus* foi calculada usando MEGA 6.0 (TAMURA et al. 2013).

3.4 Terminologia e dados morfológicos

Usamos o termo espécie candidata não confirmada (UCS) para um espécime que pode representar uma espécie distinta, enquanto se aguarda uma revisão morfológica completa (VIEITES et al.2009).

As medidas morfométricas (todas em mm, Tabela 3) foram feitas com paquímetro digital com precisão de 0,01 mm junto com microscópio de dissecação, conforme Duellman (1970) e Heyer et al. (1990). Foram utilizadas as seguintes abreviaturas: CFC (comprimento focinho a cloaca), CT (comprimento da tíbia), LC (largura da cabeça), CCA (comprimento da

cabeça), DIO (distância interorbital), DIN (distância internasal), DON (distância olho a narina), DO (diâmetro do olho), DT (diâmetro do tímpano), DTD (diâmetro do terceiro dedo do pé), DQD (diâmetro do quarto dedo do pé), CC (comprimento da coxa) e CP (comprimento do pé). O sexo foi determinado pela observação de características sexuais como saco vocal e almofada nupcial.

4. RESULTADOS

4.1 Análise filogenética e distância genética

A análise filogenética RaxML identificou espécimes de *Dendropsophus* sp1, da margem esquerda do baixo rio Tocantins como um clado monofilético único e bem suportado, sugerindo uma linhagem distinta de outras espécies incluídas em *Dendropsophus* (bootstrap = 99%, Fig. 1). Além disso, o *Dendropsophus mathiassoni* colombiano foi caracterizado como espécie irmã (bootstrap = 99%). A distância genética entre *Dendropsophus* sp1 e *D. mathiassoni* foi de 8,2% (Tabela 2). A distância genética entre os espécimes de *Dendropsophus* sp1 variou entre 0 e 0,3%.

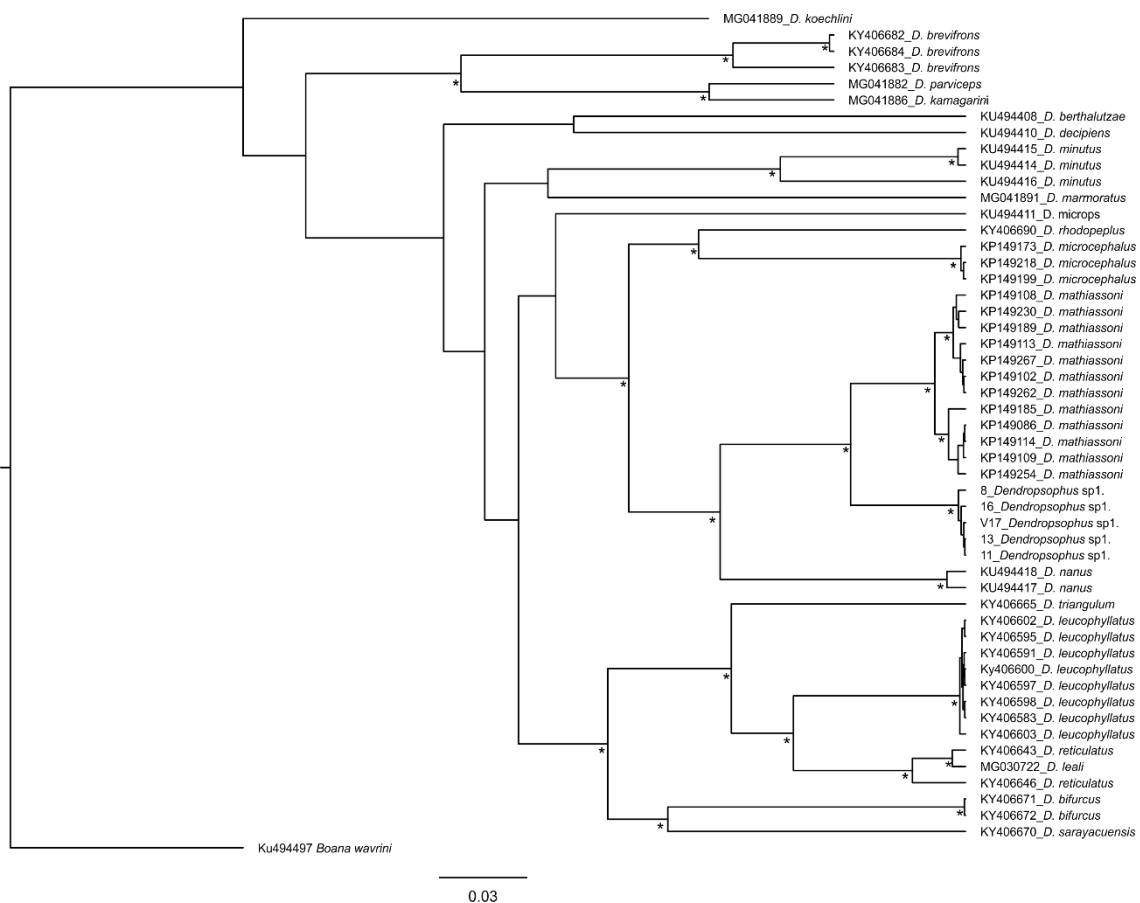


Figura 2. Árvore genética reconstruída através da análise de máxima verossimilhança das espécies de *Dendropsophus* do leste da Amazônia e outras espécies de *Dendropsophus* usando um fragmento de COI (596 pb) e modelo evolutivo GTR + G. O asterisco abaixo dos nós corresponde ao valor de bootstrap > 90%. Valores de bootstrap < 89% foram omitidos da árvore. A barra abaixo representa o número de substituições por site.

Tabela 2. Distância genética (distância p – COI mtDNA) em % entre as espécies *de Dendropsophus* analisadas neste estudo: 1) *Dendropsophus* sp1. , 2) *D. mathiassoni* , 3) *D. nanus* , 4) *D. rhodopeplus* , 5) *D. leucophyllatus* , 6) *D. reticulatus* , 7) *D. Triangulum* , 8) *D. microcephalus* , 9) *D. minutus* , 10) *D. leali* , 11) *D. marmoratus* , 12) *D. microps* , 13) *D. sarayacuensis* , 14) *D. bifurcus* , 15) *D. berthaltutzae* , 16) *D. kamagarini* , 17) *D. decipiens* , 18) *D parviceps* , 19) *D. koechlini* , e 20) *D. brevifrons* .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2	8,2																			
3	14,1	13,8																		
4	15,6	16,4	17,4																	
5	17,0	19,2	17,6	19,7																
6	17,1	18,5	17,3	18,4	11,6															
7	17,1	17,8	16,8	18,2	14,0	13,1														
8	17,3	16,7	16,8	15,5	19,4	17,9	20,5													
9	17,5	16,6	19,1	19,6	18,3	15,9	18,7	18,3												
10	17,5	18,7	17,6	18,7	11,6	2,8	13,1	18,5	16,0											
11	17,8	17,1	18,5	19,7	19,2	20,1	17,8	19,7	19,1	20,5										
12	18,6	19,6	17,0	17,8	17,7	17,8	18,0	17,4	19,4	18,4	18,7									
13	18,7	19,8	19,0	20,7	18,2	17,6	17,5	19,4	19,5	17,2	19,5	18,0								
14	19,1	18,1	17,9	19,4	16,8	16,8	16,8	18,1	19,7	17,0	19,2	16,5	17,3							
15	19,2	20,6	21,3	19,7	21,5	19,4	20,9	19,0	20,1	19,4	20,9	19,7	19,4	18,9						
16	19,3	18,9	18,8	21,7	21,0	20,0	20,4	19,4	20,1	20,0	19,5	19,2	20,9	19,9	19,4					
17	19,8	19,9	19,8	18,4	20,9	21,4	18,5	19,2	20,4	21,5	21,4	18,5	20,2	20,2	18,4	19,2				
18	20,5	18,8	20,5	20,2	22,0	21,5	21,2	19,2	20,7	21,2	20,7	19,5	20,5	19,9	21,5	9,4	19,7			
19	20,6	20,7	21,0	20,5	22,5	21,5	21,0	18,2	21,0	21,7	21,5	19,0	19,9	20,0	24,2	20,2	21,7	20,5		
20	21,3	19,2	19,7	21,3	21,0	21,6	21,8	18,7	20,5	20,9	19,0	19,9	20,7	19,9	20,1	18,6	20,6	19,1	20,1	

4.2 Delimitação de espécies

As estimativas pontuais para o SLSD das espécies de *Dendropsophus* variaram entre um mínimo de 20 espécies putativas (bGMYC) e um máximo de 24 espécies (LocMin), com um número intermediário de 22 para GMYC (Fig. 2). Das 20 espécies nominais de *Dendropsophus*, 70% foram apoiadas como válidas por congruência por todos os três métodos, 10% foram apoiadas por dois métodos e 5% por um método. Apenas três espécies nominais (*D. leali*, *D. reticulatus* e *D. minutus*) não foram agrupadas/delimitadas por nenhum dos três métodos, seja porque mais de uma espécie foi encontrada pelos algoritmos sob o mesmo nome ou porque uma espécie teve mais de um nome.

A concordância de todos os três métodos confirma claramente o *Dendropsophus* sp1, como uma linhagem biológica seguindo uma trajetória evolutiva independente. Mais uma vez, *Dendropsophus* sp1 foi estabelecido como grupo irmão de *D. mathiassoni*, sendo ambas as espécies mais derivadas das espécies congênicas analisadas no presente estudo.

A análise locMin teve um limite de divergência otimizado de 0,01380198 (distância p) para o conjunto de dados. A divergência intraespecífica das linhagens COI delimitadas por este método variou entre 0% (*D. bifurcus* e *D. leucophyllatus*) e 8,2% (*D. minutus*).

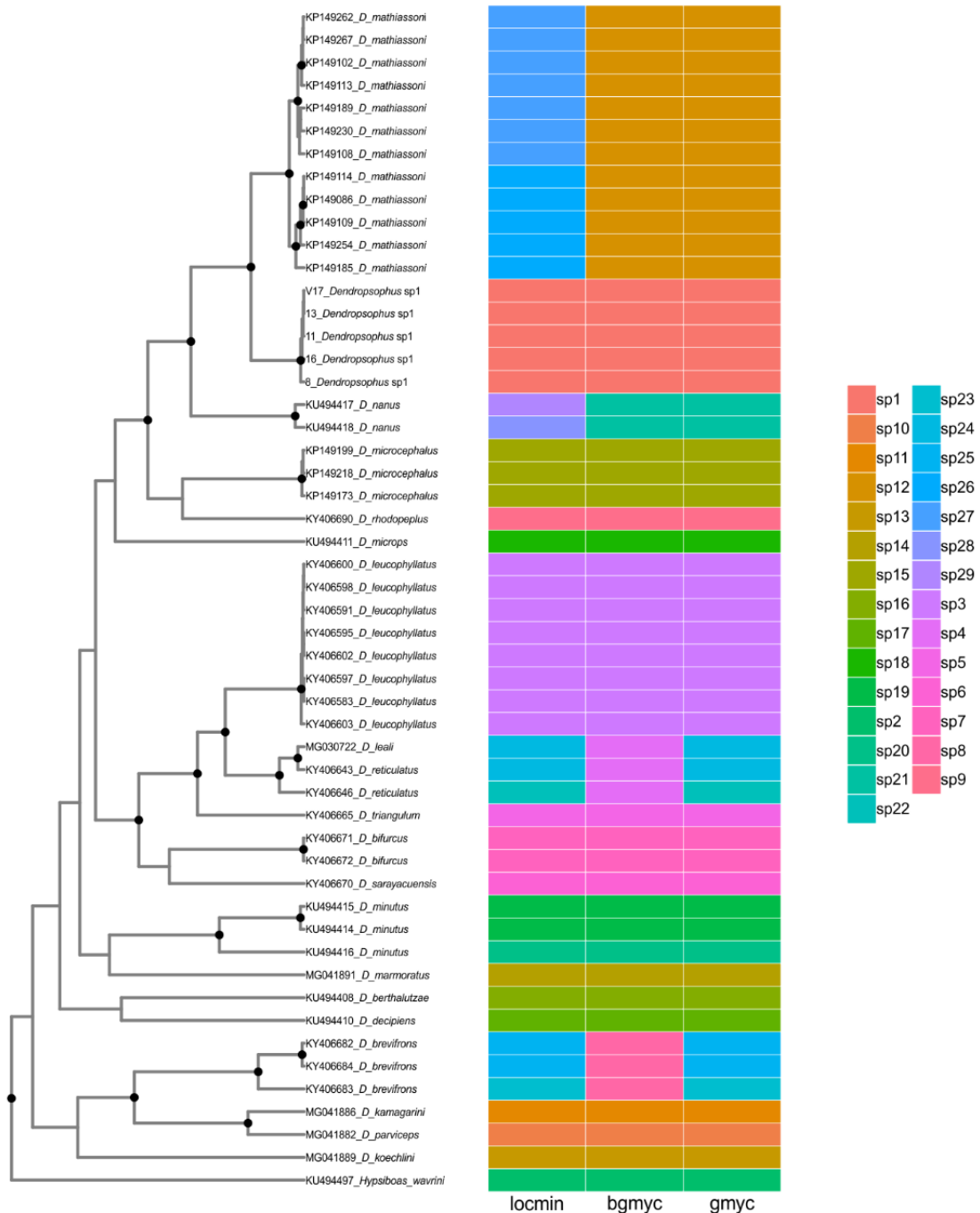


Figura 3. Árvore máxima de credibilidade do clado de 10.000 árvores posteriores geradas usando BEAST, mostrando diferentes hipóteses encontradas empregando o método Single-locus Species-Discovery, com sequências COI de *Dendropsophus* spp. Os nós escuros acima dos ramos representam valores de probabilidade posterior $>0,95$. As barras verticais correspondem a cada linhagem como espécie potencial, considerando as delimitações pontuais das espécies pelos métodos LocMin (A), bGMyc (B) e gMYC (C).

4.3 Comparação morfológica

Foram feitas comparações entre *Dendropsophus* sp1 (Tabela 3) e os seguintes grupos de espécies presentes no estado do Pará: *D. microcephalus*, *D. leucophyllatus*, *D. parviceps*, *D. marmoratus* e *D. minutus*. O estado de caráter das espécies comparadas é fornecido entre colchetes.

Dendropsophus sp1 se distingue de *D. mathiassoni* por possuir um tímpano pequeno e indistinto [distinto] e região loreal levemente côncava [plana] (COCHRAN e GOIN, 1970); distingue-se de *D. microcephalus* por possuir uma barra interorbital [ausente] e uma faixa que vai de trás do olho até o meio do corpo, delimitada acima por uma faixa escura [faixa lateral estreita, cobrindo apenas a área acima do tímpano, delimitada acima por uma faixa branca] (DUELLMAN e FOUQUETTE, 1968); de *D. rhodopeplus* por possuir focinho truncado na vista dorsal e lateral [arredondado], membrana axilar presente [ausente] e almofada nupcial presente na base do dedo I [ausente] (DUELLMAN, 1978); de *D. leali* devido à ausência de marca em forma de X em sua região escapular [presente] (RODRÍGUEZ e DUELLMAN, 1994); de *D. cachimbo* (NAPOLI e CARAMASCHI, 1999) devido ao fato de seu focinho ser truncado na vista dorsal [focinho pontiagudo na vista dorsal] e ausência de listras dorsais longitudinais [listras dorsais longitudinais presentes] (NAPOLI e CARAMASCHI, 1999); de *D. minusculus* (RIVERO, 1971) por apresentar íris avermelhada [amarelo dourado com pequenas manchas pretas] e coloração dorsal alaranjada [branco prateado com pequenas manchas pretas] (OUBOTER e JAIRAM, 2012); de *D. nanus* pela presença de um tímpano pequeno e indistinto [tímpano distinto]; de *D. brevifrons* porque possui membrana basal entre os dedos I e II [ausente], com fórmula de membrana I 0 - 1 - II 0 - 1 - III 0 + - 1 + IV 1 + - 0 + V [I 2 -2 II 1 1/3 -2 III 1 1/3 - 2 IV 2 - 1¼ V], e machos com faixa lateral [ausente] (DUELLMAN e CRUMP, 1974); de *D. counani* (Fouquet, Orrico, Ernst, Blanc, Martinez, Vacher, Rodrigues, Ouboter, Jairam e Ron, 2015), já que sua fórmula de membrana digital é I 1 + - 1 + II 0 + - 1 + III 1 + - 1 - IV [I 2 - - 2 - II 2 1/2 - 2 - III 2 + - 2 - IV], a fórmula da cinta do dedo do pé é I 0 - 1 - II 0 - 1 - III 0 + - 1 + IV 1 + - 0 + V [I 2 1/2 - 2 II 1 + - 2 - III 1 + - 2 + IV 2 + - 1 + V], e por ter o dorso laranja em vida, e rosa em etanol [dorso marrom em vida, cinza em etanol] (FOUQUET et al. 2015); de *D. haraldschultzi* (BOKERMANN, 1962) devido à ausência de glândulas conspícuas na parte posterior da cabeça [glândulas conspícuas na parte posterior da cabeça] e ausência de listras dorsais longitudinais [listras dorsais longitudinais presentes] (MISSASSI et al. 2017); de *D. leucophyllatus* devido à ausência de marca em forma de U na região da cabeça [presente] (DUELLMAN, 1974); de *D. marmoratus* por apresentar

abdômen claro e sem manchas [abdômen com manchas pretas sobre fundo branco]; de *D. melanargyreus* (COPE, 1887) por apresentar dorso laranja à noite [marrom escuro à noite], membrana basal clara [preta] e porção dorsal das coxas laranja sem listras [listras pretas] [55]; de *D. rossalleni* (GOIN, 1959) por ter a fórmula de membrana digital I 1 + - 1 + II 0 + - 1 + III 1 + - 1 - IV [II (2 - -2)-(2-3) III (2-2 +)-(1.5-2) IV] e fórmula de cinta de dedo do pé I 0 - 1 - II 0 - 1 - III 0 + - 1 + IV 1 + - 0 + V [I 1 + -2 IV 1 + -2 III (1 -1,5)-2 IV (2-2 +)-(1-1,5) V] (DE LA RIVA e DUELLMAN, 1997); de *D. sarayacuaensis* por não apresentar coloração dorsal alaranjada [área dorsal com manchas marrons escuras e claras] e porque os machos possuem um CFC menor, variando de 17,5 – 19,9 mm [24 – 29 mm] (RODRIGUEZ e DUELLMAN, 1994); e de *D. triangulum* já que seu CFC é 17,5 – 19,9 mm [SVL 28,5 – 30 mm] e a rede basal é de cor clara [rede basal vermelha] (RODRIGUEZ e DUELLMAN, 1994).



Figura 4. Coloração de *Dendropsophus* sp1 vivo.

Tabela 3. Medição de todos os indivíduos *Dendropsophus* sp1 deste estudo. CFC (Comprimento focinho a cloaca); CT (Comprimento da Tíbia); LC (largura da cabeça); CCA (Comprimento da Cabeça); DIO (Distância Interorbital); DIN (Distância Internasal); DON (Distância do olho a narina); DO (Diâmetro do olho); DT (Diâmetro do Tímpano); DTD (diâmetro do terceiro dedo do pé); DQD (diâmetro do quarto dedo do pé); CC (comprimento da coxa); CP (comprimento do pé).

Espécies	Coleção	CFC	CT	LC	CCA	DIO	DIN	DON	DO	DT	DTD	DQD	CC	CP
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 08	18,8	10,2	6,5	5,8	2,5	1,2	1,4	2,1	0,81	4,4	5,8	9,1	7,7
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 011	19,9	10,9	6,6	5,1	2,7	1,1	1,6	2,1	0,89	4,9	6,4	9,9	7,9
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 013	18,9	10,6	6,5	5,8	2,7	1,2	1,6	2,2	0,91	4,7	6	9,4	7,9
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 015	18,9	10,1	6,4	5,6	2,5	1,2	1,7	2,4	0,91	4	4,2	9,1	7,9
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 016	17,5	9,9	6,1	5	2,7	1,2	1,7	2,3	0,87	4,7	6,4	8,3	8
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 017	17,7	9,7	6,1	6	2,7	1,1	1,5	2	0,91	4,2	6,1	8,8	7,7
<i>Dendropsophus</i> sp1	VHB 018	19,3	10,2	6,6	6,1	2,7	1,2	1,7	2,5	0,87	4,8	5,5	9,4	7,7

5. DISCUSSÃO

A subestimação da diversidade de espécies de anuros é uma realidade em todas as regiões da Amazônia (LAVOUÉ et al. 2011; FOUQUET et al. 2007; DASGUPTA et al. 2013; OLIVEIRA e COLS, 2020). Na Amazônia oriental, a descrição de novas espécies de rãs revelou altos níveis de diversidade, especialmente dentro de espécies crípticas (OLIVEIRA et al. 2017; OLIVEIRA e HERNÁNDEZ- RUZ 2017; OLIVEIRA et al. 2019; OLIVEIRA et al. 2020); isso representa um problema sério para a taxonomia de sapos (PFENNINGER e SCHWENK 2007; BICKFORD et al. 2007). Na literatura é constatado que a curva de acumulação de espécies *de Dendropsophus* está longe de alcançar estabilidade (Fig. 5). Portanto, tratamos este grupo como sub-investigado e esperamos que abordagens taxonômicas modernas e pesquisas de campo revelem a diversidade oculta.

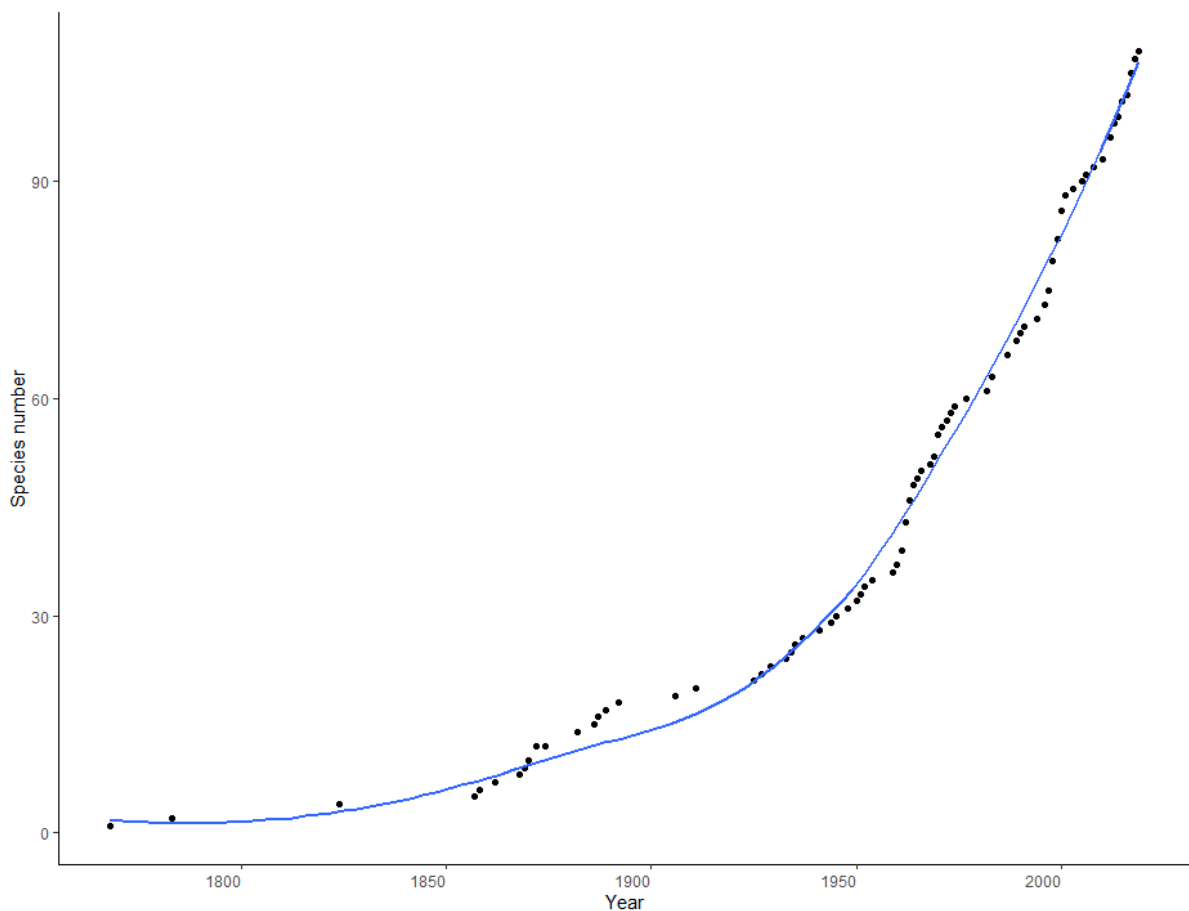


Figura 5. Curva de acumulação de espécies descritas de *Dendropsophus* segundo FROST (2020).

Atualmente, *Dendropsophus* sp1 (UCS) só foi encontrado em áreas de floresta primária, associadas a igarapés cercados por vegetação de palmeiras (Fig.4). As análises genéticas resultantes deste trabalho destacaram que *Dendropsophus mathiassoni* localizado na Colômbia possui a menor distância genética do UCS (8,2%) que foi coletado na cidade de Bagre, Baixo rio Tocantins no Pará (Figura 1). Esta informação corrobora com nossa análise, pois, esse grande intervalo de espaço apresenta várias barreiras geográficas que reforçam a distinção e separação do UCS dessas espécies geneticamente mais próximas.

As abordagens que utilizam métodos de delimitação de espécies para rãs estão a tornar-se cada vez mais críticas na resolução de questões taxonômicas (WIENS, 2007; FOUQUET et al. 2014; ZACHOS, 2016; CORREA et al. 2017; DOMINGOS, 2017; GALEN et al. 2018; OLIVEIRA e COLS, 2019). A presença de um tímpano pequeno ou indistinto representa uma das características morfológicas utilizadas para diferenciar o UCS (*Dendropsophus* sp1) de *Dendropsophus mathiassoni* (considerado sua espécie irmã) e *D. nanus*, ambos em estreita proximidade genética com o UCS. Além dessa característica morfológica que diferencia o UCS de espécies filogeneticamente mais próximas, esta última é apoiada por todos os três métodos moleculares empregados (GMYC, bGMYC e locMin), o que confere maior robustez à nossa interpretação dos dados.

Dendropsophus leali (número de acesso GenBank® MG030722) da cidade de Letícia, Departamento do Amazonas, Colômbia, e *D. reticulatus* (número de acesso GenBank® KY406643) de Loreto, Peru, foram considerados como sendo a mesma espécie pelos métodos locMin e GMYC. Enquanto isso, os mesmos métodos identificaram outro indivíduo de *D. reticulatus* (número de acesso GenBank® KY406646) do Departamento de Loreto, Peru, como uma espécie diferente dos dois primeiros. Apenas o bGMYC identificou *D. leali* e *D. reticulatus* como sendo a mesma espécie. Todos os três métodos identificaram um indivíduo de *D. minutus* (número de acesso do GenBank® KU494416) do Estado de São Paulo como sendo diferente de outros encontrados neste estado (número de acesso do GenBank® KU494414) e Rio de Janeiro (número de acesso do GenBank® KU494415). Um estudo anterior revelou mais de uma espécie críptica identificada como *Dendropsophus minutus* (Kaplan 1991). Nossos dados corroboram a hipótese que a diversidade críptica é prejudicada pelo nome *D. minutus* e exigem estudos mais aprofundados para esclarecer as incertezas taxonômicas deste grupo multidiverso de anfíbios.

Numa altura em que o declínio das populações e espécies de anfíbios está a ocorrer em todo o mundo, devido em parte à fragmentação do habitat, à desflorestação e aos fungos parasitas (STUART et al. 2004; BERNARDE e MACEDO 2008; PALMEIRIM et al. 2017; DA SILVA FRÓIS et al. 2018), a descrição de novas espécies é de vital importância para os esforços de conservação (BICKFORD et al. 2007). A sensibilidade das rãs às alterações ambientais (TOLEDO, 2009) realça a importância de estudos relativos ao estado das populações das espécies e às medidas de conservação, uma vez que são encontradas em áreas sob gestão florestal.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise filogenética o estudo determinou os espécimes de *Dendropsophus* sp1, como grupo monofilético não se encaixando em nenhum dos outros grupos de indivíduos e sugerindo ser uma espécie distinta, além disso, tendo como espécie mais próxima o *Dendropsophus mathiassoni* colombiano com distância de 8,2%, reforçando a sugestão de distinção de espécie.

As estimativas de delimitação de espécies confirmaram nos três métodos o *Dendropsophus* sp1, que a linhagem biológica está seguindo uma trajetória evolutiva independente, corroborando com as afirmações citadas anteriormente e embasando ainda mais as afirmações, além disso, os métodos de delimitação apontaram divergências em outros grupos de *Dendropsophus*, como, *Dendropsophus leali* (Colômbia) e *D. reticulatus* (Peru) foram considerados a mesma espécie por dois dos métodos e um indivíduo de *D. minutus* que foi considerado pelos três métodos como uma espécie diferente dos outros do mesmo grupo.

As comparações morfológicas feitas no estudo também serviram como embasamento para diferenciar o *Dendropsophus* sp1 (USC) dos demais, tendo como principal resultado a diferença no tímpano do *Dendropsophus* sp1 em relação ao *D. mathiassoni* e o *D. nanus*, já que, os dois detêm a menor distância genética com o USC.

Devido à falta de informações, como vocalização e análise molecular com sequências 16S, os dados atuais permanecem insuficientes para uma classificação completa do UCS do nosso estudo. Assim, para descrever com precisão esta nova espécie, novas amostragens devem ser realizadas em áreas próximas, além de análises genéticas com sequências 16s e análises de bioacústica.

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, Aldemar A.; LAMPO, Margarita; CIPRIANI, Roberto. The cane or marine toad, *Rhinella marina* (Anura, Bufonidae): two genetically and morphologically distinct species. **Zootaxa**, v. 4103, n. 6, p. 574-586, 2016.

ALTSCHUL, S. et al. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of molecular biology* 215, 403–410, doi: 10.1016. **S0022-2836 (05)**, p. 80360-2, 1990.

BANG, Davi Lee et al. A comparative acoustic analysis of species of *Vitreorana* (Anura: Centrolenidae) from the Brazilian Atlantic Forest and Cerrado, with a description of the call of *V. baliomma* and insights into the taxonomic status of Cerrado populations. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 19, n. 1, p. 35-47, 2020.

BERNARDE, Paulo Sérgio; MACEDO, Lílian Cristina. Impacto do desmatamento e formação de pastagens sobre a anurofauna de serapilheira em Rondônia. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, p. 454-459, 2008.

BERNARDO, Pedro H. et al. Checklist of amphibians and reptiles of Reserva Biológica do Tapirapé, Pará, Brazil. **Check List**, v. 8, n. 5, p. 839-846, 2012.

BICKFORD, David et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

BINI, Luis Mauricio et al. Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. **Diversity and distributions**, v. 12, n. 5, p. 475-482, 2006.

BROWN, Samuel DJ et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

CAMINER, Marcel A. et al. Systematics of the *Dendropsophus leucophyllatus* species complex (Anura: Hylidae): Cryptic diversity and the description of two new species. **PLoS one**, v. 12, n. 3, p. e0171785, 2017.

COCHRAN, Doris M.; GOIN, Coleman J. Frogs of Colombia. **Bulletin of the United States National Museum**, 1970.

CORREA, Claudio et al. Species delimitation in frogs from South American temperate forests: the case of *Eupsophus*, a taxonomically complex genus with high phenotypic variation. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0181026, 2017.

CRUMP, ML. Visual encounter surveys. **Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians**, p. 84-92, 1994.

CRUZ-PIEDRAHITA, Catalina; NAVAS, Carlos A.; CRAWFORD, Andrew J. Life on the edge: a comparative study of ecophysiological adaptations of frogs to tropical semiarid environments. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 91, n. 1, p. 740-756, 2018.

DA SILVA, Leandro Alves da et al. Richness, diversity patterns, and taxonomic notes of

amphibians from the Tocantins state. **Biota Neotropica**, v. 20, 2020.

DASGUPTA, Partha; KINZIG, Ann P.; PERRINGS, Charles. The value of biodiversity. **Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition [Levin, S.(ed.)]**. Academic Press, Elsevier, Massachusetts, USA, p. 167-179, 2013.

DE ANDRADE, Felipe Silva et al. A new species of long-legged Pseudopaludicola from northeastern Brazil (Anura, Leptodactylidae, Leiuperinae). **Salamandra**, v. 52, n. 2, 107-124, 2016.

DE LA RIVA, Ignacio; DUELLMAN, William E. The identity and distribution of *Hyla rossalleni* Goin. **Amphibia-Reptilia**, v. 18, n. 4, p. 433-436, 1997.

DE SÁ, Rafael O.; HEYER, W. Ronald; CAMARGO, Arley. Are *Leptodactylus didymus* and *L. mystaceus* phylogenetically sibling species (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)? **Herpetologia Petropolitana**, p. 90-92, 2005.

DIAS, Pedro HS et al. Larval anatomy of *Dendropsophus decipiens* (A. Lutz 1925) (Anura: Hylidae: Dendropsophini) with considerations to larvae of this genus. **Plos one**, v. 14, n. 7, p. e0219716, 2019.

DOMINGOS, Fabricius MCB et al. In the shadows: phylogenomics and coalescent species delimitation unveil cryptic diversity in a Cerrado endemic lizard (Squamata: Tropidurus). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 455-465, 2017.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, 1987.

DRUMMOND, Alexei J.; RAMBAUT, Andrew. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 214, 2007.

DRUMMOND, Alexei J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

DUELLMAN, William Edward. The hylid frogs of Middle America. The Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 1970.

DUELLMAN, William Edward. A reassessment of the taxonomic status of some Neotropical hylid frogs. Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas 27: 1–27. 1974.

DUELLMAN, William Edward. **The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador**. Lawrence: University of Kansas, 1978.

DUELLMAN William Edward, Crump ML. Speciation in frogs of the *Hyla parviceps* group in the upper Amazon Basin. Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas 23: 1–40, 1974.

DUELLMAN William Edward, Fouquette Jr MJ. Middle American frogs of the *Hyla*

microcephala group. University of Kansas Publications, Museum of Natural History 17: 517–557, 1968.

FAIVOVICH, Julián et al. 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**, v. 2005, n. 294, p. 1-240, 2005.

FOUQUET, Antoine et al. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Biogeography**, v. 41, n. 5, p. 855-870, 2014.

FOUQUET, Antoine et al. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. **PLoS one**, v. 2, n. 10, p. e1109, 2007.

FOUQUET, Antoine et al. A new *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 (Anura: Hylidae) of the parviceps group from the lowlands of the Guiana Shield. **Zootaxa**, v. 4052, n. 1, p. 39-64, 2015.

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

DA SILVA FRÓIS, Raul de Paula; DE CARVALHO, Joyce Celerino; RUZ, Emil José Hernández. Variation in vegetation cover affect the herpetofauna assembly composition at the serra azul, eastern amazon. **Revista de Biologia Neotropical/Journal of Neotropical Biology**, v. 15, n. 1, p. 9-21, 2018.

Frost DR. Espécies de Anfíbios do Mundo: uma Referência Online. Versão 6.1 (08 de junho de 2020). Banco de dados eletrônico acessível em <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Museu Americano de História Natural, Nova York, EUA, 2020.

Frost DR. Espécies de Anfíbios do Mundo: uma Referência Online. Versão 6.1 (05 de novembro de 2023). Banco de dados eletrônico acessível em <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Museu Americano de História Natural, Nova York, EUA, 2023.

FUJISAWA, Tomochika; BARRACLOUGH, Timothy G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

GALEN, Spencer C. et al. Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, p. 1-15, 2018.

GEHARA, Marcelo et al. High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the Neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e103958, 2014.

GIARETTA, Ariovaldo Antonio; LOPES, André Gomes; BANG, Davi Lee. Reassessment of the advertisement call of topotypic *Scinax squalirostris* (Anura: Hylidae), with an acoustic

evaluation of its occurrence in the Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 19, n. 1, p. 49-61, 2020.

GRENAT, Pablo Raúl; SALAS, Nancy Edith; MARTINO, Adolfo Ludovico. Intraand inter-specific morphometric variation between *Odontophrynus* populations (Anura: Cycloramphidae) of central Argentina. **Revista de Biología Tropical**, v. 60, n. 4, p. 1589-1601, 2012.

GUARNIZO, Carlos E. et al. DNA barcoding survey of anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the impact of the Andes on cryptic diversity. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0127312, 2015.

HALL, Tom A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. 1999. p. 95-98.

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

HORTAL, Joaquín et al. Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, p. 523-549, 2015.

IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. 2012.

KAPLAN, Moises. A new species of *Hyla* from the eastern slope of the Cordillera Oriental in northern Colombia. **Journal of Herpetology**, p. 313-316, 1991.

KASSAS, M. Biodiversity: gaps in knowledge. **Environmentalist**, v. 22, p. 43-49, 2002.

KEARSE, Matthew et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

LAVOUÉ, Sébastien et al. Remarkable morphological stasis in an extant vertebrate despite tens of millions of years of divergence. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1708, p. 1003-1008, 2011.

LYRA, Mariana L.; HADDAD, Celio FB; DE AZEREDO-ESPIN, Ana Maria L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 5, p. 966-980, 2017.

MACHADO, Valeria N. et al. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8387, 2018.

MÂNGIA, Sarah et al. A new species of *Proceratophrys* (Amphibia: Anura: Odontophrynidae) from the Araripe plateau, Ceará state, northeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 74, n. 3, p. 255-268, 2018.

MEYER, Christopher P. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 79, n. 3,

p. 401-459, 2003.

MISSASSI, Alexandre Felipe Raimundo et al. Range extension of the poorly know tree frog *Dendropsophus haraldschultzi* (Bokermann, 1962)(Amphibia, Anura, Hylidae): first records for two Brazilian Amazon states. **Herpetology Notes**, v. 10, p. 703-707, 2017.

NAPOLI, M. F.; CARAMASCHI, Ulisses. Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi*, with the description of a new species (Anura, Hylidae). **ALYTES-PARIS-**, v. 16, p. 165-189, 1999.

OLIVEIRA, Elciomar Araújo et al. Four new species of *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870 (Anura: Craugastoridae) in the eastern Amazon. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229971, 2020.

OLIVEIRA, Elciomar Araújo; HERNÁNDEZ-RUZ, Emil José. New species of glassfrog, genus *Hyalinobatrachium* (Anura: Centrolenidae), for the Brazilian Amazon revealed by mitochondrial DNA and morphology. **Int. J. Res. Stud. Biosci**, v. 5, n. 3, p. 41-52, 2017.

OLIVEIRA, Elciomar Araújo et al. *Pristimantis* in the Eastern Brazilian Amazon: DNA barcoding reveals underestimated diversity in a megadiverse genus. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 30, n. 6, p. 731-738, 2019.

OLIVEIRA, Elciomar Araújo et al. A new species of *Pristimantis* from eastern Brazilian Amazonia (Anura, Craugastoridae). **ZooKeys**, n. 687, p. 101, 2017.

OUBOTER, Paul E.; JAIRAM, Rawien. Taxonomic Index. In: **Amphibians of Suriname**. Brill, p. 373-376, 2012.

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

PADIAL, José M. et al. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2010.

PALMEIRIM, Ana Filipa; VIEIRA, Marcus Vinicius; PERES, Carlos A. Herpetofaunal responses to anthropogenic forest habitat modification across the neotropics: insights from partitioning β -diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, p. 2877-2891, 2017.

PELOSO, Pedro LV et al. A new species of clown tree frog, *Dendropsophus leucophyllatus* species group, from Amazonia (Anura, Hylidae). **South American Journal of Herpetology**, v. 11, n. 1, p. 66-80, 2016.

PFENNINGER, Markus; SCHWENK, Klaus. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2007.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PULLANDRE, Nicolas et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864-1877, 2012.

REID, Noah M.; CARSTENS, Bryan C. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2012.

RIVADENEIRA, C. Daniel; VENEGAS, Pablo J.; RON, Santiago R. Species limits within the widespread Amazonian treefrog *Dendropsophus parviceps* with descriptions of two new species (Anura, Hylidae). **ZooKeys**, n. 726, p. 25, 2018.

RODRÍGUEZ, Lily O.; DUELLMAN, William E. **Guide to the frogs of the Iquitos region, Amazonian Peru**. Natural History Museum, University of Kansas, 1994.

SCHLIEP, Klaus Peter. phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592-593, 2011.

SCHÖNROGGE, Karsten et al. When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 75, n. 3, p. 291-300, 2002.

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STAMATAKIS, Alexandros; HOOVER, Paul; ROUGEMONT, Jacques. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771, 2008.

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

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2011.

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOLEDO, L. F. Anfíbios como bioindicadores. **Bioindicadores da qualidade ambiental (S. Neumann-Leitão & S. El-Dier, org.)**. Instituto Brasileiro Pró-Cidadania, Recife, p. 196-208, 2009.

VAZ-SILVA, W. et al. Contributions to the knowledge of amphibians and reptiles from Volta Grande do Xingu, northern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 205-218, 2015.

VENCES, Miguel et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of

amphibians. **Frontiers in zoology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2005.

VIEITES, David R. et al. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 20, p. 8267-8272, 2009.

WIENS, John J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 875-878, 2007.

YU, Guangchuang et al. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 28-36, 2017.

ZACHOS, Frank E. Tree thinking and species delimitation: guidelines for taxonomy and phylogenetic terminology. **Mammalian Biology**, v. 81, p. 185-188, 2016.

APÊNDICE 1

Detalhes do PCR (COI)

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 53°C, 40s a 72°C e uma extensão final de 7 min. os 72°C. O volume final da reação de PCR foi de 15 µL e continha 7,1 µL de ddH₂O, 1,6 µL de 25 mM MgCl₂, 1,25 µL de dNTPs 10 mM (2,5 mM cada dNTP), 1,25 µL de tampão 10x (75 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1,5 µL do *primer* LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3') e HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), 0,3 µL de 1 U Taq DNA Polimerase e 1 µL de DNA (30 – 50 ng/ µL).

Protocolo de reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços com volume final de 10µL, contendo 4 µL de H₂O estéril, 1,5 µL de tampão de sequenciamento 5X, 0,5 µL de primer (10 µM), 1 µL de mistura Big Dye e 3 µL de Produto limpo por PCR. As condições de PCR foram as seguintes: 96°C (1 min); 35 ciclos de 96°C (15 seg), 50°C (15 seg) e 60°C (4 min). As reações foram precipitadas em etanol/EDTA e secas a 90°C durante 2 min. As placas foram ressuspensas com 10 µL Formamida Hi-Di, aquecida a 94°C por 3 min. e sequenciado em analisador genético ABI 3500xl (Applied Biosystems™).