

# Filogenia Molecular e Evolução de Modos Reprodutivos das Rãs *Leptodactylus* do grupo *marmoratus* (Anura: Leptodactylidae)

Elisa Barreto Pereira<sup>1</sup>, Núbia Esther de Oliveira Miranda<sup>2</sup>, Marcelo Nogueira de Carvalho Kokubum<sup>3</sup>, Rosane Garcia Collevatti<sup>4</sup> e Natan Medeiros Maciel<sup>5</sup>

<sup>1 e 5</sup> Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Goiás - UFG

<sup>3</sup> Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

<sup>4</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG

E-mail para correspondência: elisabpereira@gmail.com; nmaciel@gmail.com

PALAVRAS-CHAVES: Bayesiana, Cladística, Mapeamento e Modo reprodutivo.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 é composto atualmente de 89 espécies, distribuídas na América do Sul, América Central e sul da América do Norte. Cinco grupos de espécies são definidos feneticamente, baseados no comportamento, morfologia e ecologia dos adultos: *Leptodactylus latrans*, *L. melanonotus*, *L. pentadactylus*, *L. fuscus* e *L. marmoratus*.

A taxonomia e as relações filogenéticas destes grupos ainda não são totalmente compreendidas. Segundo alguns autores, as espécies do grupo *Leptodactylus marmoratus* podem ser classificadas em um gênero a parte, denominado *Adenomera* Steindachner, 1867. Frost *et al.* (2006) em sua hipótese filogenética para Lissamphibia sugeriram, a partir de dados moleculares, que o gênero *Leptodactylus* é monofilético apenas quando considerado em conjunto com *Adenomera* e *Lithodytes*. Trabalhos como os de Ponssa (2008) e Kwet *et al.* (2009) não aderiram a esta nova classificação, já que apenas *Leptodactylus hylaedactylus* foi utilizado como representante de *Adenomera* ou *L.* do grupo *marmoratus*. Neste trabalho, usamos o nome *Leptodactylus* do grupo *marmoratus*, para nos referir as espécies de rãs que estavam alocadas no gênero *Adenomera* (segundo Frost *et al.*, 2006).

Todas as espécies de *Leptodactylus* depositam seus ovos em ninhos de espuma construídos pelos parentais no momento da oviposição. Características como o local de deposição dos ovos e a forma de desenvolvimento do girino variam entre as espécies dos grupos fenéticos, com um grau de tendência a terrestrialidade para atributos de modo reprodutivo de algumas espécies destes grupos (Heyer, 1969).

Revisado pelo orientador

<sup>1</sup> Orientando, <sup>5</sup> Orientador, <sup>2,3 e 4</sup> Colaboradores

A disponibilidade de hipóteses filogenéticas para diversos grupos, principalmente a partir de dados moleculares, servem de base para o estudo da evolução de caracteres de diversas naturezas como morfológicos, ecológicos, comportamentais e bioacústicos através de análises de reconstrução de estados ancestrais (mapeamento) (Avise, 2006). Estas análises permitem a interpretação da evolução de diversos caracteres e do comportamento destes na evolução de um dado grupo de organismos. Os atributos podem ter surgido uma única vez nas mesmas linhagens (homologias - que suportam os clados) ou em linhagens independentes (homoplasias - convergências, reversões ou paralelismos). As espécies de *Leptodactylus* são um excelente grupo para investigação da evolução de caracteres ecológico-comportamentais relacionados aos modos reprodutivos.

## 2 OBJETIVOS

- Obter uma hipótese filogenética a partir de dados moleculares para espécies de *Leptodactylus* com ênfase nas espécies do grupo *L. marmoratus*
- Estudar a evolução de caracteres ecológico/comportamentais nas espécies de *Leptodactylus* com ênfase nas espécies do grupo *L. marmoratus*

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Obtenção das Sequências

Tecidos (fígado e/ou músculo) de espécimes de diversas populações de espécies de *Leptodactylus* foram obtidos (Figura 1). Os tecidos foram extraídos com kit de extração (*Kit Dneasy Tissue - Qiagen*) e os fragmentos de rDNA mitocondrial foram amplificados e sequenciados por reação de cadeia de polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos (Camargo *et al.*, 2006).

O fragmento inteiro previsto para ser utilizado nesse trabalho possui aproximadamente 1800 pb, e é formado por parte do gene 16S, tRNA-Leu (gene completo) e parte do gene ND1. Os fragmentos 16S foram amplificados utilizando os iniciadores 16Sc (5'-GT(A/C)GGCCTAAAAGCAGCCAC-3') e 16Sd (5'-CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG-3') enquanto que os fragmentos ND1 utilizaram os iniciadores ND1tmet (5'-TTGGGGTATGGGCCCAAAGCT-3') e ND116S (5'-TTACCCT(A/G)GGGATAACAGCGCAA-3'). O iniciador interno 16SaR (5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3') foi utilizado para a obtenção das sequências, anelando

especificamente no fragmento 16Sc-16Sd. Para espécies que não obtivemos material biológico, foram utilizadas sequências disponíveis no banco de dados “GenBank” (Figura 1).

As sequências que obtivemos foram editadas no programa SeqScape 2.5 e alinhadas juntamente com as sequências disponíveis no “GenBank” no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997). O alinhamento apresentou lacunas (“indels”), indicando inserções ou remoções de bases que podem refletir mudanças evolutivas entre as espécies. Estes “indels” foram tratados como dados perdidos (“?”). A frequência de cada nucleotídeo e a taxa de substituição de bases foram calculadas no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011)

Figura 1 – Relação das espécies e origem da sequência mitocondrial utilizadas no presente trabalho. Sequências retiradas do “Genbank” estão indicadas juntamente com seu código de acesso.

Espécie	Origem da sequência	Espécie	Origem da sequência
<i>Paratelmatoobius cardosoi</i>	GenBank: EU224402.1	<i>Leptodactylus latrans</i>	Genbank: DQ158417.1
<i>Centrolene prosoblepon</i>	GenBank: AY843574.1	<i>Leptodactylus lineatus</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus bokermanni</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus lutzi</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus hylaedactylus</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus macrosternum</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus andreae</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus martinezi</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus araucaria</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus melanonotus</i>	Genbank: AY943237.1
<i>Leptodactylus bolivianus</i>	Genbank: FJ784394.1	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus bufonius</i>	GenBank: AY943233.1	<i>Leptodactylus mystacinus</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Genbank: EF632055.1	<i>Leptodactylus notoaktites</i>	Genbank: AY948958.1
<i>Leptodactylus didymus</i>	Genbank: AY948957.1	<i>Leptodactylus pallidirostris</i>	GenBank: EF632046.1
<i>Leptodactylus diedrus</i>	GenBank: AY943230.1	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Genbank: FJ784394.1
<i>Leptodactylus elenae</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Sequência própria
<i>Leptodactylus fragilis</i>	Genbank: FJ784394.1	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Genbank: AY947855.1
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus spixi</i>	Genbank: AY948956.1
<i>Leptodactylus gracilis</i>	Sequência própria	<i>Leptodactylus validus</i>	Genbank: EF632060.1
<i>Leptodactylus heyeri</i>	Genbank: EU201051.1	<i>Leptodactylus wagneri</i>	Genbank: EF632054.1
<i>Leptodactylus jolyi</i>	Sequência própria		

### 3.2 Análises Filogenéticas

O modelo de evolutivo para as sequências foi selecionado utilizando o jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) com o critério de Akaike (AIC, Bozdogan, 1987). Ajustamos o número de modos substituição para 11, de forma que o melhor modelo evolutivo para os dados moleculares fosse procurado entre os 88 modelos possíveis.

A análise Bayesiana foi realizada no programa MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) utilizando-se o modelo evolutivo sugerido pelo jModelTest. Árvores aleatórias foram

utilizadas para iniciar a análise, de modo a atingir 2.000.000 gerações. Foram desconsideradas 25% das amostras em fase de aquecimento, visto que foram geradas antes da “estabilização”.

Após as análises, o cladograma de consenso da regra da maioria (50%) com valores de probabilidade *a posteriori* foi obtido. Segundo Huelsenbeck *et al.* (2002), a probabilidade *a posteriori* gerada pela análise Bayesiana pode ser interpretada como a probabilidade de que a árvore (ou o clado) seja a correta. Valores acima que 0,95 foram considerados significantes para um grupo bem suportado, permitindo inferências quanto ao monofiletismo (Leaché e Reeder, 2002).

As espécies *Paratelmatoobius cardosoi* e *Centrolene prosoblepon* foram utilizadas como grupos externos. Esta escolha se baseou nas filogenias de Grant *et al.* (2006) e Frost *et al.* (2006), onde *Paratelmatoobius* se mostra intimamente relacionado às espécies de *Leptodactylus*, pertencendo então à família Leptodactylidae. O gênero *Centrolene* é alocado mais distante de *Leptodactylus*, pertencendo a uma família filogeneticamente irmã, Centrolenidae.

### **3.2 Evolução dos Caracteres Ecológico-comportamentais (Mapeamento)**

Para realização do mapeamento foram obtidos da literatura dados de sete caracteres ecológico-comportamentais (Figura 2). A análise foi realizada no programa Mesquite 2.7.3 (Maddison & Maddison, 2010) a partir da filogenia molecular obtida no presente trabalho. Para a reconstrução dos estados ancestrais foi utilizada a parcimônia. A resolução dos estados dos caracteres nos ramos internos da topologia foram resolvidos, em caso de ambiguidades, através de otimizações MPR's.

O modo reprodutivo em anuros foi definido por Salthe e Duellman (1973) como sendo a combinação de traços reprodutivos classificados a partir de caracteres como: o local de oviposição, o tipo dos ovos, o modo de desenvolvimento dos girinos e a forma de cuidado parental, quando presente. Haddad e Prado (2005) apresentam a revisão mais recente sobre estes modos reprodutivos, sendo então, a classificação adotada no presente trabalho. Os estados deste carácter são explicados a seguir: modo 11 - ninho de espuma em poças e girinos exotróficos; modo 13 – ninho de espuma flutuando na água acumulada em bacias construídas e girinos exotróficos em poças; modo 30 – ninho de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em câmaras subterrâneas que após inundação tem os girinos carregados para poças (exotróficos) e modo 32 – ninho de espuma em câmaras subterrâneas e girinos que completam o desenvolvimento no ninho (endotróficos).

Figura 2 – Caracteres ecológico-comportamentais utilizados no estudo evolutivo (mapeamento) e seus respectivos estados.

Estado de caracter	Modo reprodutivo	Fecundidade (Heyer, 1974)	Habitat	Ambiente do girino	Posicionamento do girino na coluna d'água	Calos nupciais/espinhos nos machos	Pigmentação dos ovos
0	Modo 11	Menos de 50 ovos	Áreas abertas	Corpo d'água lótico	Nectônico	Ausência	Sem melanina
1	Modo 13	Entre 50 e 1.000 ovos	Formações florestais	Corpo d'água lântico	Bentônico	Presença	Com melanina
2	Modo 30	Mais de 1.000 ovos	-	Terrestre - girino não tem contato com corpos d'água	Terrestre	-	-
3	Modo 32	-	-	-	-	-	-

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Alinhamento

Foram obtidas ampliações de todo o fragmento mitocondrial proposto, porém não foi possível sequenciar completamente o fragmento por problemas técnicos relacionados ao sequenciador. Desta forma, para os resultados apresentados nesse relatório utilizamos apenas parte do gene 16S, contendo 213 pb. O alinhamento não pôde ser apresentado aqui devido a extensão dos dados e conseqüente limitação do espaço.

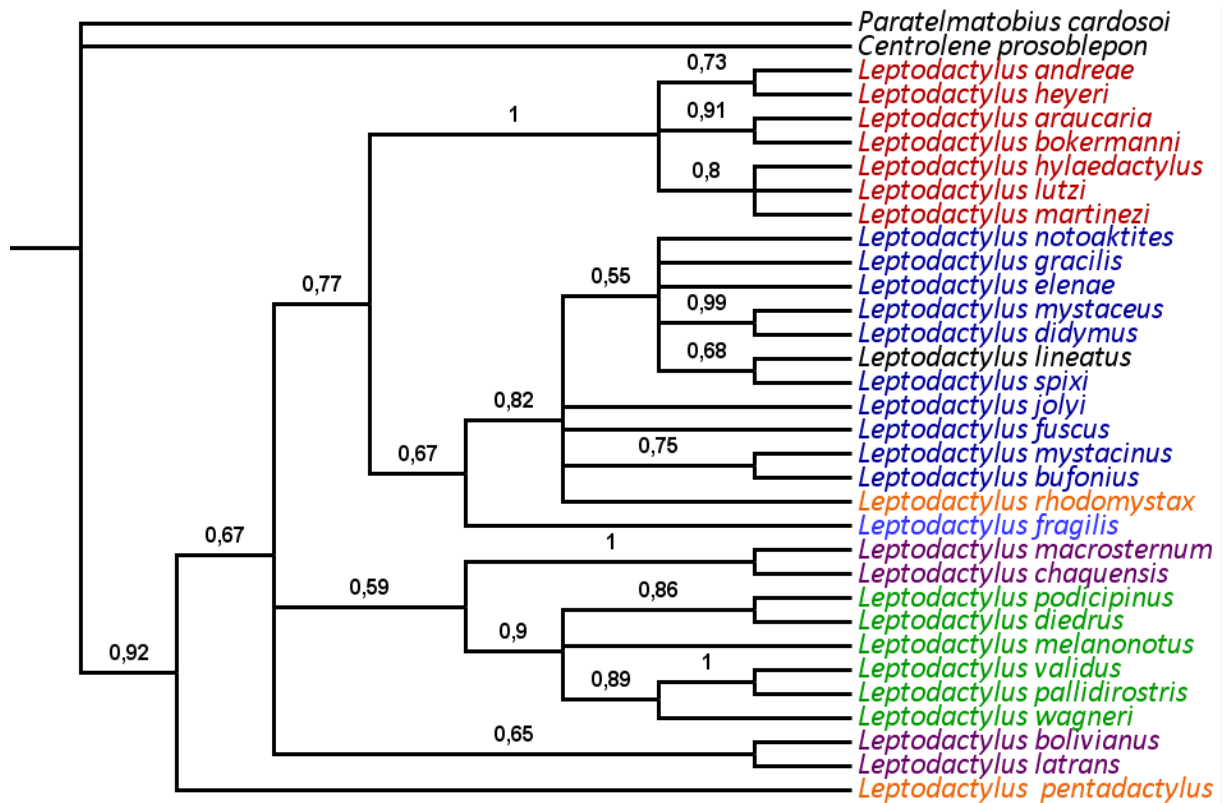
A análise do alinhamento no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) indica que a frequência dos nucleotídeos foi: A = 30,25%; T = 25,87%; C = 20,98% e G = 22,98%. As taxas de substituição mais significativas foram: T-C = 28,37; C-T = 23,01; A-G = 15,04 e G-T = 11,38. A partir destes dados, o modelo evolutivo mais adequado foi o TIM2ef+I+G (Posada, 2008).

### 4.2 Análises Filogenéticas

O modelo evolutivo indicado pelo programa jModelTest foi utilizado na análise Bayesiana, que gerou o cladograma de 50% da regra da maioria apresentado na Figura 3. Esta hipótese filogenética indicou que a espécie mais basal dentre todas as do grupo interno, é *Leptodactylus pentadactylus*, com suporte de 0,92 para este clado.

Conforme ilustrado na Figura 3, as espécies do grupo *Leptodactylus marmoratus* ficaram bem resolvidas, formando um grupo monofilético suportado pelo valor máximo de probabilidade *a posteriori* (1,0). Estas espécies se mostraram mais relacionadas filogeneticamente com as do grupo *L. fuscus*, com 0,77 de probabilidade *a posteriori* para suporte do clado. Todas as espécies do grupo *L. marmoratus* ficaram reunidas em um mesmo clado, sendo: *L. andreae* + *L. heyeri* filogeneticamente próximas, com suporte de 0,73; *L. araucaria* + *L. bokermanni* relacionadas com suporte de 0,91 e *L. hylaedactylus* + *L. lutzi* + *L. martinezi* formando uma politomia que não nos permite compreender qual espécie é mais basal dentro do grupo *L. marmoratus*.

Figura 3 – Cladograma de 50% da regra da maioria gerado pela análise Bayesiana com os valores de probabilidade *a posteriori* indicado nos nós. As cores representam os grupos de espécies, sendo: vermelho – grupo *Leptodactylus marmoratus*, azul – grupo *L. fuscus*, laranja – grupo *L. pentadactylus*, roxo – grupo *L. latrans*, verde – grupo *L. melanonotus* e preto – *L. lineatus* (não incluído em grupos fenéticos) e *P. cardosoi* + *C. prosoblepon* (grupos externos).



Espécies do grupo *Leptodactylus fuscus* também ficaram reunidas em um mesmo clado, sendo *L. fragilis* a espécie mais basal (0,67). Como é possível observar na Figura 3, *L. rhodomystax* foi a única espécie pertencente a outro grupo fenético que ficou embebida com espécies do grupo *L. fuscus*, porém este dado não é relevante visto que houve a formação de uma politomia. *L. didymus* + *L. mystaceus* se mostram altamente relacionadas do ponto de vista filogenético, suportados por 0,99 de probabilidade *a posteriori*. *L. spixi* + *L. lineatus*

estão suportadas por um valor de 0,68. *L. mystacinus* + *L. bufonius* como espécies irmãs apresentam suporte de 0,75.

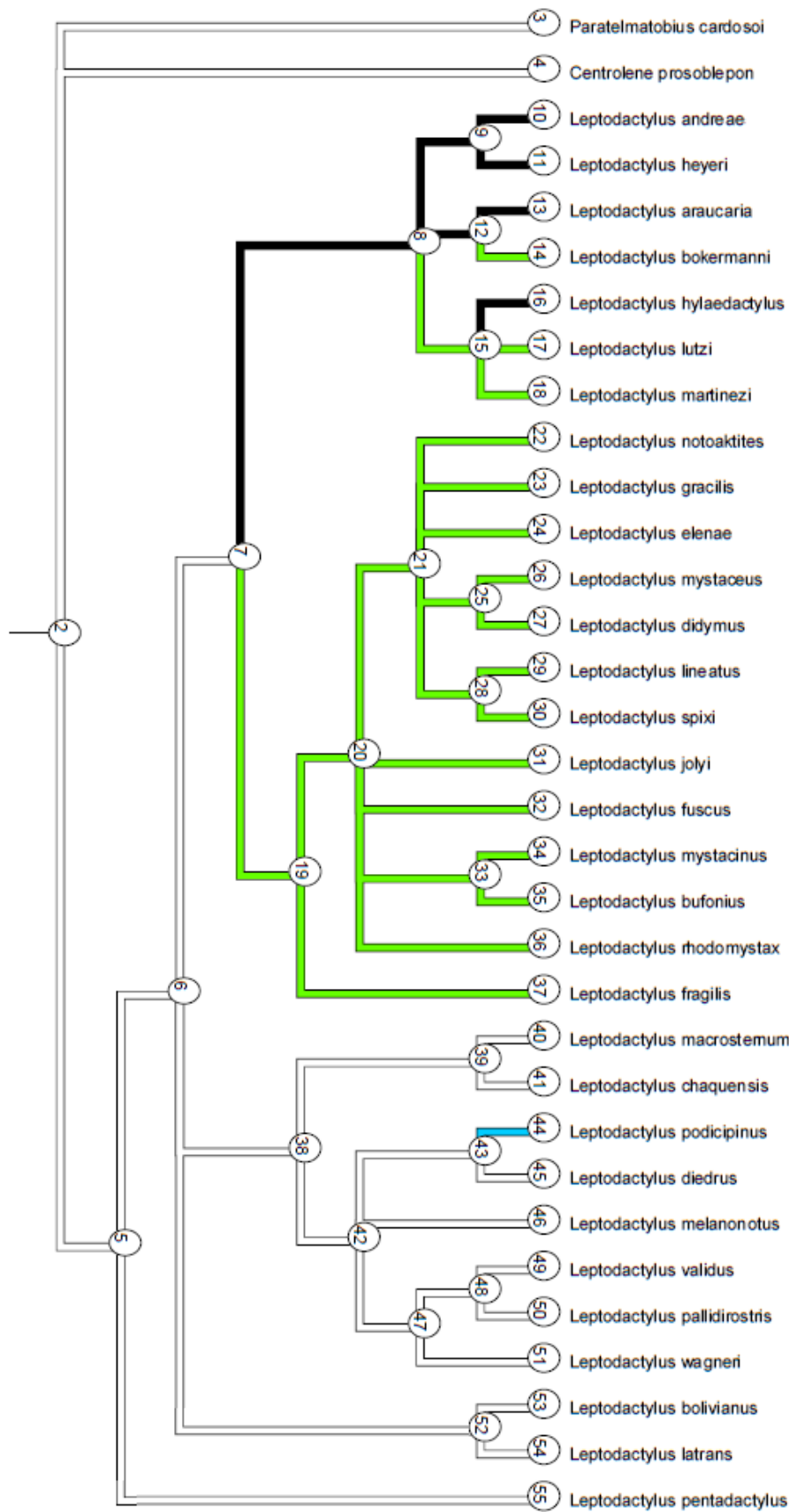
Segundo o cladograma apresentado na Figura 3, espécies dos grupos *Leptodactylus melanonotus* e *L. latrans* se mostraram relacionadas, sendo as do grupo *L. melanonotus* mais basais. Duas espécies do grupo *L. latrans* (*L. latrans* e *L. insularum*), não ficaram próximas às outras espécies do grupo, porém se trata de um clado onde as relações filogenéticas não apresentaram boa resolução, formando uma politomia. *L. macrosternum* + *L. chaquensis* apresentam o suporte máximo de probabilidade *a posteriori* (1,0), assim como *L. validus* + *L. pallidirostris*. *L. wagneri* se mostra relacionada a estas duas espécies anteriores com suporte de 0,89. *L. podicipinus* + *L. diedrus* estão relacionadas com suporte de 0,86. *L. wagneri* é colocada como a espécie mais basal do grupo *L. melanonotus*.

### 4.3 Evolução dos caracteres ecológico-comportamentais (Mapeamento)

Devido à limitação de espaço optamos por apresentar cladograma apenas o mapeamento do carácter “modo reprodutivo” (Figura 4). Para o restante dos caracteres foi elaborada a tabela apresentada como Figura 5, onde está indicado o estado do carácter de cada clado conforme indicado na Figura 2.

Em relação ao carácter “modo reprodutivo”, o estado ancestral para *Leptodactylus* é (0) - modo 11, que surgiu apenas uma vez na história deste grupo. Segundo nosso estudo da evolução dos caracteres (Figura 4), o modo reprodutivo codificado pelo estado (3) é o modo ancestral para espécies do grupo *L. marmoratus*. Algumas espécies deste grupo apresentam o modo 30 (estado 2), indicando possíveis reversões.

Figura 4 – Mapeamento do carácter “modo reprodutivo” indicado na topologia através de cores da seguinte forma: branco – (0) modo 11, azul – (1) modo 13, verde – (2) modo 30 e preto – (3) modo 32. Os números indicativos dos clados são os mesmos utilizados na Figura 5 para os outros caracteres mapeados.



Character: Modo reproductivo  
 Parsimony reconstruction  
 [Steps: 5]

0
1
2
3



Figura 5 – Mapeamento dos caracteres indicado conforme a numeração dos clados apresentados na Figura 4. A primeira coluna indica o número do clado, e as colunas seguintes indicam o estado que cada espécie apresentou para determinado caracter.

Clado	Modo reprodutivo	Fecundidade	Habitat	Ambiente do girino	Girino na coluna de água	Calos nupciais	Pigmentação dos ovos
2	0	2	0	1	1	1	1
3	0	2	0	1	1	1	1
4	0	2	0	1	1	1	1
5	0	2	0	1	1	1	1
6	0	2	0	1	1	1	1
7	0	1	0	1	1	0	0
8	3	0	0	2	2	0	0
9	3	0	1	2	2	0	0
10	3	0	1	2	2	0	0
11	3	0	1	2	2	0	0
12	3	0	0	2	2	0	0
13	3	0	1	2	2	0	0
14	2	0	0	0	0	0	0
15	3	0	0	2	2	0	0
16	3	0	0	2	2	0	0
17	3	0	1	2	2	0	0
18	2	0	0	0	0	0	0
19	2	0	0	1	1	0	0
20	2	1	0	1	1	0	0
21	2	1	0	1	1	0	0
22	2	1	1	0	1	0	0
23	2	1	0	1	1	0	0
24	2	1	0	1	1	0	0
25	2	1	0	1	1	0	0
26	2	1	0	1	1	0	0
27	2	1	1	1	1	0	0
28	2	1	1	1	1	0	0
29	2	1	1	1	1	0	0
30	2	1	1	1	1	0	0
31	2	1	0	1	1	0	0
32	2	1	0	1	1	0	0
33	2	1	0	1	1	0	0
34	2	1	0	1	1	0	0
35	2	1	0	1	1	0	0
36	2	1	0	1	1	0	0
37	2	1	0	1	1	0	0

Clado	Modo reprodutivo	Fecundidade	Habitat	Ambiente do girino	Girino na coluna de água	Calos nupciais	Pigmentação dos ovos
38	0	2	0	1	1	1	1
39	0	2	0	1	1	1	1
41	0	2	0	1	1	1	1
43	0	2	0	1	1	1	1
44	1	2	0	1	1	1	1
45	0	2	0	1	1	1	0
46	0	2	0	1	0	1	1
47	0	2	0	1	1	1	1
48	0	2	0	1	1	1	1
49	0	2	0	1	1	1	1
50	0	2	0	1	1	1	1
51	0	2	0	1	1	1	1
52	0	2	0	1	1	1	1
53	0	2	0	1	0	1	1
54	0	2	0	1	1	1	1
55	0	2	0	1	1	1	1

O mapeamento do caracter “fecundidade” (Figura 5) mostrou que o estado (2) - postura de mais de 1.000 ovos por desova – é o modo ancestral das espécies de *Leptodactylus*, sendo o caracter 0 – menos de 50 ovos por desova – o modo ancestral para espécies do grupo *L. marmoratus*. Todos os estados mapeados surgiram apenas uma vez na história evolutiva dos grupos.

O caracter “habitat” (Figura 5) apresentou como estado ancestral o uso de áreas abertas (0), sendo este, o estado da maioria das espécies de *Leptodactylus* amostradas. O uso de formações florestais (1) surgiu mais de uma vez na história evolutiva deste grupo sendo observado em espécies de grupos que não são intimamente relacionados do ponto de vista filogenético.

Os caracteres “ambiente dos girinos” e “local na coluna de água”, segundo nossos dados apresentados na Figura 5, se mostraram bem conservados entre espécies de *Leptodactylus*, ambas tendo o estado (1) – girino bentônico em corpo d’água lântico - como ancestral para *Leptodactylus*. Espécies do grupo *L. marmoratus* apresentam estado (2) – girino terrestre – como modo ancestral, porém duas espécies deste grupo apresentam reversão para o modo (0) – girino nectônico de ambiente lótico.

A presença de calos nupciais e de melanina nos ovos de espécies de *Leptodactylus*, em nossa análise, se mostrou ancestral para espécies do gênero (Figura 5). Os dois estados destes

caracteres surgiram apenas uma vez na história evolutiva do grupo, sendo o estado (0) – ausência de calos nupciais e de melanina nos ovos – o ancestral para espécies do grupo *L. marmoratus*.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de não ter sido utilizado todo o fragmento gênico proposto, esta ainda é a hipótese filogenética mais completa para o grupo de *Leptodactylus marmoratus*. O cladograma gerado pela análise Bayesiana, a partir dos dados moleculares, apresentou boa resolução para o grupo *L. marmoratus*, que se mostrou altamente suportado (Figura 3). Além disso, foram feitas inferências sobre a relação do grupo *L. marmoratus* com outras espécies de *Leptodactylus*. A hipótese filogenética obtida ainda nos permitiu fazer inferências acerca da evolução de caracteres ecológico-comportamentais de *Leptodactylus*.

É possível sugerir a partir da hipótese filogenética obtida (Figura 3), que o grupo filogenético mais relacionado filogeneticamente com espécies do grupo *L. marmoratus* é *L. fuscus*, seguido por *L. latrans*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus*.

Até o momento um dos poucos trabalhos publicados sobre a relação entre as espécies de *Leptodactylus* do grupo *marmoratus* foi realizado por Heyer (1974), através da utilização de 50 caracteres morfológicos e comportamentais entre espécies de *Leptodactylus* e espécies do grupo externo. Segundo as análises de Heyer (1974), o grupo *L. marmoratus* é monofilético, e apresenta *L. martinezi* como espécie mais basal. A topologia gerada no presente trabalho (Figura 3) confirma este monofiletismo, mas não nos permite inferir qual espécie ocupa a posição basal, já que houve a formação de uma politomia. Os resultados de Heyer (1974), apesar de indicar o monofiletismo de espécies de *L.* do grupo *marmoratus*, não permitem fazer inferências quanto a sua relação com as demais espécies de *Leptodactylus*.

De Sá *et al.* (2006) buscaram elucidar a relação de *Vanzolinus* com outros gêneros através de uma hipótese filogenética. Estes autores obtiveram uma filogenia onde os gêneros *Adenomera* e *Lithodytes* são apresentados como grupos irmãos evolutivamente distintos de *Leptodactylus*. Nossa análise aponta um resultado diferente, onde espécies pertencentes ao antigo gênero *Adenomera* (*Leptodactylus* do grupo *marmoratus*) se mostram intimamente relacionadas com outros grupos de *Leptodactylus*, especialmente *L. fuscus*. *Leptodactylus lineatus*, antes pertencente ao gênero *Lithodytes*, é alocado como táxon irmão de *L. spixi* (grupo *L. fuscus*), ambas embebidas em meio a espécies do grupo *L. fuscus*.

A topologia obtida por Ponssa (2008) aloca *Leptodactylus marmoratus* e *L. andreae* como táxons irmãos. As espécies deste grupo (*L. marmoratus*) se mostraram filogeneticamente próximas à *L. lineatus*, diferente do encontrado em nosso trabalho. O grupo *Leptodactylus* se mostrou monofilético quando *L. lineatus* e espécies do grupo *L. marmoratus* não são incluídas. Este resultado foi oposto ao encontrado em nossa análise Bayesiana indicada na Figura 1.

Boistel *et al.* (2006) ao descreverem *Leptodactylus heyeri* não descartam a possibilidade de que novas análises podem revelar que esta espécie é basal em relação ao grupo, ou até mesmo esta não pertença ao gênero *Adenomera/L.* do grupo *marmoratus*. Diferente do esperado por estes autores, o cladograma gerado neste trabalho (Figura 3) aponta *L. heyeri* como uma das espécies mais derivadas, juntamente com *L. andrae*.

A recuperação da história evolutiva dos estados de caracteres nos permite inferir como se deu o surgimento de cada caracter-ecológico comportamental na história dos grupos. A partir do mapeamento (Figura 5) foi possível observar que alguns caracteres parecem ter evoluído conjuntamente, como é o caso dos caracteres “fecundidade” e “modo reprodutivo”; “calos nupciais” e “pigmentação dos ovos”.

O mapeamento do caracter “modos reprodutivos” indicou uma tendência dos grupos à terrestrialidade, visto que espécies mais basais na filogenia apresentam modos mais dependentes da água, enquanto que espécies mais recentes apresentam modos reprodutivos menos dependentes da água, com girinos em câmaras subterrâneas. Esta tendência à terrestrialidade parece acompanhar a evolução do caracter “fecundidade”, visto que espécies mais basais depositam mais de 1.000 ovos por ninho de espuma, enquanto que espécies mais recentes (grupo *L. marmoratus*) depositam em média menos de 50 ovos.

A evolução dos caracteres “calos nupciais” e “pigmentação dos ovos” apresentaram topologias semelhantes. É possível sugerir uma evolução conjunta destes caracteres, visto que espécies mais basais e mais dependentes da água apresentam calos nupciais e pigmento nos ovos. A presença de calos nupciais nestas espécies é essencial para garantir a estabilidade dos adultos no momento do amplexo, e a presença de melanina protege os ovos dos raios ultravioletas, visto que as desovas ficam expostas ao sol. Já as espécies mais recentes e menos dependentes da água não necessitam de calos nupciais visto que o amplexo se dá em ambiente terrestre, e os ovos não apresentam melanina pois estes são depositados em tocas subterrâneas.

## 6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região do fragmento 16S utilizada forneceu uma boa quantidade de sítios informativos para a resolução da relação de parentesco das espécies do grupo *Leptodactylus marmoratus*. O número de caracteres informativos são de suma importância para a construção de uma árvore filogenética com resolução. Porém, para as espécies do grupo *L. fuscus* essa parte do fragmento aparenta ser muito conservada, o que levou a baixa resolução da relação entre as espécies deste grupo.

O cladograma gerado pela análise Bayesiana indica todas as espécies do grupo *Leptodactylus marmoratus* que foram amostradas formam um grupo monofilético relacionado filogeneticamente com as demais espécies de *Leptodactylus*. O monofiletismo do grupo *L. marmoratus* é corroborado por trabalhos como os de Heyer (1974) e Ponssa (2008). Porém *Leptodactylus* só se mostra monofilético apenas quando considerado em conjunto com espécies do grupo *L. marmoratus* e *L. lithodites*, diferente do encontrado por Ponssa (2008).

O estudo da evolução dos caracteres ecológico-comportamentais mostrou que alguns destes caracteres são homólogos, sendo importantes para suportar os clados. Alguns caracteres mapeados parecem surgir nas mesmas linhagens, como é o caso de “fecundidade” + “modo reprodutivo” e “calos nupciais” + “pigmentação dos ovos”. Isto nos permite afirmar que há uma relação histórica da evolução destes caracteres, e que esta relação está intimamente ligada tendência à terrestrialidade.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Awise, J. C. 2006. **Evolutionary pathways in nature: A phylogenetic approach**. Cambridge University, New York, 286 p.
- Boistel, R.; Massary, J.C.; Angulo, 2006. A. **Description of a new species of the genus *Adenomera* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from French Guiana**. Acta Herpetologica, 1: 1 – 14.
- Bozdogan, H. 1987. **Model selection and Akaike’s Information Criterion (AIC): the General Theory and its Analytical Extensions**. Psychometrika, 52 (3): 345-370.
- Camargo, A.; de Sá, R. O.; Heyer, W. R. 2006. **Phylogenetics analysis of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799)(Anura, Leptodactylidae)**. Biol. J. Linnean Soc., 87: 325-341.
- de Sá, R. O., W. R. Heyer, & A. Camargo. 2006. **A phylogenetic analysis of *Vanzolinius* Heyer, 1974 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Taxonomic and life history implications**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, 63(4):707-726.

Fitzinger, L. J. F. J. 1826. **Neue Classification der Reptilien nach ihren Natürlichen Verwandtschaften nebst einer Verwandtschafts-Tafel und einem Verzeichnisse der Reptilien-Sammlung des K. K. Zoologisch Museums zu Wien.** Wien: J. G. Heubner

Frost, D. R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R. H.; Haas, A.; Haddad, C. F. B.; de Sá, R. O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S. C.; Raxworthy, C. J.; Campbell, J. A.; Blotto, B. L. 2006. **Amphibian tree of Life.** Bull. of the American Museum of Natural History, 297: 1-370.

Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J. P.; Gagliardo, R.; Haddad, C. F. B.; Kok, P. J. R.; Bruce Means, D.; Noonan, B. P.; Schargel, W. E.; Ehlweler, W. C. 2006. **Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Anura: Dendrobatidae).** Bulletin of the American Museum of Natural History, 1 – 262.

Haddad, C.F.B.; Prado, C.P.A. 2005. **Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil.** BioScience, 55(3):207-217.

Heyer, W. R. 1969. **The adaptive ecology of the species groups of the frog genus Leptodactylus (Amphibia, Leptodactylidae).** Evolution, 23:421-428.

Heyer, W. R. 1974. **Relationships of the *marmoratus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the Subfamily Leptodactylinae.** Contributions in Science, Los Angeles County Museum of Natural History, (253):1-46.

Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F.; Nielsen, R.; Bollback, J. P. 2001. **Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology.** Science, 294: 2310-2314.

Huelsenbeck, J.P.; Larget, B.; Miller, R.E.; Ronquist, F. 2002. **Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny.** Syst. Biol., 51:673–688.

Kwet, A.; Steiner, J.; Killikens, A. 2009 **A new species of *Adenomera* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic rain forest in Santa Catarina, southern Brazil.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, 1-15

Leaché, A.D.; Reeder, T.W. 2002. **Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches.** Systematic Biology, 51:44–68.

Maddison, W. P.; D.R. Maddison. 2010. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.** Version 2.73 <http://mesquiteproject.org>

Oliveira-Filho, J. C.; Costa, H. C. M.; Braga, U. M. L. 2005. **Egg-laying and foam-beating in *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae).** Biota Neotropica, 5(2):1-2.

Ponssa, M.L. 2008. **Cladistic analysis and osteological descriptions of the frog species in the *Leptodactylus fuscus* species group (Anura, Leptodactylidae).** J. Zool. Syst. Evol. Res., 46: 249-266.

Posada, D. 2008. **jModelTest: Phylogenetic Model Averaging.** *Molecular Biology and Evolution.* 25: 1253-1256.

Salthe, S.N.; Duellman, W.E. 1973. **Quantitative constrains associated with reproductive mode in anurans.** In: Vial, J.L. (Ed.), *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems.* University of Missouri Press, Columbia, p.229-249.

Steindachner, F. 1867. **Reise der österreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren 1857, 1858, 1859 unter den Befehlen des Commodore B. von Wüllerstorff-Urbair. Zoologischer Theil. 1. Amphibien.** Wien: K. K. Hof- und Staatsdruckerei.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Molecular Biology and Evolution*

Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. 1997. **The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876-488.