

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Origem, diversificação e biogeografia de Neobatrachia  
Reig, 1958 (Amphibia, Anura)**

Annelise Frazão Nunes



UFRJ

## **Origem, diversificação e biogeografia de Neobatrachia Reig, 1958 (Amphibia, Anura)**

Annelise Frazão Nunes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva).

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Augusta de Moraes Russo

Co-orientação: Prof. Dr. Hélio Ricardo da Silva

Rio de Janeiro  
Setembro, 2013

# **Origem, diversificação e biogeografia de Neobatrachia Reig, 1958 (Amphibia, Anura)**

Annelise Frazão Nunes

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Augusta de Moraes Russo

Co-orientação: Prof. Dr. Hélio Ricardo da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva).

Aprovada por:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Maeda Takiya (IB - UFRJ)

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago (IB - UFRJ)

---

Prof. Dr. William Bryan Jennings (MN - UFRJ)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cássia Mônica Sakuragui (IB - UFRJ)

---

Prof. Dr. Marcelo Weksler (IB - UNIRIO)

Data da defesa: 27 de setembro de 2013.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Nunes, Annelise Frazão.

Origem, diversificação e biogeografia de Neobatrachia Reig, 1958/ Annelise Frazão Nunes. – Rio de Janeiro: UFRJ/IB, 2013.

xii, 120f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Claudia Augusta de Moraes Russo

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Biologia/ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 100-120.

1. Evolução. 2. Biodiversidade 3. Biogeografia. 4. Amphibia. 5. Anura. 6. Neobatrachia. I. Annelise Frazão Nunes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. III. Origem, diversificação e biogeografia de Neobatrachia Reig, 1958.

## Agradecimentos

Agradecer. Sou tão grata a tantas pessoas... Tentarei ser breve, o que é difícil, entretanto justa. O que mais tenho a fazer é agradecer. Fico pensando que tem tanta gente que teria que construir uma dissertação sobre aqueles que gostaria de agradecer. Mas... Vamos lá.

Os primeiros a receberem meus agradecimentos eternos, merecidamente, são meus pais. Eles, Celma e Alcides, foram essenciais sempre. Desde quando eu quis bater asas por aí eles já sabiam que não voltaria mais e mesmo assim me apoiaram, fizeram de tudo e mais um pouco pra eu continuar fazendo aquilo que eu gosto e entendendo a distância. À eles os maiores e sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha família, ao meu irmão, Alcides Jr., meus tios e tias, em especial à minha tia Cida por todo auxílio até então e à minha madrinha, Zilda pelo carinho e atenção que sempre me foi dado. Obrigada!

Agradeço aos meus amigos queridos. Aos meus amigos de infância que sempre me apoiaram, apesar da distância. Aos meus amigos-irmãos que tive a magnífica oportunidade de conhecer. Em especial às meus amigos queridos, Cássia de Carvalho, Cristine de Paula, Izabella Coutinho, Isabella Diegues, Luana Santos, Luciana Marinho, Mariana Chagas, Natalia Cruz, Paulo Vítor e Sabrina Pereira que sempre estão ao meu lado, mesmo que à distância. Coisas mais lindas da minha vida!

Agradeço aos meus *roommates* (ex e oficiais), Eder Pires, Débora Hottz, Francine Valente, Francielle Graus e Milena Seibert, pela paciência esse tempo todo. Agradeço pela companhia e risadas garantidas! Muito obrigada!

Agradeço também a todos aqueles que participaram da minha formação, em especial à Genise Somner, Alexandra Pires, Ana Brasil, Lana Silvestre e Marilena Conde pelos incessantes estímulos para que continuasse a fazer o que queria e por serem exímios exemplos de profissionais. Muito obrigada!

Um agradecimento especial àqueles que estiveram comigo em muitos, momentos importantes, incluindo da minha formação. Obrigada à Rachel Montesinos, Gabriela Bittencourt, André Luiz Carvalho e Francisco Racca. Vocês, herpetólogos e entomólogo preferidos, são muito especiais na minha vida!

Àquele que não me deixou desistir da academia e sempre me incentivou. Muito obrigada Helio Ricardo da Silva. Obrigada, meu caro amigo! Obrigada por ter aceitado ser

meu co-orientador e por ter me ajudado tanto ao longo do mestrado. Sem palavras...

Agradeço à Claudia Russo por tudo. Obrigada por ter me recebido no laboratório e pela orientação ao longo desse tempo. Foi uma experiência fabulosa! Realmente aprendi muito, de muitas coisas, e isso tudo porque você me disse sim. Obrigada!

Agradeço aos professores do LBETA, Carlos Schrago e Carolina Voloch pelas inúmeras vezes que me ajudaram e, certamente, contribuíram muito para minha formação. Sou realmente grata!

Aos integrantes do LBETA (ex e-atuais), André, Bárbara, Júlio, Letícia, Lucas, Noemi, Olívio, Silvia, Ricardo e mais quem eu possa ter esquecido, pela companhia, inúmeras ajudas e trocas de ideias. Foi realmente maravilhoso encontra-los! Um agradecimento especial para Alexandre, Anieli e Beatriz por TUDO! Pela companhia, amizade, pelas trocas de ideia, pelos desabafos e todas as outras coisas que espero continuar pro resto da vida trocando com vocês! Muito obrigada!

À todos os professores e alunos no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. Obrigada pelas inúmeras contribuições para minha formação.

Por fim, agradeço à TODOS aqueles que estiveram, estão e estarão presentes na minha vida acadêmica. Muito obrigada!

## **Resumo**

# **Abstract**

# Sumário

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
Lista de Figuras .....	11
Lista de Tabelas.....	14
Lista de Anexos .....	15
<b>1. Introdução .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Neobatrachia: diversidade e distribuição.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. Um breve histórico da taxonomia e sistemática de Neobatrachia Reig, 1958.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3. Evolução de Neobatrachia no tempo e espaço .....</b>	<b>24</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Referência taxonômica e dados moleculares.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Alinhamentos e construção da supermatriz .....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Alinhamento .....	28
3.2.2. Modelo evolutivo .....	29
3.2.3. Construção da supermatriz .....	32
<b>3.3. Reconstrução filogenética .....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Máxima Verossimilhança (ML).....	35
3.3.2. Inferência Bayesiana (BI).....	39
<b>3.4. Inferência do tempo de divergência .....</b>	<b>42</b>
3.4.1. Relógio molecular e inferência do tempo de divergência de linhagens .....	42
3.4.2. Inferência do tempo de divergência de Neobatrachia .....	44
3.4.2.1. Calibrações .....	46
3.4.2.2. Testes das calibrações .....	49
<b>3.5. Análise biogeográfica .....</b>	<b>52</b>
3.5.1. Lagrange: dados e análise.....	57
3.5.1.1. Primeiro intervalo de tempo delimitado (IT1), antes de 120 Ma (Jurássico Médio-Superior ao Barremiano, Cretáceo Inferior, Figura 15a). .....	59
3.5.1.2. Segundo intervalo de tempo delimitado (IT2), antes de 90 Ma (Aptiano, Cretáceo Inferior ao Turoniano, Cretáceo Superior, Figura 15b). .....	62
3.5.1.3. Teceiro intervalo de tempo delimitado (IT3), antes de 60 Ma (Turoniano, Cretáceo Superior ao Daniano, Paleoceno Inferior, Figura 15c). .....	63
3.5.1.4. Quarto intervalo de tempo delimitado (IT4), antes de 30 Ma (Daniano, Paleoceno Inferior ao Rupeliano, Oligoceno Inferior, Figura 15d). .....	63
3.5.1.5. Quinto intervalo de tempo delimitado (IT 5), depois de 30 Ma (Rupeliano, Oligoceno Inferior ao Neogeno, Figura 15e).....	64
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Relações filogenéticas de Neobatrachia .....</b>	<b>65</b>
4.1.1. Clado A.....	67
4.1.2. Clado B.....	68
<b>4.2. A evolução de Neobatrachia no espaço e tempo .....</b>	<b>70</b>
4.2.1. A diversificação do clado A e a evolução do leste da Gondwana .....	77
4.2.2. A diversificação do clado B e a evolução do oeste da Gondwana .....	82

4.2.3. Diversificação de Neobatrachia foi maior após transição Cretáceo-Paleógeno (K-Pg), com aumento acentuado no Eoceno .....	87
<b>5. Considerações Finais .....</b>	<b>93</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>95</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1: Representação da diversidade de dos anfíbios atuais (Lissamphibia). a: *Hyalinobatrachium taylori* (Anura), ©Pedro Peloso; b: *Rhinella arenarum* (Anura), ©Mirco Solé; c: *Dendrobates tinctorius* (Anura), ©John White; d: *Microcaecilia taylori* (Gymnophiona), ©Pedro Peloso; e: *Salamandrina terdigitata* (Caudata), ©Wouter Beukema. Todas as imagens utilizadas estão depositadas no banco de dados de imagens de organismos CalPhotos (<http://calphotos.berkeley.edu/>)..... 17
- Figura 2: Representação filogenética dos Anura mostrando o parafiletismo de Archaeobatrachia. Topologia modificada de Pyron e Wiens (2011) com taxonomia vigente (Frost 2013)..... 18
- Figura 3: Distribuição de Neobatrachia no mundo. Neobatrachia é um grupo que ocorre em todo o planeta, com exceção de regiões extremas do planeta e Nova Zelândia. Mapa construído de acordo com as distribuições informadas em Frost (2013) e Vitt e Caldwell (2009)..... 19
- Figura 4: Representação da diversidade dos grandes linhagens de Neobatrachia. Nasikabatrachidae + Sooglossidae – a: *Nasikabatrachus sahyadrensis*; ©Biju Das, b: *Sechelophryne pipilodryas*, ©Dr. Justin Gerlach. Ranoides – c: *Breviceps adspersus* (Allopadanura, Afrobatrachia), ©Thomas Eimermacher; d: *Microhyla heymonsi* (Allopadanura, Microhylidae), ©Wouter Beukema; e: *Rhacophorus reinwardtii* (Natananura), ©Twan Leenders. Heleophrynidae – f: *Heleophryne regis*, ©Miguel Vences. Australobatrachia – g: *Calyptocephalella gayi*, ©Sergio Bitran M.; h: *Limnodynastes peronii*, ©Eric Vanderduys; i: *Myobatrachus gouldii*, ©Evan Pickett. Nobleobatrachia – j: *Dendropsophus tritaeniatus*, ©Thiago R. Carvalho. Todas as imagens utilizadas estão depositadas no banco de dados de imagens de organismos CalPhotos (<http://calphotos.berkeley.edu/>) e Flickr (<http://www.flickr.com/>). .....21
- Figura 5: Esquemas das relações filogenéticas propostas para os clados internos de Neobatrachia. As filogenias são esquemas das árvores dos trabalhos referenciadas à cada uma delas sumarizadas. As filogenias foram ordenadas cronologicamente e são as duas com maiores amostragens taxonômicas já realizadas..... 23
- Figura 6: Iconografia dos fósseis utilizados para calibrar a inferência de tempo de divergência. a: *Eleutherodactylus* (Poinar Jr & Singer 1987); b: *Indobatrachus* (Noble 1930); c: *Rhadinosteus parvus* (Henrici 1998). .....47
- Figura 5 Filogenia proposta por Henrici (1998) para a linhagem “Pipoidea” (Modificada de Henrici, 1998).....48
- Figura 8: Representação gráfica das distribuições da idade da raiz em cada uma das diferentes combinações de calibrações..... 50
- Figura 9: Representação gráfica da sobreposição dos valores das idades médias dos nós das três diferentes análises conduzidas nesta dissertação. ....50
- Figura 10: Representação gráfica da distribuição das posteriores para a idade da raiz na combinação com os três fósseis selecionados. A distribuição normal em torno de 150 Ma refere-se à análise que incluiu a supermatriz; o histograma localizado em 200 Ma refere-se à inferência da idade da raiz da análise que incluiu apenas a informação priori. Ma – milhões de anos. .... 52
- Figura 11: Ilustração do mecanismo utilizado por métodos probabilísticos que assumem uma matriz baseada em modelo de Markov. A e B são áreas geográficas discretas. A figura mostra, com um exemplo de vicariância, como um método probabilístico infere o a distribuição ancestral de um nó, dada uma filogenia datada. Na matriz DAB refere-se à dispersão da A para área B, DBA à dispersão da área B para a área A, EA à extinção na

- área A e EB à extinção na área B (modificado de SanMartín, dados não publicados).....54
- Figura 12: Ilustração demonstrando a lógica do método DEC. Assumindo o modelo de Markov, uma matriz instantânea da taxa de dispersão e extinção (Q) é construída com base na conexão entre as áreas de distribuição dos táxons. A partir dessa matriz Q, a probabilidade com base na Máxima Verossimilhança da inferência das distribuições ancestrais é calculada dada a filogenia datada e o comprimento de ramo da árvore. O esquema à direita mostra uma filogenia de um grupo hipotético. Quanto maior o comprimento de ramo, maior o tempo e maior a possibilidade de mudanças de distribuição geográfica é associada à inferência da distribuição ancestral para cada nó da filogenia. Os grafos circulares representam a probabilidade da distribuição ancestral para cada nó ter sido na área A ou na área B (modificado de SanMatín, dados não publicados).  
.....55
- Figura 13: Ilustração dos possíveis eventos reconstruídos por DEC. São mostrados eventos anagenéticos e cladogenéticos. As diferentes gradações das cores representam a diferenciação das populações ao longo de eventos biogeográficos. Modificado de Ronquist e SanMartín (2011).....56
- Figura 14: Regiões biogeográficas utilizadas no estudo de Neobatrachia. A: Neártica; B: Neotropical+Panamaniana; C: Paleártica; D: Saaro-Arabiana; E: Afrotropical; F: Madagascariana; G: Oriental+Sino-Japonesa; H: Australiana+Oceânica. ....58
- Figura 15: Modelo paleogeográfico utilizados na análise biogeográfica para Neobatrachia utilizando o Lagrange (REE; SMITH, 2008). São mostrados os cinco intervalos de tempo (IT) delimitados e suas respectivas matrizes de dispersão, refletindo as probabilidades de conectividade ao longo do tempo. ....61
- Figura 16: Filogenia reconstruída sob os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) com o programa RAxML 7.3.2 e Inferência Bayesiana com o programa MrBayes 3.1.2 disponíveis no servidor online CIPRES. Esta topologia foi encontrada pelo método de ML. Os nós reconstruídos no método bayesiano concordantes com a topologia de ML apresentam os valores de probabilidade posterior próximo aos nós. Ramos destacados em colorido serão descritos e discutidos. Grupos monofiléticos são mostrados em negrito. Nomes próximos aos terminais ou nos terminais são famílias ou superfamílias reconstruídas como monofiléticas (negrito/italico). Nomes próximos aos nós ou sobre ramos representam grupamentos taxonômicos definidos por Frost et al. (2006), aqui reconstruídos como monofiléticos. Círculos brancos representam valores de bootstrap iguais a 100, o círculo preto representa esses valores referentes à bootstrap menores do que 100 e maiores ou iguais a 75. Aqueles nós com valores menores do que 75 ou que não foram reconstruídos no método bayesiano não apresentam nenhuma representação.  
.....67
- Figura 17: Cronograma de Neobatrachia inferido no programa BEAST. Números nos nós são referências para as idades inferidas aqui disponíveis no Anexo 1. Nomes em negrito referem-se às famílias amostradas e os em letras normais às subfamílias da família Microhylidae.....74
- Figura 18: Cenário da disposição dos continentes que compunham a Gondwana no Cretáceo Inferior. As regiões sombreadas em cinza referem-se às possíveis áreas ocupadas pelo ancestral Neobatrachia neste período. A seta representa uma possível rota de conexão entre as diferentes massas continentais via Antártica. Mapa modificado de Scotese (2002).....74
- Figura 19: Cronograma com a reconstrução biogeográfica de Neobatrachia inferida pelo método DEC. Os retângulos ao lado dos terminais representam a distribuição atual dos táxons utilizados na análise. Os quadrados nos nós representam as áreas ancestrais reconstruídas. Foram informadas as reconstruções de áreas ancestrais mais verossímeis

- para cada nó. \*segunda inferência mais verossímil. O intervalo de tempo referente ao Eoceno, quando ocorreram as maiores temperaturas do Cenozóico, foi sombreada. A linha vermelha representa a transição Eoceno-Oligoceno, período quando ocorreu a primeira glaciação no Cenozóico. .... 77
- Figura 20: Esquema mostrando as diferentes conexões entre Índia e Seicheles ao longo do tempo. Modificado de Chatterjee; Goswami; Scotese, (2013). .... 78
- Figura 21: Figura mostrando a divergência entre a família indiana Nasikabatrachidae e a seichelense Sooglossidae no espaço-tempo. Os esquemas acima do cronograma referem-se às separações das massas continentais Madagascar (MA), Seicheles (Sei), Ponte Laxmi (PL) e Índia ao longo do tempo, modificado de Chatterjee, Goswami e Scotese (2013). .... 79
- Figura 22: Representação gráfica da inferência biogeográfica para o clado B. Os quadrados nos nós representam a distribuição do ancestral para cada linhagem. Os círculos azuis destacam as divergências marcadas por possíveis eventos vicariantes entre Neotrópico e Austrália. Os mapas mostram as distribuições e possíveis rotas de ampliação de distribuição do ancestral. O primeiro mapa refere-se à diversificação do ancestral da linhagem Heleophrynidae mais Australobatrachia no Neotrópico, com posterior possível ampliação de distribuição do ancestral para o sul da África e Austrália, referindo-se ao ancestral de Heleophrynidae e Limnodynastidae mais Myobatrachidae, respectivamente. O segundo mapa representa a segunda conexão entre Neotrópico e Austrália, no Eoceno. O terceiro mapa refere-se à ampliação da distribuição do ancestral Bufonidae na transição Eoceno-Oligoceno até o Mioceno. A linha vermelha delimita a transição Eoceno-Oligoceno, quando ocorreu a primeira glaciação do Cenozóico. .... 84
- Figura 23: Gráfico relacionando as diversificações de Neobatrachia ao longo do tempo. A linha contínua representa o número de divergências ocorridas em Neobatrachia. As linhas descontínuas representam o número de famílias de Neobatrachia divergindo ao longo do tempo. A linha tracejada em vermelho, representa a transição Cretáceo-Paleógeno. A linha em azul representa a variação climática medida de acordo com a concentração de isótopo de oxigênio 18 ao longo do Cenozóico, modificado de Zachos (2001). Ma: milhões de anos. .... 87
- Figura 24: Esquema ilustrando a hipótese da manutenção do nicho tropical. Do lado esquerdo, está representado o número de espécies de um dado grupo em um dado local, assumindo variações ambientais, neste caso com variação de temperatura representada pelo gradiente em vermelho. Do lado direito, a ilustração direta da hipótese da manutenção do nicho tropical, onde existe mais diversidade associada aos trópicos, onde as que estão nas regiões temperadas são derivadas desta. Modificado de Wiens e Donoghue (2004). 90
- Figura 25: Filogenia com a distribuição atual dos táxons de Neobatrachia por regionalização. Como destacado no texto, a maior parte da diversidade das linhagens viventes encontram-se distribuídas nos trópicos (em vermelho). Existe pouca diversidade restritas às regiões temperadas (em azul) ou em ambas as regiões (em roxo). .... 91

## Lista de Tabelas

- Tabela 1: Tabela comparativa da diversidade dos vertebrados. As referências utilizadas foram disponibilizadas abaixo da tabela. .... 16
- Tabela 2: Tabela mostrando a taxonomia definida por Frost et al. (2006). A última coluna refere-se às famílias que compõem cada clado. i.s. insert sedis.....22
- Tabela 3: Tabela com as características das diferentes supermatrizes construídas neste trabalho. N = número de táxons na matriz; Comp (pb) = comprimento do alinhamento em pares de base; Gblocks = edição dos alinhamentos individualmente no Gblocks; Sobreposição = todos os táxons sendo comparados na supermatriz (sobreposição taxonômica); MD (%) = missing data total da matriz ..... 33
- Tabela 4: Tabela com os genes utilizados, tamanhos, posições relativas no alinhamento concatenado (supermatriz) e valor proporcional do número de taxa representantes para cada gene na matriz. A marcação em cinza mostra genes mitocondriais e em branco, genes nucleares. c-myc (mielocitomatose celular éxon), cyt-b (citocromo b), H3A (histona 3a), ND1 (NADH desidrogenase subunidade 1), POMC (pro-opiomelanocortina), RAG-1 (gene de ativação de recombinação 1), RHOD (rodopsina), TyrPrecur (precursor de tirosinase), 12S, 16S e 28S..... 34
- Tabela 5: Tabela mostrando os fósseis utilizados neste trabalho com respectivas informações taxonômicas, idade em milhões de anos (Ma), estrato geológico, localidade e publicação. ....47
- Tabela 6: Tabela com as idades estimadas para as divergências de linhagens aqui utilizadas. Estão representadas as estimativas de tempo para cada uma das três combinações de calibração e respectiva inferência sem a supermatriz. Os valores entre colchetes representam o intervalo de 95% de confiança da idade média encontrada para cada um dos nós. 1. Inferência sem o prior para a raiz; 1.1. Inferência sem o prior para a raiz e sem a supermatriz. 2. Inferência sem o prior de Myobatrachidae; 2.1. Inferência sem o prior de Myobatrachidae e sem a supermatriz. 3. Inferência com as três calibrações; 2.1. Inferência com as três calibrações e sem a supermatriz. .... 51
- Tabela 7: Tabela comparativa entre os valores do tempo de divergência em milhões de anos de algumas linhagens de Neobatrachia. São mostrados os valores de divergência das linhagens ramo e do grupo coroa para cada uma das linhagens. Os valores entre colchetes referem-se aos intervalos de confiança para cada uma das inferências de tempo em milhões de anos. Os valores apresentados deste trabalhos referem-se aos inferidos utilizando os três pontos de calibração inicialmente selecionados. \*Foram utilizadas as idades de Roelantes et al. (2007) por inferência de ML; \*\*As idades médias foram as informadas pelos autores e referem-se à média aritmética das idades médias encontradas nas duas análises conduzidas pelos autores, onde o intervalo de confiança disponibilizado referem-se às médias aritméticas dos valores mínimo e máximo de cada uma das análises (os valores das idades mínimas e máximas foram calculadas com base nos resultados encontrados pelos autores e disponibilizado por eles no material suplementar do artigo); - informações de estimativa do tempo de divergência ausentes. 72

## Lista de Anexos

- Anexo 1: Tabela com as idades inferidas para cada um dos nós da filogenia aqui reconstruída de Neobatrachia. Os valores referem-se às idades inferidas com combinação de três calibrações, a utilizada aqui como final. As idades estão expressas em milhões de anos. ic: intervalo de confiança; min: mínimo; máx: máximo..... 111
- Anexo 2: Escala de tempo geológico da Sociedade de Geologia da América. Esta é a versão de 2012. .... 114
- Anexo 3: Tabela com as informações taxonômicas e distribuição geográfica dos táxons aqui utilizados para investigar a história evolutiva de Neobatrachia. Os números entre parênteses representam o número total que representam os táxons. i.s.: táxons insert sedis. AT, Afrotropical: todos os países da África Subsaariana; AU, Australian: região australiana e ilhas adjacentes; MA, Madagascan: Madagascar e ilhas adjacentes, incluindo Seychelles, Mauritius e Reunion; NA, Nearctic: América do Norte, exceto o sul do México e extremo norte do Canadá e Groelândia; NT, Neotropical: América do Sul e ilhas adjacentes; OC, Oceanian: Papua Nova Guiné e ilhas adjacentes; OR, Oriental: sudeste Asiático mais Índia, Sri Lanka, Bangladesh, Butão, Nepal e Paquistão; PA, Palearctic: todos os países europeus e asiáticos, exceto sul da China, sudeste asiático e Índia, Bangladesh, Butão, Japão, Nepal, Paquistão e Sri Lanka; PM, Panamanian: América Central e ilhas adjacentes; S-A, Saharo-Arabian: norte da África, exceto Sudão mais Oriente Médio; SJ, Sino-Japanese: região Tibetana, região sul da China e Japão. 115

## 1. Introdução

### 1.1. Neobatrachia: diversidade e distribuição

Os anfíbios vivos representam um dos grupos mais diversos de vertebrados terrestres, com uma estimativa de 7.044 espécies descritas (Tabela 1). O grupo é reconhecido como Lissamphibia Haeckel, 1866 e está subdividido em três ordens: Gymnophiona (192 espécies) (Figura 1 d), Caudata (652 espécies) (Figura 1 e) e Anura (6.200 espécies) (Figura 1 a-c). As relações de Lissamphibia com outros anfíbios extintos ainda não foram claramente estabelecidas. Distintas hipóteses indicam Lissamphibia pode ser monofilético (ver CARROLL, 2001; HEDGES; MAXSON, 1993; PYRON, 2011) ou parafilético (ver CARROLL, 2001; FONG et al., 2012) em relação aos outros anfíbios.

**Tabela 1:** Tabela comparativa da diversidade dos vertebrados. As referências utilizadas foram disponibilizadas abaixo da tabela.

	<b>Táxon</b>	<b>Número</b>	<b>(%)</b>
Anfíbios <sup>1</sup>			
	Anura	6.200	11,1
	Caudata	652	1,2
	Gymnophiona	192	0,3
Repteis <sup>2</sup>			
	Testudinia	328	0,6
	Lepidosauria	9.229	16,5
	Crocódilia	25	0,04
	Amphisbaenia	184	0,3
	Aves <sup>3</sup>	10.488	18,7
Mamíferos <sup>4</sup>			
	Mammalia	5.416	9,7
Outros Vertebrados			
		23.286	42
<b>TOTAL</b> #		<b>56.000</b>	

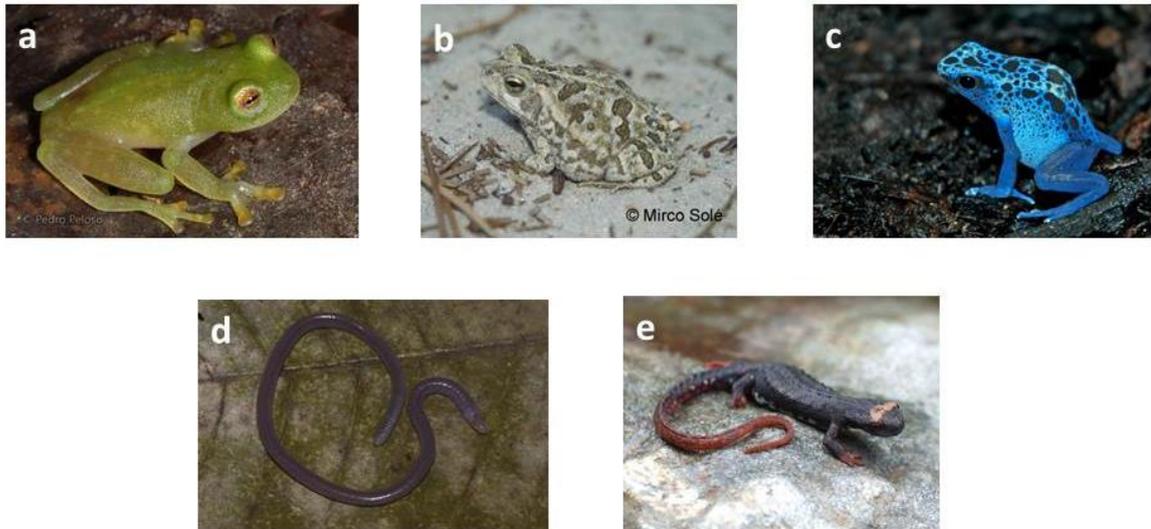
1 - Amphibia Species of the World 5.6- <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>

2 - The Reptile database - <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>

3 - The IOC World Bird List - <http://www.worldbirdnames.org/>

4 - Mammal Species of the World - [http://vertebrates.si.edu/msw/mswCFApp/msw/about\\_introtable.cfm](http://vertebrates.si.edu/msw/mswCFApp/msw/about_introtable.cfm)

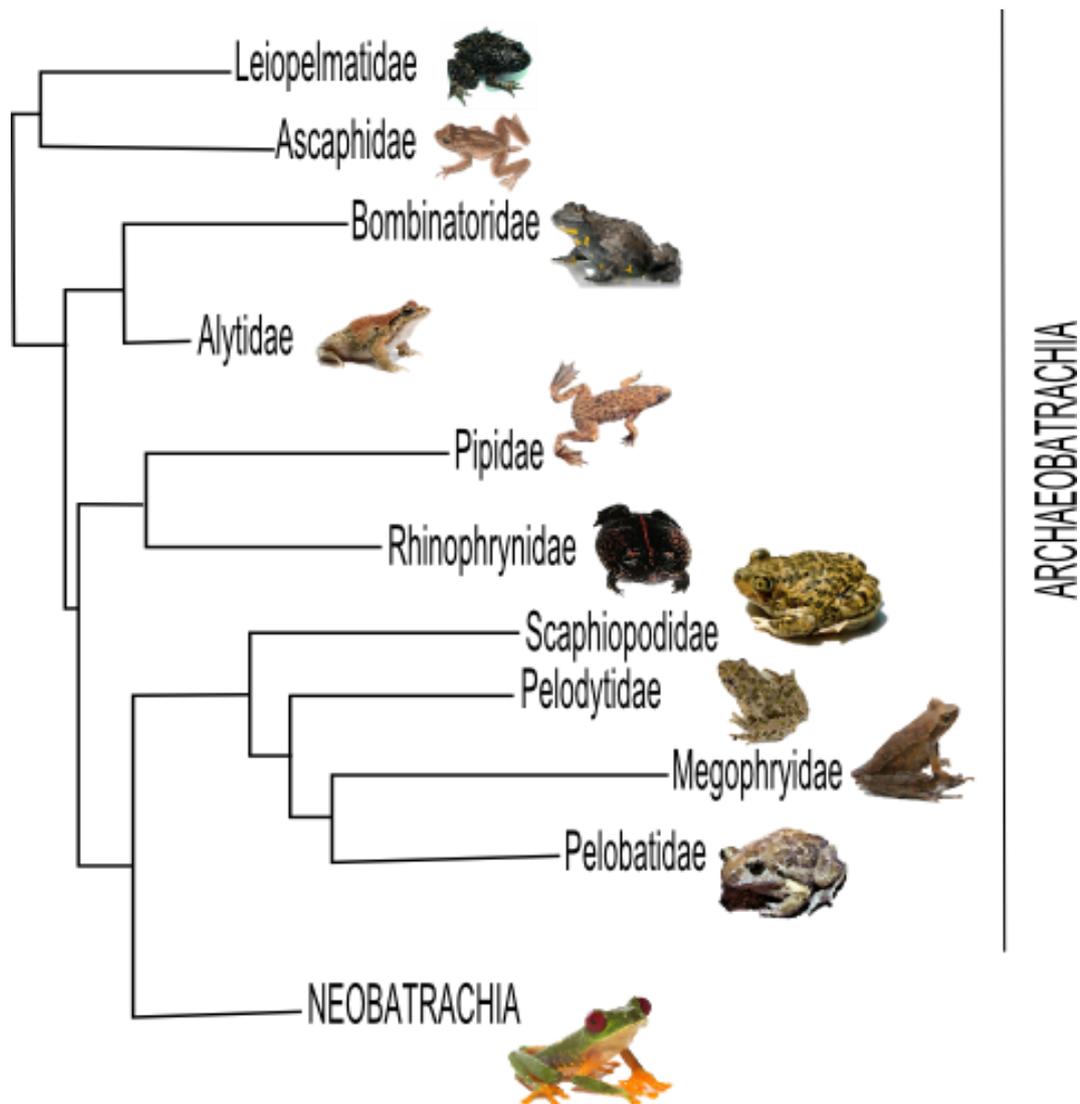
# - (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), A vida dos vertebrados, pag. 2.



**Figura 1:** Representação da diversidade de dos anfíbios atuais (Lissamphibia). **a:** *Hyalinobatrachium taylori* (Anura), ©Pedro Peloso; **b:** *Rhinella arenarum* (Anura), ©Mirco Solé; **c:** *Dendrobates tinctorius* (Anura), ©John White; **d:** *Microcaecilia taylori* (Gymnophiona), ©Pedro Peloso; **e:** *Salamandrina terdigitata* (Caudata), ©Wouter Beukema. Todas as imagens utilizadas estão depositadas no banco de dados de imagens de organismos CalPhotos (<http://calphotos.berkeley.edu/>).

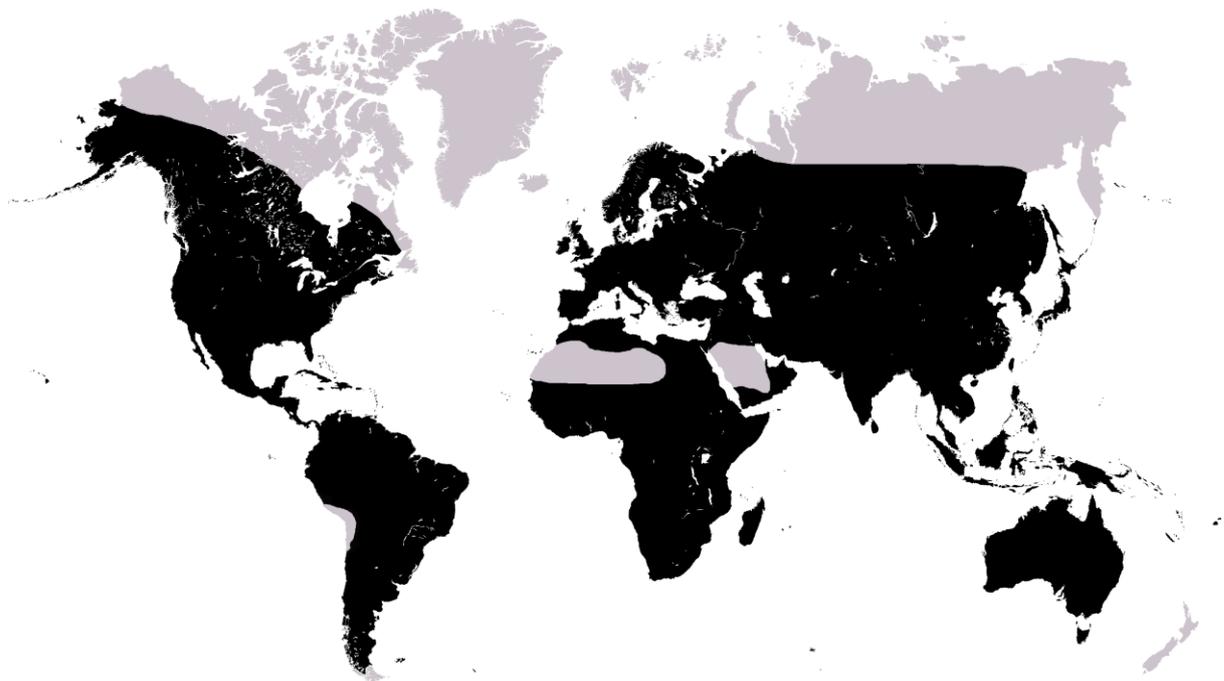
Apesar da maioria das espécies serem conhecidas dos trópicos, uma diversidade de anfíbios considerável também ocorre em ambientes temperados a frios (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST *et al.*, 2006; FROST, 2013; POUGH; JANIS; HEISER, 2008). No caso dos Anura, existe uma alta diversidade de modos reprodutivos (ver HADDAD; PRADO, 2005). Essa diversidade de locais onde anuros se reproduzem está associada à especialização destes, o que os tornam suscetíveis a mudanças bruscas nestes ambientes.

A ordem Anura é subdividida em Archaeobatrachia, os “sapos primitivos” e Neobatrachia, também conhecido como o clado dos “sapos modernos” (ver FROST *et al.*, 2006; LYNCH, 1973). O Archaeobatrachia é um grupo parafilético (ver ROELANTS; BOSSUYT, 2005) representado por todos os anuros não-Neobatrachia (Alytidae, Ascaphidae, Bombinatoridae, Leiopelmatidae, Megophryidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Pipidae, Rhinophrynidae e Scaphiopodidae) (Figura 2). Este é um grupo menos diverso em relação aos Neobatrachia representando aproximadamente 4% da diversidade de Anura (FROST, 2013; ROELANTS; BOSSUYT, 2005), distribuídos nas Américas, África, Europa, Ásia, incluindo todo Sudeste Asiático e Nova Zelândia (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013).



**Figura 2:** Representação filogenética dos Anura mostrando o parafiletismo de Archaeobatrachia. Topologia modificada de Pyron e Wiens (2011) com taxonomia vigente (Frost 2013).

Neobatrachia é um grupo monofilético (e.g. FORD; CANNATELLA, 1993; FROST et al., 2006; PYRON; WIENS, 2011) representado pela maioria dos anuros vivos. É composto por 5.965 das 6.200 espécies de anuros descritas. Entre os demais vertebrados, este número representa 10% da diversidade conhecida. Entre os anfíbios, Neobatrachia contém 85% da diversidade conhecida e 96% das espécies de anuros (Tabela 1). Neobatrachia contém 44 famílias e tem espécies distribuídas em todo o globo, com exceção de algumas regiões extremas (como ilhas oceânicas) e Nova Zelândia, onde existem espécies do gênero *Litoria* introduzidos (Figura 3).



**Figura 3:** Distribuição de Neobatrachia no mundo. Neobatrachia é um grupo que ocorre em todo o planeta, com exceção de regiões extremas do planeta e Nova Zelândia. Mapa construído de acordo com as distribuições informadas em Frost (2013) e Vitt e Caldwell (2009).

Embora a diversidade de Neobatrachia seja há muito reconhecida e esteja refletida em um conjunto nomenclatural complexo (ver Frost, 2013), pouco sabemos dos aspectos básicos ligados a evolução do grupo. Existem poucos estudos relacionados a origem e à história de diversificação deste grupo. Os fósseis mais antigos, claramente relacionados à Neobatrachia, datam do Cretáceo e indicam que durante este período o grupo já havia começado a diversificar e se encontrava estabelecido na África, na América do Sul, Índia e Madagascar (ver BÁEZ et al., 2012).

Pelo fato de Neobatrachia ser um grupo muito diverso, representativo dentre os anfíbios e distribuído por todo o globo, inclusive em locais remotos, como ilhas oceânicas, compreender a história evolutiva deste grupo torna-se relevante. Como é um grupo dependente de disponibilidade de habitats úmidos, é possível associar a história evolutiva de Neobatrachia com a história do planeta.

## 1.2. Um breve histórico da taxonomia e sistemática de Neobatrachia Reig, 1958

Estudos que investigassem a sistemática e taxonomia de anuros, inclusive de Neobatrachia, começaram a buscar uma perspectiva filogenética a partir da metade do século XX (FARRIS; KLUGE; MICKEVICH, 1982; INGER, 1967; KLUGE; FARRIS, 1969; LYNCH, 1971, 1973). Até o início a década de 1990, todos os trabalhos propostos em ampla escala para anuros incluíam apenas caracteres morfológicos. A partir deste período, começaram a surgir trabalhos que também utilizavam caracteres moleculares para entenderem a história evolutiva dos anfíbios de uma forma geral (e.g. CANNATELLA; HILLIS, 1993).

Estudos com objetivo de compreender a evolução de anfíbios anuros com uma abordagem molecular aumentaram consideravelmente na década do ano 2000 (BIJU; BOSSUYT, 2003; BOSSUYT *et al.*, 2006; FROST *et al.*, 2006; HOEGG *et al.*, 2004; HUA *et al.*, 2009; PRAMUK, 2006; PRAMUK *et al.*, 2008; ROELANTS; BOSSUYT, 2005; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; VAN BOCXLAER *et al.*, 2006). Com o advento da tecnologia de sequenciamento nos últimos anos, incremento das coletas e sequenciamento de tecidos de diversos grupos taxonômicos, seguido do desenvolvimento tecnológico para inferências sobre a história evolutiva das linhagens, possibilitou que os estudos pudessem incluir e avaliar, em curto espaço de tempo, um número cada vez maior de táxons. Esta tendência também está refletida nos estudos com anfíbios (e.g. FROST *et al.*, 2006; PYRON; WIENS, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; SAN MAURO, 2010).

O trabalho mais abrangente que incluiu anfíbios anuros foi o realizado por Frost e colaboradores (2006). Esta proposta possibilitou uma nova visão sobre a sistemática do grupo. Por esta razão, este trabalho passou a ser a referência em nomenclatura de anfíbios em diferentes níveis taxonômicos, (FROST, 2013). Estes autores utilizaram tanto dados moleculares (522 táxons, 7 genes, 2 mitocondriais e 5 nucleares; ca. 4.500 pares de base) quanto morfológicos (152 caracteres) derivados de um trabalho realizado anteriormente com caracteres de larvas (HAAS, 2003). Em adição aos nomes de gêneros e famílias, Frost e colaboradores também propuseram uma classificação sem *ranking*, não designando grupamentos taxonômicos maiores do que famílias. Desde então, a classificação utilizada para grupos taxonômicos mais inclusivos foi definida, inclusive para Neobatrachia.

A diagnose proposta por Frost e colaboradores (2006) para o táxon Neobatrachia Reig, 1958 seria a presença do músculo sartório distinto do músculo semitendinoso. A maior parte

da diversidade de Neobatrachia apresenta vértebra completamente ossificada. Outros caracteres que podem ser atribuídos a Neobatrachia seriam osso palatino, terço carpal distal fundido (convergente no gênero de Archaeobatrachia, *Pelodytes*), músculo adutor longo acessório na cabeça e ossificação para-hióide. A presença de osso palatino seria, na verdade, uma sinapomorfia de Acosmamura (Neobatrachia mais seu grupo irmão segundo Frost *et al.* 2006) e poderia ser considerado sinapomorfia de Neobatrachia (FORD; CANNATELLA, 1993; FROST *et al.*, 2006; HAAS, 2003).

Na classificação vigente para grandes grupos de Neobatrachia (FROST *et al.*, 2006), este grupo seria composto por três grandes linhagens, a família Heleophrynidae, Hyloides e Ranoides (Tabela 2). A família sul-africana Heleophrynidae (Figura 4 f) seria a linhagem irmã de todo o resto da diversidade de Neobatrachia (Figura 5 a). Ranoides (Figura 4 c-e) seria grupo irmão de Hyloides. Hyloides seria composto pelas linhagens Sooglossidae + Nasikabatrachidae (Figura 4 a-b) irmão de Australobatrachia (Figura 4 g-i) + Nobleobatrachia (Figura 4 j) (Figura 5 a). Australobatrachia é uma linhagem composta pelas famílias australianas Limnodynastidae e Myobatrachidae mais a família chilena Calyptocephalellidae (Figura 5 a).

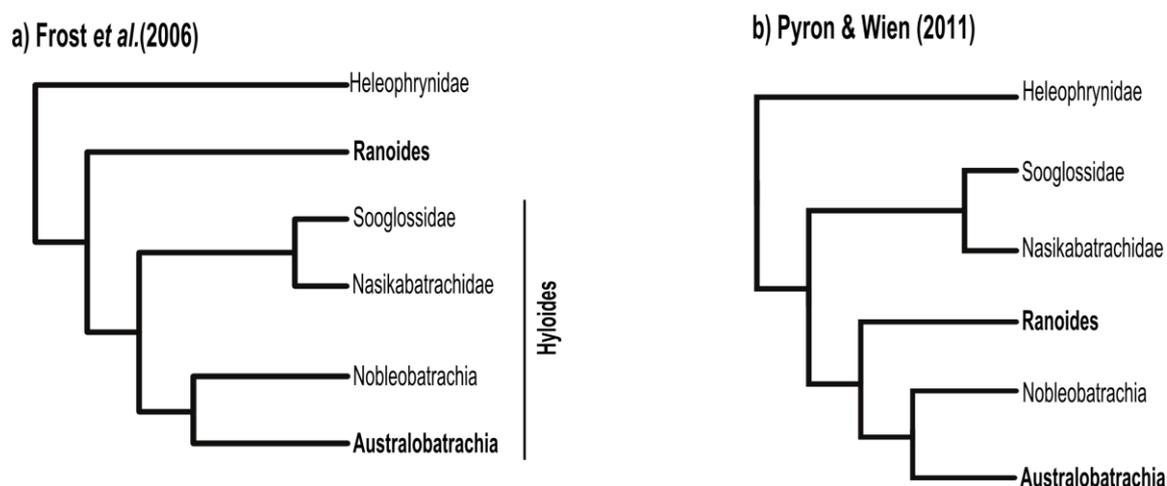


**Figura 4:** Representação da diversidade dos grandes linhagens de Neobatrachia. **Nasikabatrachidae + Sooglossidae** – **a:** *Nasikabatrachus sahyadrensis*; ©Biju Das, **b:** *Sechellophryne pipilodryas*, ©Dr. Justin Gerlach. **Ranoides** – **c:** *Breviceps adspersus* (Allopadanura, Afrobatrachia), ©Thomas Eimermacher; **d:** *Microhyla heymonsi* (Allopadanura, Microhylidae), ©Wouter Beukema; **e:** *Rhacophorus reinwardtii* (Natanura), ©Twan Leenders. **Heleophrynidae** – **f:** *Heleophryne regis*, ©Miguel Vences. **Australobatrachia** – **g:** *Calyptocephalella gayi*, ©Sergio Bitran M.; **h:** *Limnodynastes peronii*, ©Eric Vanderduys; **i:** *Myobatrachus gouldii*, ©Evan Pickett. **Nobleobatrachia** – **j:** *Dendropsophus tritaeniatus*, ©Thiago R. Carvalho. Todas as imagens utilizadas estão depositadas no banco de dados de imagens de organismos CalPhotos (<http://calphotos.berkeley.edu/>) e Flickr (<http://www.flickr.com/>).

Tabela 2: Tabela mostrando a taxonomia definida por Frost *et al.* (2006). A última coluna refere-se às famílias que compõem cada clado. *i.s.* *insert sedis*.

<b>Neobatrachia</b>	
<b>i.s.</b>	Heleophrynidae
<b>Hyloides</b>	Nasikabatrachidae Sooglossidae
<b>Australobatrachia</b>	
	Calyptocephalellidae Limnodynastidae Myobatrachidae
<b>Nobleobatrachia</b>	
	Allophrynidae Alsodidae Aromobatidae Batrachylidae Brachycephalidae Bufonidae Centrolenidae Ceratophryidae Ceuthomantidae Craugastoridae Cycloramphidae Dendrobatidae Eleutherodactylidae Hemiphractidae Hylidae Hylodidae Leptodactylidae Odontophrynidae Rhinodermatidae Telmatobiidae
<b>Ranoides</b>	
<b>Allopadanura</b>	
	Microhylidae
<b>Afrobatrachia</b>	
	Hemisotidae Hyperoliidae Arthroleptidae Brevicipitidae
<b>Natatanura</b>	
	Ceratobatrachidae Conrauidae Mantellidae Micrixalidae Nyctibatrachidae Petroedetidae Phrynobatrachidae Ptychadenidae Pyxicephalidae Ranidae Ranixalidae Rhacophoridae

Além do trabalho de Frost e colaboradores (2006), recentemente foi realizado um estudo com o maior número de táxons para anfíbios já proposto (PYRON; WIENS, 2011) (Figura 5 b). Esses autores utilizaram uma matriz composta por 2.871 espécies, 12 genes mitocondriais e nucleares com mais de 12.000 pares de base, com uma porcentagem alta de *missing data* (ca. 80% da supermatriz). Esses autores propuseram outras relações filogenéticas entre as grandes linhagens de Neobatrachia (Figura 5 b), recuperando Ranoides dentro da diversidade de Hyloides, onde Sooglossidae + Nasikabatrachidae foram grupo irmão de (Ranoides (Australobatrachia, Nobleobatrachia)) (Figura 5 b). Naquele trabalho, foram propostas a validação de diversas famílias que foram encontradas como parafiléticas no trabalho de Frost e colaboradores (2006) e também encontraram Neobatrachia como um grupo natural. Algumas das alterações propostas por Pyron e Wiens (2011) foram incorporadas na última atualização da biblioteca *online Amphibian Species of the World* (FROST, 2013).



**Figura 5:** Esquemas das relações filogenéticas propostas para os clados internos de Neobatrachia. As filogenias são esquemas das árvores dos trabalhos referenciadas à cada uma delas sumarizadas. As filogenias foram ordenadas cronologicamente e são as duas com maiores amostragens taxonômicas já realizadas.

Apesar da existência das diversas propostas filogenéticas que incluíram Neobatrachia, algumas lacunas ainda persistem no entendimento da história evolutiva do grupo. No que diz respeito a isso, existem alguns relacionamentos entre os clados internos de Neobatrachia que, possivelmente, dependendo da amostragem taxonômica utilizada, mudam. Por exemplo, o posicionamento da família sul-africana Heleophrynidae pode mudar dependendo da proposta taxonômica. Existem propostas que recuperaram esta linhagem como grupo irmão de todos os Neobatrachia (e.g. CORREA et al., 2006; FROST et al., 2006; PYRON; WIENS, 2011;

ROELANTS et al., 2007), como grupo irmão da família australiana Myobatrachidae (BIJU; BOSSUYT, 2003) e como grupo irmão de (Myobatrachidae (Nobleobatrachia, Calyptocephalellidae)).

Neobatrachia representa o maior clado dos anuros atuais. É um grupo que apresenta alguns problemas quanto ao posicionamento de algumas linhagens, principalmente as grandes linhagens que a compõe. Compreender as relações evolutivas do grupo seria crucial para compreender sua distribuição no espaço ao longo do tempo. Nesta perspectiva, o presente trabalho inclui uma proposta para a história filogenética das grandes linhagens de Neobatrachia, utilizando uma supermatriz com baixo número de *missing data* e com uma ampla amostra da diversidade de Neobatrachia em nível de família.

### 1.3. Evolução de Neobatrachia no tempo e espaço

Eu tenho a sensação que muito do que se pensa do passado sobre singularidades de táxons de anuros – e outros animais – em diferentes continentes, tem sido influenciado por um equívoco, amplamente difundido, acerca da inabilidade desses animais atravessarem de um continente a outro. O trabalho com *Bufo* que meus colaboradores e eu fizemos sugere que sapos da América do Sul, América do Norte e Eurásia evoluíram virtualmente como se essas massas fossem todas uma só. A evidência também aponta para a habilidade de sapos se moverem de um continente a outro facilmente ao longo do Terciário e Quaternário. Se os sapos puderam fazer isso, muitos outros tipos de animais devem ter sido capazes de fazê-lo também. Além disso, novas evidências acerca da deriva continental agora fazem isto parecer provável, que a mais primitiva das linhagens de anuros se moveu juntamente com as respectivas massas de terra delas ou que as barreiras hídricas atravessadas eram menos extensivas do que as atualmente existentes. (BLAIR, 1973, p. 4)

Na segunda metade do século XX, a metodologia proposta por Hennig gerou questionamentos sobre as correlações entre os padrões temporais descritos pela sequência de cladogêneses nas árvores filogenéticas e a distribuição geográfica (HENNIG, 1966; NELSON; PLATNICK, 1981). Posteriormente a Hennig, Brundin (1966) utilizou esta ideia para compreender a distribuição geográfica de múltiplas clados. Em um segundo momento, estas ideias começaram a ser aplicadas para a construção de métodos biogeográficos (e.g. BROOKS, 1981, 1985, 1990). Este foi um marco nos estudos biogeográficos, já que a partir de então, a distribuição ao longo do espaço começou a ser associado com a evolução dos organismos. Após o advento do relógio molecular proposto na década de 1960 por Zuckerkandl e Pauling (1965, 1962), o tempo passa a ser incorporado na inferência da história

evolutiva das espécies. Neste sentido, a compreensão da história biogeográfica passou a ser mais completa.

Tendo em vista a diversidade de Neobatrachia, grupo este amplamente distribuído no planeta, muitos autores ficaram estimulados a investigar questões biogeográficas relacionadas a este grupo ou a clados menores pertencentes a ele (e.g. BÁEZ *et al.*, 2012; BIJU; BOSSUYT, 2003; BOSSUYT *et al.*, 2006; DE SÁ *et al.*, 2012; VAN BOCXLAER *et al.*, 2006; VENCES *et al.*, 2003). Como os registros fósseis mais antigos de Neobatrachia são encontrados em continentes austrais, existem hipóteses de que a evolução deste grupo estaria associada ao paleocontinente Gondwana (e.g. ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; SAN MAURO, 2010; VITT; CALDWELL, 2009). Esta proposta já foi pensada para alguns clado internos de Neobatrachia, onde alguns autores sugerem a diversificação de alguns clados como reflexo da separação de algumas massas continentais da Gondwana (e.g. BÁEZ *et al.*, 2012; DE SÁ *et al.*, 2012; DUELLMAN, 1970; FELLER; HEDGES, 1998; KURABAYASHI *et al.*, 2011; PRAMUK *et al.*, 2008; SAVAGE, 2002; VAN BOCXLAER *et al.*, 2006, 2010; VENCES *et al.*, 2003).

Por exemplo, Biju e Bossuyt (2003) descreveram um novo representante de anuros o qual mostrou-se relacionado com Neobatrachia. Esses autores propuseram que esta divergência seria em decorrência da separação da Índia da Ilha Seicheles, devido o grupo irmão de este grupo descrito estar nesta Ilha no Oceano Índico. No entanto, eles acharam uma divergência mais antiga do que a separação dessas duas massas continentais, tornando sua justificativa vicariante, ou seja, a separação das linhagens em consequência do surgimento de uma barreira geográfica, conjectural. Neste trabalho, a ausência de calibrações internas a Neobatrachia indica dúvidas acerca de tal datação, já que a presença de múltiplas calibrações dentro da diversidade investigada confere uma inferência mais acurada (ver HELED; DRUMMOND, 2012).

Nesta perspectiva, foram investigadas nesta dissertação a história biogeográfica de Neobatrachia, com base em inferência da distribuição ancestral das linhagens. Dado os resultados aqui obtivos com uma supermatriz molecular consistente e calibrações utilizando fósseis de identificação confiável, foi investigado se a diversificação de Neobatrachia está associado à eventos vicariantes gondwânicos. Dentre as questões estudadas estão (i) se a divergência entre a família indiana Nasikabatrachidae e a seichelense Sooglossidae reflete a separação entre Índia e Seichelese e (ii) se o padrão de distribuição observado hoje para Australobatrachia reflete uma conexão via Antática entre América do Sul e Austrália.

## 2. Objetivos

Tendo em vista o que foi apresentado anteriormente, o objetivo desta dissertação foi compreender as relações evolutivas entre das grandes linhagens de Neobatrachia, no tempo e espaço. Para isto, foram utilizadas diferentes conjuntos de informações de espécies do grupo e diferentes métodos analíticos afim de produzir hipóteses que deem conta tanto do padrão de diversificação do grupo como dos processos ligados à distribuição geográfica das espécies ao longo do tempo geológico.

Nesta perspectiva, foram propostas para o presente trabalho de mestrado (i) uma inferência da história filogenética das grandes linhagens de Neobatrachia usando uma matriz de caracteres moleculares composta por genes mitocondriais e nucleares; (ii) uma inferência do tempo de diversificação do grupo usando calibrações com fósseis inequivocamente identificados; e (iii) uma inferência sobre os padrões de distribuição geográfica das espécies de Neobatrachia, afim de compreender a história de diversificação do grupo no tempo e no espaço.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Referência taxonômica e dados moleculares

Os nomes de gênero e de família usado neste trabalho segue o *Amphibian Species of the World 5.6* (FROST, 2013), uma referência *online* para taxonomia de anfíbios atualizada periodicamente. Os nomes para táxons em níveis mais inclusivos ainda que não ranqueados seguem a proposta de Frost *et al.* (2006).

Após a delimitação taxonômica, foram identificados genes candidatos para a composição deste trabalho. Para isso foi realizada uma pesquisa no banco de dados *online* Phylota (Sanderson *et al.*, 2008), que agrupa sequências nucleotídicas disponibilizadas no banco de dados *online* GenBank (Benson *et al.*, 2007) por grupamento taxonômico. No Phylota, é possível identificar os genes disponíveis e a representatividade taxonômica para cada gene do grupo de interesse. Assim, foram escolhidos os genes nucleares c-myc (mielocitomatose celular), H3A (histona 3a), POMC (pro-opiomelanocortina), RAG-1 (gene de ativação de recombinação 1), RHOD (rodopsina), TyrPrecur (precursor de tirosinase),

ribossomal 28S; e os mitocondriais cyt-b (citocromo b), ND1 (NADH desidrogenase subunidade 1) e ribossomais 12S e 16S. Como a última atualização do Phylota foi em junho de 2011, genes disponibilizados no GenBank de junho de 2011 até a primeira quinzena de janeiro de 2013 foram amostrados. De todos os genes selecionados foram escolhidas as maiores sequências para representar cada táxon amostrado.

O grupo externo foi composto por *Bombina* (Bombinatoridae), *Pelobates* (Pelobatidae), *Pipa* e *Xenopus* (Pipidae). Gêneros representados por apenas uma sequência nucleotídica pequena, foram excluídos da análise. A tabela com todos os gêneros amostrados aqui com respectivas espécies representantes e números de acesso encontra-se disponível no endereço online (<https://copy.com/YqN1pZpJSFiN>) e no CD anexado. Para aumentar a diversidade amostrada sem comprometer o preenchimento da matriz, o monofiletismo em nível de gênero foi assumido. Nesse sentido, cada gênero pode ser representado por qualquer uma das suas espécies componentes. O grupo interno foi composto por gêneros do clado Neobatrachia, os quais foram selecionados em três etapas.

Para os dois grupos mais diversos de Neobatrachia, Ranoides e Nobleobatrachia, foi priorizada a seleção de gêneros sem ambiguidade de distribuição espacial para melhor resolução de futura análise biogeográfica. Inicialmente, foram selecionados táxons do clado Nobleobatrachia a partir de análise previamente realizada com todos os gêneros deste clado, onde para cada família reconstruída como monofilética até três representantes foram selecionados e para famílias parafiléticas todos os gêneros foram utilizados. Para Bufonidae foram selecionados todos os gêneros com representantes com sequências disponíveis no GenBank, já que trata-se de um grupo com ampla distribuição, mas caracterizado por endemismos, o que ajudaria na investigação biogeográfica. Para a seleção de representantes do clado Ranoides, não foi reconstruída uma filogenia para escolha dos táxons a serem utilizados, pois ao contrário de Nobleobatrachia, a taxonomia do grupo não apresenta muitas propostas distintas. Para cada família foram selecionados até três gêneros, com exceção daquelas monotípicas. Para a família Microhylidae foi selecionado um gênero de cada subfamília com sequência disponível. Para os clados restantes foram selecionados todos os gêneros com sequência nucleotídica disponíveis.

## 3.2. Alinhamentos e construção da supermatriz

### 3.2.1. Alinhamento

Sequências de espécies diferentes podem diferir por eventos de substituição ou eventos *indel*, ou seja, de inserção e deleção. Enquanto os primeiros não modificam o tamanho da sequência e não existe a necessidade de alinhamento, os eventos *indel* modificam o tamanho e o alinhamento se faz necessário (ROSENBERG, 2009). O alinhamento de sequências é um procedimento corriqueiro em estudos que comparem duas ou mais sequências moleculares. Para sequências alinhadas, assume-se que cada coluna nas sequências alinhadas é uma hipótese de homologia, ou seja, que os sítios de cada coluna compartilham uma história evolutiva em comum. Uma premissa obrigatória para garantir coerência é que as sequências alinhadas sejam homólogas.

Sequências para cada um dos marcadores selecionados foram submetidas ao procedimento individualmente de forma a aprimorar o alinhamento. Foi utilizada, para isso, a opção automática do algoritmo de alinhamento múltiplo de sequências do programa MAFFT 6 *online* (KATO; TOH, 2008).

Existem diferentes formas de um alinhamento múltiplo ser construído. O mais utilizado deles é o alinhamento progressivo das sequências. Neste método, são calculadas as distâncias genéticas entre cada par de sequências. A distância é calculada testando possibilidades de alinhamentos entre o par e para cada coluna, buscando maximizar as identidades e minimizar diferenças e *gaps*. Uma vez que a matriz de distâncias par a par é finalizada, uma árvore de distância é construída, utilizando *neighbor joining*, por exemplo. Inicia-se a seguir, o alinhamento múltiplo alinhando as sequências de acordo com os ramos da árvore de *neighbor joining*. As sequências com menores distâncias são alinhadas primeiro. Em seguida, são feitos alinhamentos entre conjuntos de sequências. Neste momento, se uma mudança é feita em uma das sequências de um grupo, todas as sequências deste grupo receberão a mudança, como a inserção de um nucleotídeo, por exemplo (KATO; TOH, 2008; NEI; KUMAR, 2000).

Uma derivação de tal método é o alinhamento iterativo. Neste caso, após o alinhamento progressivo, o algoritmo compara os valores de qualidade dos alinhamentos. Se o alinhamento realizado grupo-a-grupo for melhor do que o inicialmente realizado comparando

todos os pares de sequências, este substitui o alinhamento original e o processo de alinhamento continua até que o alinhamento grupo-a-grupo ao final do ciclo seja pior que o do início do ciclo (KATO; TOH, 2008). No caso do MAFFT 6 *online*, o algoritmo escolhido quando selecionada a opção de alinhamento automático, depende do tamanho das sequências utilizadas.

### 3.2.2. Modelo evolutivo

Modelos evolutivos são modelos matemáticos que representam o conjunto de pressupostos acerca da substituição de nucleotídeos ao longo do tempo. Eles associam probabilidades de substituição de um nucleotídeo para outro, o que permite escolher entre as diferentes hipóteses aquela que melhor se adequa para explicar os dados dispostos numa matriz de caracteres moleculares (POSADA, 2009). O processo de substituição nucleotídica segue o modelo de Markov, ou seja, o fato de um nucleotídeo ser observado num dado sítio num tempo  $t_1$  é independente do nucleotídeo que era observado neste mesmo sítio em um tempo  $t_0$  (SWOFFORD *et al.*, 1996). Isso significa que o fato de uma posição da sequência observada ser C independe dela ter sido em algum momento anterior A, C, T ou G. O que muda, dependendo do modelo evolutivo, é a probabilidade desta mudança ter acontecido.

Alguns desses modelos assumem que a probabilidade de substituição entre nucleotídeos acontece segundo, por exemplo, o modelo Jukes-Cantor (JC69). Neste caso, o modelo também é chamado de modelo de um parâmetro pois a probabilidade de substituição entre qualquer par de nucleotídeos é idêntica. Outros modelos, por outro lado, já particularizam substituições entre nucleotídeos diferentes que incluem taxas diferentes associadas a diferenças nas taxas de mutação e seleção natural de acordo com os nucleotídeos.

Um outro aspecto é o fato de que existe uma variação nas taxas de substituição ao longo dos sítios de uma mesma molécula. Por exemplo, as terceiras posições do códon evoluem mais rapidamente do que as duas primeiras, pois na última a degeneração é maior (70% das substituições na terceira posição do códon são sinônimas e não alteram aminoácido). Para corrigir tal variação, assume-se que cada sítio está evoluindo sob um dado modelo evolutivo associado a uma distribuição gamma ( $\Gamma$ ) como, por exemplo, JC69+ $\Gamma$ , HKY85+ $\Gamma$  e GTR+ $\Gamma$  (NEI; KUMAR, 2000; YANG; RANNALA, 2012).

De forma geral, modelos mais complexos tendem a se ajustarem mais aos dados, visto que apresentam mais parâmetros. No entanto, quando estes modelos são utilizados, um alto

número de parâmetros precisa ser estimado e mais erros são incluídos em cada estimativa pois o valor real do parâmetro não é conhecido e tem que ser estimado a partir dos dados (POSADA, 2009; STRIMMER; VON HAESLER, 2009).

O modelo evolutivo que melhor se adequa a um conjunto particular de sequências pode ser selecionado a partir de técnicas estatísticas. Para encontrar o modelo evolutivo dentro de um conjunto de modelos candidatos, diferentes abordagens podem ser utilizadas como *hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs)* e *information criteria* (POSADA, 2009).

A abordagem *hLRT* seleciona o modelo a partir da comparação entre os valores do logaritmo das verossimilhanças utilizando a estatística das taxas de verossimilhança (*LTR*). Se o valor do *LRT* for pequeno, significa que o modelo mais complexo não explica melhor os dados observados do que o modelo mais simples. Caso o valor do *LRT* seja significativamente alto, a conclusão é que a inclusão de parâmetros adicionais no modelo alternativo aumentou significativamente a verossimilhança dos dados, ou seja, o uso do modelo mais complexo é favorecido (POSADA, 2009).

Na abordagem *information criteria*, a seleção de modelos evolutivos inclui comparação simultânea de todos os modelos concorrentes, incluindo mais parâmetros apenas se o ganho em verossimilhança for acentuado. A abordagem do tipo *IC* pode ser do tipo *Akaike Information Criterion (AIC)* (AKAIKE, 1974) ou *Bayesian Information Criterion (BIC)* (SCHWARZ, 1978). O *AIC* mede a distância esperada entre o verdadeiro modelo esperado e o estimado com base nos valores de verossimilhança. O *AIC* seria a quantidade de informação perdida quando um determinado modelo de evolução nucleotídica é utilizado para aproximar o real processo de evolução molecular, sendo então o modelo com o menor valor de *AIC* selecionado. O *BIC* seria uma aproximação do fator de Bayes, ou seja, a relação entre a probabilidade posterior dos diferentes modelos no conjunto de modelos evolutivos comparados, onde dadas informações *a priori* uniformes para cada modelo concorrente, o modelo com menor valor de *BIC* será equivalente ao modelo com a maior probabilidade posterior (ABDO *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2010; POSADA, 2009).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que o desempenho de escolha do modelo evolutivo ser algumas vezes melhor pela abordagem *BIC* (e.g. ABDO *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2010), os modelos selecionados pela abordagem *BIC* foram similares em relação aos escolhidos com a abordagem *AIC*. Desta forma, a abordagem *AIC* foi escolhida para a seleção do modelo evolutivo nesta dissertação (ver POSADA; BUCKLEY, 2004).

O *jModelTest 2* (DARRIBA *et al.*, 2012) é uma ferramenta desenvolvida para a seleção

de modelos evolutivos que melhor se ajustam a evolução de sequências nucleotídicas. Nesta ferramenta, estão implementadas diferentes abordagens de seleção de sequências, incluindo *AIC*, *BIC* e *hLRT*. Os diferentes alinhamentos realizados aqui foram submetidos ao programa jModelTest 2, onde o modelo de evolução nucleotídica selecionado para quase todos os genes foi o GTR, incluindo a proporção de sítios invariáveis (I) e a distribuição  $\Gamma$  de variação entre os sítios para quase todos os genes. Para os genes H3A, RHOD e TyrPrecur, os modelos encontrados foram TIM1+ $\Gamma$ +I, TrN+ $\Gamma$ +I e TVM+ $\Gamma$ +I, respectivamente.

Apesar dos modelos evolutivos selecionados terem sido os mencionados anteriormente, o modelo escolhido como final para todos os genes foi o GTR+ $\Gamma$ +I, já que os programas selecionados para a realização das reconstruções filogenéticas não implementam todos os outros modelos encontrados. Como o jModelTest 2 apresentou a alternativa do GTR+ $\Gamma$ +I ser o segundo melhor modelo, a utilização deste é metodologicamente justificável.

O modelo evolutivo selecionado para os alinhamentos desta dissertação, o *general time-reversible model* (GTR), faz parte do grupo de modelos tempo-reversível juntamente com os modelos JC69, K80, F84, HKY85 e TN93 (YANG, 2006). Um modelo evolutivo será considerado tempo-reversível se a frequência das bases for  $\pi_A$ ,  $\pi_T$ ,  $\pi_C$ ,  $\pi_G$  e se a seguinte premissa for assumida:

$$\pi_i \text{Prob}(j | i, t) = \pi_j \text{Prob}(i | j, t)$$

onde  $i$  e  $j$  são os nucleotídeos A, T, C e G, sendo  $i \neq j$ . Isso significa que a probabilidade de começar com  $i$  em uma extremidade de um ramo e terminar com  $j$  em outro é a mesma probabilidade de começar com  $j$  e evoluir para  $i$ . Isto é, se ocorre um  $i$  em uma extremidade do ramo e  $j$  em outra, não existe nenhuma forma possível de saber qual seria a extremidade ancestral e qual seria a descendente. A reversibilidade é matematicamente conveniente e não existe nenhuma razão biológica que explique o porquê que modelos de mudança no DNA seriam reversíveis. No entanto, alguns modelos reversíveis se adequam bem a dados reais (FELSENSTEIN, 2004; YANG, 2006). A matriz de substituição GTR é:

$$Q = \{q_{ij}\} = \begin{bmatrix} \cdot & a\pi_C & b\pi_A & c\pi_G \\ a\pi_T & \cdot & d\pi_A & e\pi_G \\ b\pi_T & d\pi_C & \cdot & f\pi_G \\ c\pi_T & e\pi_C & f\pi_A & \cdot \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cdot & a & b & c \\ a & \cdot & d & e \\ b & d & \cdot & f \\ c & e & f & \cdot \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \pi_T & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \pi_C & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \pi_A & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \pi_G \end{bmatrix}$$

onde a diagonal de  $Q$  é determinado pelo requisito de que a soma de cada linha de  $Q$  seja

igual a zero. Esta matriz é caracterizada por nove parâmetros livres, as taxas de substituição  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$  e  $f$  e três parâmetros de frequências nucleotídicas (YANG, 2006).

A proporção de sítios invariáveis (I) representa uma parcela dos sítios que nunca variam. Quando a combinação  $\Gamma+I$  é utilizada, uma proporção dos sítios será invariável enquanto os sítios restantes terão suas taxas distribuídas de acordo com  $\Gamma$  (GU; FU; LI, 1995; YANG, 2006), como no modelo evolutivo selecionado para as análises filogenéticas descritas a seguir.

### 3.2.3. Construção da supermatriz

Para a realização de estudos filogenéticos utilizando caracteres moleculares pode-se usar uma supermatriz, que seria o uso de múltiplos genes compondo uma única matriz de caracteres. Esta é uma metodologia que tem sido muito utilizada nos últimos anos, já que, devido ao alto número de caracteres, existe um aumento no poder de resolução de inferências filogenéticas (DE QUEIROZ; GATESY, 2007; ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013).

O fator que apresentaria maior impacto na inferência de uma filogenia, a amostragem taxonômica ou o número de caracteres, é um tema amplamente discutido (*e.g.* MCMAHON; SANDERSON, 2006; NABHAN; SARKAR, 2012; ROKAS; CARROLL, 2005; WIENS; TIU, 2012). Uma indicação para esse tipo de matriz é a manutenção da amostragem taxonômica (*taxon sampling*) em detrimento do número de caracteres da matriz (ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013; WIENS; TIU, 2012). Isso porque isto resultaria em uma filogenia com melhor resolução, principalmente quando os métodos probabilísticos são utilizados. Uma maior amostragem taxonômica presente em uma matriz de caracteres tende a resultar em topologias melhores do que a com menor amostragem taxonômica (ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013; WIENS; TIU, 2012).

Uma outra questão importante seria que a falta de sobreposição taxonômica na matriz influencia na reconstrução de uma filogenia sub ótima, já que não existem caracteres suficientes para que todos os táxons da matriz sejam comparados entre si (LEMMON *et al.*, 2009; NABHAN; SARKAR, 2012). Apesar de alguns autores argumentarem que a presença de *missing data* não apresenta uma influência significativa na filogenia reconstruída principalmente por métodos probabilísticos (WIENS; TIU, 2012; WIENS, 2005), uma grande quantidade desses caracteres numa matriz pode gerar reconstruções filogenéticas sub ótimas. Isso ocorre devido a possibilidade de parâmetros serem estimados equivocadamente, de haver um decréscimo do poder de resolução da estimativa e redução na detecção de múltiplas

substituições (LEMMON *et al.*, 2009; ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013).

Além dessas, existe uma abordagem que trata a presença de *missing data* (i.e. caracteres ambíguos e *indels*) traria um impacto negativo para a filogenia reconstruída (LEMMON *et al.*, 2009; ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013). Mesmo com o atual panorama da alta geração de sequências, nem todas as espécies apresentam exatamente os menos genes disponíveis nos bancos de dados. Assim, ao utilizar a metodologia de supermatriz, existe a possibilidade de os táxons amostrados para os diferentes genes utilizados não serem comparáveis entre si. No entanto, uma conexão mínima entre os diferentes alinhamentos que compõem a supermatriz por pelo menos quatro táxons permite que estes diferentes alinhamentos sejam comparados, já que quatro táxons é o menor número de táxons em uma filogenia informativa não enraizada (MCMAHON; SANDERSON, 2006; WIENS; TIU, 2012). Apesar disto, pode ser que alguns resultados envisados não sejam minimizados devido a diminuição da quantidade de informação filogenética na matriz (MCMAHON; SANDERSON, 2006; THOMSON; SHAFFER, 2010).

A fim de testar a consistência dos dados aqui utilizados, foram construídas quatro diferentes supermatrizes compostas pelos 12 genes aqui utilizados com objetivo de comparação entre elas com base nas três abordagens metodológicas anteriormente descritas. Para exclusão dos *missing data* dos alinhamentos de cada um dos 12 genes foi realizada com o algoritmo do programa Gblocks (CASTRESANA, 2000). O Gblocks é um algoritmo que elimina do alinhamento regiões com baixo qualidade de estabelecimento de homologies, como regiões com presença de muitos caracteres ambíguos (CASTRESANA, 2000). Os alinhamentos de cada gene aqui utilizados foram editados e concatenados com a utilização do programa Seaview 4 (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010). As características das diferentes supermatrizes construídas aqui estão disponíveis na Tabela 3.

**Tabela 3:** Tabela com as características das diferentes supermatrizes construídas neste trabalho. N = número de táxons na matriz; Comp (pb) = comprimento do alinhamento em pares de base; Gblocks = edição dos alinhamentos individualmente no Gblocks; Sobreposição = todos os táxons sendo comparados na supermatriz (sobreposição taxonômica); MD (%) = *missing data* total da matriz

Supermatriz	N	Comp (pb)	Gblocks	Sobreposição	MD (%)
A	148	10724	Não	Não	52.97
B	141	10724	Não	Sim	51.80
C	148	8145	Sim	Não	44.69
D	139	8145	Sim	Sim	42.95

Após a comparação dos critérios apresentados aqui, a supermatriz escolhida foi a supermatriz C (Tabela 3) pois apresenta todos os táxons inicialmente amostrados e uma menor quantidade de *missing data*. Como teorizado anteriormente, é melhor que o número de táxons seja o maior possível com a menor quantidade de *missing data* na matriz. Além disso, a matriz apresenta pelo menos 11 táxons representados por todos os 12 genes utilizados, o que permite que os diferentes alinhamentos estejam conectados. Mesmo que a supermatriz D tenha um menor número de *missing data*, a supermatriz C seria mais apropriada devido ao maior número de táxons representantes. O tamanho dos alinhamentos de cada gene, suas posições na supermatriz final e a representatividade taxonômica para cada gene estão disponíveis na Tabela 2.

**Tabela 4:** Tabela com os genes utilizados, tamanhos, posições relativas no alinhamento concatenado (supermatriz) e valor proporcional do número de taxa representantes para cada gene na matriz. A marcação em cinza mostra genes mitocondriais e em branco, genes nucleares. c-myc (mielocitomatose celular éxon), cyt-b (citocromo b), H3A (histona 3a), ND1 (NADH dehidrogenase subunidade 1), POMC (pro-opiomelanocortina), RAG-1 (gene de ativação de recombinação 1), RHOD (rodopsina), TyrPrecur (precursor de tirosinase), 12S, 16S e 28S.

Gene	Tamanho (pb)	Posição no alinhamento	Proporção de taxa na matriz por gene (%)
12S	783	1-783	96
16S	1189	784-1972	100
Cytb	678	1973-2650	59
ND1	961	2651-3611	45
28S	672	3612-4283	70
Cmyc	766	4284-5049	51
H3a	327	5050-5376	70
POMC	555	5377-5931	41
RAG-1	970	5932-6901	70
RHOD	316	6902-7217	78
SAI	397	7218-7614	69
Tyrprecursor	531	7615-8145	52

### 3.3. Reconstrução filogenética

Reconstrução filogenética é um procedimento no qual objetiva-se construir a melhor estimativa para a história evolutiva de um grupo baseado em informações de um conjunto de dados. Em um contexto molecular, geralmente não é possível acessar o passado diretamente pois a amplificação de DNA de organismos antigos não é simples. Assim, cenários evolutivos poderiam ser sugeridos a partir de uma filogenia escolhida que poderia ter produzido os dados observados, a qual é selecionada com base em uma ou dentre todas as possíveis filogenias reconstruídas (SWOFFORD *et al.*, 1996).

A reconstrução de uma filogenia, independente do tipo de dado utilizado, necessita de um método. Para a reconstrução de filogenias utilizando uma matriz de dados moleculares, o método pode ser baseado em distância, como *neighbour joining* ou baseado em caracteres, como máxima verossimilhança e inferência bayesiana. Métodos baseados em distância analisam a distância genética (número de diferenças) das sequências par-a-par e constroem uma matriz de distância, a partir da qual é reconstruída uma filogenia. Métodos baseados em caracteres analisam todas as sequências simultaneamente comparando todas as sequências da matriz, considerando cada coluna do alinhamento um caracter e, com base nisso, atribui um valor à filogenia final reconstruída (YANG; RANNALA, 2012).

Para a realização da reconstrução filogenética nesta dissertação, foram conduzidas análises com métodos probabilísticos baseados em caracter, Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI). Toda reconstrução filogenética baseada em método probabilístico necessita de um pressuposto associado à evolução das sequências utilizadas para inferi-la. Esse pressuposto é o modelo evolutivo, o qual já foi descrito anteriormente. A reconstrução é, então, realizada assumindo mudanças nas sequências utilizadas a partir do modelo evolutivo assumido. Logo, para as análises descritas a seguir foi assumido o modelo evolutivo descrito em seção anterior, o GTR+ $\Gamma$ +I.

#### 3.3.1. Máxima Verossimilhança (ML)

A inferência da filogenia por ML avalia uma hipótese acerca da história evolutiva de organismos em termos da probabilidade que um modelo proposto para o processo evolutivo geraria uma vez conhecidos os dados, isto é o alinhamento observado. Com base nisso, é

conjecturado que a história com maior probabilidade de ter gerado os dados observados é preferível àquela com menor probabilidade (SWOFFORD *et al.*, 1996). A estimativa por ML foi utilizada pela primeira vez para inferência filogenética por Cavalli-Sforza e Edwards (1967) e foi introduzido por Felsenstein (1981) para dados de sequências nucleotídicas.

No método de ML, a verossimilhança observada de um dado conjunto de sequências para um específico modelo evolutivo é maximizado para cada topologia possível, onde a topologia que tiver o maior valor de verossimilhança é escolhida como final. A ideia principal por trás da inferência por ML é determinar a topologia da árvore, comprimento de ramos e parâmetros do modelo evolutivo de forma a maximizar a probabilidade de observar o alinhamento usado na análise. Em outras palavras, a função de verossimilhança é a probabilidade condicional de obtermos os dados (o alinhamento) dada uma hipótese filogenética, ou seja, um modelo evolutivo e uma árvore, incluindo os comprimentos de ramos (SCHMIDT; VON HAESLER, 2009; YANG; RANNALA, 2012).

Para que a melhor árvore por este critério seja encontrada, uma busca em todo o espaço paramétrico de um conjunto de árvores deve ser explorado, onde apenas uma das árvores terá a verossimilhança maximizada. No entanto, a busca em todo o espaço paramétrico das árvores possíveis para um conjunto de sequências, tem uma alta demanda computacional, pois aumenta exponencialmente com o número de sequências analisadas. Para resolver este problema, são utilizados algoritmos heurísticos de busca de árvores (FELSENSTEIN, 2004).

Como o mecanismo de busca heurística não vasculha o espaço paramétrico como um todo, pode ser que os valores verossimilhança sejam maximizados em pontos restritos do espaço amostral de árvores. Tais pontos são chamados de ótimos locais ou ilhas, os quais representam um problema para a reconstrução filogenética. Em conjuntos de dados com muitos sítios, os picos tendem a ser maiores, ou seja, apresentar maiores valores de verossimilhança, e os vales, locais com valores mais baixos de verossimilhança, tendem ser mais profundos. Isso implica em uma maior dificuldade do algoritmo atravessar de um pico para o outro, fazendo com que a busca se torne restrita a um ótimo local (SALTER, 2001).

O programa RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (STAMATAKIS, 2006), emprega um mecanismo de busca onde a probabilidade de ficar preso em ótimos locais é reduzida. Este programa otimiza a topologia pelo mecanismo de rearranjo da topologia LSR (*Lazy Subtree Rearrangement*), o qual necessita de uma menor demanda computacional (STAMATAKIS; LUDWIG; MEIER, 2005). Desta forma, o RAxML é um programa que consome um tempo computacional menor associado à busca heurística, em relação a outros

programas (STAMATAKIS, 2006).

Para a reconstrução por ML, foi utilizado o programa *Randomized Axelerated Maximum Likelihood* 7.3.2 (RAxML 7.3.2), disponível no servidor *online* CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). A reconstrução foi realizada combinando o algoritmo *rapid bootstrapping* (RBS) (STAMATAKIS *et al.*, 2008), o qual diminui o espaço de busca de árvores, seguido da opção de busca minuciosa da melhor árvore de ML (comando `-f a`). Utilizando este algoritmo, a árvore final foi reconstruída utilizando o modelo evolutivo selecionado pelo model teste, o GTR+ $\Gamma$ +I.

O *bootstratrap* ou *bootstrap* não-paramétrico é uma análise muito utilizada para estimar a robustez dos dados de uma matriz utilizada para uma reconstrução filogenética. Esta é uma técnica estatística que mostra o quão reamostráveis são os dados analisados. Na análise filogenética, o *bootstrap* não-paramétrico consiste na retirada de colunas do alinhamento original com reposição para construção de cada um dos alinhamentos pseudoréplicas. Em cada pseudoréplica, o mesmo número de colunas do alinhamento original é sorteado, mas como existe reposição, uma mesma coluna pode ser sorteada mais de uma vez e outras não serem sorteadas na construção de um alinhamento pseudoréplica. Uma vez construído cada alinhamento pseudoréplica, uma árvore filogenética é reconstruída e comparada com a árvore com o alinhamento original. Em geral, mil árvores filogenéticas construídas com (mil) alinhamentos pseudoréplicas são comparadas com a original. Ao final, a proporção dos clados reconstruídos para cada pseudoréplica de *bootstrap* é associada aos clado da árvore reconstruída a partir do alinhamento original. Isso significa, que esta técnica diz o quão homogêneos são os dados utilizados (FELSENSTEIN, 2004; VAN DER PEER, 2009; YANG, 2006).

No caso do *rapid bootstrapping* (RBS), o algoritmo faz múltiplas buscas a partir de diferentes pontos em uma única corrida, retornando ao alinhamento original a cada dez pseudoréplicas, gerando uma nova árvore inicial sob o método de ML. A cada nova árvore inicial gerada, a primeira árvore otimizada sob ML serve como árvore inicial para otimização da pseudoréplica seguinte. Este procedimento é repetido até terminar o número de pseudoréplicas estipulado. Em seguida, o processo de busca pela melhor árvore se inicia a partir das árvores obtidas do RBS. Desta forma, a otimização da árvore final é baseada em inferências otimizadas do alinhamento na forma de pseudoréplicas de bootstrap, o que confere maior robustez à inferência. Em outras palavras, esse conjunto de árvores consequentes da análise por RBS, são utilizadas como espaço amostral de árvores para a inferência por ML

utilizando o comando `-f` a no RAxML. Por este motivo que esta análise apresenta um tempo computacional menor do que outros algoritmos de inferência por ML. Assim como no *bootstrap* normal, os valores da proporção com que os clados são reamostrados são atribuídos aos clados da árvore final inferida (STAMATAKIS *et al.*, 2008).

Como calcular a distribuição  $\Gamma$  para todos os sítios de um alinhamento é computacionalmente custoso com mais do que quatro categorias (STAMATAKIS *et al.*, 2008), uma forma de burlar o limite do número de categorias é estimar maiores categorias de heterogeneidade utilizando a aproximação CAT (STAMATAKIS, 2006 a). O CAT é uma aproximação que é utilizada apenas como uma forma de percorrer rapidamente o espaço de busca de árvores. As melhores árvores selecionadas tem a verossimilhança maximizada sob o modelo GTR+ $\Gamma$ , ou seja, a árvore final é construída assumindo a taxa de heterogeneidade  $\Gamma$  e não CAT (STAMATAKIS *et al.*, 2008). Além disso, o CAT é um aproximação com taxa de heterogeneidade sítio a sítio e consome uma menor quantidade de memória, apresentando uma eficiência computacional maior do que o modelo  $\Gamma$  (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011; STAMATAKIS, 2006 a). Desta forma, foram realizadas 1000 réplicas de (RBS) sob o modelo evolutivo GTR+CAT. A árvore final foi lida e editada no programa FigTree 1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

Uma importante tarefa quando se trata de inferência de uma filogenia é até que ponto a filogenia reconstruída apresenta suporte dado os dados utilizados. Existe uma abordagem metodológica que trata da depreciação dos valores de suporte da filogenia reconstruída por táxons que diminuem os valores de suporte de análise de *bootstrap*, os *rogue taxa*. *Rogue taxa* são geralmente táxon que apresentam pouca informação filogenética, contribuindo para a diminuição da acurácia da reconstrução filogenética (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013; SANDERSON; SHAFFER, 2002; WILKINSON, 1996).

Para testar se existiam táxons se comportando como *rogue taxa* na supermatriz utilizada para a reconstrução filogenética foi conduzida uma análise para identificá-los. A identificação desses táxons foi realizada com o programa RogueNarok (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013). Foram identificados 28 *rogue taxa* presentes na supermatriz escolhida como final. Uma supermatriz secundária, onde esses táxons identificados foram retidos, foi construída. Posteriormente, uma filogenia de ML foi reconstruída com esta supermatriz secundária para fim de comparação com a gerada pela supermatriz escolhida como final para esta dissertação.

Os táxons excluídos após a análise conduzida no RogueNarok foram informados a seguir.

São eles Bufonidae – *Amietophrynus*, *Ansonia*, *Bufo*, *Bufotes*, *Capensibufo*, *Epidalea*, *Ghatophryne*, *Ingerophrynus*, *Leptophryne*, *Mertensophryne*, *Nectophryne*, *Pelophryne*, *Peltophryne*, *Rhinella*, *Schismaderma*; Craugastoridae – *Craugastor*, *Haddadus*; Dendrobatidae – *Dendrobates*; Limnodynastidae – *Neobatrachus*, *Notaden*; Leptodactylidae – *Leptodactylus*; Micrixalidae – *Micrixalus*; Nyctibatrachidae – *Lankanectes*, *Nyctibatrachus*; Phrynobatrachidae – *Phrynobatrachus*; Pyxicephalidae – *Amietia*, *Aubria*; Ranidae – *Indirana*.

### 3.3.2. Inferência Bayesiana (BI)

A BI começou a ser utilizada para reconstruções filogenéticas no final da década de 1990 (YANG; RANNALA, 2012). A característica chave do método Bayesiano associa-se a noção de distribuição de probabilidade para um parâmetro. Ao contrário da escola frequentista, onde parâmetros são constantes desconhecidas e não podem apresentar uma distribuição, a probabilidade no método Bayesiano é usada para representar incerteza acerca de um parâmetro. A ideia da BI é que, uma vez que o valor do parâmetro seja desconhecido, é sensato especificar a distribuição probabilística que descreve os seus possíveis valores (YANG, 2006).

A distribuição dos parâmetros antes que os dados sejam analisados é chamado de *prior distribution* (distribuição *a priori*). Isso pode ser especificado por uma avaliação objetiva dos dados ou pela opinião subjetiva do pesquisador. Então, o teorema de Bayes é usado para calcular a distribuição posterior do parâmetro, ou seja, a distribuição condicional do parâmetro dado um determinado conjunto de dados. Todas as inferências relativas ao parâmetro são baseadas na distribuição posterior (YANG, 2006). A BI é relacionada com os métodos de verossimilhança, diferindo somente no uso dessa distribuição *a priori* do parâmetro a ser inferido, no caso, a árvore filogenética e os parâmetros associados a esta (FELSENSTEIN, 2004; YANG; RANNALA, 2012).

De forma geral, a probabilidade posterior das árvores não pode ser diretamente calculada. Isso porque o cálculo da probabilidade posterior requer que todos os valores possíveis dos parâmetros do modelo evolutivo sejam testados, o que exigiria muito tempo computacional. Em muitos casos, a inclusão de todos os parâmetros possíveis torna impossível derivar a distribuição da probabilidade posterior analiticamente. Além disso, não é possível estimar a distribuição da probabilidade posterior mesmo a partir de uma amostragem

randômica. O motivo disso é que a maior parte da probabilidade posterior está suscetível a estar concentrada em uma menor parte do amplo espaço paramétrico. Mesmo com um massivo esforço amostral é altamente improvável que a probabilidade posterior seja amostrada na região de interesse. Este argumento é aceitável no contexto filogenético uma vez que o número de árvores possíveis é enorme, mesmo para um pequeno número de taxons. A solução deste problema é a utilização na BI do algoritmo Cadeia de Markov Monte Carlo (*Markov-chain Monte Carlo* - MCMC) para gerar uma amostra da coleção de árvores possíveis da distribuição posterior (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009; YANG; RANNALA, 2012; YANG, 2006).

Cadeias de Markov tem a propriedade de convergir tendendo a um estado de equilíbrio independente do ponto de início da análise. A ideia central de funcionamento do MCMC é fazer pequenas mudanças aleatórias nos parâmetros observados de acordo com os dados e aceitar ou rejeitar essas mudanças de acordo com probabilidades apropriadas. Isso significa que se após uma mudança do parâmetro a probabilidade for maior do que a anterior sem a mudança, a probabilidade referente ao parâmetro mudado é escolhido (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

Se a cadeia é iniciada de uma árvore aleatória e os comprimentos de ramos são arbitrariamente escolhidos, existe a possibilidade de que a verossimilhança inicial seja baixa. Como a cadeia se move no sentido das regiões com maiores probabilidades posteriores, a verossimilhança aumenta rapidamente. Esta fase inicial da corrida da cadeia é conhecida como *burn-in*. As amostras representadas pelo *burn-in* são frequentemente descartadas porque eles são muito influenciados pelo ponto de início da corrida de MCMC (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

Na amostragem de problemas filogenéticos por MCMC, a topologia da árvore é geralmente o parâmetro mais difícil de amostrar. Se mais de uma corrida de MCMC é rodada com escolha aleatória de árvores, serão amostradas diferentes árvores de diferentes regiões do espaço paramétrico de busca de árvore. Assim, um apelo intuitivo é diagnosticar a convergência das diferentes MCMC, comparando a variância dentro e entre as árvores amostradas nas diferentes corridas. Um mecanismo para verificar isso é avaliar o valor do *split frequency*, o qual é a frequência com que *splits* (clados) são amostrados nas cadeias independentes de MCMC. Quando o valor do *split frequency* tende a zero, significa que o conjunto de árvores amostradas nas diferentes cadeias de MCMC são similares (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009). A convergência das diferentes cadeias de

MCMC é detectada quando o valor do *split frequency* chega a ser, idealmente, menor do que 0.01. Caso o foco da análise seja clados mais inclusivos, o valor do *split frequency* igual a 0.05 pode ser adequado (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

No entanto, como seria realizada essa comparação entre diferentes corridas metodologicamente? Numa perspectiva padrão, acessar a convergências de diferentes cadeias em uma quantidade razoável de gerações é muito difícil. Assim como no método de ML, existe um problema associado a existência de picos isolados no espaço de árvores, os ótimos locais. Assim, a inferência utilizando apenas uma cadeia com um dado número de gerações, acaba por apresentar uma menor capacidade de movimento no espaço de árvores.

Uma alternativa é a incorporação da técnica *Metropolis Coupling* associada à MCMC, também conhecida como MCMCMC (GEYER, 1991). A ideia desta técnica seria introduzir uma série de Cadeias de Markov de uma distribuição da probabilidade posterior aquecida. Esse aquecimento seria alcançado pelo aumento da probabilidade posterior a uma potência inferior a 1. O efeito é o achatamento da superfície da distribuição da probabilidade posterior, o que facilitaria a movimentação no espaço de árvores entre um pico e outro, já que os vales entre os picos acabariam por se tornar rasos. Em um intervalo regular, seria realizada uma tentativa de mudança de valor de probabilidade posterior entre cadeias. Se a mudança é aceita, a cadeia fria pode saltar entre picos isolados presentes neste espaço de uma só vez, o que ocasionaria uma aceleração da busca no espaço paramétrico de árvores. No final da análise, todas as amostras da cadeia quente são descartadas, mantendo-se apenas as amostras da cadeia fria (ALTEKAR *et al.*, 2004; RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

Após a convergência das cadeias ser observada e a análise terminada, um conjunto de árvores com seus respectivos parâmetros são encontrados pelo algoritmo de BI. A partir desse conjunto de árvores, objetiva-se obter uma árvore final. Para isso, é preciso sumarizar todos os resultados encontrados. No entanto, sumarizar distribuição posterior, topologia e comprimentos de ramos não é uma tarefa fácil. Se forem encontradas poucas topologias ao final da análise, a produção de uma lista das melhores topologias e suas probabilidades ou simplesmente selecionar a topologia com maior probabilidade posterior resolveria. O problema maior é quando são encontradas muitas árvores com alto valor de probabilidade posterior. Uma solução para este caso é a utilização do consenso de maioria sob consenso por regra de maioria das árvores (*majority rule consensus tree*) que nada mais é do que a representação do conjunto de topologias encontradas (RONQUIST; VAN DER MARK;

HUELSENBECK, 2009).

Para a BI realizada nesta dissertação, foi utilizado o programa MrBayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) disponível no servidor online CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). A reconstrução foi feita com duas corridas independentes de MCMC até que estas duas cadeias convergissem (*split frequency*=0.037). Para isso, foram rodadas 49.484.300 de gerações, amostradas a cada 1.000 gerações. Para estimar a probabilidade posterior dos ramos recuperados foi aplicada a regra de 50% de maioria. Todas as árvores encontradas pela análise foram sumarizadas no programa MrBayes assumindo o comprimento médio dos ramos dessas árvores. O número de árvores iniciais descartadas na análise (*burn-in*) foi 25%, o padrão do programa. A árvore final foi lida e editada no programa FigTree 1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

### **3.4. Inferência do tempo de divergência**

#### **3.4.1. Relógio molecular e inferência do tempo de divergência de linhagens**

Antes de Kimura ter postulado a teoria neutralista da evolução molecular (KIMURA, 1968), Zuckerkandl and Pauling já tinham publicado dois artigos sobre as taxas constantes de evolução de proteínas ao longo das linhagens (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965, 1962). Eles mostraram que a distância genética entre duas sequências codificantes para uma mesma proteína parece aumentar linearmente com o tempo de divergência das duas espécies. Como diferentes proteínas mostraram taxas diferentes mas sempre regulares, um comportamento similar, Zuckerkandl e Pauling hipotetizaram que a taxa de evolução para algumas proteínas é constante ao longo do tempo. Com base neste padrão, eles introduziram o conceito de relógio molecular, teoria que versa que a taxa de evolução de sequências de DNA e proteínas é constante ao longo do tempo conforme as linhagens evolutivas vão divergindo (LEMEY; POSADA, 2009; YANG, 2006).

A utilização de relógios moleculares tornou-se bastante popular deste sua descoberta. Se existe um relógio molecular onde a taxa de evolução de um gene pode ser calculada há a possibilidade de estimar o tempo que duas linhagens distintas divergiram por comparação de DNA ou proteínas. No entanto, é sabido que nem todos os genes apresentam uma mesma taxa de evolução constante ao longo do tempo. Desta forma, novas abordagens metodológicas

surgiram objetivando encontrar formas de “relaxar” o pressuposto do relógio molecular quando se está estimando os tempos de divergência entre espécies. Essas novas abordagens modelam a variação das taxas evolutivas entre as linhagens ao invés de usar somente os genes e espécies que passaram pelos testes de constância de taxas de evolução, como era feito sob o método inicialmente proposto (KUMAR, 2005; LEMEY; POSADA, 2009).

Diferentes tentativas para desenvolver modelos que se acomodassem razoavelmente a uma quantidade de variação das taxas evolutivas foram realizadas. Rambaut e Bromham (1998) discutiram um modelo de máxima verossimilhança com duas taxas diferentes em uma árvore de quatro espécies. Yoder e Yang (YODER; YANG, 2000) ampliaram esta ideia e demonstraram que a hipótese de relógio poderia ser relaxada permitindo uma taxa constante de evolução dentro de um clado particular, mas assumindo diferentes taxas para os diferentes cladogramas, isto é, assumindo um relógio molecular local (LEMEY; POSADA, 2009). A ideia de que diferentes cladogramas de uma árvore filogenética poderia assumir um relógio local surgiu no final da década de 1980 com estudos de Hasegawa e Kishino (HASEGAWA; KISHINO, 1989; KISHINO; HASEGAWA, 1990).

Thorne e colaboradores (1998) propuseram um modelo com abordagem Bayesiana onde as taxas de evolução poderiam variar ao longo do tempo. Esta taxa seria moldada a partir de uma distribuição lognormal a qual é centrada na taxa de evolução de um ramo ancestral. As taxas entre os ramos estariam autocorrelacionadas e a força da correlação entre os ramos ancestral e descendente dependendo somente da diferença dos pontos médios dos ramos ou do comprimento do ramo ancestral. Estes modelos foram inspirados no fato de que linhagens proximamente relacionadas possuem propriedades biológicas similares, sendo esperado que possuam taxas evolutivas parecidas. Mudanças significativas nestas taxas são mais frequentes em espaços de tempo maiores (LEMEY; POSADA, 2009).

Existe uma alternativa aos modelos autocorrelacionados a qual assume uma correlação entre ramos adjacentes. Nesse caso, taxas específicas para cada ramo são extraídas independentemente de uma distribuição de taxas como as distribuições exponenciais ou lognormais (DRUMMOND *et al.*, 2006). Ao contrário dos modelos de relógio relaxado anteriores que precisavam ser aplicados em uma árvore com topologia fixada, os parâmetros dos modelos não correlacionados poderiam ser estimados por meio de uma média associada ao conjunto de árvores possíveis utilizando a MCMC. Assim, esses modelos são muito úteis para a estimativa de taxas evolutivas e tempos de diversificação assumindo incertezas filogenéticas. Esses modelos de relógio relaxado não correlacionados (*Uncorrelated Relaxed*

*Clock*) estão implementados em um pacote computacional Bayesiano amplamente utilizado, o BEAST (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Neste tipo de relógio molecular, diferente do relógio molecular correlacionado, as taxas evolutivas estimadas dos ramos descendentes são independentes das dos ancestrais, além de serem idênticas à uma distribuição atribuída a prior, neste caso log-normal.

Análises com abordagem Bayesiana necessitam que uma informação *a priori* seja apresentada. Thorne e colaboradores (1998) implementaram o primeiro método Bayesiano para datação molecular que incorporasse incerteza na inferência por meio de calibração fóssil. Se as idades de um ou mais nós de uma filogenia podem ser fixados basedos em dados de fóssil ou eventos geológicos, os comprimentos de ramos podem ser convertidos em tempo geológico absoluto para todos os nós restantes da filogenia. A combinação de dados moleculares com informações fósseis é uma forma eficiente de acessar informações temporais da evolução dos organismos (INOUE; DONOGHUE; YANG, 2010).

### **3.4.2. Inferência do tempo de divergência de Neobatrachia**

Para a realização da análise do tempo de divergência no programa BEAST é necessária a construção de um arquivo de entrada para o programa iniciar a análise. A construção deste arquivo (formato *.xml*) foi realizada com o programa do pacote computacional BEAST, o BEAUti v. 1.7.4.

Para a realização da análise foi utilizada a mesma supermatriz utilizada para a reconstrução filogenética por ML e BI. A análise de inferência do tempo de divergência necessita de uma árvore inicial, a qual pode ser construída pelo programa ou fornecida pelo usuário. Desta forma, foi fornecida ao programa a filogenia reconstruída por ML nesta dissertação. O tempo foi calculado com base na filogenia já reconstruída com a supermatriz utilizada.

A opção de relógio molecular escolhida foi a de um relógio molecular relaxado não correlacionado log-normal (*Uncorrelated Lognormal*). O modelo de substituição nucleotídica selecionado foi o GTR+ $\Gamma$ +I. O prior escolhido para a árvore foi o modelo de especiação seguindo o processo de Yule (*Speciation: Yule Process*), o qual assume uma taxa de especiação constante por linhagem. Esse *prior* tem um único parâmetro, o *yule.birthRate*, que representa a taxa média do nascimento de uma linhagem (DRUMMOND *et al.*, 2007). Os outros *priors* utilizados foram os para efeito de calibração dos nós, descritos anteriormente.

Após a construção do arquivo de entrada no BEAUti, foi fornecido este arquivo para o programa BEAST 1.7.5 para a obtenção das distribuições posteriores com o algoritmo de MCMC. Foram conduzidas três corridas independentes de 50.000.000 de gerações, com uma frequência de amostragem das cadeias a cada 1.000 gerações, gerando 50.000 árvores amostradas.

As informações das estatísticas de corrida disponíveis no arquivo *.log* gerado ao final da análise no BEAST foram analisados no programa Tracer v1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007). Este programa é utilizado para a obtenção de um panorama da corrida por meio da análise das médias do tamanho efetivo da amostra, o ESS (*Effective Sample Size*). O ESS é o número de amostras independentes as quais um gráfico é equivalente. O cálculo do ESS leva em consideração o comprimento das cadeias de MCMC excluindo o *burn-in* e o número médio de estados da cadeia de MCMC que represente duas amostras separadas (i.e. amostras independentes da distribuição posterior) para que elas sejam não correlacionadas. Os valores de ESS devem ser, preferencialmente, superiores a 200 após a retirada do período de aquecimento (*burn-in*). O *burn-in* adotado foi de 5.000.000, de acordo com o padrão para o programa, que é de 10% do total de gerações. A fim de aumentar os valores de ESS e alcançar a convergência das corridas de MCMC, os arquivos das três corridas independentes realizadas no BEAST foram combinadas no programa LogCombiner 1.7.4 também do pacote computacional do BEAST, já excluindo o *burn-in*, totalizando 135.000.000 de gerações. Após este procedimento, o arquivo final gerado foi submetido à análise no Tracer v.1.5, onde os valores de ESS foram todos acima do valor mínimo ideal 200.

Assim como para os arquivos *.log*, os arquivos *.trees* gerado ao final da análise de inferência do tempo de divergência de Neobatrachia foram combinados no programa LogCombiner 1.7.4, onde já foi retirado o *burn-in*, totalizando 135.000 árvores. Para a construção da árvore final, foi utilizado o programa do mesmo pacote computacional do BEAST para sumarizar o conjunto de árvores amostradas em uma única árvore (*summarized tree* ou *target tree*), o TreeAnnotator 1.7.4. As informações reunidas incluem as estimativas das idades dos nós, as probabilidades posteriores dos nós na árvore final e a média das taxas de evolução para cada ramo. Foi selecionada a opção MCC (*Maximum Clade Credibility*) que determina que as estatísticas sejam sumarizadas na árvore que possui o maior valor de probabilidade posterior nos nós internos. A fim de testar a consistência da inferência do tempo de divergência definidas aqui, diferentes análises foram realizadas. Foram conduzidos testes para verificar a robustez da supermatriz e das calibrações utilizadas.

### 3.4.2.1. Calibrações

A inferência do tempo de divergência desta dissertação foi realizada no programa BEAST 1.7.5 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) disponível no servidor *online* CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). A seguir serão descritos os procedimentos para escolha das calibrações utilizadas e parâmetros da análise.

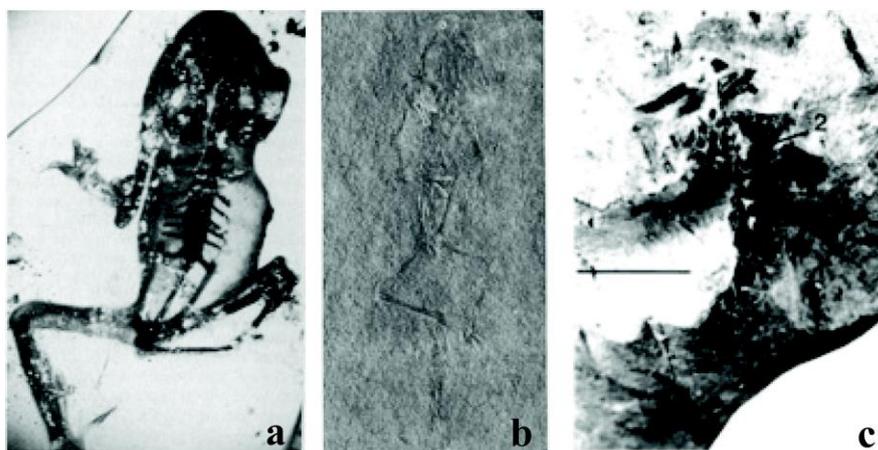
Para a estimativa do tempo de divergência de Neobatrachia realizada nesta dissertação, foram utilizados apenas fósseis como pontos de calibração. Foram escolhidos fósseis ao invés de eventos geológicos porque um dos objetivos proposto nesta dissertação é acessar a história biogeográfica do grupo. Utilizar evento geológico como calibração significaria assumir que tal evento influenciou na evolução do grupo em estudo, o que daria um caráter enviesado à análise biogeográfica posteriormente realizada (ver MELLO; SCHRAGO, 2012).

A utilização de fósseis com identificação e informações temporais equivocadas pode conferir à análise de cálculo do tempo de divergência um viés, levando a uma estimativa também equivocada (PARHAM *et al.*, 2012). Assim, a seleção dos fósseis para a calibração da inferência de tempo de divergência deste trabalho foi criteriosa. Foi realizada uma seleção prévia de fósseis candidatos na página *online* Lisanfos KMS v.1.2 (MARTÍN; SANCHÍZ, 2010). A partir desses fósseis, foram selecionados somente aqueles que apresentassem uma identificação potencialmente correta. Isso significa que somente fósseis com esqueleto completo ou parcialmente completo foram escolhidos, o que facilitaria no levantamento de caracteres sinapomórficos para a localização do fóssil na filogenia a ser datada. A descrição dos Períodos, Épocas e, algumas vezes, Idades utilizados aqui seguem a escala de tempo geológico da Sociedade de Geologia da América (WALKER *et al.*, 2012), a qual encontra-se anexada à esta dissertação (Anexo 2).

Foram selecionados três fósseis para a inferência de tempo de divergência das linhagens de Neobatrachia. A seguir a descrição de cada calibração e respectivo fóssil utilizado para tal em milhões de anos (Ma). Informações sobre localização, idade e publicação dos fósseis aqui utilizados, ver Tabela 5.

**Tabela 5:** Tabela mostrando os fósseis utilizados neste trabalho com respectivas informações taxonômicas, idade em milhões de anos (Ma), estrato geológico, localidade e publicação.

Fóssil	Família	Idade (Ma)	Estrato	Localidade	Publicação
<i>Eleutherodactylus</i>	Eleutherodactylidae	37.8-33.9	Eoceno Superior	República Dominicana	(POINAR; CANNATELLA, 1987)
<i>Indobatrachus</i>	Myobatrachidae	70.6-65.5	Cretáceo Superior	Índia	(NOBLE, 1930)
<i>Rhadinosteus parvus</i>	Rhinophrynidae	161.2-145.5	Jurássico Superior	Estados Unidos da América	(HENRICI, 1998)



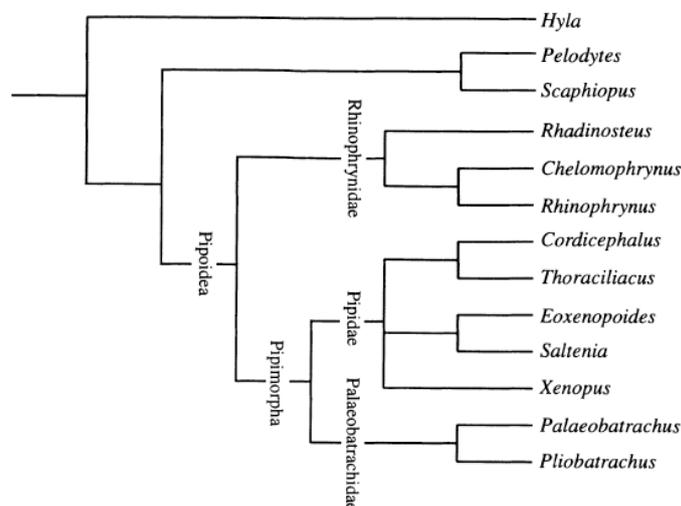
**Figura 6:** Iconografia dos fósseis utilizados para calibrar a inferência de tempo de divergência. a: *Eleutherodactylus* (Poinar Jr & Singer 1987); b: *Indobatrachus* (Noble 1930); c: *Rhadinosteus parvus* (Henrici 1998).

A divergência da linhagem Eleutherodactylidae (*Adelophryne* e *Eleutherodactylus*) do seu grupo irmão foi moldada com um *prior* com uma distribuição normal de média 35,6 Ma assumindo 95% de intervalo de confiança, onde foi utilizada a idade do fóssil de *Eleutherodactylus* (Figura 6a) como limite mínimo (33,9 Ma) e máximo (37,2 Ma) da distribuição. Desta forma, a maior probabilidade dessa divergência ter ocorrido foi a 35,6 Ma, no Eoceno Superior.

A divergência da linhagem Myobatrachidae (*Arenophryne*, *Myobatrachidae*, *Metacrinia*, *Pseudophryne*, *Spicospina*, *Uperoleia*, *Assa*, *Geocrinia*, *Paracrinia*, *Crinia*, *Taudactylus*, *Mixophyes* e *Rheobatrachus*) do seu grupo irmão Limnodinastidae foi moldada com um *prior* com uma distribuição normal de média 92,75 Ma assumindo 95% de intervalo de confiança, onde foi utilizada a idade do fóssil de *Indobatrachus* (Figura 6b) como limite mínimo (65,5 Ma) da distribuição. Como a distribuição atual do táxon Myobatrachidae é restrita ao continente Australiano e a localidade do fóssil é no sul da Índia, assumiu-se que a idade

máxima do fóssil deveria ser pelo menos até o período que ainda existia conexão entre Austrália e Índia (130 Ma). Apesar do critério para atribuir calibrações desta dissertação não incluir eventos geológicos, foi preferível utilizar um critério conservador para a escolha da idade máxima do *prior*. Desta forma, a maior probabilidade dessa divergência ter ocorrido foi a 97,75 Ma, no Cretáceo Tardio, variando do Cretáceo Inferior (130 Ma) até o final do Cretáceo Tardio (65,5 Ma).

A última calibração refere-se à atribuição do *prior* para a raiz da filogenia de Neobatrachia. Esta calibração foi definida com base na divergência da linhagem “Pipoidea”. De acordo com Henrici (1998), a linhagem “Pipoidea” é composta pela linhagem Rhinophrynidae mais “Pipomorpha”, a qual é composta pela linhagem extinta Palaeobatrachidae mais a linhagem que ainda apresenta representantes recentes Pipidae (Figura 7). Como a linhagem utilizada para enraizar a filogenia proposta nesta dissertação faz parte de “Pipoidea” assumiu-se que a idade mínima para calibração da raiz da filogenia seria referente à divergência de Pipidae, *Pipa* mais *Xenopus* utilizados na supermatriz desta dissertação, com seu grupo irmão Rhinophrynidae de acordo com o fóssil *Rhadinosteus parvus* (145,5 Ma) (Figura 6c). A idade máxima foi atribuída a idade mais antiga atribuída ao táxon que divergiu anteriormente à “Pipoidea” segundo Frost *et al.* (2006), Leopelmatidae (171,6 Ma), ou seja, assumiu-se que a linhagem ramo “Pipoidea” começou a divergir no máximo há 171,6 Ma e no mínimo há 145,5 Ma. Desta forma, a idade com maior probabilidade de ter ocorrido a divergência de Pipidae foi atribuído como sendo há 158,6 Ma, valor da média da distribuição normal atribuída ao *prior*.



**Figura 7** Filogenia proposta por Henrici (1998) para a linhagem “Pipoidea” (Modificada de Henrici, 1998).

### 3.4.2.2. Testes das calibrações

Mello e Schrago (artigo submetido para publicação), ao testarem o viés e a precisão das estimativas de tempo de divergência com dados empíricos e simulados, viram que a presença de uma calibração na raiz de uma filogenia a ser datada é crucial para o aumento da acurácia e precisão das estimativas de tempo de divergência. Isso porque a quantidade de erros acumulados ao longo da estimativa dos nós da filogenia é muito maior quando não existe um *prior* atribuído à raiz da filogenia, sendo que o erro associado à estimativa tende a aumentar quando mais próximo da raiz.

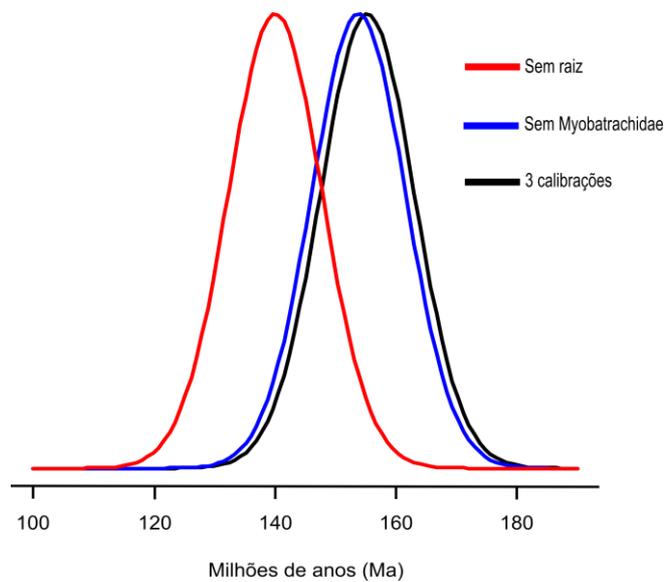
Desta forma, foram construídos diferentes arquivos para serem analisados no BEAST, sendo um com todas as três calibrações selecionadas, outro sem a calibração da raiz da filogenia e um terceiro sem a calibração com o fóssil de Myobatrachidae. A ideia foi testar se (i) a calibração da raiz estaria influenciando a inferência de forma significativa e (ii) se o fato de a calibração baseada no fóssil de Myobatrachidae com idade máxima estendida até o período mínimo que ainda havia conexão entre o continente Australiano e a Índia estaria influenciando a estimativa da idade dos nós.

Para cada teste proposto foi conduzida uma análise no BEAST com os mesmos parâmetros utilizados no arquivo com todas as três calibrações utilizadas, ou seja, três análises independentes no BEAST com 50.000.000 de gerações, o mesmo *prior* para a árvore, modelo evolutivo e relógio molecular. Assim como para a análise com as três calibrações presentes, os arquivos finais *.log* e *.trees* foram combinados no programa LogCombiner 1.7.4, totalizando após a retirada do *burn-in*, 135.000.000 de gerações e 135.000 árvores amostradas. Para cada análise, os arquivos *.trees* foram submetidos à análise no programa TreeStat v. 1.2, implementado no pacote do programa BEAST. Foi selecionada a opção de *node heights*, onde é testada a significância da altura dos nós (comprimentos dos ramos) disponibilizando no arquivo de saída a idade média para cada um dos nós da filogenia datada.

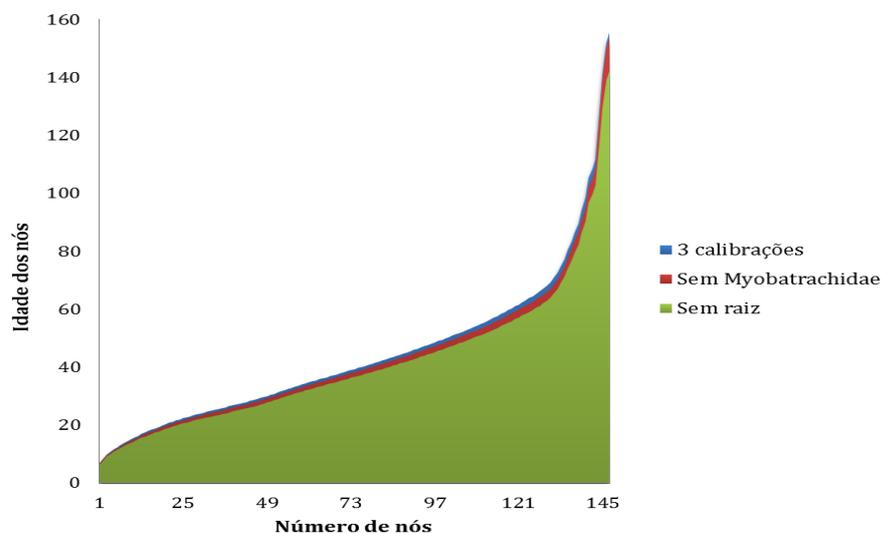
Comparando os resultados obtidos em cada umas das três análises com diferentes arranjos de calibração, não houve diferença significativa entre as idades dos nós das diferentes estimativas de tempo conduzidas. Isso significa que a idade média de todos os nós de cada uma das filogenias encontra-se no intervalo de confiança atribuído para cada um dos nós. Por exemplo, a idade da raiz na filogenia datada sem a atribuição de *prior* para a raiz foi 140.3 Ma, enquanto a idade atribuída à raiz na análise sem o *prior* com a idade do fóssil de Myobatrachidae estendida e com todas as calibrações foi 153.8 Ma e 155.2 Ma, respectivamente. A idade 140.3 Ma encontra-se na distribuição atribuída às raízes das outras

inferências (Figura 8). A sobreposição das idades médias pode ser observada na Figura 9.

Apesar de as idades inferidas em cada uma das análises estarem no intervalo de variação entre si, as idades encontradas para quando utilizando três pontos de calibração formam mais antigos do que as outras combinações. Além disso, os intervalos de com 95% confiança são maiores para aquela inferência que não teve a idade da raiz como prior. Essa variação de distribuição tendeu ser mais ou menos igual entre as combinações de calibração que tiveram um prior atribuído à raiz (Tabela 6).



**Figura 8:** Representação gráfica das distribuições da idade da raiz em cada uma das diferentes combinações de calibrações.



**Figura 9:** Representação gráfica da sobreposição dos valores das idades médias dos nós das três diferentes análises conduzidas nesta dissertação.

**Tabela 6:** Tabela com as idades estimadas para as divergências de linhagens aqui utilizadas. Estão representadas as estimativas de tempo para cada uma das três combinações de calibração e respectiva inferência sem a supermatriz. Os valores entre colchetes representam o intervalo de 95% de confiança da idade média encontrada para cada um dos nós. 1. Inferência sem o *prior* para a raiz; 1.1. Inferência sem o *prior* para a raiz e sem a supermatriz. 2. Inferência sem o *prior* de Myobatrachidae; 2.1. Inferência sem o *prior* de Myobatrachidae e sem a supermatriz. 3. Inferência com as três calibrações; 2.1. Inferência com as três calibrações e sem a supermatriz.

Tipo de Calibração	Raiz	Divergência Neobatrachia	Primeira divisão Neobatrachia	Divergência de Ranoides	Divergência Heleophrynidae	Calyptocephalellidae/ Myobatrachoidea	Divergência Nobleobatrachia
1	140.3 [105.6-176.5]	125.8 [94.8-156.6]	102.1 [80.2-127.6]	98 [75.9-122.2]	89.4 [69.2-112.2]	84.2 [64.8-106]	96.9 [80.2-127.6]
1.1	9991	6211.7	2472.7	1594.3	1345.9	1236.1	1354.3
2	153.8 [138.9-168.8]	136.7 [119.5-153.6]	108.9 [92.3-125.7]	104.4 [88.1-121.1]	94.8 [79.2-111.3]	89.2 [73.9-105.4]	103.1 [87-119.7]
2.1	248	87.3	84.6	83.2	75.3	73.6	75.9
3	155.2 [140.8-170.4]	138.4 [121.3-154.9]	110.9 [95.5-127.6]	106.4 [91.3-123.2]	97.1 [92-113.6]	91.6 [76.6-107.4]	105.3 [90.1-121.6]
3.1	199	92.2	74	74	70.7	69.1	72.8

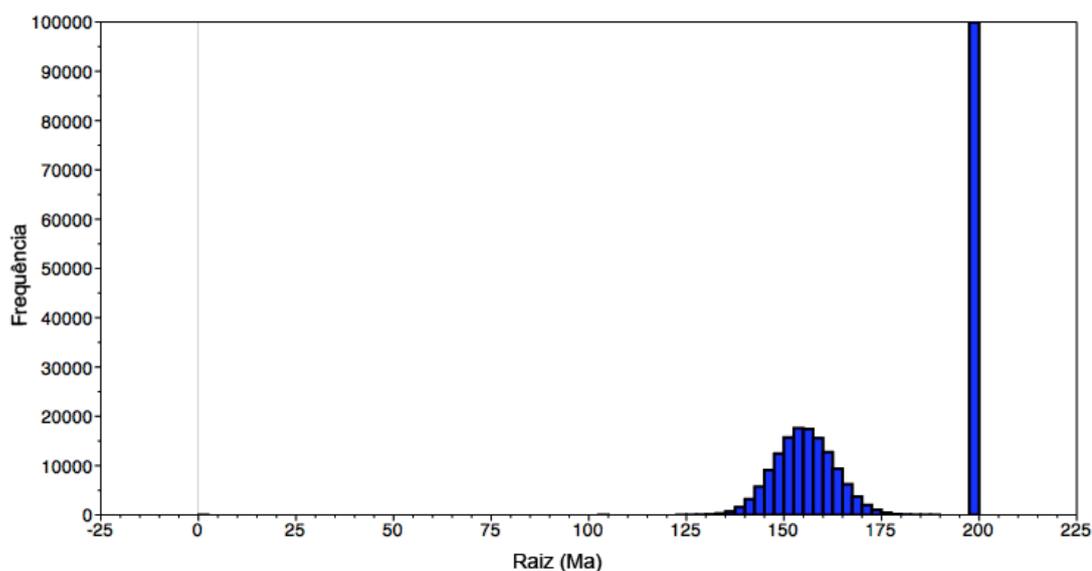
Para testar o quanto os dados utilizados para a inferência, neste caso a supermatriz, estão contribuindo para a inferência do tempo de divergência, foi conduzida uma análise utilizando a opção amostragem somente do *prior* (*sample from prior only*) ao final da construção de cada um dos arquivos *.xml* gerados no programa BEAUti, observando se os dados presentes nos genes que compõem a supermatriz apresentam informações evolutivas suficientes para a inferência. Com esta opção selecionada, a corrida de MCMC é rápida e mostra os resultados da probabilidade posterior calculada somente com os *priors* fornecidos para o programa, ou seja, a árvore, o *prior* para a árvore (*Yule Process*) e as calibrações. Após a análise terminada, os arquivos *.trees* foram submetidos à análise com opção para estatística de *node heights* no programa TreeStat v.1.2.

Para verificar se as análises realizadas somente com os *priors* atribuídos encontraram resultados similares ou não com as que foram realizadas incluindo a supermatriz, os arquivos de saída do TreeStat foram abertos no Tracer v1.5. As idades para os nós de todas as análises foram comparadas entre os pares de análises somente com a informação *a priori* e sua respectiva análise incluindo a supermatriz.

Para as três de análises, a idade inferida para os nós utilizando somente o *prior* foram diferentes das que incluíram a supermatriz. Isso significa que a supermatriz construída nesta dissertação contribuiu significativamente para a inferência do tempo de divergência de Neobatrachia, independente da combinação de calibrações utilizada (Tabela 6). Por exemplo, a idade da raiz inferida quando utilizadas todas as calibrações foi 155 Ma na análise incluindo

a supermatriz e 199 Ma na análise sem o alinhamento. Este valor não estava incluído no intervalo de confiança atribuído a este nó incluindo a supermatriz (Figura 10).

As idades inferidas para as divergências sem o alinhamento foram sempre muito diferentes daquelas inferidas com a presença da supermatriz, não estando nem mesmo no intervalo de confiança de 95% atribuído à inferência. Além disso, foi notável o aumento da diferença para os nós de divergência mais antigas nitidamente na inferência onde não existia calibração na raiz (Tabela 6).



**Figura 10:** Representação gráfica da distribuição das posteriores para a idade da raiz na combinação com os três fósseis selecionados. A distribuição normal em torno de 150 Ma refere-se à análise que incluiu a supermatriz; o histograma localizado em 200 Ma refere-se à inferência da idade da raiz da análise que incluiu apenas a informação priori. Ma – milhões de anos.

Dado os resultados dos testes das calibrações aqui realizadas, as idades utilizadas para a apresentação dos resultados e a discussão destes, seguirá os valores do cronograma inferido utilizando a combinação das três calibrações.

### 3.5. Análise biogeográfica

Quando o padrão de distribuição geográfica de espécies relacionadas é investigado, sua associação com a história evolutiva do grupo pode sugerir dispersão, vicariância e/ou extinção. A distinção entre os dois primeiros casos depende de outras fontes de informação que permitam avaliar se o evento de especiação sendo avaliado é mais jovem ou mais antigo que uma barreira geográfica putativa. Neste caso a dispersão seria o evento onde já existiria

uma barreira geográfica prévia e, de acordo com o potencial de dispersão de um dado organismo, este poderia ter transposto esta barreira, possibilitando a formação de uma novas espécies. Já a vicariância seria o evento biogeográfico onde a evolução dos táxons estaria associado ao surgimento de um barreira geográfica. Eventos vicariantes deixariam padrão, já que em diferentes grupos taxonômicos apresentariam uma mesma história de evolução no espaço. Já eventos de dispersão, podem não deixar padrão, já que este evento é dependente da capacidade de ampliação de distribuição. É importante ressaltar que o evento biogeográfico dispersão (no inglês *dispersal*) não significa o mesmo que mobilidade de organismos no espaço associado ao potencial de dispersão destes (no inglês *dispersion*) (BUNNELL; HARESTAD, 1983; LOMOLINO; RIDDLE; BROWN, 2006).

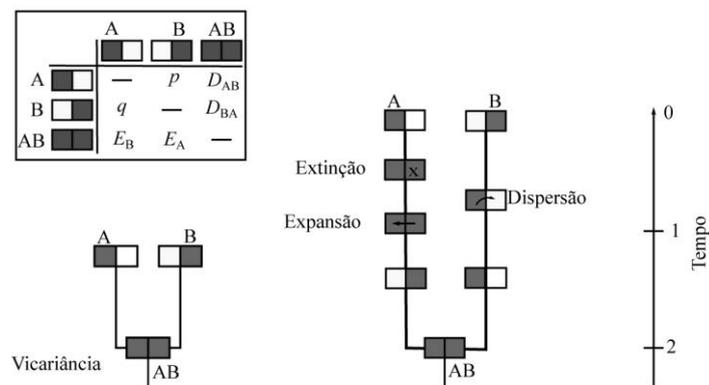
A evolução de táxons irmãos no espaço pode estar associado à três padrões biogeográficos básicos, especiação alopátrica, simpátrica e parapátrica. Na especiação alopátrica a formação de diferentes entidades biológicas se daria em reflexo à completa separação espacial do táxon ancestral, estando associado barreiras físicas. No caso da especiação simpátrica, as divergência entre espécies irmãs seria em resposta a especialização ambiental, ocorrendo em uma mesma região geográfica sem o surgimento de uma barreira física. Já a especiação parapátrica ocorreria quando duas populações ancestrais se diferenciam compartilhando áreas geográficas adjacentes, podendo estar associado à baixa vagilidade entre membros das populações (BROOKS; MCLENNAN, 1991; LOMOLINO; RIDDLE; BROWN, 2006)

Existem basicamente dois tipos de método de reconstrução da história biogeográfica, os baseados em padrão e os baseados em eventos. Ao contrário dos métodos baseados em eventos, métodos baseados em padrão são aqueles que focam no padrão existente no panorama biogeográfico dos organismos e não no processo que gerou tal padrão durante a inferência da história biogeográfica dos organismos. Mais recentemente, devido ao desenvolvimento metodológico por ML e BI, a biogeografia tem sido estudada em uma perspectiva estatística (REE; SMITH, 2008; RONQUIST; SANMARTÍN, 2011).

Existem diversas abordagens metodológicas para a realização de reconstrução biogeográfica (ver BROOKS, 1981, 1985, 1990; NELSON; PLATNICK, 1981; PLATNICK; NELSON, 1978; RONQUIST; SANMARTÍN, 2011). Esses métodos não apresentavam uma abordagem que levasse em consideração tempo de diversificação das diferentes linhagens. Eventos geológicos que condizessem com o padrão observado numa história filogenética de um determinado grupo era a ferramenta utilizada para justificar a separação de linhagens

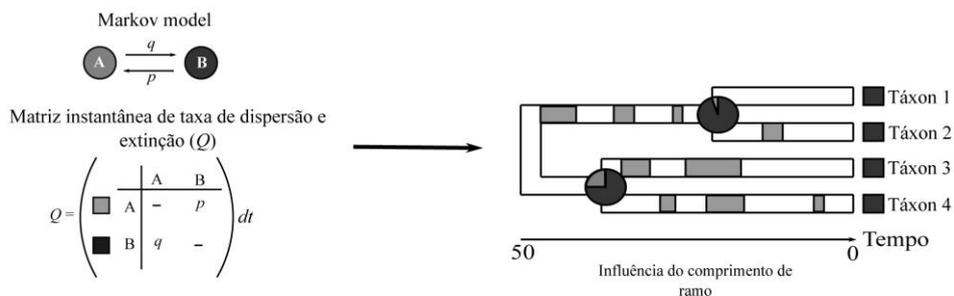
ao longo do tempo. Esta forma de “enxergar” o tempo na filogenia associando à eventos geológicos poderia atribuir viés à análise, já que se alguma outra barreira geográfica fosse identificada, a justificativa do padrão mudaria. Com o advento metodológico de inferências de tempo de diversificação de linhagens utilizando relógio molecular, a ideia de tempo passou a ser incorporada a essas estimativas biogeográficas com maior eficiência. Isso porque o tempo de diversificação dos táxons ao longo do tempo seria inferido de acordo com a história associada à história contida em informações do próprio táxons, as macromoléculas. Nesta perspectiva, o entendimento biogeográfico de um dado táxon começou ser interpretado dada uma história evolutiva com um cronograma, ou seja, com idades inferidas para cada eventos de diversificação. Desta forma, eventos geológicos ao longo do tempo passaram a serem utilizados juntamente com a história inferida para um táxon para o entendimento da evolução deste (CRISP; TREWICK; COOK, 2011; MELLO; SCHRAGO, 2012).

Tendo a inferência da história evolutiva de um dado táxon sido metodologicamente desenvolvida, métodos de reconstrução biogeográfica que utilizavam esta informação prévia para a inferência da evolução dos táxons ao longo do tempo começaram a ser desenvolvidos. Uma abordagem utilizada por alguns desses métodos foi a de associar probabilidades de um dado evento biogeográfico ter ocorrido, dada uma filogenia com tempos de divergência inferidos. Esta abordagem leva em consideração um modelo discreto de possibilidade de dispersão e extinção baseado em modelo de Markov associado à uma estimativa por ML ou BI (Figura 11). Esses modelos instantâneos de dispersão e extinção entre diferentes áreas seriam similares aos utilizados para a interpretação da evolução molecular (REE *et al.*, 2005; RONQUIST; SANMARTÍN, 2011; SANMARTÍN; VAN DER MARK; RONQUIST, 2008).



**Figura 11:** Ilustração do mecanismo utilizado por métodos probabilísticos que assumem uma matriz baseada em modelo de Markov. A e B são áreas geográficas discretas. A figura mostra, com um exemplo de vicariância, como um método probabilístico infere o a distribuição ancestral de um nó, dada uma filogenia datada. Na matriz  $D_{AB}$  refere-se à dispersão da A para área B,  $D_{BA}$  à dispersão da área B para a área A,  $E_A$  à extinção na área A e  $E_B$  à extinção na área B (modificado de SanMartín, dados não publicados).

O modelo de Dispersão-Extinção-Cladogênese (DEC) é um dos que utilizam uma abordagem probabilística para inferir a evolução de táxon no espaço ao longo do tempo. Este método foi desenvolvido com o objetivo de inferir a história evolutiva de organismos numa perspectiva geohistórica utilizando modelos de evolução de áreas explícitos, assumindo mudanças anagenéticas (ao longo dos ramos de uma filogenia) e cladogenéticas (no ponto de separação de linhagens; nó). Para as mudanças anagenéticas o modelo infere a possibilidade de mudanças entre as áreas geográficas de táxon dada uma filogenia datada com comprimentos de ramos e a matriz com as probabilidades de dispersão e extinção ( $Q$ ) em espaços de tempo geológicos com informações disponíveis de relacionamento entre as áreas onde os táxons se encontram. Como esse método leva em consideração também o comprimento de ramo da filogenia, quanto maior o comprimento de ramo maior a incerteza associada à inferência do estado ancestral. Isso porque quanto maior o comprimento de ramo em uma filogenia datada, maior o tempo e, conseqüentemente, maior a probabilidade de mudanças estocásticas da distribuição geográfica (Figura 12) (REE; SMITH, 2008; REE *et al.*, 2005). Desta forma, este modelo permite a estimativa estatística para a evolução de organismos no espaço levando em consideração a história de evolução reticulada das áreas geográficas (ver RONQUIST; SANMARTÍN, 2011).

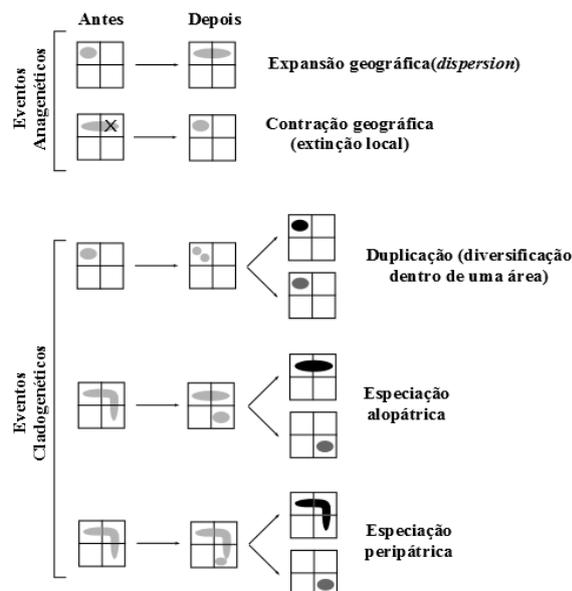


**Figura 12:** Ilustração demonstrando a lógica do método DEC. Assumindo o modelo de Markov, uma matriz instantânea da taxa de dispersão e extinção ( $Q$ ) é construída com base na conexão entre as áreas de distribuição dos táxons. A partir dessa matriz  $Q$ , a probabilidade com base na Máxima Verossimilhança da inferência das distribuições ancestrais é calculada dada a filogenia datada e o comprimento de ramo da árvore. O esquema à direita mostra uma filogenia de um grupo hipotético. Quanto maior o comprimento de ramo, maior o tempo e maior a possibilidade de mudanças de distribuição geográfica é associada à inferência da distribuição ancestral para cada nó da filogenia. Os grafos circulares representam a probabilidade da distribuição ancestral para cada nó ter sido na área A ou na área B (modificado de SanMatín, dados não publicados).

Para chegar ao cálculo da verossimilhança para cada nó, o algoritmo do DEC segue basicamente o seguinte procedimento. Inicialmente, a probabilidade de uma área geográfica ancestral é calculada dada as áreas descendentes. Este cálculo é realizado dadas as matrizes de dispersão por intervalo de tempo. Isso significa que o algoritmo, além de utilizar a informação

da distribuição geográfica dos descendentes para estimar a do ancestral, considera as pesagens da matriz dada e a idade da especiação, e por isso é necessário a entrada de uma filogenia datada. Após o cálculo das probabilidades para cada nó, o valor de verossimilhança que maximiza a possibilidade de dada distribuição ancestral ser observada em cada nó é inferido. Com base nesses valores de ML inferidos para cada nó, o valor para a verossimilhança global da árvore é calculado (REE; SMITH, 2008; REE *et al.*, 2005).

Como o DEC é um método que leva em consideração mudanças estocásticas baseadas no modelo Markoviano, as taxas de dispersão e extinção locais são as mesmas para todas as áreas e intervalos de tempo, sendo que ambas variações, espacial e temporal, podem ser acomodadas (BUERKI *et al.*, 2011; REE; SMITH, 2008; REE *et al.*, 2005; RONQUIST; SANMARTÍN, 2011). Este modelo assume diferentes padrões de mudanças geográficas por anagênese ou cladogênese. Em termos anagenéticos, ele permite a inferência de eventos de dispersão e expansão geográfica e, em termos cladogenéticos, o método permite a inferência de especiação alopátrica, ou seja, a vicariância entre duas áreas resultaria na separação de uma única área da restante da área ancestral. Além disso, permite a reconstrução de especiação peripátrica, ou seja, a separação de uma área da área ancestral resultando em um descendente ocupar esta área enquanto os outros ocupam toda a área ancestral (REE *et al.*, 2005; RONQUIST; SANMARTÍN, 2011). Estes e outros eventos permitidos para reconstrução por DEC podem ser observados na Figura 13.



**Figura 13:** Ilustração dos possíveis eventos reconstruídos por DEC. São mostrados eventos anagenéticos e cladogenéticos. As diferentes graduações das cores representam a diferenciação das populações ao longo de eventos biogeográficos. Modificado de Ronquist e SanMartín (2011).

O algoritmo DEC foi implementado no programa Lagrange (REE; SMITH, 2008). Este programa desenvolvido em linguagem de programação Python está disponível <http://code.google.com/p/lagrange/> para utilização livre. Para a realização da análise é necessário a construção de um *script*, o qual pode ser criado *online* em <http://www.reelab.net/lagrange/configurator/index>. A seguir descrição dos critérios utilizados para a análise biogeográfica utilizando o Lagrange e respectiva construção do *script*.

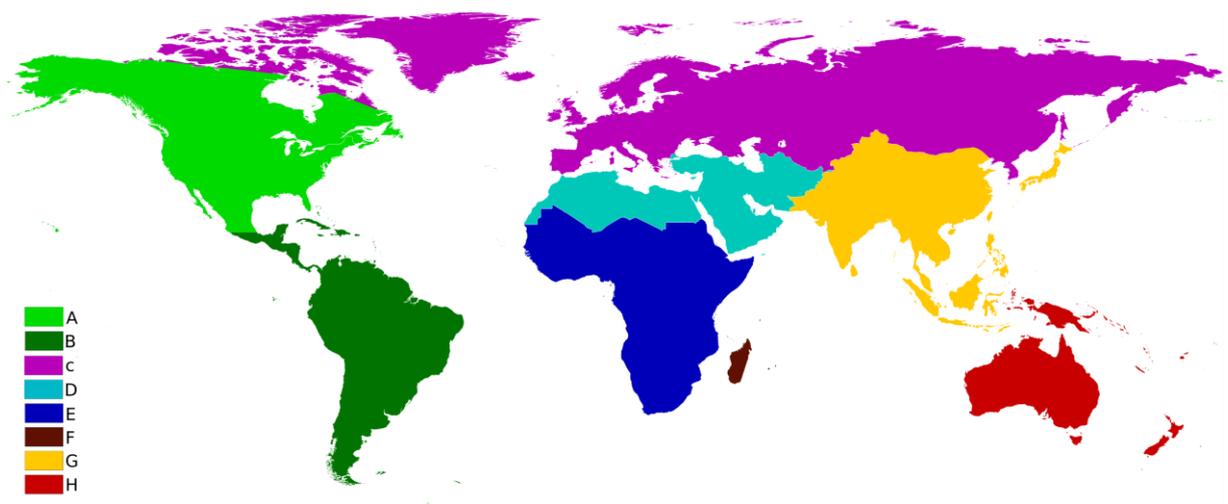
### 3.5.1. Lagrange: dados e análise

Inicialmente, as distribuições geográficas para cada um dos táxons foram definidas de acordo com Frost (2013) e AMPHIBIAWEB (2013). As distribuições geográficas para cada um dos gêneros juntamente com as informações taxonômicas do grupo estão disponíveis no Anexo 3.

As áreas de distribuição definidas para testar a história biogeográfica de Neobatrachia foram definida com base no trabalho de Holt *et al.* (2013). Esses autores utilizaram as áreas zoogeográficas de Wallace (1876) e as redefiniram para os grupos anfíbios, aves e mamíferos. Após redefinirem essas áreas, propuseram um consenso entre todas as áreas dos diferentes grupos. Para mais detalhes ver material suplementar de Holt *et al.* (2013). De acordo com as distribuições atuais de Neobatrachia, é possível que esta delimitação de áreas apresente resolução para compreender a história biogeográfica deste grupo ao longo do tempo. Por este motivo, essa proposta foi utilizada para embasar a delimitação de áreas para o estudo de Neobatrachia.

Para delimitar as áreas finais para a análise de DEC no programa Lagrange, algumas áreas primárias foram unidas devido o número limitado de áreas (oito) no programa Lagrange. O cálculo do número de áreas inferidas é igual a  $2^n - 1$ , ou seja, no caso da utilização de oito áreas o número de áreas possíveis para serem inferidas é igual a 255 (RONQUIST; SANMARTÍN, 2011; SALVO *et al.*, 2010). Um maior número de áreas aumentaria muito o tempo computacional necessário para a realização da análise. Além dessa questão de tempo computacional, as áreas finais representam unidades geográfica ao longo do tempo que permitem uma maior resolução para o entendimento de possíveis padrões biogeográficos para Neobatrachia. Tendo em vista isto, as áreas finais para a inferência biogeográfica para Neobatrachia estão descritas a seguir e podem ser observadas na Figura 14.

- A. Neártica: América do Norte, exceto o sul do México e extremo norte do Canadá e Groelândia.
- B. Neotropical+Panamaniana: essas regiões foram unidas por serem grupos irmãos no trabalho original proposto por Holt *et al.* (2013). A região Neotropical+Panamaniana compreende toda a América do Sul mais América Central, incluindo o sul do México.
- C. Paleártica: compreende todos os países europeus e parte dos asiáticos, com exceção daqueles do sudeste asiático, Índia, Sri Lanka, região sul da China, Bangladesh, Butão, Nepal e Paquistão.
- D. Saaro-Arabiana: norte da África mais Oriente Médio, exceto Sudão.
- E. Afrotropical: todos os países da África Subsaariana.
- F. Madagascariana: Madagascar e ilhas adjacentes, incluindo Seychelles, Mauritius e Reunion.
- G. Oriental+Sino-Japonesa: sudeste Asiático mais Índia, Sri Lanka, Bangladesh, Butão, Nepal e Paquistão, incluindo a região Tibetana e região sul da China.
- H. Australiana+Oceânica: essas regiões foram unidas por existirem poucos táxons exclusivos da região Oceânica e por a história geológica das áreas desta região ser mais relacionada à Austrália do que com outras áreas geográficas (ver Anexo II). Estas regiões compreendem a Austrália, Papua Nova Guiné e ilhas adjacentes.



**Figura 14:** Regiões biogeográficas utilizadas no estudo de Neobatrachia. A: Neártica; B: Neotropical+Panamaniana; C: Paleártica; D: Saaro-Arabiana; E: Afrotropical; F: Madagascariana; G: Oriental+Sino-Japonesa; H: Australiana+Oceânica.

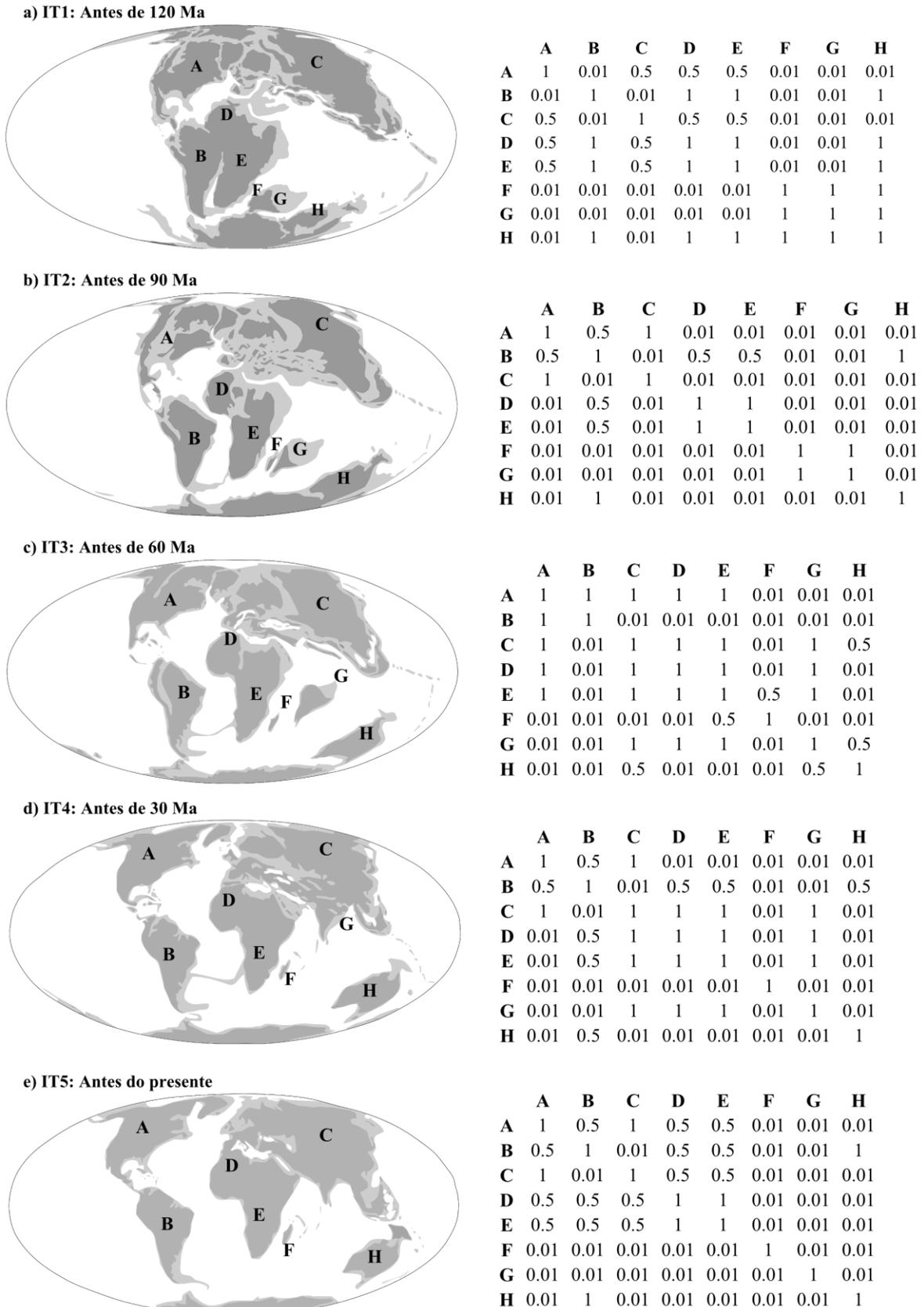
Após a delimitação das áreas, um arquivo .txt com as distribuições atuais dos Neobatrachia foi introduzido no construtor *online* de *script* do Lagrange. Junto com este arquivo com as distribuições geográficas dos táxons dadas as áreas delimitadas, foi introduzida a filogenia datada de Neobatrachia. O número máximo de áreas permitidas para a inferência de cada distribuição ancestral dos nós foi restringido para uma combinação de até três áreas. Além disso, alguns pares de áreas foram desabilitados. O critério estabelecido pelo montador de *script* do Lagrange é de que pode-se habilitar aqueles pares de áreas que uma única espécie compartilharia sem que estivessem em outra área e desabilitar quando fosse o contrário, ou seja, que não compartilhassem somente esse par de área ao longo do tempo. Após essa seleção de áreas, foram permitidas um total de 52 áreas ancestrais possíveis para a inferência da história biogeográfica de Neobatrachia.

O próximo passo foi definir as matrizes de dispersão entre as áreas aqui delimitadas ao longo do tempo. Foram delimitadas cinco intervalos de tempo (IT) ao longo da filogenia datada. A pesagem da possibilidade de dispersão entre áreas para cada uma das cinco matrizes foi realizada da seguinte forma. Foi estabelecida a pesagem com o valor igual a “1” para todas as possíveis conexões intercontinentais por proximidade de placas e/ou por conexões via evidência de pontes, como por exemplo a ponte de terra do Atlântico Norte (*Nort Atlantic land bridge*). Para as conexões por ilhas oceânicas ou continentais formadas por barreiras físicas, foi estabelecida a pesagem com o valor igual a “0.5”. Quando não existia conexões aparentes entre as áreas ou na existência de algum tipo de conexão mas a possível dispersão necessária para um dado organismo se dispersar entre elas era improvável, foi estabelecido um valor igual a “0.01”. Os valores delimitados para cada par de áreas e a descrição dessas pesagens por IT foram descritos a seguir. Junto com cada descrição de IT estão disponibilizadas as respectivas reconstruções paleogeográficas do planeta e as matrizes de dispersão.

#### **3.5.1.1. Primeiro intervalo de tempo delimitado (IT1), antes de 120 Ma (Jurássico Médio-Superior ao Barremiano, Cretáceo Inferior, Figura 15a).**

Neste período a separação da Pangea em Gondwana e Laurasia já havia iniciado (180 Ma). O surgimento do Oceano Atlântico Central separou o oeste da Gondwana do oeste da Laurasia, o qual não deixou nenhuma rota por terra firme direta (ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999; SANMARTÍN, 2001; SCOTese, 2002). As massas continentais,

Paleártico e Neártico, que compunham o continente do norte, a Laurasia, mantiveram-se unidos pela conexão entre Europa e Groelândia via Ilhas Britânicas no Proto-Atlântico Norte (SANMARTÍN, 2001). O continente do sul, a Gondwana, era composto pelas áreas continentais América do Sul, África, Antártica, Austrália, Índia, Seicheles e Madagascar, as quais permaneceram conectadas até aproximadamente 170 Ma, quando o leste da Gondwana (Antártica+Austrália+Índia+Seicheles+Madagascar) iniciou sua separação do oeste da Gondwana (América do Sul+África). A segunda quebra da Gondwana foi há cerca de 167 Ma, quando a África separou da Índia-Madagascar-Antártica. Em sequência, Índia-Madagascar separou de Antártica-Austrália há cerca de 130 Ma (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013). A América do Sul permaneceu conectada à Austrália até o Eoceno, há cerca de 40 Ma (ALMEIDA *et al.*, 2012; WOODBURNE; CASE, 1996). Além desta, existiu uma conexão por ilha ao longo do Oceano Atlântico Sul entre África e América do Sul até o Eoceno (ver OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Esta conexão permitiu uma possível rota de dispersão da África para a Austrália, via América do Sul. A dispersão entre Laurasia e Gondwana, possivelmente, começaram a diminuir neste período, tendo conexão somente por meio de ilhas entre os dois continentes (SCOTese, 2002).



**Figura 15:** Modelo paleogeográfico utilizados na análise biogeográfica para Neobatrachia utilizando o Lagrange (REE; SMITH, 2008). São mostrados os cinco intervalos de tempo (IT) delimitados e suas respectivas matrizes de dispersão, refletindo as probabilidades de conectividade ao longo do tempo.

### **3.5.1.2. Segundo intervalo de tempo delimitado (IT2), antes de 90 Ma (Aptiano, Cretáceo Inferior ao Turoniano, Cretáceo Superior, Figura 15b).**

Neste período de tempo, Laurasia e Gondwana já estavam separados. Existia plataforma continental conectando essas áreas. No entanto, houve um aumento do nível marinho neste período, o que possivelmente diminuiu a possibilidade de dispersão até mesmo por ilhas entre essas áreas (SCOTese, 2002). O oceano Atlântico Norte começou a surgir no Cretáceo Superior, há cerca de 90 Ma. Após a abertura deste oceano a dispersão entre as massas continentais da Laurasia, Neártico e Paleártico ocorria através da conexão por pontes de terra, a de Bering, a partir de cerca de 100 Ma até o Plioceno (~3.5 Ma; a conexão por Bering existiu em ciclos ao longo do Pleistoceno também), e através da ponte do Atlântico Norte, a partir da transição Cretáceo-Paleógeno. Estas conexões, via pontes de terra no Atlântico Norte, permaneceram até pelo menos o Mioceno (DENK; GRÍMSSON; ZETTER, 2010; DENK *et al.*, 2011; SANMARTÍN, 2001; TIFFNEY, 1985 a, 1985 b).

Estas conexões, tanto pela ponte de terra Beringiana quanto pela ponte do Atlântico Norte, permitiram que as dispersões entre Paleártico e Neártico, em todos os intervalos de tempo delimitados para esta análise biogeográfica a partir do Aptiano, Cretáceo Inferior (IT2-IT5), tenham sido pesadas com o valor “1” (Fig. 12b). Neste período, a abertura do Atlântico Sul iniciou a separação das massas continentais da África e América do Sul, as quais estavam já separadas há cerca de 100 Ma (MCLOUGHLIN, 2001). Apesar disso, existem vestígios geológicos que sugerem que existiu uma conexão entre África e América do Sul até o Eoceno Superior, há cerca de 40 Ma (EZCURRA; AGNOLÍN, 2012; KASTENS; BONATTI; CARESS, 1998; LAWVER; GAHAGAN, 2003; MARKWICK; VALDES, 2004; OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Esta evidência de conexão entre essas duas áreas foi utilizada para pesar com valor “0.5” entre América do Sul (B) até área Saaro-Arabiana (D) e B até a África Tropical (E), nos intervalos de tempo aqui delimitados IT2-IT4 (Figura 15b-d). A possibilidade de dispersão entre a região Neotropical (B) e Neártica (A) foi a partir do deste intervalo de tempo (IT2) até o IT4 pesado com o valor “0.5”, já que ao longo destes períodos existiram diferentes conexões por ilhas entre essas duas áreas, como a Gaarlândia na transição Eoceno-Oligoceno (~35 até 33 Ma) por exemplo (ver ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999). Neste período ocorreu também a separação da Índia (G) de Madagascar (F) há cerca de 90 Ma, sendo que Seicheles ainda estava junto com a Índia (Figura 15b) (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013). A conexão entre o Paleártico e a parte continental da área G,

que seria um proto Sudeste Asiático e região Sul da China seria prejudicada pela ampla área árida que recobriu toda essa região até cerca de 60 Ma (SCOTese, 2002).

### **3.5.1.3. Teceiro intervalo de tempo delimitado (IT3), antes de 60 Ma (Turoniano, Cretáceo Superior ao Daniano, Paleoceno Inferior, Figura 15c).**

Como já descrito anteriormente, neste período ainda existia a conexão entre Neártico (A) e Paleártico (C). Neste período, possivelmente, existiu uma interrupção pelo aumento do nível do mar no final do Cretáceo entre as áreas Saaro-Arabiana (D) e África Tropical (E) com o Paleártico (C). No entanto, a dispersão subsequente entre as áreas D e E para a área C foi possível por conexões por ilhas na baixa do nível marinho. Existem evidências da possibilidade de dispersão com grupos fósseis até o Eoceno (~36 Ma) (ver EZCURRA; AGNOLÍN, 2012). Desta forma, essas conexões, C até D e C até E, foram pesadas com o valor “0.5” neste intervalo de tempo (IT3) até o IT4 (Fig. Figura 15c-d). Neste período foi quando ocorreu a separação da Índia (G) com Seichelis (F). Seicheles era unida à Índia pela cordilheira Laxmi. Há cerca de 70 Ma esta cordilheira, junto com Seicheles, separou-se da Índia. Em um segundo momento, a cordilheira Laxmi voltou a se conectar à Índia e essas duas massas continentais juntas se separaram de Seicheles definitivamente à cerca de 65 Ma (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013).

### **3.5.1.4. Quarto intervalo de tempo delimitado (IT4), antes de 30 Ma (Daniano, Paleoceno Inferior ao Rupeliano, Oligoceno Inferior, Figura 15d).**

Durante este período de tempo o continente Africano se conectou com o Paleártico com o fechamento do mar de Tethys, permitindo a conexão entre as áreas D e E com a C. Neste mesmo período, a Índia deslocou-se rapidamente em direção ao sul do Paleártico, onde colidiu com o Sul Asiático, há cerca de 52 Ma. Iniciou-se a formação do que foi aqui definida como área G, composta neste momento pelo proto Sudeste Asiático mais Índia, e a área que relativa no presente ao Sri Lanka, Bangladesh, Butão, Nepal e Paquistão, incluindo a região Tibetana e região sul da China. Este novo panorama na conexão entre áreas permitiu que a conexão entre o Paleártico com a área G surgisse e, conseqüentemente, a conexão entre esta última e as África Tropical (E) e a região Saaro-Arabiana (D) (Figura 15d). Como já descrito

anteriormente, a conexão entre a América do Sul (B) e a Austrália (H) via Antártica permaneceu desde a Pangea até cerca de 40 Ma. Esta conexão mais recente foi possível devido a transgressões marinhas e via Tasmânia, sendo assim a possibilidade de dispersão neste período pesada com o valor “0.5” (ver WOODBURNE; CASE, 1996). Desta forma, no Eoceno Superior todas as massas continentais da Gondwana estavam separadas da Antártica (Figura 15 d).

#### **3.5.1.5. Quinto intervalo de tempo delimitado (IT 5), depois de 30 Ma (Rupeliano, Oligoceno Inferior ao Neogeno, Figura 15e).**

No último período definido aqui, foi quando planeta sofreu as mais significativas mudanças climáticas, o que influenciou não só na temperatura global, mas também na variação do nível do mar (SCOTESE, 2002). Neste panorama de conexão de massas continentais é possível imaginar que muitas das áreas biogeográficas aqui utilizadas estavam conectadas antes não conectadas passaram a estar conectadas. Nesta perspectiva, é possível sugerir a conexão da Austrália com toda a região G, já definida anteriormente, por ilhas. Da mesma forma, passa a ser possível sugerir que o Paleártico poderia estar conectado com a Austrália também por ilhas, mesmo com o surgimento do Himalaia há cerca de 10 Ma (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTESE, 2013). Neste período as ilhas do pacífico estavam formadas e podem ter servido como rota para dispersão (AUDLEY-CHARLES, 1991; METCALFE, 1998; NEALL; TREWICK, 2008). Além dessas novas possibilidades de conexões, a possibilidade de dispersão do Neártico para o Neotrópico também aumentou, devido as variações do nível marinho, já que as ilhas do Caribe estavam todas formadas neste período e posterior fechamento do Istmo do Panamá no Plioceno (ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999; MANN, 2007). Outra conexão que, possivelmente, começou a existir neste período foi a conexão entre o leste africano (E) com Madagascar (F) por ilhas vulcânicas existentes no canal de Moçambique possivelmente a partir do Langhiano, Mioceno Superior, há cerca de 15 Ma (NOUGIER; CANTAGREL; KARCHE, 1986; ROCHA; CARRETERO; HARRIS, 2005).

Após esta delimitação das matrizes de dispersão, o *scritp* foi gerado. Este foi rodado localmente no programa Lagrange e teve duração de 55.9 horas.

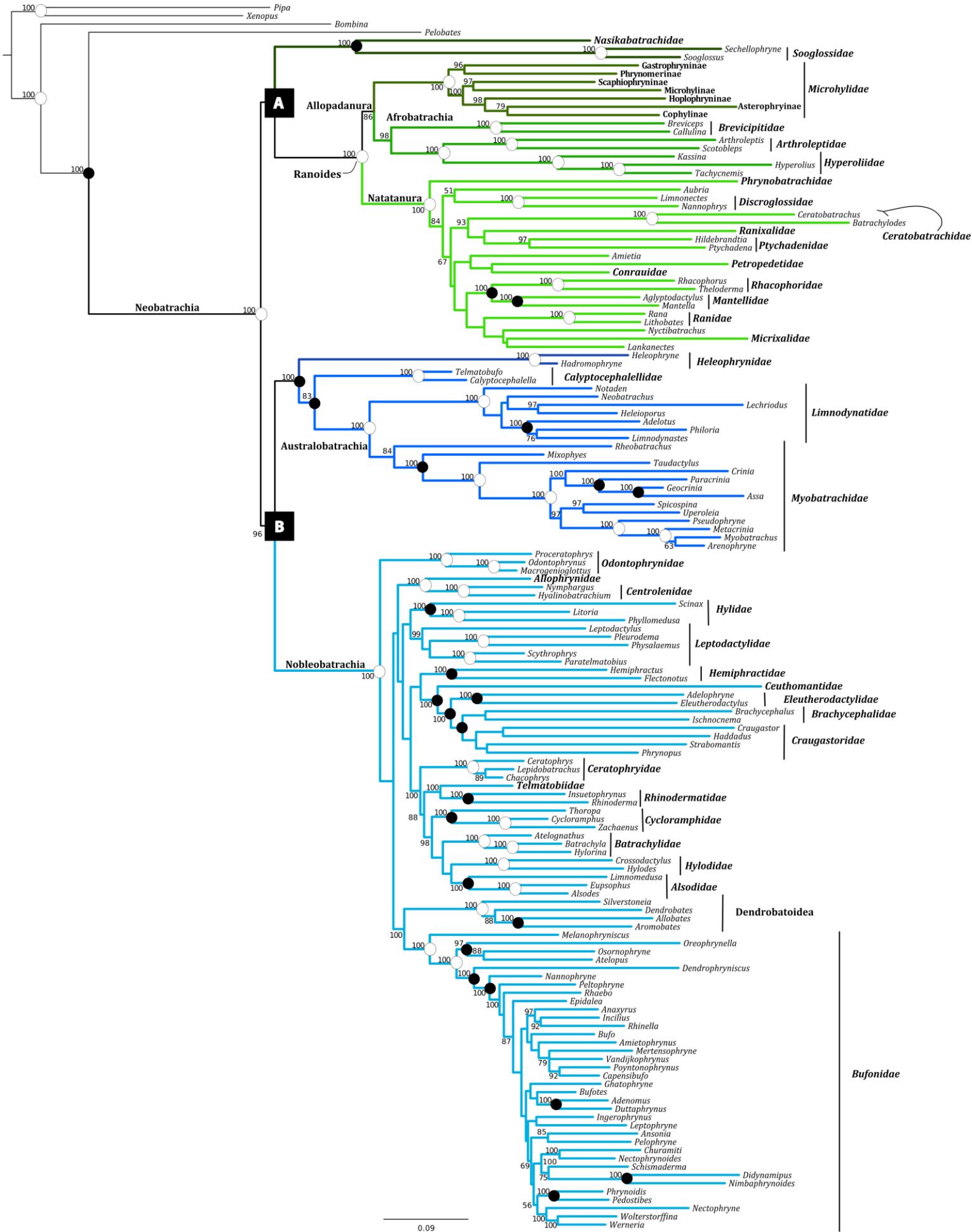
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Relações filogenéticas de Neobatrachia

A filogenia aqui reconstruída sob o método de ML foi mostrada na Figura 16. Ao longo do texto, estarei explicitando os valores de suporte para ML e para a filogenia de BI dentro de parênteses para grupos monofiléticos. Assim, BS é referente aos valores de *bootstrap* da análise por ML e PP se refere aos valores probabilidade posterior da análise por BI.

Assim como em outros trabalhos, o monofiletismo de Neobatrachia foi recuperado (BS 100; PP 100) (BIJU; BOSSUYT, 2003; FROST *et al.*, 2006; HOEGG *et al.*, 2004; IRISARRI *et al.*, 2012; PRAMUK *et al.*, 2008; PYRON; WIENS, 2011; PYRON, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005) e se apresentou como grupo irmão de Pelobatidae, também em concordância com resultados de outros autores (FROST *et al.*, 2006; IRISARRI *et al.*, 2012; PYRON; WIENS, 2011; PYRON, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; ZHANG *et al.*, 2013).

Além do suporte molecular, Neobatrachia apresenta caracteres morfológicos que corroboram existência do clado. Tais caracteres incluem a presença de músculo sartório distinto do músculo semitendinoso, osso palatino, terço carpal distal fundido (convergente em *Pelodytes*), músculo adutor longo acessório na cabeça e ossificação para-hióide (FORD; CANNATELLA, 1993; FROST *et al.*, 2006; HAAS, 2003), como já mencionado. De uma maneira geral, cerca de 90% das famílias testadas foram reconstruídas como monofiléticas, com valores de suporte elevados (Figura 16). Na filogenia de ML, Neobatrachia está subdividido em dois grandes grupos monofiléticos, aqui denominados clado A e clado B para facilitar a descrição da filogenia (Figura 16).



---

**Figura 16:** Filogenia reconstruída sob os métodos de Máxima Verossimilhança (ML) com o programa RAxML 7.3.2 e Inferência Bayesiana com o programa MrBayes 3.1.2 disponíveis no servidor online CIPRES. Esta topologia foi encontrada pelo método de ML. Os nós reconstruídos no método bayesiano concordantes com a topologia de ML apresentam os valores de probabilidade posterior próximo aos nós. Ramos destacados em colorido serão descritos e discutidos. Grupos monofiléticos são mostrados em negrito. Nomes próximos aos terminais ou nos terminais são famílias ou superfamílias reconstruídas como monofiléticas (negrito/itálico). Nomes próximos aos nós ou sobre ramos representam grupamentos taxonômicos definidos por Frost *et al.* (2006), aqui reconstruídos como monofiléticos. Círculos brancos representam valores de *bootstrap* iguais a 100, o círculo preto representa esses valores referentes à *bootstrap* menores do que 100 e maiores ou iguais a 75. Aqueles nós com valores menores do que 75 ou que não foram reconstruídos no método bayesiano não apresentam nenhuma representação.

#### 4.1.1. Clado A

O clado A foi composto por duas grandes linhagens, a linhagem (Nasikabatrachidae, Sooglossidae) (BS 97; PP 100) que é grupo irmão da grande linhagem Ranoides (Figura 16). Esta linhagem inclui grupos taxonômicos que abrangem 2.367 espécies conhecidas (ver FROST, 2013). Na topologia de ML, podemos distinguir 17 famílias, a grande maior parte monofilética com valores medianos a altos de suporte.

A linhagem (Nasikabatrachia, Sooglossidae) é pouco diversa, sendo representada por apenas cinco espécies conhecidas, com a família Nasikabatrachidae monotípica (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013). A família Sooglossidae apresenta caracteres morfológicos e comportamentais que a define como grupo natural (BIJU; BOSSUYT, 2003; NUSSBAUM; WU, 2007). O relacionamento entre Nasikabatrachidae e Sooglossidae é reconhecido desde que a descrição original de Nasikabatrachidae (BIJU; BOSSUYT, 2003). Curiosamente, existem propostas com base em caracteres morfológicos de girinos que referenciam Nasikabatrachidae como relacionado a outros táxons diferentes de Sooglossidae (e. g. NUSSBAUM; WU, 2007; RAJ *et al.*, 2012). Apesar dos autores que encontraram o relacionamento entre Nasikabatrachidae e Sooglossidae não terem proposto caracteres morfológicos que sustentassem este clado, Van der Meijden e colaboradores (2007 a) mencionam que estas duas famílias compartilhariam a ausência de tímpano.

Além disso, nos trabalhos que não incluíram Nasikabatrachidae, a maioria encontrou Sooglossidae relacionada com Ranoides (IRISARRI *et al.*, 2012; PYRON, 2011; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; ZHANG *et al.*, 2013), como na topologia aqui apresentada. A única exceção foi o trabalho da Hoegg e colaboradores (2004), onde Sooglossidae foi reconstruída como grupo irmão de Nobleobatrachia. Entretanto, vale a pena notar que o valor de suporte do clado A é baixo (BS 44; PP 57) (Figura 16).

Na grande linhagem Ranoides, também duas grandes linhagens foram evidentes. Mais especificamente, a linhagem Allopadanura (BS 28 PP 86) se apresenta como grupo irmão de Natatanura (BS 100 PP 100) (ver também BOSSUYT *et al.*, 2006; FROST *et al.*, 2006; ROELANTS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013).

Allopadanura representa 38% da diversidade do clado Ranoides, com 906 espécies conhecidas (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013), com caracteres morfológicos que sustentam este clado como um grupo natural (ver FROST *et al.*, 2006; HAAS, 2003). Allopadanura foi composto pelas linhagens Afrobatrachia como grupo irmão da família Microhylidae (Figura 16). As três famílias de Afrobatrachia e as sete subfamílias de Microhylidae foram recuperadas monofiléticas com altos valores de suporte (Figura 16).

Para Natatanura, por outro lado, 13 famílias foram amostradas e somente Pyxicephalidae e Nyctibatrachidae foram parafiléticas. Este é o clado mais diverso de Ranoides, representando grupos taxonômicos com 68% das espécies conhecidas (1.456 espécies) (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013). O status parafilético de tais famílias pode estar relacionado ao reduzido número de representantes selecionados com informação filogenética suficiente. De fato, um estudo com a maior representatividade taxonômica recuperou Nyctibatrachidae como monofilética (VAN BOCXLAER *et al.*, 2012). Para a família Pyxicephalidae, por outro lado, os representantes aqui utilizados foram encontrados como *rogue taxa* o que justificaria sua posição filogenética incerta.

#### **4.1.2. Clado B**

O outro clado de Neobatrachia, o clado B (BS 54; PP 95), foi reconstruído composto por duas linhagens, (Heleophrynidae, Australobatrachia) (BS 78; PP 100) que é grupo irmão de Nobleobatrachia (BS 100 PP 100) (Figura 16). O clado é bem diverso, representando grupos taxonômicos que incluem 3.593 espécies conhecidas (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013).

A família Heleophrynidae foi reconstruída como monofilética (BS 100; PP 100) e a mesma apresenta apenas sete espécies conhecidas com distribuição restrita a altitudes elevadas (FROST, 2013). A família apresenta vários caracteres morfológicos sinapomórficos que a diferencia de outras linhagens, mesmo das mais aparentadas (FORD; CANNATELLA, 1993; FROST *et al.*, 2006; HAAS, 2003).

Na maioria dos trabalhos que utilizaram Heleophrynidae, esta família foi reconstruída como grupo irmão de todo o resto da diversidade de Neobatrachia (e.g. CORREA *et al.*, 2006; FROST *et al.*, 2006; HOEGG *et al.*, 2004; IRISARRI *et al.*, 2012; PRAMUK *et al.*, 2008; PYRON; WIENS, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). Aqui, por outro lado, esta família foi reconstruída como grupo irmão de (Calyptocephalellidae, (Limnodynastidae, Myobatrachidae)), relacionamento este que já foi inferido por outros autores (e.g. BIJU; BOSSUYT, 2003; PYRON, 2011; VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2007 a).

Wiens (2005), com base em dados simulados, observou que a falta de táxons influenciou na acurácia da inferência filogenética, independente do algoritmo utilizado, sendo que os métodos baseados em modelos tenderam a ser mais acurados. Tendo em vista isso, a baixa diversidade de Heleophrynidae associada ao longo comprimento de ramo como mostra a (Figura 16), esta família pode ser um exemplo empírico do que foi visto por Wiens (2005) com dados simulados. Talvez, a falta de algum táxon mais relacionado à ele filogeneticamente esteja influenciando no seu posicionamento em relação às outras linhagens de Neobatrachia.

Uma solução para a influência da ausência de táxons seria a utilização de dados de fósseis nas inferências de filogenias (ver WIENS, 2005). Teoricamente, isto diminuiria o ruído deixado pelas linhagens com tamanhos de ramo longos, já que poderiam ter o tamanho de ramo reduzido. Dentre os trabalhos que incluíram representantes de Neobatrachia, um deles utilizou dados de fósseis (PYRON, 2011) e a filogenia foi inferida e os tempos de divergência destas linhagens. Curiosamente, este foi um dos trabalhos que encontrou a família Heleophrynidae com um relacionamento filogenético diferente desta ser grupo irmão de todo o resto da diversidade de Neobatrachia, sendo reconstruída como grupo irmão de (Myobatrachidae,(Calyptocephalellidae,Nobleobatrachia)).

A linhagem irmã de Heleophrynidae, Australobatrachia (BS 73; PP 83), foi composta pela família Calyptocephalellidae (BS 100 PP 100) que aparece como irmã da linhagem (Limnodynastidae, Myobatrachidae) (BS 100; PP 100), (Figura 16) (ver também FROST *et al.*, 2006; IRISARRI *et al.*, 2012; PYRON; WIENS, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005). Este clado representa 4% da diversidade total que está representada no clado B (AMPHIBIAWEB, 2013; FROST, 2013). A linhagem (Myobatrachidae, Limnodynastidae) já foi registrada em outros trabalhos (e.g. FROST *et al.*, 2006; PYRON; WIENS, 2011; ROELANTS *et al.*, 2007). Em algumas classificações, o status de Limnodynastidae foi alterado para uma subfamília de Myobatrachidae (ver

BLACKBURN; WAKE, 2011; HEYER; LIEM, 1976; PYRON; WIENS, 2011).

A linhagem irmã de (Heleophrynidae, Australobatrachia), Nobleobatrachia, foi reconstruída como monofilética (BS 100 PP 100) (Figura 16). Este clado contém representantes do grupo mais diverso dentre os Neobatrachia com representantes de grupos taxonômicos que abrangem um total de 3.443 espécies conhecidas. Dentre todas as 19 famílias selecionadas para o presente estudo, apenas uma foi parafilética, Dendrobatidae. Aquelas que foram monofiléticas foram reconstruídas com altos valores de suporte, sendo porém os relacionamentos entre tais famílias tiveram valores de suporte relativamente mais baixos (Figura 16). Nobleobatrachia não apresenta caracteres morfológicos exclusivos que sustentem o monofiletismo do grupo (FORD; CANNATELLA, 1993; FROST *et al.*, 2006).

#### 4.2. A evolução de Neobatrachia no espaço e tempo

Para estimativa dos tempos de divergência e a análise de biogeografia, foi selecionada uma abordagem conservadora na qual somente fósseis com identificação confiável foram utilizados como pontos de calibração. Neste sentido, a idade da divergência entre Neobatrachia e seu grupo irmão foi inferida para o Cretáceo Inferior, por volta de 138 Ma, sendo tal data mais recente quando comparada com outros trabalhos (Tabela 7). De acordo com a inferência biogeográfica, no momento dessa divergência, o ancestral de Neobatrachia estava, possivelmente, amplamente distribuído pelos subcontinentes gondwânicos.

O registro de fósseis mais antigo para Neobatrachia, *Cratia gracilis*, foi encontrado no nordeste do Brasil e datado para o Cretáceo Inferior, sendo que este possivelmente faria parte da linhagem ramo de Neobatrachia (BÁEZ; MOURA; GÓMEZ, 2009). Desta forma, as hipóteses de que este grupo tenha divergido do seu grupo irmão no Jurássico (IRISARRI *et al.*, 2012; MARJANOVIĆ; LAURIN, 2007; PYRON, 2011), no Triássico (ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005; ZHANG *et al.*, 2013) ou no Permiano (IGAWA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2005) são menos plausíveis.

Assim como para a idade de divergência de Neobatrachia do seu grupo irmão, a idade inferida aqui para a diversificação de Neobatrachia foi para o Cretáceo Inferior (~110 Ma), também mais recente em comparação a outros trabalhos (Tabela 7). Dentre estas diferentes propostas, poucos trabalhos incluíram representantes para todas as grandes linhagens de Neobatrachia usadas na presente dissertação (Sooglossidae, Nasikabatrachidae, Ranoides, Heleophrynidae, Australobatrachia e Nobleobatrachia), o que dificulta a comparação entre as

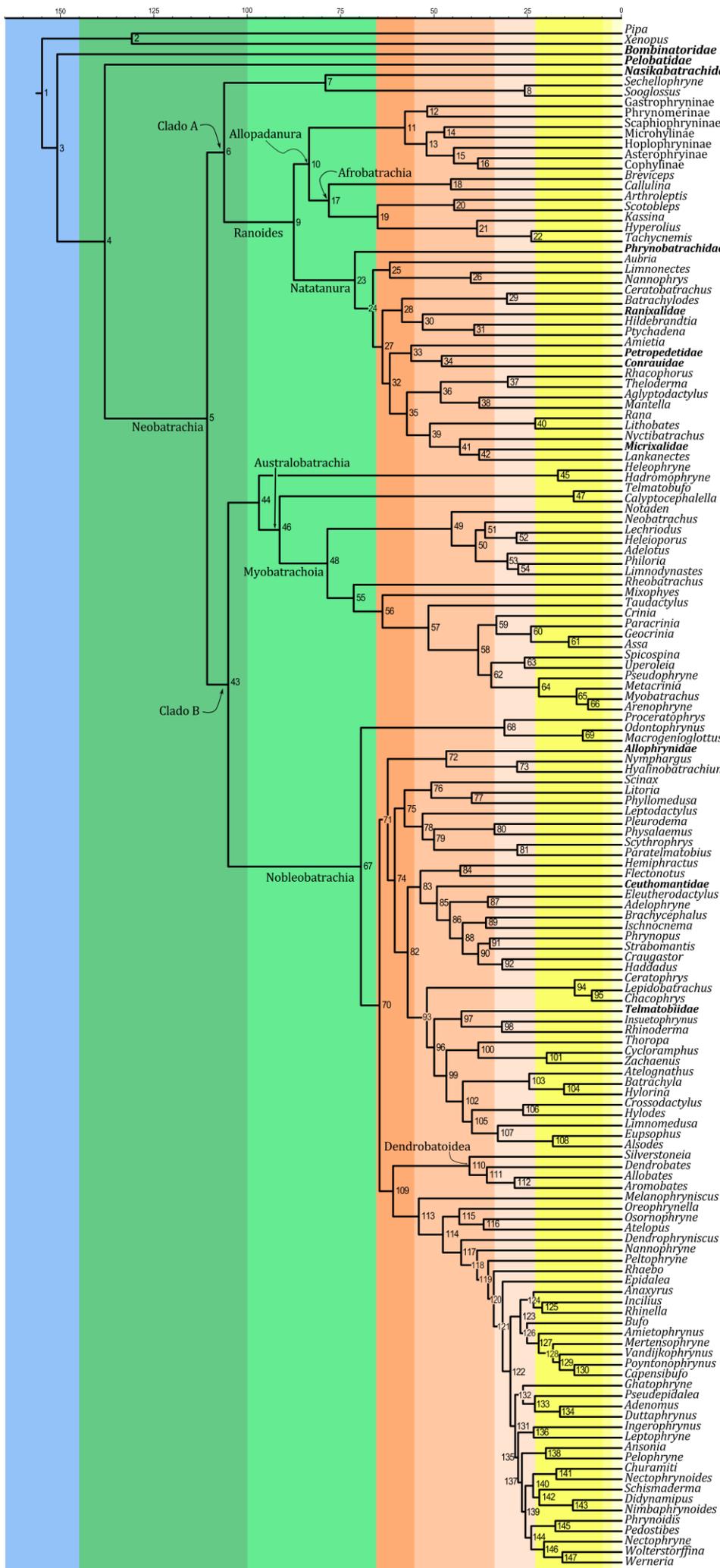
topologias.

As diferentes estimativas realizadas para Neobatrachia que inferiram o início da diversificação mais antigas, para o Jurássico, utilizaram somente calibrações externas ao grupo (BIJU; BOSSUYT, 2003; ZHANG *et al.*, 2005), calibrações com fósseis e eventos biogeográficos (IGAWA *et al.*, 2008; ROELANTS *et al.*, 2007; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005) e somente com calibrações fósseis (IRISARRI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). Calibrações externas ao grupo estudado conferem um viés à inferência (HELED; DRUMMOND, 2012). Da mesma forma, a utilização de pontos de calibração datados por eventos ou biogeográficos imbuem um erro à inferência, resultando em idades mais recentes ou mais antigas do que quando utilizados outros tipos de calibração (ver MELLO; SCHRAGO, 2012). Apesar de terem utilizado pontos de calibração utilizando fósseis, Zhang e colaboradores (2013) assumem uma distribuição uniforme para todas as calibrações, utilizando as idades dos fósseis como idade mínima da calibração, assumindo, então, que a probabilidade de dada divergência ter ocorrido seria igual ao longo do tempo calibrado. Irisarri e colaboradores (2012), utilizaram apenas um ponto de calibração dentro de Neobatrachia, possibilitando uma distribuição bastante ampla para a divergência de Calyptocephalellidae e Limnodynastidae, variando de 52 Ma a 145 Ma. Por outro lado, aqueles trabalhos que inferiram a diversificação para o Cretáceo, como na presente dissertação, também utilizaram somente dados de fósseis (MARJANOVIĆ; LAURIN, 2007) ou fósseis como terminais (PYRON, 2011).

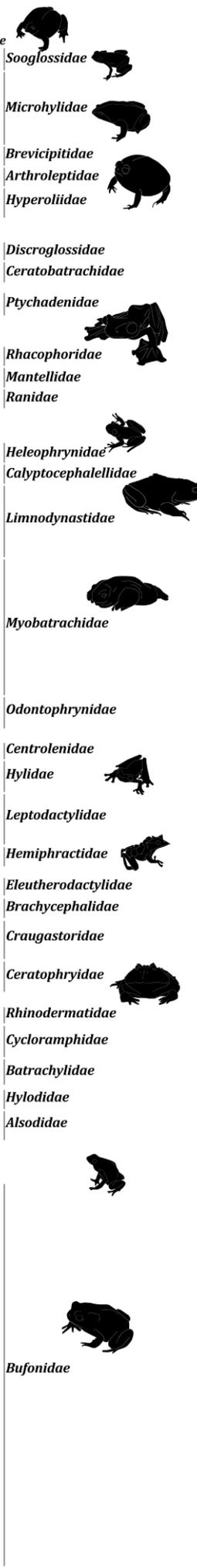
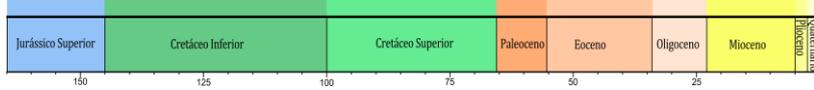
As grandes linhagens de Neobatrachia, (Sooglossidae, Nasikabatrachidae), Ranoides, Heleophrynidae, Australobatrachia e Nobleobatrachia, começaram a diversificar no no Cretáceo Superior (Figura 17). Ao realizar uma busca por Neobatrachia no banco de dados *online* Paleobiology database (PALEODB, 2013), os fósseis para Neobatrachia começaram ter registros no Cretáceo Inferior (BÁEZ; MOURA; GÓMEZ, 2009; BÁEZ *et al.*, 2012). Os primeiros registros para Neobatrachia foram datados para o Cretáceo Inferior, entre o Aptiano e o Albiano. Tais fósseis foram atribuídos aos gêneros extintos *Arariphrynus*, *Eurycephalella* e *Cratia*, registrados no nordeste do Brasil (ver BÁEZ *et al.*, 2012). Isto significa que a idade inferida aqui para a diversificação do grupo é condizente com o registro fóssil.

**Tabela 7:** Tabela comparativa entre os valores do tempo de divergência em milhões de anos de algumas linhagens de Neobatrachia. São mostrados os valores de divergência das linhagens ramo e do grupo coroa para cada uma das linhagens. Os valores entre colchetes referem-se aos intervalos de confiança para cada umas das inferências de tempo em milhões de anos. Os valores apresentados deste trabalhos referem-se aos inferidos utilizando os três pontos de calibração inicialmente selecionados. \*Foram utilizadas as idades de Roelants *et al.* (2007) por inferência de ML; \*\*As idades médias foram as informadas pelos autores e referem-se à média aritmética das idades médias encontradas nas duas análises conduzidas pelos autores, onde o intervalo de confiança disponibilizado referem-se às médias aritméticas dos valores mínimo e máximo de cada uma das análises (os valores das idades mínimas e máximas foram calculadas com base nos resultados encontrados pelos autores e disponibilizado por eles no material suplementar do artigo); - informações de estimativa do tempo de divergência ausentes.

Referência	Neobatrachia		Ranoides		Heleophrynidae	Calyptocephalellidae	Myobatrachoidea		Nobleobatrachia	
	ramo	Coroa	Ramo	Coroa	Ramo	Ramo	ramo	coroa	ramo	coroa
<i>Este trabalho</i>	138.4 [121.3-154.9]	110.9 [95.5-127.6]	106.4 [91.3-123.2]	87.8 [73.7-102.9]	97.1 [92-113.6]	91.6 [76.6-107.4]	91.6 [76.6-107.4]	78.8 [65.4-93.5]	105.3 [90.1-121.6]	69.8 [59-82.2]
Biju & Bossuyt (2003)	-	178 [131- 233]	152 [108- 202]	-	150 [109- 198]	-	150 [109- 198]	-	152 [108- 202]	-
San Mauro <i>et al.</i> (2005)	216.3 [176.1-259.7]	161.7 [127.9-198.9]	130.8 [99-166.6]	99 [69.9-132.1]	161.7 [127.9-198.9]	120.3 [90.6-154.2]	120.3 [90.6-154.2]	-	138 [108-171.6]	65 [51.9-82.8]
Zhang <i>et al.</i> (2005)	290 [268-313]	173 [152-195]	173 [152-195]	142 [123-162]	-	-	-	-	173 [152-195]	97 [81-115]
Marjarovic & Laurin (2007)	165 [152-171]	108 [72-129]	108 [72-129]	58 [34-74]	-	-	-	-	108 [72-129]	99 [72-101]
Roelants <i>et al.</i> (2007)*	222 [196.7-246.9]	166.7 [149.3-185.7]	161.3 [143.3-179.9]	118.7 [106.2-130.9]	166.7 [149.3-185.7]	129 [113.0-147.2]	129 [113.0-147.2]	107.1 [89.2-123.0]	145.6 [129.0-163.9]	63 [52.6-77.1]
Igawa <i>et al.</i> (2008)	297 [309-285]	170 [186-154]	170 [186-154]	122 [107-137]	-	-	-	-	170 [186-154]	97 [65-133]
Pyron (2011)	174.9 [117.3-245.3]	124.7 [62.2-176.5]	80.3 [20.8-137.6]	-	106.8 [52.2-159.4]	-	80.8 [30.1-134]	-	56.7 [14.8-105.9]	-
Irisarri <i>et al.</i> (2012)	192 [166-219]	160 [137-184]	139 [116-162]	114 [90-137]	150 [128-173]	108 [92-124]	108 [92-124]	-	130 [110-151]	78 [47-110]
Zhang <i>et al.</i> (2013)**	206.5 [177.5-239]	163.1 [138-191]	150.7 [127.5-177.5]	133.1 [112.5-157]	163.1 [138-191]	-	135.4 [111.5-164.5]	70 [48.5-98]	135.4 [111.5-164.5]	110.5 [90.5-135]



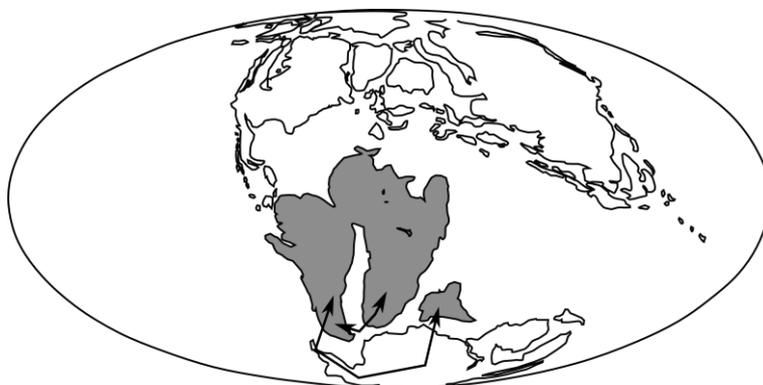
- Pipa*
- Xenopus*
- Bombinatoridae**
- Pelobatidae**
- Nasikabatrachidae**
- Sechelophryne*
- Sooglossidae**
- Sooglossus*
- Gastrophryninae
- Phrynomerinae
- Scaphiophryninae
- Microhylinae
- Hoplophryninae
- Asterophryninae
- Cophylinae
- Brevipectis*
- Callulina*
- Arthroleptidae**
- Arthroleptis*
- Scotobleps*
- Kassina*
- Hyperolius*
- Tachycnemis*
- Phrynobatrachidae**
- Audria*
- Limnonectes*
- Nannophrys*
- Ceratobatrachus*
- Batrachylodes*
- Ranixalidae**
- Hildebrandtia*
- Ptychadena*
- Amietia*
- Petropedetidae**
- Conrauidae**
- Rhacophorus*
- Theلودerma*
- Aglyptodactylus*
- Mantella*
- Ranidae**
- Rana*
- Lithobates*
- Nyctibatrachus*
- Micrixalidae**
- Lankanectes*
- Heleophryne*
- Hadromophryne*
- Telmatobufo*
- Calyptocephalella*
- Notaden*
- Neobatrachus*
- Lechriodus*
- Heleioportus*
- Adelotus*
- Philoria*
- Limnodynastes*
- Rheobatrachus*
- Mixophyes*
- Taudactylus*
- Crinia*
- Paracrinia*
- Geocrinia*
- Assa*
- Spicospina*
- Uperoleia*
- Pseudophryne*
- Metacrinia*
- Myobatrachus*
- Arenophryne*
- Proceratophrys*
- Odontophrynus*
- Macrogenioglottus*
- Allophrynidae**
- Nymphargus*
- Hyalinobatrachium*
- Scinax*
- Litoria*
- Phyllomedusa*
- Leptodactylus*
- Pleurodema*
- Physalaemus*
- Scythrophrys*
- Arenophrynoides*
- Hemiphractus*
- Flectonotus*
- Ceuthomantidae**
- Eleutherodactylus*
- Adelophryne*
- Brachycephalus*
- Aselocnema*
- Phrynopus*
- Strabomantis*
- Craugastor*
- Haddadus*
- Ceratophrys*
- Lepidobatrachus*
- Chacophrys*
- Telmatobidae**
- Insuetophrynus*
- Rhinoderma*
- Thoropa*
- Cycloramphus*
- Zachtaenus*
- Atelognathus*
- Batrachyla*
- Hylorina*
- Crossodactylus*
- Hylodes*
- Limnomedusa*
- Eupsophus*
- Alsodius*
- Silverstoneia*
- Dendrobates*
- Allobates*
- Aromobates*
- Melanophryniscus*
- Oreophrynella*
- Osornophryne*
- Atelopus*
- Dendrophryniscus*
- Nannophryne*
- Peltophryne*
- Rhaebo*
- Epidalea*
- Ancyrurus*
- Incilius*
- Rhinella*
- Bufo*
- Amietophrynus*
- Mertensophryne*
- Vandijkophryne*
- Poyntonophrynus*
- Capensibufo*
- Ghatophryne*
- Pseudepidalea*
- Adenomus*
- Duttaphrynus*
- Ingerophrynus*
- Leptophryne*
- Ansonia*
- Pelophryne*
- Churamiti*
- Nectophrynoides*
- Schismaderma*
- Diadynamis*
- Nimbaphrynoides*
- Phrynoidea*
- Pedostibes*
- Nectophryne*
- Wolterstorffina*
- Werneria*



---

**Figura 17:** Cronograma de Neobatrachia inferido no programa BEAST. Números nos nós são referências para as idades inferidas aqui disponíveis no Anexo 1. Nomes em negrito referem-se às famílias amostradas e os em letras normais às subfamílias da família Microhylidae.

Os resultados da inferência biogeográfica e do tempo de diversificação aqui encontrados sustentam a hipótese de origem gondwânica de Neobatrachia que já foi bem explorada na literatura (e.g. BÁEZ *et al.*, 2012; BOSSUYT *et al.*, 2006; FELLER; HEDGES, 1998; SAN MAURO; VENCES; ALCOBENDAS, 2005). Segundo a análise de biogeografia da presente dissertação, quando o ancestral de Neobatrachia separou do seu grupo irmão, ele apresentava uma distribuição ampla no megacontinente Gondwana (Figura 18).

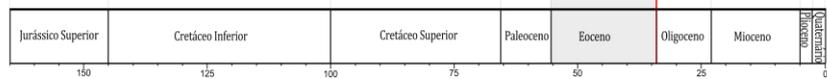
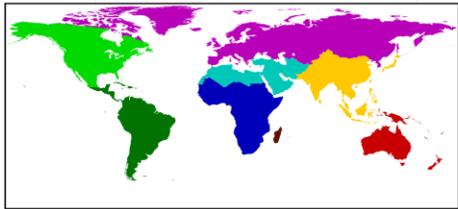
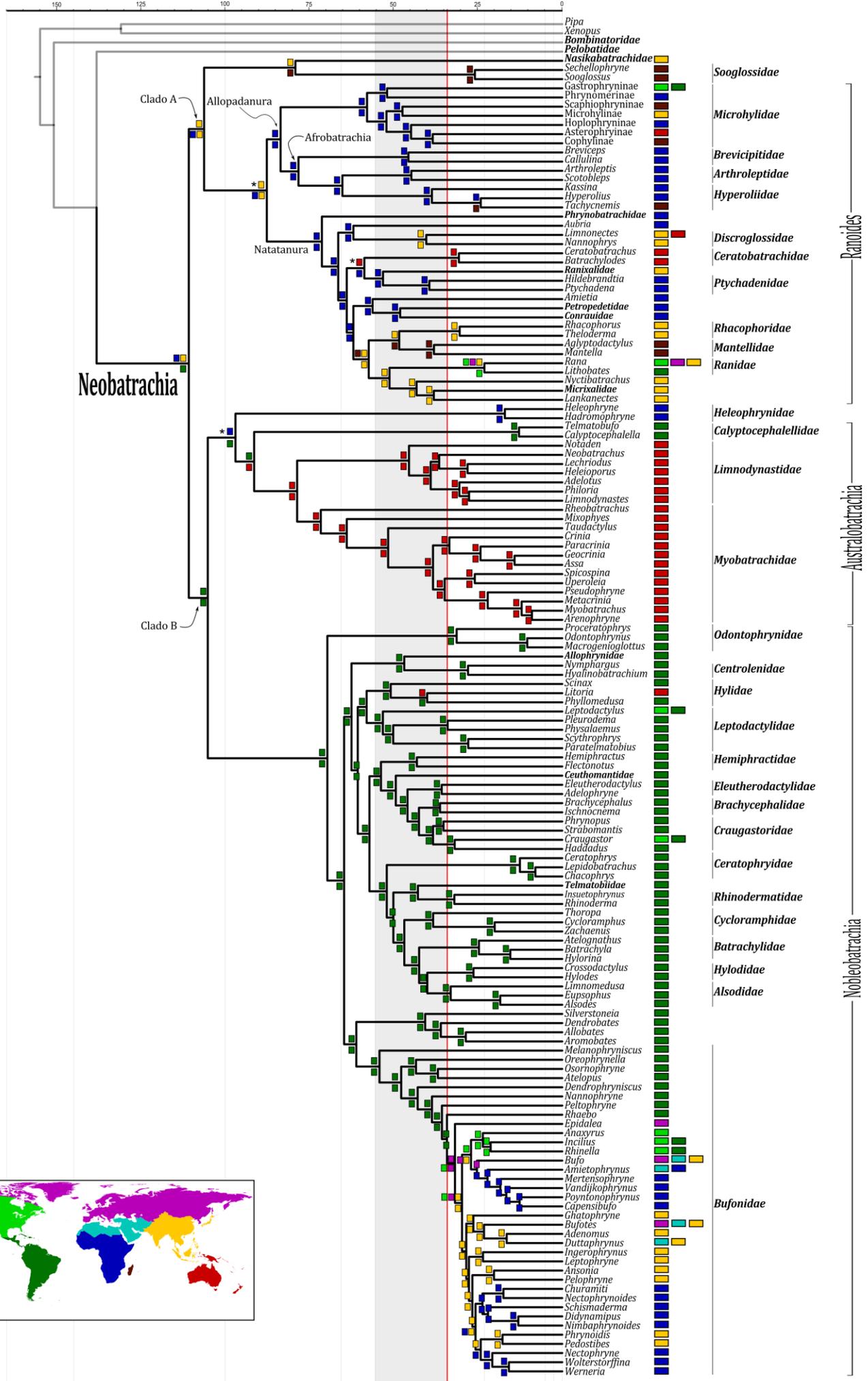


**Figura 18:** Cenário da disposição dos continentes que compunham a Gondwana no Cretáceo Inferior. As regiões sombreadas em cinza referem-se às possíveis áreas ocupadas pelo ancestral Neobatrachia neste período. A seta representa uma possível rota de conexão entre as diferentes massas continentais via Antártica. Mapa modificado de Scotese (2002).

De acordo com as inferências realizadas aqui, no momento em que começou um evento vicariante marcou o início da diversificação de Neobatrachia no Cretáceo Inferior (~110 Ma) (Figura 19). Naquele momento, a quebra primária do megacontinente promoveu a separação do ancestral do clado A que ficou na Gondwana leste e o ancestral do clado B, na oeste (Figura 19). Como Neobatrachia nunca havia sido recuperada como dividido primariamente nos cladogramas A e B (exibidos na Figura 17), os resultados apresentados aqui sugerem, pela primeira vez, uma dependência entre a quebra do megacontinente e a divergência inicial de Neobatrachia.

Com base em uma compilação de trabalhos de geologia que versavam sobre a evolução da Gondwana, McLoughlin (2001) apresentou modelos biogeográficos para plantas para este período, sugerindo que a separação entre a América do Sul e África não foi sincrônica por toda a costa. Neste sentido, a separação entre esses dois continentes ao norte parece ter

ocorrido entre 105 Ma e 109 Ma, enquanto a porção sul da América do Sul e África teriam separado anteriormente 105 Ma e 135 Ma (ver MCLOUGHLIN, 2001, p. 279). De qualquer forma, os resultados da presente dissertação sugerem fortemente que o evento vicariante aqui de separação dos clados A e B (~110 Ma) coincide temporalmente com o evento da separação entre a África e América do Sul.



---

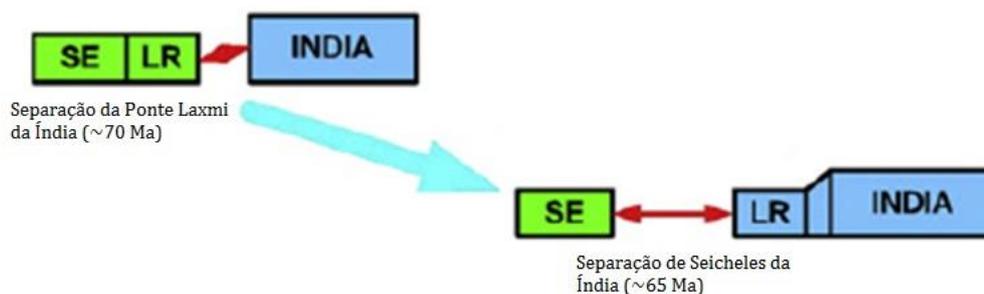
**Figura 19:** Cronograma com a reconstrução biogeográfica de Neobatrachia inferida pelo método DEC. Os retângulos ao lado dos terminais representam a distribuição atual dos táxons utilizados na análise. Os quadrados nos nós representam as áreas ancestrais reconstruídas. Foram informadas as reconstruções de áreas ancestrais mais verossímeis para cada nó. \*segunda inferência mais verossímil. O intervalo de tempo referente ao Eoceno, quando ocorreram as maiores temperaturas do Cenozóico, foi sombreada. A linha vermelha representa a transição Eoceno-Oligoceno, período quando ocorreu a primeira glaciação no Cenozóico.

#### 4.2.1. A diversificação do clado A e a evolução do leste da Gondwana

A diversificação do clado A, de acordo com o inferido aqui, estaria associada à evolução dos subcontinentes do leste da Gondwana. De acordo com a análise de biogeografia, o ancestral desta linhagem estava amplamente distribuído, na África e Índia, quando ocorreu a divergência do clado A de seu grupo irmão, por volta do Cretáceo Inferior (~110 Ma) (Tabela 7) (Figura 19).

Segundo a análise de biogeografia, quando o clado A começou a diversificar, ainda no Cretáceo Inferior (~106 Ma), a linhagem que deu origem a (Nasikabatrachidae, Sooglossidae), permaneceu no subcontinente indiano. Há cerca de 79 Ma (Figura 17, nó 7), foi inferido aqui um evento vicariante, refletindo na separação dos ancestrais das espécies que compõem as famílias Nasikabatrachidae, na Índia, e Sooglossidae, em Seycheles (Figura 21).

A história da relação entre Índia e Seicheles foi criteriosamente elucidada (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013). De acordo com esses autores, os quais utilizaram informações geológicas e bioestratigráficas para a reconstrução da história da evolução de Índia e Seicheles, essas duas massas continentais teriam separado em dois momentos (Figura 20). Entre Índia e Seicheles existia a ponte Laxmi, desde que ainda eram uma massa continental contínua. A primeira separação entre Índia e Seicheles teria ocorrido por volta de 70 Ma, quando Seicheles, juntamente com a ponte Laxmi teria separado da Índia. Em um segundo momento, a ponte Laxmi teria desconectado de Seicheles e derivado em direção à Índia, sendo acrescida a esta massa contintal por volta de 65 Ma. Naquele momento, Seicheles e Índia estariam definitivamente separadas (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013). O evento vicariante inferido aqui (79 Ma), coincide com a data de separação de Índia de Seicheles (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013)

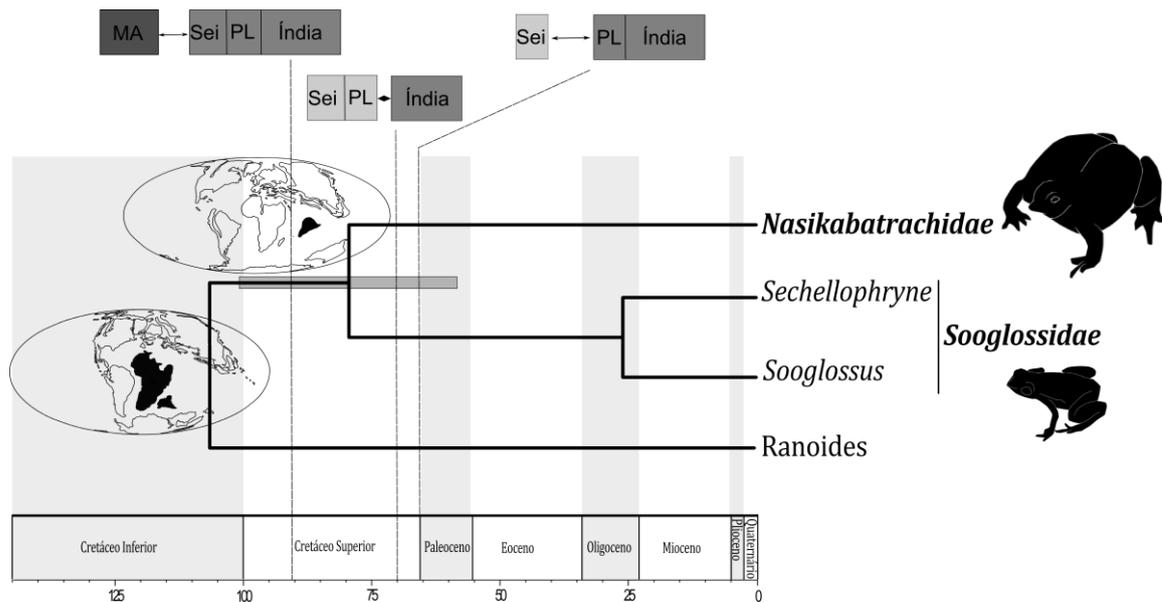


**Figura 20:** Esquema mostrando as diferentes conexões entre Índia e Seicheles ao longo do tempo. Modificado de Chatterjee; Goswami; Scotese, (2013).

Se levada em consideração as datas para a separação de Nasikabatrachidae e Sooglossidae inferidas por outros autores, a divergência entre essas linhagens teria ocorrido bem antes da separação entre Índia e Seicheles. Na proposta de Biju e Bossuyt, por exemplo, a divergência entre Sooglossidae e Nasikabatrachidae teria ocorrido bem antes há cerca de 131 Ma [93-177 Ma] (BIJU; BOSSUYT, 2003). Entretanto, naquele trabalho, os autores usaram apenas calibrações externas à Neobatrachia, o que aumenta o erro associado à inferência, já que as calibrações estão concentradas somente no grupo externo (ver HELED; DRUMMOND, 2012).

Outra proposta seria que essas duas famílias teriam divergido há cerca de 101 Ma [83-121 Ma] (ROELANTS *et al.*, 2007), datas estas inferidas utilizando múltiplos pontos de calibração com fósseis e eventos paleogeográficos. No entanto, uma das calibrações paleogeográficas utilizada por estes autores foi a separação da Índia de Seicheles de valor não detalhado por Roelants e colaboradores (2007). A data atribuída à divergência entre Nasikabatrachidae e Sooglossidae por esses últimos autores além de não ter sido inferida, pois foi utilizada como ponto de calibração, possivelmente apresentou um viés à estimativa, já que assumiu-se que o evento foi o causador da divergência (ver MELLO; SCHRAGO, 2012).

Dadas estas informações geológicas e a idade inferida aqui para a divergência entre Nasikabatrachidae e Sooglossidae, é possível sugerir que a divergência entre a família indiana Nasikabatrachidae e a seichelense Sooglossidae tenha realmente ocorrido em reflexo à separação entre a Índia e Seicheles (Figura 21). O tempo de divergência entre essas duas famílias estimado aqui para o Cretáceo Superior, há cerca de 79 Ma [58-101 Ma], diferente das propostas anteriormente apresentadas, foi a primeira inferência que coincidiu com as datas de separação entre Índia e Seicheles.



**Figura 21:** Figura mostrando a divergência entre a família indiana *Nasikabatrachidae* e a seichelense *Sooglossidae* no espaço-tempo. Os esquemas acima do cronograma referem-se às separações das massas continentais Madagascar (MA), Seicheles (Sei), Ponte Laxmi (PL) e Índia ao longo do tempo, modificado de Chatterjee, Goswami e Scotese (2013).

De forma complementar, os resultados aqui inferidos sugerem que a linhagem a qual originou (*Nasikabatrachidae*, *Sooglossidae*) e seu grupo irmão *Ranoides*, possivelmente, estava amplamente distribuído na região africana e Índia (Figura 19). Tal hipótese pressupõe que, quando *Ranoides* começou a diversificar no Cretáceo Superior (~87 Ma), os representantes dessa linhagem que estavam na Índia foram extintos. Assim, as linhagens descendentes, *Allopadanura* e *Natatanura*, possivelmente, tiveram sua origem na África (Figura 19).

Existem duas hipóteses biogeográficas para a diversificação de *Ranoides*. Uma aborda uma origem de *Ranoides* na África seguida da ampliação da distribuição para fora deste continente (SAVAGE, 1973) e a outra versa sobre a evolução desta linhagem na Índia, de onde teria saído para outros locais em um segundo momento (BOSSUYT; MILINKOVITCH, 2001; BOSSUYT *et al.*, 2006). A hipótese para fora da África (SAVAGE, 1973) sugere, com base em vestígios fósseis, que as linhagens asiáticas teriam sido originadas a partir de um ancestral africano e teriam ampliado sua distribuição via conexões continentais. Já a hipótese para fora da Índia, sugere que *Ranoides* teria originado na Índia enquanto esta estava conectada à Madagascar e Seicheles. No momento em que a Índia colidiu com o Sudeste Asiático, *Ranoides* teria começado a ampliar sua distribuição (ver BOSSUYT; MILINKOVITCH, 2001). A hipótese para fora da Índia seria a mais aceita até o momento para este grupo (ver BOSSUYT; MILINKOVITCH, 2001; BOSSUYT *et al.*, 2006).

Entretanto, os trabalhos que sugerem a hipótese da Índia para a diversificação de Ranoides (BOSSUYT; MILINKOVITCH, 2001; BOSSUYT *et al.*, 2006), estavam baseados em tempos de divergências entre as linhagens mais antigas do que as inferidas no presente trabalho. É possível que exista um viés maior nas inferências desses autores, já que eles assumiram datas de eventos geológicos para a divergência de linhagens-chave para uma reconstrução biogeográfica. Por exemplo, Bossuyt e Milinkovitch (2001), os quais propuseram a hipótese para fora da Índia, utilizaram a data de separação de Madagascar de Índia mais Seicheles, com uma calibração em  $87.6 \pm 0.6$  Ma. A divergência que esses autores assumiram como ocorrida pela separação Índia e Seicheles de Madagascar foi entre as famílias Mantellidae e Rhacophoridae, distribuídas atualmente em Madagascar e com maior diversidade no Sudeste Asiático desde o Sri Lanka até a Indonésia, respectivamente.

A idade inferida aqui para esta entre Mantellidae e Rhacophoridae foi bem mais recente 48.4 Ma [37.6-59.7 Ma] (nó 36; Figura 17), no Eoceno. Naquele período, Índia e Madagascar já estavam separados há cerca de 20 Ma, indicando que a única explicação plausível, mesmo que *ad hoc*, seria de dispersão transoceânica. De acordo com o inferido aqui, o ancestral de Mantellidae mais Rhacophoridae teria ampliado sua distribuição da Índia para Madagascar antes mesmo da divergência dessas duas famílias, entre 47.2 Ma e 68.6 Ma atrás. A Índia colidiu com o Sul da Ásia há cerca de 52 Ma (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013). Assim, ao longo do intervalo de tempo inferido para a divergência dessas duas famílias, até a Índia colidir com a Ásia, existiram diferentes distâncias entre esta e Madagascar (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2013), que pode ter facilitado essa dispersão em momentos de menores distâncias.

Assim como mencionado anteriormente, a inferência biogeográfica aqui conduzida sugere a origem de Ranoides na África, no Cretáceo, de onde teria saído em um segundo momento para diferentes áreas biogeográficas (Figura 19). Mesmo que a inferência aqui realizada seja concordante com uma hipótese de origem de Ranoides para fora da África, que sugere uma dispersão por vias terrestres, alguns eventos de dispersão devem ter sido por vias transoceânicas. Um exemplo disso seria a ampliação da distribuição do ancestral dos gêneros da família Hyperoliidae, *Hyperolius* e *Tachycnemis*, da África para Madagascar, possivelmente no final do Oligoceno (Figura 19). Não seria a primeira proposta de que anuros, mesmo com tendências a baixas tolerância à ambientes salinos, terem dispersado via transoceânica (e.g. EVANS *et al.*, 2003; HEDGES; HASS; MAXSON, 1992; VENCES; KOSUCH; RÖDEL, 2004; VENCES *et al.*, 2003). Além disso, existem registros associados à

tolerância de anfíbios, incluindo Neobatrachia, à ambientes com diferentes concentrações de salinidade (NEILL, 1958; WELLS, 2009).

Dado os resultados aqui inferidos, é possível que ampliação da distribuição ancestral ao longo do tempo por vias terrestres também tenham ocorrido dentre os Ranoides. Uma delas seria na família Microhylidae. Foi inferido que a diversificação desta família teria sido na África. De acordo com a inferência biogeográfica qui conduzida, a linhagem da subfamília Gastrophryinae divergiu do grupo irmão entre 38 e 66 Ma ainda na África e em um segundo momento dispersado para o Novo Mundo. O segundo cenário mais verossímil, seria que o ancestral de Gastrophryinae teria dispersado para a região neotropical e lá diversificado.

O cenário mais verossímil, de que a divergência entre Gastrophryinae e seu grupo irmão teria sido na África, pode ser plausível pela existência de conexões terrestres entre o Novo e Velho Mundos pelo menos até o Mioceno, pela ponte de terra do Atlântico Norte (ver SANMARTÍN, 2001). Esta conexão já foi sugerida para diversos grupos taxonômicos em diferentes períodos de tempo, como para plantas até o Mioceno (DENK; GRÍMSSON; ZETTER, 2010; DENK *et al.*, 2011; TIFFNEY, 1985 b) e mamíferos até o Eoceno (e.g. MCKENNA, 1975). Além disso, as únicas evidências fósseis para Gastrophryinae foram registradas na América do Norte, para o Mioceno (MARTÍN; SANCHÍZ, 2010).

No entanto, ao observar a distribuição atual da subfamília Gastrophryinae, a maior diversidade deste grupo é registrada para a América do Sul, correspondendo a mais de 80% das espécies da subfamília (FROST, 2013). Nesta perspectiva, o segundo cenário mais verossímil reconstruído aqui, inferiu que quando Gastrophryinae divergiu do seu grupo irmão africano, estaria na região Neotropical. de Sá e colaboradores (2012), com base em três pontos de calibração, inferiram que a divergência de Gastrophryinae do grupo irmão teria ocorrido por volta de 82 Ma. Estes autores propuseram ainda que a origem de Gastrophryinae mais seu grupo irmão estaria associado à um evento vicariante da América do Sul e Antártica, no Cretáceo Superior. De acordo com a idade para a divergência de Gastrophryinae aqui inferida não sustentaria esta hipótese proposta por de Sá e colaboradores (2012). No entanto, dada a alta diversidade da subfamília na região neotropical e as evidências geológicas que reconstruíram uma conexão insular entre África e América do Sul até o Eoceno (ver OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009), imaginar um cenário de ampliação da distribuição do ancestral de Gastrophryinae da África para o Neotrópico é possível.

Essa conexão entre África e América do Sul foi proposta com base em informações do

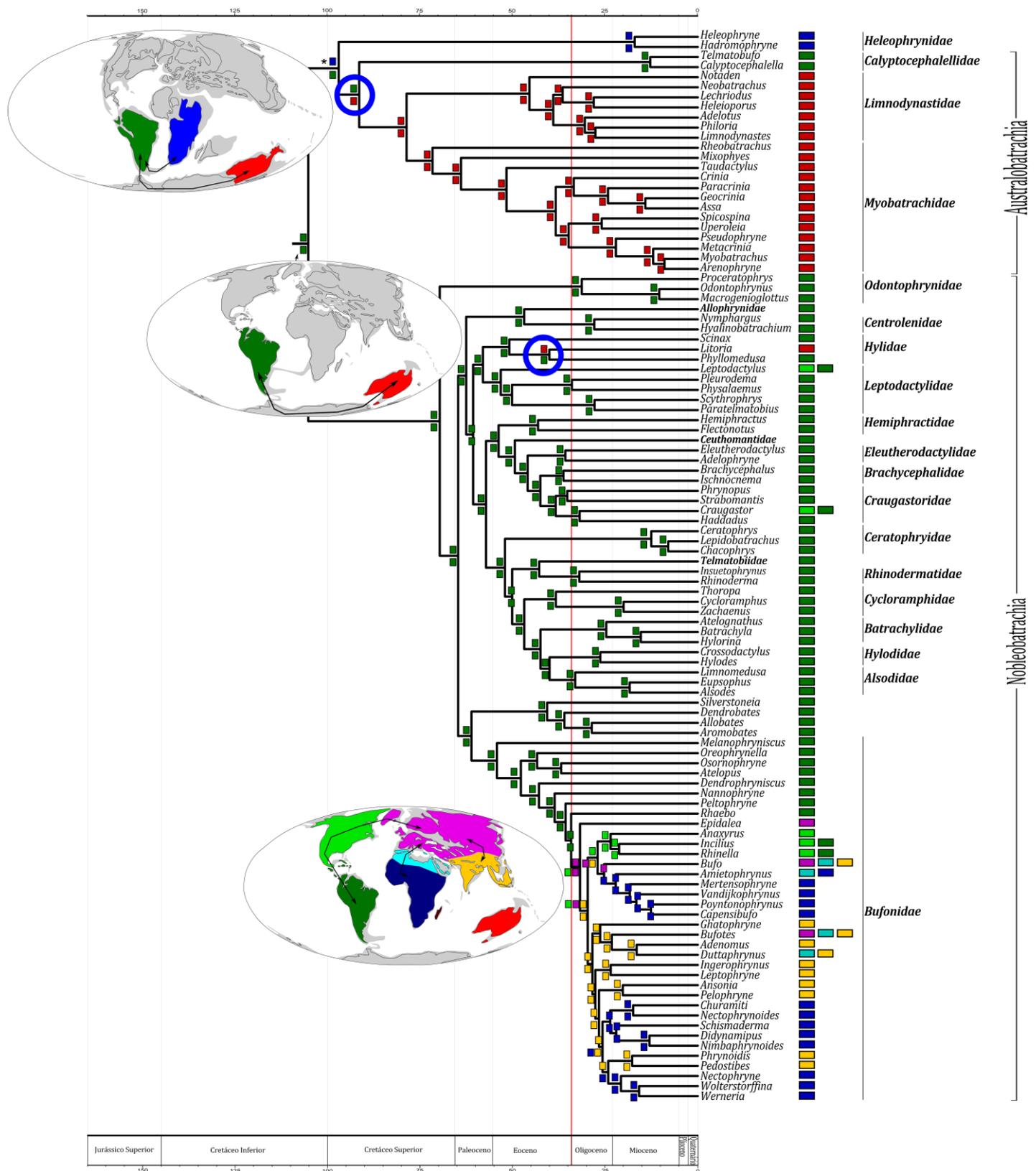
movimento horizontal das placas tectônicas, flutuações no nível do Oceano Atlântico e sedimentação térmica da litosfera oceânica (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). De acordo com a reconstrução geológica desses autores, no Eoceno, há cerca de 50 Ma, uma série de ilhas ligadas à costa africana surgiram no Oceano Atlântico. Estas ligaram-se a um grande placa oceânica ao sul do Brasil chamada *Rio Grande Rise*, consolidando uma passagem terrestre entre os dois continentes. Ainda no Eoceno, há cerca de 40 Ma, esta cadeia começou a se fragmentar e tornou-se completamente submersa há menos de 30 Ma (ver OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Datas de divergências entre organismos de diferentes grupos taxonômicos da África e América do Sul, tais como mamíferos (e.g. POUX *et al.*, 2006; VOLOCH *et al.*, 2013), peixes (e.g. VENCES; FREYHOF, 2001), plantas (e.g. ANTONELLI *et al.*, 2009; DAVIS *et al.*, 2004; PENNINGTON; DICK, 2004) e répteis arcossauros (e.g. EZCURRA; AGNOLÍN, 2012), seriam mais uma evidência de que esta conexão existiu.

#### **4.2.2. A diversificação do clado B e a evolução do oeste da Gondwana**

De acordo com as inferências do tempo de divergência e da história biogeográfica aqui realizadas, no momento em que os clados A e B divergiram, quando o ancestral estava amplamente distribuído nos subcontinentes da Gondwana, a linhagem que ficou restrita à parte oeste, na região neotropical, originou o clado B. Quando o clado B começou a diversificar, possivelmente no Cretáceo Inferior, há cerca de 105 Ma [90-121 Ma], o ancestral ainda estava no Neotrópico, originando a linhagem Nobleobatrachia e Heleophrynidae mais Australobatrachia (Figura 19).

Dois cenários foram inferidos aqui para o momento em que o ancestral de (Heleophrynidae, Australobatrachia) começou a diversificar no Cretáceo Superior (~97 Ma). Um deles seria que o ancestral desta linhagem, assim como o ancestral de todo o clado B, estaria no Neotrópico quando ocorreu a diversificação. O segundo mais verossímil seria o que parte da linhagem ancestral teria ampliado sua distribuição do Neotrópico para a África antes que começasse a diversificar ente 82 Ma e 113.6 Ma. Evidências geológicas demonstram que a separação entre América do Sul e África não foi um evento sincrônico em todo limite das placas (MCLOUGHLIN, 2001). A parte que corresponde à parte sul da América do Sul esteve conectada com a África pelo menos até cerca de 105 Ma atrás (ver MCLOUGHLIN, 2001; PARSIEGLA; GOHL; UENZELMANN-NEBEN, 2008). Neste sentido, é possível que a separação da família Heleophrynidae do grupo irmão Australobatrachia tenha sido um evento

vicariante, como reflexo da separação do Sul da América do Sul e Sul da África, no Cretáceo (Figura 22).



---

**Figura 22:** Representação gráfica da inferência biogeográfica para o clado B. Os quadrados nos nós representam a distribuição do ancestral para cada linhagem. Os círculos azuis destacam as divergências marcadas por possíveis eventos vicariantes entre Neotrópico e Austrália. Os mapas mostram as distribuições e possíveis rotas de ampliação de distribuição do ancestral. O primeiro mapa refere-se à diversificação do ancestral da linhagem Heleophrynidae mais Australobatrachia no Neotrópico, com posterior possível ampliação de distribuição do ancestral para o sul da África e Austrália, referindo-se ao ancestral de Heleophrynidae e Limnodynastidae mais Myobatrachidae, respectivamente. O segundo mapa representa a segunda conexão entre Neotrópico e Austrália, no Eoceno. O terceiro mapa refere-se à ampliação da distribuição do ancestral Bufonidae na transição Eoceno-Oligoceno até o Mioceno. A linha vermelha delimita a transição Eoceno-Oligoceno, quando ocorreu a primeira glaciação do Cenozócio.

Da mesma forma que Heleophrynidae apresentou um possível padrão vicariante, com seu grupo irmão, Australobatrachia, não foi diferente. De acordo com a inferência da história biogeográfica para esta linhagem, o ancestral de Australobatrachia ampliou sua distribuição para a Austrália antes da diversificação do clado. Essa dispersão, possivelmente, ocorreu após a divergência de Australobatrachia do seu grupo irmão, no Cretáceo (~97 Ma) (Figura 22). No momento em que ocorreu a diversificação de Australobatrachia no Cretáceo Superior, há cerca de 91 Ma [107.4-76.6 Ma], ocorreu a divergência entre a linhagem ancestral que dispersou para a Austrália e aqueles que mantiveram a distribuição ancestral, na América do Sul. O resultado desta divergência aqui inferida foi a origem da pouco diversa família chilena Calyptocephalellidae e da linhagem australiana (Limnodynastidae, Myobatrachidae) (Figura 22).

Este padrão vicariante observado entre a linhagem chilena e a australiana deve estar associada à conexão via Antártica existente entre América do Sul e Austrália (SANMARTÍN; RONQUIST, 2004). Ao longo do intervalo de tempo inferido para a divergência entre Calyptocephalellidae e Limnodynastidae mais Myobatrachidae, o planeta estava em um cenário tropical (HAYWOOD; VALDES; MARKWICK, 2004). Desta forma, uma hipótese de que o ancestral de Australobatrachia teria ampliado sua distribuição para fora da América do Sul, via Antártica é plausível.

De acordo com o inferido aqui, a linhagem irmã de (Heleophrynidae, Australobatrachia), Nobleobatrachia, quando começou a diversificar no Cretáceo Superior, por volta de 69 Ma [59-82.2 Ma], mantendo a distribuição do ancestral, permanecendo no Neotrópico (Figura 22). Assim como o ancestral, a maioria das linhagens de Nobleobatrachia permaneceram na região neotropical (Figura 22).

Em Nobleobatrachia, de acordo com os resultados aqui inferidos, uma linhagem parece ter diversificado com um padrão vicariante similar ao inferido para Australobatrachia, só que em outro período geológico. Quando a família Hylidae começou a diversificar, o ancestral

estava na região neotropical (Figura 22). Possivelmente, assim como o ancestral de Australobachia, uma parte da linhagem ancestral de Hylidae deve ter ampliado sua distribuição para a Austrália também via Antártica, no Eoceno. O evento vicariante ocorreu no momento da divergência entre as subfamílias de Hylidae, a australiana Pelodryadinae (*Litoria*) e seu grupo irmão Phyllomedusinae (representado aqui pelo gênero *Phyllomedusa*), há cerca de 40 Ma [51-28 Ma], entre o Eoceno e o início do Oligoceno (Figura 22). Ao longo desse intervalo de tempo, o planeta passou por momentos de mudança climática global significativa, com um segundo aumento de temperatura na metade do Eoceno e um decréscimo acentuado da temperatura na transição Eoceno-Oligoceno, ocasionando a primeira glaciação do Cenozóico (GALAZZO *et al.*, 2013; LAWVER; GAHAGAN, 2003; ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008; ZACHOS *et al.*, 2001).

O padrão de dispersão via Antártica com consecutivo padrão vicariante parece não ter ocorrido somente com linhagens de Neobatrachia. Este padrão já foi reportado para invertebrados (e.g. ALMEIDA *et al.*, 2012; SÆTHER; EKREM, 2003), plantas (e.g. BUERKI *et al.*, 2011; RENNER; FOREMAN; MURRAY, 2000) e outros vertebrados (e.g. SIGÉ *et al.*, 2009; WOODBURNE; CASE, 1996). No entanto, o tempo em que o evento vicariante ocorreu varia de acordo com as linhagens, sendo a ampliação da distribuição ancestral de organismos deve ter ocorrido até pelo menos 40 Ma atrás, no Eoceno (ver ALMEIDA *et al.*, 2012; WOODBURNE; CASE, 1996). Isto sustenta a hipótese tanto da ampliação da distribuição do ancestral de Limnodynastidae mais Myobatrachidae no Cretáceo quanto a inferida para a família Hylidae, possivelmente no Eoceno.

No Eoceno, assim como no Cretáceo, o planeta estava em um panorama climático tropical (ZACHOS *et al.*, 2001). Esses padrões devem estar associados à descontinuidade ocorrida entre Neotrópico e Austrália, via Antártica, devido as mudanças no nível marinho em resposta ao aumento da temperatura ao longo do tempo. No Cretáceo Superior e no Eoceno foi quando o nível marinho atingiu os maiores picos nos últimos 100 Ma (ver KOMINZ *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2005), o que sustenta a hipótese de interrupções da conexão entre Neotrópico e Austrália de acordo com a variação do nível marinho.

Assim como mencionado anteriormente, a diversificação da maioria das linhagens de Nobleobatrachia foi inferida com altos valores de verossimilhança para ter ocorrido no Neotrópico. No entanto, algumas delas, a partir de um momento que a amostragem taxonômica aqui utilizada não permite inferir, ampliaram sua distribuição para as áreas localizadas hoje na América Central ou até mesmo chegando ao Neártico. De acordo com as

inferências aqui realizadas, é possível imaginar que essas linhagens teriam ampliado sua distribuição para essas áreas na América Central, depois que diversificaram. Um adendo seria a história biogeográfica de *Eleutherodactylus* (Eleutherodactylidae) e *Peltophryne* (Bufonidae) (Figura 22). Estas linhagens estão hoje restritas a ilhas do Caribe e algumas partes continentais na América Central, sendo que *Eleutherodactylus* apresenta distribuição até o sul do Neártico e *Peltophryne* ocorre apenas nas Antilhas.

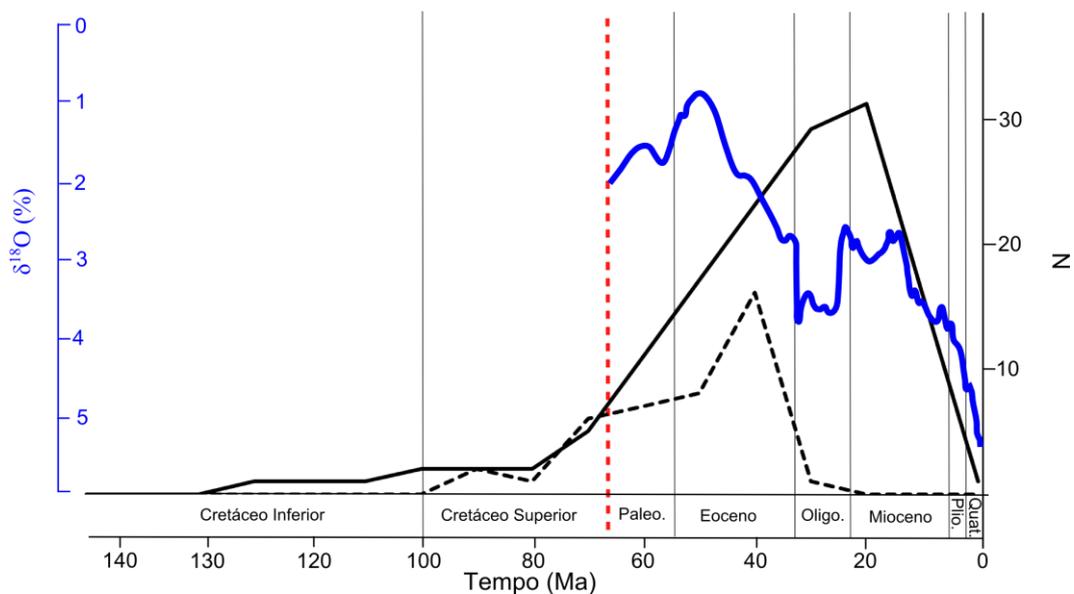
Coincidentemente, a divergência tanto de *Eleutherodactylus* quanto de *Peltophryne* ocorreu no final Eoceno, entre 33 e 37 Ma (nó 87, Figura 17) e entre 29 e 42 Ma (nó 119, Figura 17), respectivamente. No período em que essas duas linhagens diversificaram a ocorria a evolução de ilhas nas Antilhas, a chamada proto-Antilhas, onde hoje é a América Central (ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999). Neste período, formou-se uma conexão entre a América do Sul e as ilhas que compunham um arco de ilhas originadas desde o Cretáceo (MANN, 2007). Essa conexão, que pode ter formado ilhas em alguns momentos por efeito de alterações do nível do mar, seria a área denominada de Gaalândia (ITURRALDE-VINENT; MACPHEE, 1999). A hipótese de dispersão por massas continentais que predatam a subida do Istmo do Panamá já havia sido sugerida para a família Eleutherodactylidae (ver CRAWFORD; SMITH, 2005; HEINICKE; DUELLMAN; HEDGES, 2007) e outros grupos taxonômicos (e.g. CUENCA; ASMUSSEN-LANGE; BORCHSENIUS, 2008; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; ARBOUR, 2013).

Quando Bufonidae começou a diversificar, as linhagens continuaram apresentando o padrão de diversificação neotropical observada para o resto da diversidade de Nobleobatrachia. No entanto, a partir do final do Eoceno, uma diversificação rápida de Bufonidae foi observada seguida de uma ampliação substancial da distribuição dessas linhagens que começaram a divergir. A partir deste momento, linhagens de Bufonidae iniciaram uma diversificação não só no Neotrópico, mas passaram a ocorrer no Velho Mundo também (Figura 22).

Possivelmente, o ancestral de linhagem irmã de *Rhaebo* se diversificou no Velho Mundo via Neártico (Figura 22). A partir do momento em que este ancestral da linhagem de Bufonidae chegou às áreas ao norte dos trópicos, a rápida diversificação foi seguida de uma ampliação espacial das linhagens. A rápida diversificação de Bufonidae foi seguida por uma adaptação fenotípica gradual desta linhagem (ver VAN BOCXLAER *et al.*, 2010).

### 4.2.3. Diversificação de Neobatrachia foi maior após transição Cretáceo-Paleógeno (K-Pg), com aumento acentuado no Eoceno

Após o início da diversificação das grandes linhagens de Neobatrachia no Cretáceo, estas começaram a diversificar. Com algumas exceções, a maioria das grandes linhagens começaram a diversificar após a transição Cretáceo-Paleógeno (K-Pg) com mais evidência no Eoceno (Figura 23) e com distribuição do ancestral na região neotropical e África (Figura 19). Possivelmente, ao final deste período todas as linhagens existentes hoje já tinham divergido. As exceções seriam a divergência entre as famílias Nasikabatrachidae e Sooglossidae, Microhylidae (Ranoides), Brevicipitidae (Afrobatrachia), Phrynobatrachidae (Natatanura), Limnodynastidae (Myobatrachoidea), Myobatrachidae (Myobatrachoidea) e Odontophrynidae (Nobleobatrachia), as quais possivelmente começaram a divergir entre 83 e 66 Ma, no Cretáceo Superior (Figura 17).



**Figura 23:** Gráfico relacionando as diversificações de Neobatrachia ao longo do tempo. A linha contínua representa o número de divergências ocorridas em Neobatrachia. As linhas descontínuas representam o número de famílias de Neobatrachia divergindo ao longo do tempo. A linha tracejada em vermelho, representa a transição Cretáceo-Paleógeno. A linha em azul representa a variação climática medida de acordo com a concentração de isótopo de oxigênio 18 ao longo do Cenozóico, modificada de Zachos (2001). Ma: milhões de anos.

Comparativamente, a diversificação das linhagens de Neobatrachia foi bastante pronunciada após a transição Eoceno-Oligoceno, com pico de diversificação no Mioceno (Figura 23). Isto foi representado pela alta diversificação da família Bufonidae, a qual

apresentou uma rápida e numerosa diversificação neste período (Figura 17). Esta família apresenta o maior número de espécies de Neobatrachia distribuídas pelo globo (FROST, 2013).

No Cenozóico muitas mudanças associadas ao clima do planeta ocorreram (ver ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008; ZACHOS *et al.*, 2001). Ao longo deste período, eventos de mudanças climáticas marcantes já foram documentadas através de evidências geológicas (EDGAR *et al.*, 2010; HEINEMANN; JUNGCLAUS; MAROTZKE, 2009; HUBER; CABALLERO, 2011; LUPI; WISE, 2006). Muitas das mudanças de temperaturas no Cenozóico ocorreram no Eoceno, incluindo mudanças transitórias e duradouras (WITKOWSKI *et al.*, 2012; ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008; ZACHOS *et al.*, 2001). Durante este período, as temperaturas mais altas do foram registradas, onde no início do Eoceno as temperaturas eram mais altas e foram decrescendo até a primeira glaciação do Cenozóico, na transição Eoceno-Oligoceno (ver ZACHOS *et al.*, 2001).

As mudanças da temperatura global ao longo do tempo trouxeram para o planeta características próprias. Geralmente, períodos em que ocorreram aumento da temperatura o planeta era caracterizado pela presença de florestas, aumento da pluviosidade com conseqüente aumento de umidade e aumento dos níveis marinhos. Em contraponto a esta caracterização, quando o planeta passou por momentos de baixas temperaturas, existiu a retração de florestas, períodos de seca e diminuição dos níveis marinhos (HODKINSON *et al.*, 2011; KOMINZ *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2005).

Toda essa dinâmica climática ocorrida ao longo do tempo no planeta refletiu na mudança da disponibilidade de ambientes. Essas mudanças de ambientes, possivelmente, influenciaram na evolução de muitas linhagens já extintas ou não (HODKINSON, 2011; ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008). Em um cenário onde existe uma dinâmica ambiental, com períodos de aumento e diminuição da disponibilidade de ambientes, é possível imaginar a ação de forças evolutivas conspícuas, como seleção natural e deriva genética (HODKINSON *et al.*, 2011).

De acordo com algumas evidências fósseis, a diversificação de muitas linhagens parecem estar associadas com mudanças acentuadas de temperatura. No registro fóssil, por exemplo, existem registros da variação da diversidade de organismos que depositam carbonato de cálcio em resposta ao aumento ou diminuição da temperatura global, como visto para foraminíferos (e.g. GALAZZO *et al.*, 2013; JOVANE *et al.*, 2007). Apesar do fato que nem todos os organismos deixam vestígios fósseis claros como os foraminíferos, a variação

de diversificação ao longo do tempo e ao longo de períodos de mudanças climáticas já foi visto por inúmeros autores para diferentes grupos taxonômicos por meio de reconstrução filogenéticas e inferência dos tempos de diversificação dessas linhagens (e.g. BUERKI *et al.*, 2013; DIVAKAR *et al.*, 2012; SCHWEIZER; SEEHAUSEN; HERTWIG, 2011; WAHLBERG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2006).

Dado os resultados aqui encontrados, os dois períodos em que ocorreram diversificações acentuadas em Neobatrachia foram em momentos de mudanças climáticas bruscas, no início do Eoceno e após a transição Eoceno-Oligoceno (Figura 23). A maior diversificação no Eoceno foi concentrada na linhagem Nobleobatrachia, onde o ancestral encontrava-se distribuído no Neotrópico (Figura 19). A alta diversificação ocorrida na transição Eoceno-Oligoceno refere-se a uma linhagem da família Bufonidae (Figura 19), a qual foi seguida da ampliação da distribuição do ancestral para fora da região neotropical (Figura 22).

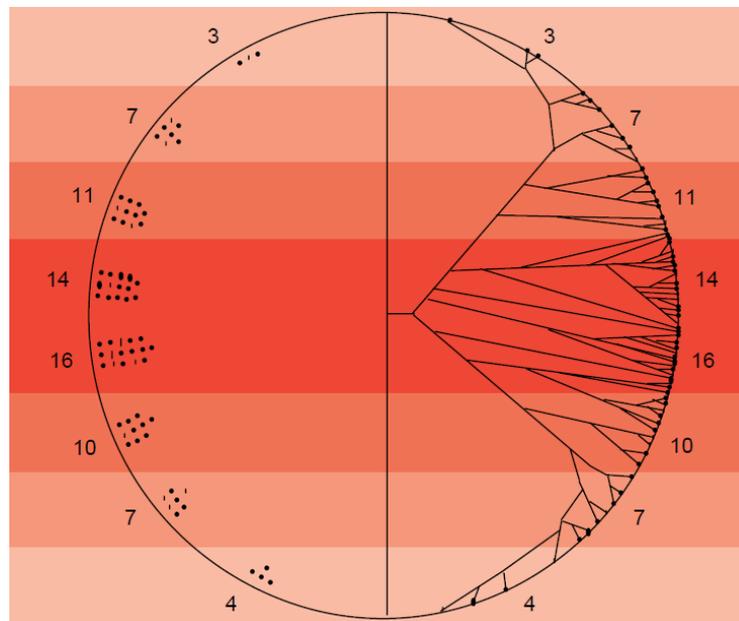
Curiosamente, a diversificação no Eoceno já foi sugerida por outros autores (e.g. TOLLEY; TOWNSEND; VENCES, 2013; WAHLBERG *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2007). Da mesma forma, a diversificação no Eoceno-Oligoceno já foi inferida para outros grupos taxonômicos, como plantas (e.g. BUERKI *et al.*, 2013; WILSON *et al.*, 2007), fungos (e.g. DIVAKAR *et al.*, 2012) e vertebrados (e.g. UPHAM; PATTERSON, 2012; VOLOCH *et al.*, 2013).

Uma abordagem para compreender a evolução dos organismos no espaço juntamente com informações biogeográficas é o de que existe uma conservação filogenética de nicho (ver WIENS; DONOGHUE, 2004). A ideia seria que organismos mais aparentados filogeneticamente tenderiam a ocupar os mesmos tipos de ambientes. Nesta perspectiva, eventos de especiação ocorreriam sem grandes mudanças dos tipos de nichos ocupados pelos descendentes (ver PETERSON; SOBERÓN; SÁNCHEZ-CORDERO, 1999).

Diversos autores já propuseram para diferentes grupos taxonômicos, como por exemplo para plantas (ver DONOGHUE, 2008) e aves (ver RANGEL; DINIZ-FILHO; COLWELL, 2007), que parece que organismos com distribuição tropical mantiveram o nicho ocupado pelo ancestral. Neste sentido, existe uma hipótese que associa a alta diversidade de organismos nas regiões tropicais à conservação de nicho ancestral (WIENS; DONOGHUE, 2004).

A hipótese da manutenção do nicho tropical sugere que existem mais espécies nas regiões tropicais porque muitos grupos taxonômicos teriam se originado nos trópicos. Estes seriam especializados para um regime climático tropical (devido a conservação do nicho ancestral) (DONOGHUE, 2008). Além disso, postula que devido o longo tempo e as áreas

disponíveis para especiação levaram ao aumento da riqueza de espécies nos trópicos para muitos táxons (WIENS; DONOGHUE, 2004). A hipótese da manutenção do nicho tropical prediz que linhagens de áreas temperadas, frequentemente, são derivadas de ancestrais distribuídos na região tropical. Por isso, geralmente, as idades das divergências filogenéticas seriam mais recentes entre linhagens temperadas do que entre linhagens tropicais (Figura 24). Uma importante parte da hipótese da manutenção do nicho tropical seria a ideia de que regiões tropicais foram mais extensas até a metade do Cenozóico, o que pode ajudar a explicar o grande número de clados existentes originados nessas áreas (WIENS; DONOGHUE, 2004).

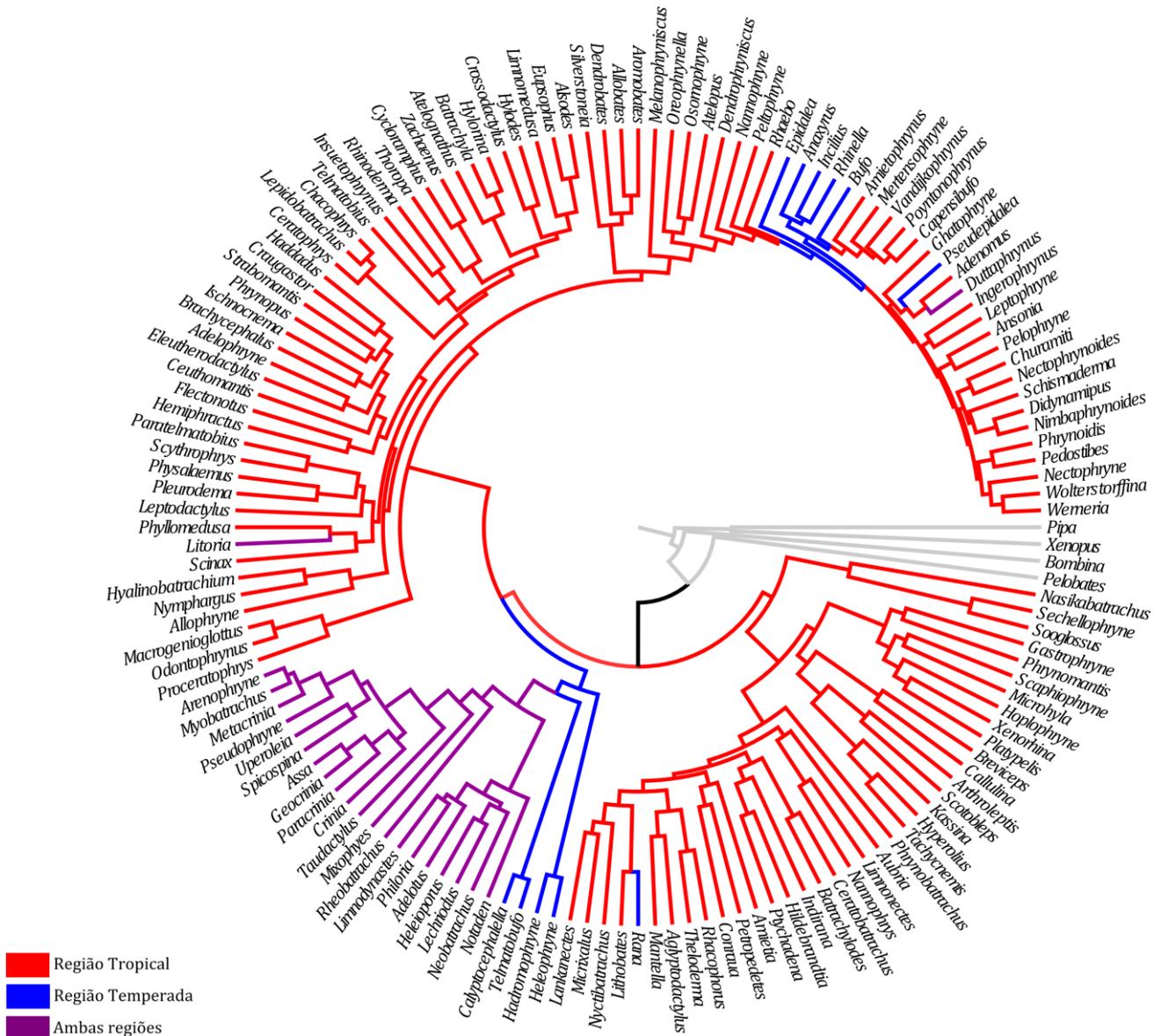


**Figura 24:** Esquema ilustrando a hipótese da manutenção do nicho tropical. Do lado esquerdo, está representado o número de espécies de um dado grupo em um dado local, assumindo variações ambientais, neste caso com variação de temperatura representada pelo gradiente em vermelho. Do lado direito, a ilustração direta da hipótese da manutenção do nicho tropical, onde existe mais diversidade associada aos trópicos, onde as que estão nas regiões temperadas são derivadas desta. Modificado de Wiens e Donoghue (2004).

Ainda no âmbito da conservação do nicho ancestral, seria plausível imaginar a existência de conexão entre diferentes áreas com características ambientais similares. Neste sentido, seria mais fácil a migração de organismos entre essas áreas que já tivessem a adaptação para viver em dado tipo ambiental do que essas migrarem e adquirirem a adaptação posteriormente (DONOGHUE, 2008). Em caso de mudanças climáticas, é possível imaginar pelo menos dois cenários. Caso exista conexão entre diferentes áreas a linhagem tenderá seguir o habitat ao qual tem a adaptação. Caso contrário, se a conexão entre áreas se perder em um dado tempo e local, a adaptação possivelmente surgirá na linhagem residente

(DONOGHUE, 2008).

Os resultados aqui encontrados sugerem que a diversificação de Neobatrachia concorda com a hipótese da manutenção do nicho tropical. Como mencionado anteriormente, a maior diversidade de organismos pertencentes às linhagens que divergiram no Eoceno encontravam-se na região tropical (Figura 19). Da mesma forma, a maioria dos táxons Neobatrachia atuais estão distribuídos na região tropical, o que parece uma evidência da conservação do nicho ancestral para essas linhagens (Figura 25).



**Figura 25:** Filogenia com a distribuição atual dos táxons de Neobatrachia por regionalização. Como destacado no texto, a maior parte da diversidade das linhagens viventes encontram-se distribuídas nos trópicos (em vermelho). Existe pouca diversidade restrita às regiões temperadas (em azul) ou em ambas as regiões (em roxo).

Assim como a diversificação do Eoceno restrita aos trópicos, o segundo aumento de diversificação de Neobatrachia na transição Eoceno-Oligoceno, parece estar de acordo com a hipótese da manutenção do nicho tropical. Assim como sugerido nesta hipótese, a linhagem de Bufonidae que saiu da região tropical no momento de baixas temperaturas da transição Eoceno-Oligoceno, foi em direção às regiões temperadas no Hemisfério Norte (Figura 22). Em um segundo momento, a partir de regiões temperadas, o ancestral Bufonidae começou a ampliar sua distribuição novamente para os trópicos (Figura 22).

Uma vez que o ancestral da família Bufonidae tenha vivido nos trópicos, a capacidade de voltar à região tropical torna-se possível (DONOGHUE, 2008). Além disso, a ideia de limites de temperaturas altas fixarem uma tolerância à altas temperaturas (ARAÚJO *et al.*, 2013), pode prover mais uma explicação para essa possibilidade de retorno aos trópicos.

A diversificação rápida e seguida da ampliação da distribuição no espaço inferida para a família Bufonidae deve ter a ver com a redução de conexões entre áreas com características ambientais similares (DONOGHUE, 2008). O cenário deste período de diversificação foi caracterizado por uma glaciação e seguido e instabilidades climáticas (ZACHOS *et al.*, 2001). Neste sentido, é possível que retrações de áreas com características tropicais e, conseqüentemente, a conexão descontínua entre elas tenham acontecido em vários momentos no tempo e espaço. Neste cenário, é plausível sugerir que o surgimento de novas características em resposta à seleção que deve ter ocorrido nestes diferentes ambientes para onde o ancestral Bufonidae ampliou sua distribuição.

Para sugerir que este cenário influenciou na dispersão no espaço do ancestral Bufonidae, deve-se pressupor que este já tinha a adaptação para a tolerância para baixas temperaturas. Essa diversificação, que foi rápida, deve ter associação com a disponibilidade de ambientes que estariam sob efeito de seleção constantemente (DONOGHUE, 2008; VAN BOCXLAER *et al.*, 2010). Parece que características fenotípicas, como o tamanho corporal de Bufonidae e a forma com que estes se reproduzem, seja um reflexo desta adaptação gradual ao longo do tempo e espaço, caracteres os quais parecem ter ficado retidos nas linhagens viventes (VAN BOCXLAER *et al.*, 2010). Esses últimos autores, identificaram múltiplos caracteres fenotípicos, como tamanho corporal e estratégia reprodutiva, que prediriam a ampla distribuição de Bufonidae. Utilizaram métodos estatísticos para definir esses caracteres e os reconstruíram filogeneticamente um espectro fenotípico identificado para a família (ver VAN BOCXLAER *et al.*, 2010). Estes autores observaram uma gradação entre o limite mínimo e máximo da gradação desses caracteres fenotípicos identificados por eles após a ampliação da

distribuição de Bufonidae para o Velho Mundo.

Dadas essas informações, é possível que a diversificação rápida e numerosa de Bufonidae, seguida da ampliação da distribuição aqui inferidos esteja associada à seleção dessas diferentes características fenotípicas ao longo do período frio, quando a família possivelmente diversificou. Isso porque o período de diversificação para Bufonidae aqui estimado concorda com aquele proposto por Van Bocxlaer e colaboradores (2010) seguida de uma adaptação fenotípica gradual ao longo do tempo e espaço.

## **5. Considerações Finais**

Dados os resultados aqui encontrados com base em todas as análises criteriosas realizadas, as possíveis considerações podem ser feitas ao final desta dissertação:

- 1) As relações filogenéticas para as grandes linhagens de Neobatrachia, o grupo mais diverso dentre os anfíbios anuros modernos, são instáveis. Esta instabilidade pode ter a ver com a incompletude do registro fóssil ou até mesmo do desconhecimento de linhagens viventes, como foi o caso de Nasikabatrachidae, desconhecida até 2003.
- 2) A evolução de Neobatrachia no tempo e espaço concorda com a hipótese de que esta é uma linhagem associada aos subcontinentes da Gondwana, a partir do Cretáceo Inferior.
- 3) A evolução dos clados aqui identificados como clado A e clado B, foram reflexo de um evento vicariantes ocorrida na Gondwana, quando o ancestral do clado A ficou restrito a subcontinentes ao leste da Gondwana e do clado B aos do oeste.
- 4) Diferente de outros trabalhos que propuseram datas mais antigas, o período inferido para a divergência entre as famílias Nasikabatrachidae e Sooglossidae, coincide com a data de separação da Ilha de Seicheles da Índia, no Cretáceo Superior.

- 5) Ao contrário do proposto por outros autores, a evolução da linhagem Ranoides possivelmente esteve associada à uma ampliação da distribuição do ancestral para fora da África.
- 6) A divergência da família sul-africana Heleophrynidae do seu grupo irmão parece ter ocorrido em resposta à um evento vicariantes, possivelmente em resposta à separação do sul da América do Sul do Sul da África no Cretáceo.
- 7) Dois eventos vicariantes devem ter ocorrido em resposta à contínua interrupção da conexão entre América do Sul e Austrália via Antártica. Ambos teriam ocorrido em momentos em que os níveis marinhos estiveram mais altos nos últimos 100 Ma, no Cretáceo e no Eoceno. Estes eventos seriam a separação da linhagem Australiana (Limnodynastidae, Myobatrachidae) do grupo irmão e da subfamília de Hylidae Pelodyadinae do grupo irmão, respectivamente.
- 8) O maior período de divergência das famílias de Neobatrachia foi no Eoceno, quando quase todas as famílias existentes hoje já teriam divergido.
- 9) O segundo período de maior diversificação de Neobatrachia foi após a transição Eoceno-Oligoceno, quando a família Bufonidae apresentou uma rápida e numerosa diversificação.
- 10) Parece que a alta diversidade e atual endemismo no Neotrópico vistos para Neobatrachia e a aut diversificação de Bufonidae seguida da ampliação da distribuição ancestral para regiões temperadas estejam associados à hipótese da conservação do nicho tropical e, de forma complementar, à fixação do nicho ancestral em resposta à evolução de tolerância à altas temperaturas.

## 6. Referências Bibliográficas

ABDO, Z. et al. Accounting for uncertainty in the tree topology has little effect on the decision-theoretic approach to model selection in phylogeny estimation. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 3, p. 691–703, mar. 2005.

ABERER, A. J.; KROMPASS, D.; STAMATAKIS, A. Pruning rogue taxa improves phylogenetic accuracy: an efficient algorithm and webservice. **Systematic biology**, v. 62, n. 1, p. 162–6, 1 jan. 2013.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. AC-19, n. 6, p. 716–723, 1974.

ALMEIDA, E. A. B. et al. Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae): emerging patterns from the southern end of the world. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 3, p. 526–544, 6 mar. 2012.

ALTEKAR, G. et al. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 3, p. 407–15, 12 fev. 2004.

AMPHIBIAWEB. **AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation** Berkeley, California: AmphibiaWeb. Berkeley, California University of California, , 2013. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org/>>. Acesso em: 4 jun. 2013

ANTONELLI, A. et al. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 24, p. 9749–54, 16 jun. 2009.

ARAÚJO, M. B. et al. Heat freezes niche evolution. **Ecology Letters**, 2013.

AUDLEY-CHARLES, M. G. Tectonics of the New Guinea area. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 19, p. 17–41, 1991.

BÁEZ, A. M. et al. The diverse Cretaceous neobatrachian fauna of South America: *Uberabatrachus carvalhoi*, a new frog from the Maastrichtian Marília Formation, Minas Gerais, Brazil. **Gondwana Research**, v. 22, n. 3-4, p. 1141–1150, nov. 2012.

BÁEZ, A. M.; MOURA, G. J. B.; GÓMEZ, R. O. Anurans from the Lower Cretaceous Crato Formation of northeastern Brazil: implications for the early divergence of neobatrachians. **Cretaceous Research**, v. 30, n. 4, p. 829–846, ago. 2009.

BENSON, D. A et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D21–5, jan. 2007.

BIJU, S. D.; BOSSUYT, F. New frog family from India reveals an ancient biogeographical link with the Seychelles. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 711–4, 16 out. 2003.

BLACKBURN, D. C.; WAKE, D. B. Class Amphibia Gray, 1985. In: ZHANG, Z. (Ed.). **Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness**. New Zealand: Magnolia Press, 2011. p. 39–55.

BLAIR, W. F. Major Problems in Anuran Evolution. In: VIAL, J. L. (Ed.). **Evolutionary biology of the Anurans**. Columbia: University of Missouri Press, 1973. p. 1–8.

BOSSUYT, F. et al. Phylogeny and biogeography of a cosmopolitan frog radiation: Late cretaceous diversification resulted in continent-scale endemism in the family ranidae. **Systematic biology**, v. 55, n. 4, p. 579–94, ago. 2006.

BOSSUYT, F.; MILINKOVITCH, M. C. Amphibians as indicators of early tertiary “out-of-India” dispersal of vertebrates. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5514, p. 93–5, 6 abr. 2001.

BROOKS, D. Hennig’s Parasitological Method: A Proposed Solution. **Systematic Zoology**, v. 30, n. 3, p. 229–249, 1981.

BROOKS, D. Historical Ecology: A New Approach to Studying the Evolution of Ecological Associations. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 72, n. 4, p. 660–680, 1985.

BROOKS, D. Parsimony analysis in historical biogeography and coevolution: methodological and theoretical update. **Systematic Zoology**, v. 39, n. 1, p. 14–30, 1990.

BROOKS, D. R.; MCLENNAN, D. A. **Phylogeny, Ecology, and Behavior**. Chicago: The University of Chicago Press, 1991. p. 434

BRUNDIN, L. Z. Transantartic relationships and their significance, as evidenced by chironomid midges with a monograph of the subfamilies Podonominae and Aphroteninae and the austral Heptagytiae. **Vetenskapsakad. Handl.**, v. 11, p. 1–472, 1966.

BUERKI, S. et al. An evaluation of new parsimony-based versus parametric inference methods in biogeography: a case study using the globally distributed plant family Sapindaceae. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 3, p. 531–550, 3 mar. 2011.

BUERKI, S. et al. The abrupt climate change at the Eocene–Oligocene boundary and the emergence of South-East Asia triggered the spread of sapindaceous lineages. **Annals of Botany**, 2013.

BUNNELL, F.; HARESTAD, A. Dispersal and Dispersion of Black-Tailed Deer: Models and Observations. **Journal of Mammalogy**, v. 64, n. 2, p. 201–209, 1983.

CANNATELLA, D. C.; HILLIS, D. M. Amphibian Relationships: Phylogenetic Analysis of Morphology and Molecules. **Herpetological Monographs**, v. 7, p. 1, 1993.

CARROLL, R. L. the Origin and Early Radiation of Terrestrial Vertebrates. **Journal of Paleontology**, v. 75, n. 6, p. 1202–1213, nov. 2001.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–52, abr. 2000.

- CAVALLI-SFORZA, L.; EDWARDS, A. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human ...**, v. 21, n. 3, p. 550–570, 1967.
- CHATTERJEE, S.; GOSWAMI, A.; SCOTese, C. R. The longest voyage: Tectonic, magmatic, and paleoclimatic evolution of the Indian plate during its northward flight from Gondwana to Asia. **Gondwana Research**, v. 23, n. 1, p. 238–267, jan. 2013.
- CORREA, C. et al. Phylogenetic relationships of Chilean leptodactylids: a molecular approach based on mitochondrial genes 12S and 16S. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 79, p. 435–450, 2006.
- CRAWFORD, A. J.; SMITH, E. N. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 35, n. 3, p. 536–55, jun. 2005.
- CRISP, M. D.; TREWICK, S. A.; COOK, L. G. Hypothesis testing in biogeography. **Trends in ecology & evolution**, v. 26, n. 2, p. 66–72, fev. 2011.
- CUENCA, A.; ASMUSSEN-LANGE, C. B.; BORCHSENIUS, F. A dated phylogeny of the palm tribe Chamaedoreae supports Eocene dispersal between Africa, North and South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 2, p. 760–775, fev. 2008.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, ago. 2012.
- DAVIS, C. C. et al. High-Latitude Tertiary Migrations of an Exclusively Tropical Clade: Evidence from Malpighiaceae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. S4, p. S107–S121, jul. 2004.
- DE QUEIROZ, A.; GATESY, J. The supermatrix approach to systematics. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 1, p. 34–41, jan. 2007.
- DE SÁ, R. O. et al. Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. **BMC evolutionary biology**, v. 12, p. 241, jan. 2012.
- DENK, T. et al. Late Cainozoic Floras of Iceland. v. 35, p. 647–668, 2011.
- DENK, T.; GRÍMSSON, F.; ZETTER, R. Episodic migration of oaks to Iceland: Evidence for a North Atlantic “land bridge” in the latest Miocene. **American journal of botany**, v. 97, n. 2, p. 276–87, fev. 2010.
- DIVAKAR, P. K. et al. Diversification of the newly recognized lichen-forming fungal lineage Montanelia (Parmeliaceae, Ascomycota) and its relation to key geological and climatic events. **American journal of botany**, v. 99, n. 12, p. 2014–26, dez. 2012.
- DONOGHUE, M. A phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11549–11555, 2008.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS biology**, v. 4, n. 5, p. e88, maio. 2006.

DRUMMOND, A. J. et al. **A Rough Guide to BEAST 1 . 4**, 2007.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 214, jan. 2007.

DUELLMAN, W. **The hylid frogs of Middle America. Vol. 2.** [s.l.] University of Kansas, 1970.

EDGAR, K. M. et al. New biostratigraphic, magnetostratigraphic and isotopic insights into the Middle Eocene Climatic Optimum in low latitudes. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 297, n. 3-4, p. 670–682, nov. 2010.

EVANS, B. J. et al. Phylogenetics of Fanged Frogs: Testing Biogeographical Hypotheses at the Interface of the Asian and Australian Faunal Zones. **Systematic Biology**, v. 52, n. 6, p. 794–819, 1 dez. 2003.

EZCURRA, M. D.; AGNOLÍN, F. A New Global Palaeobiogeographical Model for the Late Mesozoic and Early Tertiary. **Systematic Biology**, v. 61, n. 4, p. 553–566, 2012.

FARRIS, J. S.; KLUGE, A. G.; MICKEVICH, M. F. Phylogenetic Analysis, The Monothetic Group Method, and Myobatrachid Frogs. **Systematic Zoology**, v. 31, n. 3, p. 317–327, 1982.

FELLER, A. E.; HEDGES, S. B. Molecular evidence for the early history of living amphibians. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 9, n. 3, p. 509–16, jun. 1998.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–76, jan. 1981.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2004. p. 664

FONG, J. J. et al. A phylogenomic approach to vertebrate phylogeny supports a turtle-archosaur affinity and a possible paraphyletic lissamphibia. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48990, jan. 2012.

FORD, L.; CANNATELLA, D. The major clades of frogs. **Herpetological Monographs**, v. 7, n. 1993, p. 94–117, 1993.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference Version 5.6**. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>.

FROST, D. R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 297, p. 370, 2006.

GALAZZO, F. B. et al. Paleoenvironmental changes during the Middle Eocene Climatic Optimum (MECO) and its aftermath: The benthic foraminiferal record from the Alano section

(NE Italy). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 378, p. 22–35, maio. 2013.

GEYER, C. **Markov chain Monte Carlo maximum likelihood** Computing Science and Statistics: Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface. **Anais...**1991Disponível em: <<http://users.stat.umn.edu/geyer/f05/8931/c.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2013

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–4, fev. 2010.

GU, X.; FU, Y.; LI, W. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. **Molecular Biology and Evolution**, 1995.

HAAS, A. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). **Cladistics**, v. 19, n. 1, p. 23–89, fev. 2003.

HADDAD, C.; PRADO, C. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207–217, 2005.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H. Heterogeneity of tempo and mode of mitochondrial DNA evolution among mammalian orders. **The Japanese journal of genetics**, v. 64, n. 4, p. 243–258, 1989.

HAYWOOD, A. M.; VALDES, P. J.; MARKWICK, P. J. Cretaceous (Wealden) climates: a modelling perspective. **Cretaceous Research**, v. 25, n. 3, p. 303–311, jun. 2004.

HEDGES, S. B.; HASS, C. A.; MAXSON, L. R. Caribbean biogeography: molecular evidence for dispersal in West Indian terrestrial vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1909–13, 1 mar. 1992.

HEDGES, S.; MAXSON, L. A molecular perspective on lissamphibian phylogeny. **Herpetological Monographs**, v. 7, n. 1993, p. 27–42, 1993.

HEINEMANN, M.; JUNGCLAUS, J.; MAROTZKE, J. Warm Paleocene/Eocene climate as simulated in ECHAM5/MPI-OM. **Climate of the Past**, n. 1987, p. 785–802, 2009.

HEINICKE, M. P.; DUELLMAN, W. E.; HEDGES, S. B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 24, p. 10092–7, 12 jun. 2007.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. **Systematic biology**, v. 61, n. 1, p. 138–49, jan. 2012.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. **Systematic biology**, v. 61, n. 1, p. 138–49, jan. 2012.

HENNIG, W. **Phylogenetic systematics**. Chicago: University of Illinois Press, 1966. p. 263

- HENRICI, A. C. A New Pipoid Anuran from the Late Jurassic Morrison Formation at Dinosaur National Monument , Utah. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 18, n. 2, p. 321–332, 1998.
- HEYER, W.; LIEM, D. Analysis of the intergeneric relationships of the Australian frog family Myobatrachidae. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 233, p. 29, 1976.
- HODKINSON, T. R. et al. **Climate change, ecology and systematics**. New York: Cambridge University Press, 2011.
- HODKINSON, T. R. Integrating ecology and systematics in climate change research. In: **Climate change, ecology and systematic**. New York: Cambridge University Press, 2011. p. 3–43.
- HOEGG, S. et al. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 7, p. 1188–200, jul. 2004.
- HOLT, B. G. et al. An update of Wallace’s zoogeographic regions of the world. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6115, p. 74–8, 4 jan. 2013.
- HUA, X. et al. A Revised Phylogeny of Holarctic Treefrogs ( Genus Hyla ) Based on Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences HYL A ) BASED ON NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL. v. 65, n. 3, p. 246–259, 2009.
- HUBER, M.; CABALLERO, R. The early Eocene equable climate problem revisited. **Climate of the Past**, v. 7, n. 2, p. 603–633, 16 jun. 2011.
- IGAWA, T. et al. Complete mitochondrial genomes of three neobatrachian anurans: a case study of divergence time estimation using different data and calibration settings. **Gene**, v. 407, n. 1-2, p. 116–29, 15 jan. 2008.
- INGER, R. The development of a phylogeny of frogs. **Evolution**, v. 21, n. 2, p. 369–384, 1967.
- INOUE, J.; DONOGHUE, P. C. J.; YANG, Z. The impact of the representation of fossil calibrations on Bayesian estimation of species divergence times. **Systematic biology**, v. 59, n. 1, p. 74–89, jan. 2010.
- IRISARRI, I. et al. The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear substitution rates. **BMC genomics**, v. 13, p. 626, jan. 2012.
- ITURRALDE-VINENT, M. A.; MACPHEE, R. D. E. Paleogeography of the Caribbean region: implications for canozoic biogeography. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 238, p. 95, 1999.
- IZQUIERDO-CARRASCO, F.; SMITH, S. A; STAMATAKIS, A. Algorithms, data structures, and numerics for likelihood-based phylogenetic inference of huge trees. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 470, jan. 2011.

- JOVANE, L. et al. The middle Eocene climatic optimum event in the Contessa Highway section, Umbrian Apennines, Italy. **Geological Society of America Bulletin**, v. 119, n. 3-4, p. 413–427, 15 mar. 2007.
- KASTENS, K.; BONATTI, E.; CARESS, D. The Vema transverse ridge (central Atlantic). **Marine Geophysical ...**, p. 533–556, 1998.
- KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 286–98, jul. 2008.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, p. 0–2, 1968.
- KISHINO, H.; HASEGAWA, M. Converting distance to time: application to human evolution. **Methods Enzymol.**, n. 183, p. 550–570, 1990.
- KLUGE, A.; FARRIS, J. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. **Systematic Zoology**, v. 18, n. 1, p. 1–32, 1969.
- KOMINZ, M. A. et al. Late Cretaceous to Miocene sea-level estimates from the New Jersey and Delaware coastal plain coreholes: An error analysis. **Basin Research**, v. 20, p. 211–226, 2008.
- KUMAR, S. Molecular clocks: four decades of evolution. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 8, p. 654–62, ago. 2005.
- KURABAYASHI, A. et al. From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoidea*. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 175, jan. 2011.
- LAWVER, L.; GAHAGAN, L. Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, ...**, v. 198, n. 1-2, p. 11–37, set. 2003.
- LEMEY, P.; POSADA, D. Molecular clock analysis. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 362–380.
- LEMMON, A. R. et al. The effect of ambiguous data on phylogenetic estimates obtained by maximum likelihood and Bayesian inference. **Systematic biology**, v. 58, n. 1, p. 130–45, fev. 2009.
- LOMOLINO, M. V.; RIDDLE, B. R.; BROWN, J. H. **Biogeography**. Third ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2006. p. 845
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; ARBOUR, J. Testing for ancient adaptive radiations in Neotropical cichlid fishes. **Evolution**, v. 67, n. 5, p. 1321–1337, 2013.

LUO, A. et al. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. **BMC evolutionary biology**, v. 10, p. 242, jan. 2010.

LUPI, C.; WISE, S. W. Calcareous nannofossil biostratigraphic framework for middle Eocene sediments from ODP Hole 1260A, Demerara Rise. **Revue de Micropaléontologie**, v. 49, n. 4, p. 245–253, out. 2006.

LYNCH, J. D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Miscellaneous Publications of the University of Kansas Museum of Natural History**, v. 53, p. 1–238, 1971.

LYNCH, J. D. The transition from archaic to advanced frogs. In: **Evolutionary biology of the Anurans: contemporary research on major problems**. Columbia: University of Missouri Press, 1973. p. 133–182.

MANN, P. Overview of plate tectonic history and its unresolved tectonic problems. **Central America: Geology, ...**, 2007.

MARJANOVIĆ, D.; LAURIN, M. Fossils, molecules, divergence times, and the origin of lissamphibians. **Systematic biology**, v. 56, n. 3, p. 369–88, jun. 2007.

MARKWICK, P. J.; VALDES, P. J. Palaeo-digital elevation models for use as boundary conditions in coupled ocean–atmosphere GCM experiments: a Maastrichtian (late Cretaceous) example. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 213, n. 1-2, p. 37–63, out. 2004.

MARTÍN, C.; SANCHÍZ, B. **Lisanfos KMS. Version 1.2**. Madrid, Espanha Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, , 2010. Disponível em: <<http://www.lisanfos.mncn.csic.es/>>

MCKENNA, M. Fossil mammals and early Eocene North Atlantic land continuity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, n. 2, p. 335–353, 1975.

MCLOUGHLIN, S. The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. **Australian Journal of Botany**, p. 271–300, 2001.

MCMAHON, M. M.; SANDERSON, M. J. Phylogenetic supermatrix analysis of GenBank sequences from 2228 papilionoid legumes. **Systematic biology**, v. 55, n. 5, p. 818–36, out. 2006.

MELLO, B.; SCHRAGO, C. G. Incorrect handling of calibration information in divergence time inference: an example from volcanic islands. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 3, p. 493–500, mar. 2012.

METCALFE, I. Palaeozoic and Mesozoic geological evolution of the SE Asian region: multidisciplinary constraints and implications for biogeography. In: HALL, R.; HOLLOWAY, J. D. (Eds.). **Biogeography and geological evolution of SE Asia**. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. p. 25–41.

MILLER, K. G. et al. The Phanerozoic record of global sea-level change. **Science**, v. 310, p. 1293–1298, 2005.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees** **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)** New Orleans, Los Angeles **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, , 2010. Disponível em: <<http://www.phylo.org/index.php/portal/>>

NABHAN, A. R.; SARKAR, I. N. The impact of taxon sampling on phylogenetic inference: a review of two decades of controversy. **Briefings in bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 122–34, jan. 2012.

NEALL, V. E.; TREWICK, S. A. The age and origin of the Pacific islands: a geological overview. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1508, p. 3293–308, 27 out. 2008.

NEI, M.; KUMAR, S. Evolutionary Change of DNA Sequences. In: **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. p. 33–50.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. p. 333

NEILL, W. T. The occurrence of amphibians and reptiles in saltwater areas, and a bibliography. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v. 8, n. 1, p. 97, 1958.

NELSON, G.; PLATNICK, N. Systematics and biogeography: cladistics and vicariance. 1981.

NOBLE, B. Y. G. K. THE FOSSIL FROGS OF THE INTERTRAPPEAN BEDS OF. n. 401, p. 387–389, 1930.

NOUGIER, J.; CANTAGREL, J. M.; KARCHE, J. P. The Comores archipelago in the western Indian Ocean: volcanology, geochronology and geodynamic setting. **Journal of African Earth Sciences**, v. 5, n. 2, p. 135–145, 1986.

NUSSBAUM, R. A.; WU, S. Morphological Assessments and Phylogenetic Relationships of the Seychellean Frogs of the Family Sooglossidae (Amphibia: Anura). **Zoological Studies**, v. 46, n. 3, p. 322–335, 2007.

OLIVEIRA, F. B. DE; MOLINA, E. C.; MARROIG, G. South American Primates. p. 55–68, 2009.

PALEODDB. **Paleobiology Database**. Disponível em: <<http://paleodb.org>>. Acesso em: 8 ago. 2013.

PARHAM, J. F. et al. Best practices for justifying fossil calibrations. **Systematic biology**, v. 61, n. 2, p. 346–59, mar. 2012.

PARSIEGLA, N.; GOHL, K.; UENZELMANN-NEBEN, G. The Agulhas Plateau: structure and evolution of a Large Igneous Province. **Geophysical Journal International**, v. 174, n. 1, p. 336–350, jul. 2008.

PENNINGTON, R. T.; DICK, C. W. The role of immigrants in the assembly of the South American rainforest tree flora. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1450, p. 1611–22, 29 out. 2004.

PETERSON, A.; SOBERÓN, J.; SÁNCHEZ-CORDERO, V. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. **Science**, v. 285, n. 5431, p. 1265–1267, 1999.

PLATNICK, N.; NELSON, G. A Method of Analysis for Historical Biogeography. **Systematic Zoology**, v. 27, n. 1, p. 1–16, 1978.

POINAR, G. O.; CANNATELLA, D. C. An upper eocene frog from the dominican republic and its implication for Caribbean biogeography. **Science (New York, N.Y.)**, v. 237, n. 4819, p. 1215–6, 4 set. 1987.

POSADA, D. Selecting models of evolution. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 256–282.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793–808, out. 2004.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneus Editora, 2008. p. 684

POUX, C. et al. Arrival and diversification of caviomorph rodents and platyrrhine primates in South America. **Systematic biology**, v. 55, n. 2, p. 228–44, abr. 2006.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, n. 3, p. 407–452, mar. 2006.

PRAMUK, J. B. et al. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, v. 17, p. 72–83, 16 ago. 2008.

PYRON, R. A. Divergence time estimation using fossils as terminal taxa and the origins of Lissamphibia. **Systematic biology**, v. 60, n. 4, p. 466–81, jul. 2011.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 61, n. 2, p. 543–83, nov. 2011.

RAJ, P. et al. Larval morphology and ontogeny of *Nasikabatrachus sahyadrensis* Biju & Bossuyt, 2003 (Anura, Nasikabatrachidae) from Western Ghats, India. **Zootaxa**, v. 3510, p. 65–76, 2012.

RAMBAUT, A. **FigTree**, 2010. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>

RAMBAUT, A.; BROMHAM, L. Estimating divergence dates from molecular sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 4, p. 442–8, abr. 1998.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **Tracer**, 2007. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>

RANGEL, T. F. L. V. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; COLWELL, R. K. Species richness and evolutionary niche dynamics: a spatial pattern-oriented simulation experiment. **The American naturalist**, v. 170, n. 4, p. 602–16, out. 2007.

REE, R. H. et al. A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 59, n. 11, p. 2299–311, nov. 2005.

REE, R. H.; SMITH, S. A. Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. **Systematic biology**, v. 57, n. 1, p. 4–14, mar. 2008.

RENNER, S. S. R.; FOREMAN, D. B. F.; MURRAY, D. Timing Transantarctic Disjunctions in the Atherospermataceae (Laurales): Evidence from coding and noncoding chloroplast sequences. **Systematic biology**, v. 49, n. 3, p. 579–591, 2000.

ROCHA, S.; CARRETERO, M. A.; HARRIS, D. J. Mitochondrial DNA sequence data suggests two independent colonizations of the Comoros archipelago by Chameleons of the genus *Furcifer*. v. 135, n. January, p. 39–42, 2005.

ROELANTS, K. et al. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 887–92, 16 jan. 2007.

ROELANTS, K.; BOSSUYT, F. Archaeobatrachian paraphyly and pangaeon diversification of crown-group frogs. **Systematic biology**, v. 54, n. 1, p. 111–26, fev. 2005.

ROKAS, A.; CARROLL, S. B. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 5, p. 1337–44, maio. 2005.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 11 ago. 2003.

RONQUIST, F.; SANMARTÍN, I. Phylogenetic Methods in Biogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 441–464, dez. 2011.

- RONQUIST, F.; VAN DER MARK, P.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic analysis using MRBAYES. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 210–266.
- ROSENBERG, M. S. **Sequence alignment: methods, models, concepts, and strategies**. Berkeley, California: University of California Press, 2009. p. 337
- ROURE, B.; BAURAIN, D.; PHILIPPE, H. Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 1, p. 197–214, jan. 2013.
- SÆTHER, O.; EKREM, T. Biogeography of Afrotropical Chironomidae (Diptera), with special reference to Gondwanaland. **Cimbebasia**, v. 19, p. 123–139, 2003.
- SALTER, L. A. Complexity of the likelihood surface for a large DNA dataset. **Systematic biology**, v. 50, n. 6, p. 970–8, 2001.
- SALVO, G. et al. Tracing the temporal and spatial origins of island endemics in the Mediterranean region: a case study from the citrus family (Ruta L., Rutaceae). **Systematic biology**, v. 59, n. 6, p. 705–22, dez. 2010.
- SAN MAURO, D. A multilocus timescale for the origin of extant amphibians. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 2, p. 554–61, ago. 2010.
- SAN MAURO, D.; VENCES, M.; ALCOBENDAS, M. Initial diversification of living amphibians predated the breakup of Pangaea. **The American Naturalist**, v. 165, n. 5, p. 590–599, 2005.
- SANDERSON, M. J. et al. The PhyLoTA Browser: processing GenBank for molecular phylogenetics research. **Systematic biology**, n. 3, p. 335–46, jun. 2008.
- SANDERSON, M. J.; SHAFFER, H. B. Troubleshooting Molecular Phylogenetic Analyses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, n. 1, p. 49–72, nov. 2002.
- SANMARTÍN, I. Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 73, n. 4, p. 345–390, ago. 2001.
- SANMARTÍN, I.; RONQUIST, F. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. **Systematic biology**, v. 53, n. 2, p. 216–43, abr. 2004.
- SANMARTÍN, I.; VAN DER MARK, P.; RONQUIST, F. Inferring dispersal: a Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 3, p. 428–449, mar. 2008.
- SAVAGE, J. M. The Geographic distribution of frogs: patterns and predictions. In: VIAL, J. L. (Ed.). **Evolutionary biology of the Anurans: contemporary research on major problems**. Columbia: University of Missouri Press, 1973. p. 351–445.

SAVAGE, J. M. the Hylid Frogs of Middle America. *Copeia*, v. 2002, n. 2, p. 545–552, maio. 2002.

SCHMIDT, H. A.; VON HAESLER, A. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 181–209.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.

SCHWEIZER, M.; SEEHAUSEN, O.; HERTWIG, S. T. Macroevolutionary patterns in the diversification of parrots: effects of climate change, geological events and key innovations. *Journal of Biogeography*, v. 38, p. 2176–2194, 2011.

SCOTESE, C. R. **PALEOMAP website**. Disponível em: <<http://www.scotese.com>>.

SIGÉ, B. et al. Chulpasia and Thylacotinga, late Paleocene-earliest Eocene trans-Antarctic Gondwanan bunodont marsupials: New data from Australia. *Geobios*, v. 42, n. 6, p. 813–823, nov. 2009.

STAMATAKIS, A.; LUDWIG, T.; MEIER, H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 21, n. 4, p. 456–63, 15 fev. 2005.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 22, n. 21, p. 2688–90, 2006.

STAMATAKIS, A. **Phylogenetic models of rate heterogeneity: a high performance computing perspective** Proceedings 20th IEEE International Parallel & Distributed Processing Symposium. *Anais...Ieee*, 2006 Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1639535>>

STAMATAKIS, A. et al. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic biology*, v. 57, n. 5, p. 758–71, out. 2008.

STRIMMER, K.; VON HAESLER, A. Genetic distances and nucleotide substitution models. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M. (Eds.). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 111–140.

SWOFFORD, D. L. et al. Phylogenetic Inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Eds.). **Molecular Systematics**. Second ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1996. p. 407–514.

THOMSON, R. C.; SHAFFER, H. B. Sparse supermatrices for phylogenetic inference: taxonomy, alignment, rogue taxa, and the phylogeny of living turtles. *Systematic biology*, v. 59, n. 1, p. 42–58, jan. 2010.

- THORNE, J. L.; KISHINO, H.; PAINTER, I. S. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 12, p. 1647–57, dez. 1998.
- TIFFNEY, B. Perspectives on the origin of the floristic similarity between eastern Asia and eastern North America. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 66, n. February, p. 73–94, 1985.
- TIFFNEY, B. The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in Tertiary and modern phytogeography of the Northern Hemisphere. **J. Arnold Arbor**, v. 66, n. October, p. 243–273, 1985.
- TOLLEY, K. A.; TOWNSEND, T. M.; VENCES, M. Large-scale phylogeny of chameleons suggests African origins and Eocene diversification Large-scale phylogeny of chameleons suggests African origins and Eocene diversification. **Proceedings of the Royal Society**, v. 280, p. 20130184, 2013.
- UPHAM, N. S.; PATTERSON, B. D. Molecular Phylogenetics and Evolution Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 417–429, 2012.
- VAN BOCXLAER, I. et al. Late Cretaceous vicariance in Gondwanan amphibians. **PloS one**, v. 1, n. 1, p. e74, jan. 2006.
- VAN BOCXLAER, I. et al. Gradual adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. **Science**, v. 327, p. 679–682, 2010.
- VAN BOCXLAER, I. et al. Supplementar Material - Gradual adaptation toward a range-expansion phenotype initiated the global radiation of toads. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 679–82, 5 fev. 2010.
- VAN BOCXLAER, I. et al. Mountain-associated clade endemism in an ancient frog family (Nyctibatrachidae) on the Indian subcontinent. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 62, n. 3, p. 839–47, mar. 2012.
- VAN DER MEIJDEN, A. et al. Molecular phylogenetic evidence for paraphyly of the genus *Sooglossus*, with the description of a new genus of Seychellean frogs. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, p. 347–359, 2007.
- VAN DER PEER, Y. Phylogenetic inference based on distance methods. In: LEMEY, P.; VANDAMME, A.-M.; SALEMI, M. (Eds.). **Phylogenetic Handbook**. Second ed. New York: Cambridge University Press, 2009. p. 142–180.
- VENCES, M. et al. Multiple overseas dispersal in amphibians. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1532, p. 2435–42, 7 dez. 2003.
- VENCES, M.; FREYHOF, J. Reconciling fossils and molecules: Cenozoic divergence of cichlid fishes and the biogeography of Madagascar. **Journal of Biogeography**, v. 28, p. 1091–1099, 2001.

VENCES, M.; KOSUCH, J.; RÖDEL, M. Phylogeography of *Ptychadena mascareniensis* suggests transoceanic dispersal in a widespread African-Malagasy frog lineage. **Journal of Biogeography**, v. 31, p. 593–601, 2004.

VITT, L.; CALDWELL, J. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Third ed. San Diego, California: Elsevier Inc., 2009. p. 687

VOLOCH, C. M. et al. Phylogeny and chronology of the major lineages of New World hystricognath rodents: insights on the biogeography of the Eocene/Oligocene arrival of mammals in South America. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 160, 2013.

WAHLBERG, N. et al. Nymphalid butterflies diversify following near demise at the Cretaceous/Tertiary boundary. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1677, p. 4295–302, 22 dez. 2009.

WALKER, J. D. et al. **Geologic Time Scale v. 4.0: Geological Society of America**The Geological Society of America, , 2012.

WALLACE, A. R. **The Geographical Distribution of Animals**. Cambridge: Cambridge Iniversity Press, 1876.

WELLS, K. D. Water Relations. In: **The Ecology and Behavior of Amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2009. p. 82–121.

WIENS, J. J. Can incomplete taxa rescue phylogenetic analyses from long-branch attraction? **Systematic biology**, v. 54, n. 5, p. 731–42, out. 2005.

WIENS, J. J.; DONOGHUE, M. J. Historical biogeography, ecology and species richness. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 12, p. 639–44, dez. 2004.

WIENS, J. J.; TIU, J. Highly incomplete taxa can rescue phylogenetic analyses from the negative impacts of limited taxon sampling. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e42925, jan. 2012.

WILKINSON, M. Majority-rule reduced consensus trees and their use in bootstrapping. **Molecular biology and evolution**, v. 13, n. 3, p. 437–44, mar. 1996.

WILSON, R. et al. Steady diversification of derived liverworts under Tertiary climatic fluctuations. **Biology letters**, v. 3, n. 5, p. 566–9, 22 out. 2007.

WITKOWSKI, J. et al. Enhanced siliceous plankton productivity in response to middle Eocene warming at Southern Ocean ODP Sites 748 and 749. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 326–328, p. 78–94, abr. 2012.

WOODBURNE, M. O.; CASE, J. A. Dispersal, vicariance, and the Late Cretaceous to early tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 3, n. 2, p. 121–161, jun. 1996.

YANG, Z. **Computational molecular evolution**. First ed. New York: Oxford University Press, 2006. p. 357

- YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–14, maio. 2012.
- YODER, A. D.; YANG, Z. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 7, p. 1081–90, jul. 2000.
- ZACHOS, J. et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 686–93, 27 abr. 2001.
- ZACHOS, J. C.; DICKENS, G. R.; ZEEBE, R. E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. **Nature**, v. 451, p. 279–283, 2008.
- ZHANG, P. et al. Mitogenomic perspectives on the origin and phylogeny of living amphibians. **Systematic biology**, v. 54, n. 3, p. 391–400, jun. 2005.
- ZHANG, P. et al. Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7360–7365, 2006.
- ZHANG, P. et al. Efficient Sequencing of Anuran mtDNAs and a Mitogenomic Exploration of the Phylogeny and Evolution of Frogs. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 2011, p. 1899–1915, 2013.
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. **Evolving genes and proteins**, 1965.
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. B. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: KASHA, M.; PULLMAN, B. (Eds.). **Horizons in Biochemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 189–225.

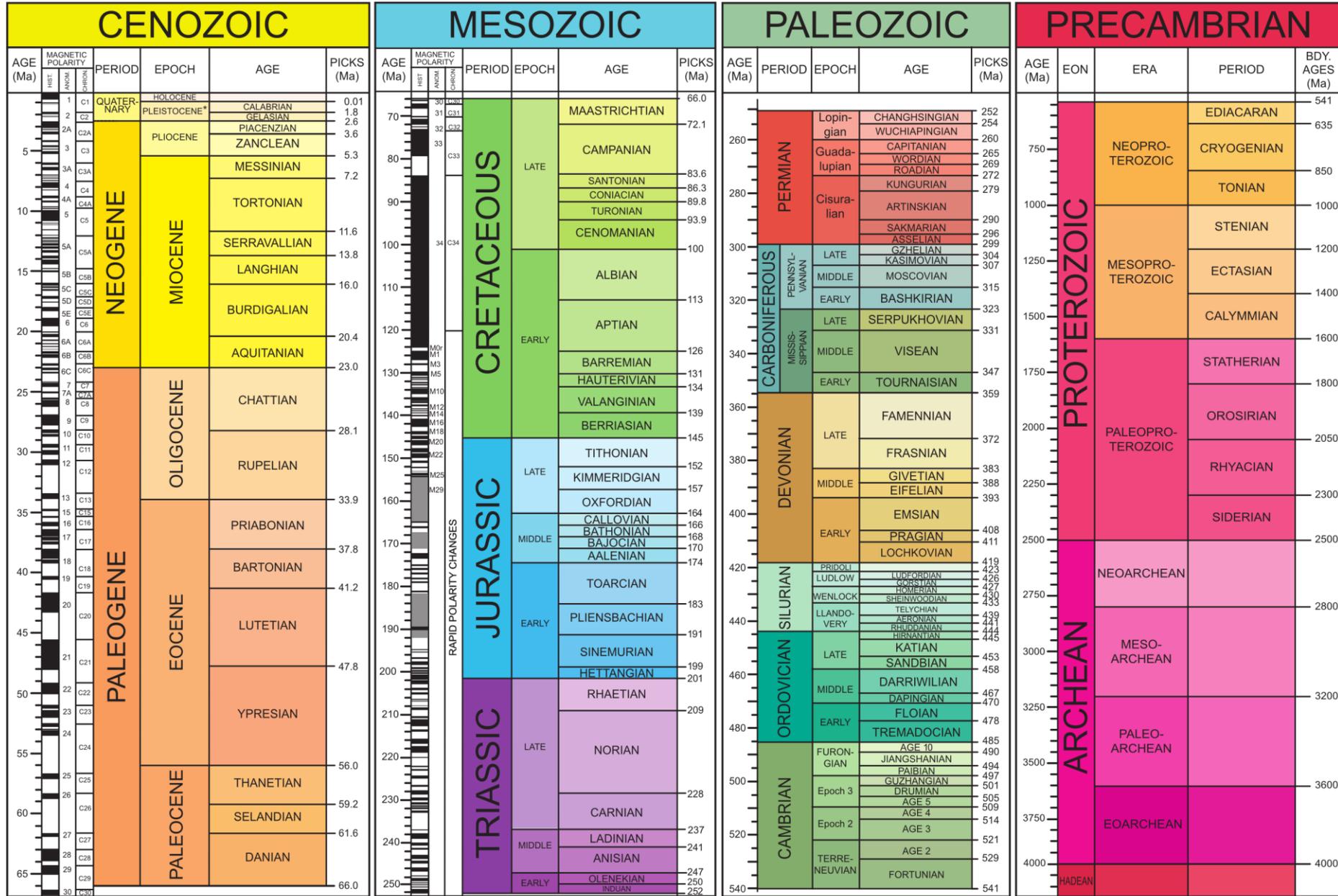
**Anexo 1: Tabela com as idades inferidas para cada um dos nós da filogenia aqui reconstruída de Neobatrachia. Os valores referem-se às idades inferidas com combinação de três calibrações, a utilizada aqui como final. As idades estão expressas em milhões de anos. ic: intervalo de confiança; min: mínimo; máx: máximo.**

<b>Nó</b>	<b>Idade mínima</b>	<b>Idade máxima</b>	<b>Idade Média</b>
1	140.82	170.38	155.2
2	89.94	158.83	124.385
3	135.35	167.31	151.33
4	121.3	154.92	138.11
5	95.47	127.58	111.525
6	91.29	123.23	107.26
7	58.03	101.19	79.61
8	14.03	41.36	27.695
9	73.75	102.89	88.32
10	69.8	98.68	84.24
11	45.18	71.79	58.485
12	38.18	66.61	52.395
13	40.21	65.76	52.985
14	35.25	60.8	48.025
15	32.96	58.71	45.835
16	26.19	52.12	39.155
17	63.95	93.03	78.49
18	27.92	64.47	46.195
19	51.44	80.59	66.015
20	29.19	60.67	44.93
21	26.16	51.72	38.94
22	13.71	35.77	24.74
23	59.79	84.3	72.045
24	55.77	78.74	67.255
25	49.93	75.13	62.53
26	26.39	56.29	41.34
27	53.73	76.17	64.95
28	48.21	71	59.605
29	18.96	42.77	30.865
30	41.91	65.73	53.82
31	25.94	53.08	39.51
32	51.83	73.92	62.875
33	44.71	69.11	56.91
34	35.01	61.95	48.48
35	47.17	68.62	57.895
36	37.58	59.75	48.665
37	19.2	42.11	30.655
38	26.51	51.06	38.785
39	40.49	62.69	51.59
40	12.57	35.22	23.895
41	31.95	54.94	43.445
42	26.03	50.69	38.36
43	90.11	121.61	105.86
44	82.02	113.58	97.8
45	7.51	30.42	18.965
46	76.68	107.39	92.035
47	4.29	26.32	15.305

48	65.4	93.53	79.465
49	34	58.08	46.04
50	29.1	50.69	39.895
51	26.41	48.23	37.32
52	17.81	39.99	28.9
53	20.99	41.72	31.355
54	18.32	38.78	28.55
55	59.02	85.84	72.43
56	51.92	77.9	64.91
57	40.97	63.58	52.275
58	30.3	47.71	39.005
59	25.1	42.7	33.9
60	16.39	33.19	24.79
61	7.56	21.99	14.775
62	26.74	43.95	35.345
63	16.2	36.14	26.17
64	15.21	30.04	22.625
65	7.25	17.78	12.515
66	4.72	14.28	9.5
67	59.01	82.27	70.64
68	17.54	49.22	33.38
69	4.61	18.33	11.47
70	55.11	75.81	65.46
71	53.38	73.37	63.375
72	31.5	61.08	46.29
73	14.68	43.76	29.22
74	51.75	71.02	61.385
75	48.91	68.46	58.685
76	40.72	61.88	51.3
77	28.09	51.16	39.625
78	43.95	63.96	53.955
79	40.54	61.15	50.845
80	21.33	46.78	34.055
81	14.66	42.53	28.595
82	48.92	66.9	57.91
83	46.02	63.03	54.525
84	31.37	54.5	42.935
85	42.22	58.07	50.145
86	39.48	54.04	46.76
87	33.92	37.75	35.835
88	35.72	50.48	43.1
89	28.38	44.82	36.6
90	31.33	46.11	38.72
91	27.32	43.39	35.355
92	23.68	40.58	32.13
93	43.44	61.92	52.68
94	7.47	19.38	13.425
95	3.92	13.56	8.74
96	41.41	59.39	50.4
97	32.64	54.08	43.36
98	20.72	43.86	32.29
99	38.68	56.03	47.355

100	28.56	48.63	38.595
101	10.93	30.61	20.77
102	34.44	51.39	42.915
103	15.96	34.56	25.26
104	8.49	24.04	16.265
105	32.03	48.87	40.45
106	16.15	37.62	26.885
107	24.67	42.35	33.51
108	10.67	27.76	19.215
109	52.1	72.23	62.165
110	31.04	51.76	41.4
111	26.67	46.63	36.65
112	19.1	39.08	29.09
113	45.07	64.15	54.61
114	39.62	56.37	47.995
115	34.11	53.01	43.56
116	26.66	46.98	36.82
117	35.63	51.05	43.34
118	31.92	46.03	38.975
119	29.19	42.33	35.76
120	27.89	40.43	34.16
121	26.05	37.77	31.91
122	24.43	35.34	29.885
123	21.75	32.61	27.18
124	17.64	29.35	23.495
125	15.58	27.19	21.385
126	20.05	30.88	25.465
127	16.93	27.79	22.36
128	13.06	24.01	18.535
129	11.13	22.51	16.82
130	7.4	18.72	13.06
131	23.28	33.87	28.575
132	20.97	32.17	26.57
133	17.03	29.15	23.09
134	10.62	22.52	16.57
135	22.61	33.03	27.82
136	16.94	30.02	23.48
137	21.67	31.89	26.78
138	13.96	26.14	20.05
139	20.86	30.88	25.87
140	18.96	28.81	23.885
141	12.05	23.27	17.66
142	17.19	27.19	22.19
143	8.51	17.91	13.21
144	19.27	29.21	24.24
145	11.75	23.64	17.695
146	15.56	25.82	20.69
147	10.38	21.31	15.845

Anexo 2: Escala de tempo geológico da Sociedade de Geologia da América. Esta é a versão de 2012.



**Anexo 3: Tabela com as informações taxonômicas e distribuição geográfica dos táxons aqui utilizados para investigar a história evolutiva de Neobatrachia. Os números entre parênteses representam o número total que representam os táxons. *i.s.*: táxons *insert sedis*. AT, *Afrotropical*: todos os países da África Subsaariana; AU, *Australian*: região australiana e ilhas adjacentes; MA, *Madagascan*: Madagascar e ilhas adjacentes, incluindo Seychelles, Mauritius e Reunion; NA, *Nearctic*: América do Norte, exceto o sul do México e extremo norte do Canadá e Groelândia; NT, *Neotropical*: América do Sul e ilhas adjacentes; OC, *Oceanian*: Papua Nova Guiné e ilhas adjacentes; OR, *Oriental*: sudeste Asiático mais Índia, Sri Lanka, Bangladesh, Butão, Nepal e Paquistão; PA, *Palaearctic*: todos os países europeus e asiáticos, exceto sul da China, sudeste asiático e Índia, Bangladesh, Butão, Japão, Nepal, Paquistão e Sri Lanka; PM, *Panamanian*: América Central e ilhas adjacentes; S-A, *Saharo-Arabian*: norte da África, exceto Sudão mais Oriente Médio; SJ, *Sino-Japanese*: região Tibetana, região sul da China e Japão.**

Clados sensu Frost <i>et al.</i> (2006)				Família	Subfamília	Gênero	Distribuição
Archeobatrachia				Bombinatoridae (8)		<i>Bombina</i> (6)	PA, SJ, OR
				Pelobatidae (4)		<i>Pelobates</i> (4)	PA, S-A
				Pipidae (33)		<i>Pipa</i> (4)	NT, PM
						<i>Xenopus</i> (21)	AT
Neobatrachia (5965)	<i>i.s.</i> (7)			Heleophrynidae (7)		<i>Hadromophryne</i> (1)	AT
						<i>Heleophryne</i> (6)	AT
	Hyloides (3593)			Nasikabatrachidae (1)		<i>Nasikabatrachus</i> (1)	OR
				Sooglossidae (4)		<i>Sechellophryne</i> (2)	MA
						<i>Sooglossus</i> (2)	MA
			Australobatrachia (136)	Calyptocephalellidae (5)		<i>Calyptocephalella</i> (1)	NT
						<i>Telmatobufo</i> (4)	NT
				Limnodynastidae (43)		<i>Adelotus</i> (1)	AU
						<i>Heleioporus</i> (6)	AU
						<i>Lechriodus</i> (4)	AU, OC
						<i>Limnodynastes</i> (11)	AU, OC
						<i>Neobatrachus</i> (9)	AU
						<i>Notaden</i> (4)	AU
						<i>Phyllorhina</i> (6)	AU
				Myobatrachidae (88)		<i>Arenophryne</i> (2)	AU
						<i>Assa</i> (1)	AU

						<i>Crinia</i> (17)	AU
						<i>Geocrinia</i> (7)	AU
						<i>Metacrinia</i> (1)	AU
						<i>Mixophyes</i> (8)	AU
						<i>Myobatrachus</i> (1)	AU
						<i>Paracrinia</i> (1)	AU
						<i>Pseudophryne</i> (14)	AU
						<i>Rheobatrachus</i> (2)	AU
						<i>Spicospina</i> (1)	AU
						<i>Taudactylus</i> (6)	AU
						<i>Uperoleia</i> (27)	AU, OC
			Nobleobatrachia (3452)	Allophrynidae (2)		<i>Allophryne</i> (2)	NT
				Alsodidae (30)		<i>Alsodes</i> (19)	NT
						<i>Eupsophus</i> (10)	NT
						<i>Limnomedusa</i> (1)	NT
				Aromobatidae (115)	Allobatinae (46)	<i>Allobates</i> (46)	NT
					Aromobatinae (37)	<i>Aromobates</i> (18)	NT
				Batrachylidae (14)		<i>Atelognathus</i> (7)	NT
						<i>Batrachyla</i> (5)	NT
						<i>Hylorina</i> (1)	NT
				Brachycephalidae (52)		<i>Brachycephalus</i> (20)	NT
						<i>Ischnocnema</i> (32)	NT
				Bufo		<i>Adenomus</i> (3)	OR
						<i>Amietophrynus</i> (40)	AT, S-A
						<i>Anaxyrus</i> (22)	NA
						<i>Ansonia</i> (26)	G
						<i>Atelopus</i> (96)	NT, PM
						<i>Bufo</i> (17)	OR, PA, S-A, SJ
						<i>Bufotes</i> (14)	PA, S-A, SJ

						<i>Capensibufo</i> (2)	AT
						<i>Churamiti</i> (1)	AT
						<i>Dendrophryniscus</i> (10)	NT
						<i>Didynamipus</i> (1)	AT
						<i>Duttaphrynus</i> (28)	OR, S-A, SJ
						<i>Epidalea</i> (1)	PA
						<i>Ghatophryne</i> (2)	OR
						<i>Incilius</i> (38)	NA, NT, PM
						<i>Ingerophrynus</i> (12)	OR
						<i>Leptophryne</i> (2)	OR
						<i>Melanophryniscus</i> (26)	NT
						<i>Mertensophryne</i> (14)	AT
						<i>Nannophryne</i> (4)	NT
						<i>Nectophryne</i> (2)	AT
						<i>Nectophrynoides</i> (13)	AT
						<i>Nimbaphrynoides</i> (1)	AT
						<i>Oreophrynella</i> (9)	NT
						<i>Osornophryne</i> (11)	NT
						<i>Pedostibes</i> (5)	OR
						<i>Pelophryne</i> (11)	OR, SJ
						<i>Peltophryne</i> (12)	PM
						<i>Phrynoidis</i> (2)	OR
						<i>Poyntonophrynus</i> (10)	AT
						<i>Rhaebo</i> (10)	NT, PM
						<i>Rhinella</i> (86)	NA, NT, PM
						<i>Schismaderma</i> (1)	AT
						<i>Vandijkophrynus</i> (5)	AT
						<i>Werneria</i> (6)	AT
						<i>Wolterstorffina</i> (3)	AT

				Centrolenidae (149)	Hyalinobatrachinae (30)	<i>Hyalinobatrachium</i> (28)	NT
					Centroleninae (118)	<i>Nymphargus</i> (35)	NT
				Ceratophryidae (12)		<i>Ceratophrys</i> (8)	NT
						<i>Chacophrys</i> (1)	NT
						<i>Lepidobatrachus</i> (3)	NT
				Ceuthomantidae (4)		<i>Ceuthomantis</i> (4)	NT
				Craugastoridae (713)	Craugastorinae (115)	<i>Craugastor</i> (113)	NA, NT, PM
						<i>Haddadus</i> (2)	NT
					Pristimantinae (509)	<i>Phrynopus</i> (25)	NT
					Strabomantinae (22)	<i>Strabomantis</i> (17)	NT, PM
				Cycloramphidae (40)		<i>Cycloramphus</i> (28)	NT
						<i>Thoropa</i> (6)	NT
						<i>Zachaenus</i> (2)	NT
				Dendrobatidae (177)	Dendrobatinae (54)	<i>Dendrobates</i> (5)	NT, PM
					Colostethinae (62)	<i>Silverstoneia</i> (3)	NT, PM
				Eleutherodactylidae (205)	Phyzelaphryninae (8)	<i>Adelophryne</i> (7)	NT
					Eleutherodactylinae (197)	<i>Eleutherodactylus</i> (186)	PM
				Hemiphractidae (100)		<i>Flectonotus</i> (2)	NT
						<i>Hemiphractus</i> (6)	NT, PM
				Hylidae (926)	Pelodyrinae (201)	<i>Litoria</i> (201)	AU
					Phyllomedusinae (58)	<i>Phyllomedusa</i> (30)	NT, PM
					Hylinae (667)	<i>Scinax</i> (111)	NT, PM
				Hylodidae (42)		<i>Crossodactylus</i> (11)	NT
						<i>Hylodes</i> (24)	NT
				Leptodactylidae (189)	Leptodactylinae (94)	<i>Leptodactylus</i> (75)	NA, NT, PM
					Leiuperinae (88)	<i>Physalaemus</i> (45)	NT
					Leiuperinae (88)	<i>Pleurodema</i> (15)	NT
					Paratelmatobiinae (7)	<i>Paratelmatobius</i> (6)	NT

					Paratelmatobiinae (7)	<i>Scythrophrys</i> (1)	NT
				Odontophrynidae (40)		<i>Macrogenioglottus</i> (1)	NT
						<i>Odontophrynus</i> (12)	NT
						<i>Proceratophrys</i> (27)	NT
				Rhinodermatidae (3)		<i>Insuetophrynus</i> (1)	NT
						<i>Rhinoderma</i> (2)	NT
				Telmatobiidae (61)		<i>Telmatobius</i> (61)	NT
	Ranoides (2372)	Allopadanura (906)		Microhylidae (519)	Gastrophryinae (54)	<i>Gastrophryne</i> (4)	NA, PM
					Asterophryinae (274)	<i>Xenorhina</i> (31)	OC
					Cophylinae (59)	<i>Platypelis</i> (12)	MA
					Hoplophryinae (3)	<i>Hoplophryne</i> (2)	AT
					Microhylinae (71)	<i>Microhyla</i> (31)	OR, SJ
					Phrynomerinae (5)	<i>Phrynomantis</i> (5)	AT
					Scaphiophryinae (10)	<i>Scaphiophryne</i> (8)	MA
			Afrobatrachia (387)	Hyperoliidae (210)		<i>Hyperolius</i> (131)	AT
						<i>Tachycnemis</i> (1)	MA
						<i>Kassina</i> (16)	AT
				Arthroleptidae (144)	Astyosterninae (30)	<i>Scotobleps</i> (1)	AT
					Arthroleptinae (63)	<i>Arthroleptis</i> (47)	AT
				Brevicipitidae (33)		<i>Breviceps</i> (16)	AT
						<i>Callulina</i> (9)	AT
		Natatanura (1466)		Ceratobatrachidae (85)		<i>Ceratobatrachus</i> (1)	OC
						<i>Batrachylodes</i> (8)	OC
				Conrauidae (6)		<i>Conraua</i> (6)	AT
				Dicroglossidae (181)	Dicroglossinae (157)	<i>Limnonectes</i> (56)	OC, OR, SJ
						<i>Nannophrys</i> (4)	OR
				Mantellidae (204)	Mantellinae (125)	<i>Mantella</i> (16)	MA

					Laliostominae (4)	<i>Aglyptodactylus</i> (3)	MA
				Micrixalidae (11)		<i>Micrixalus</i> (11)	OR
				Nyctibatrachidae (28)		<i>Lankanectes</i> (1)	OR
						<i>Nyctibatrachus</i> (27)	OR
				Petropedetidae (12)		<i>Petropedetes</i> (12)	AT
				Phrynobatrachidae (85)		<i>Phrynobatrachus</i> (85)	AT
				Ptychadenidae (53)		<i>Ptychadena</i> (49)	AT
						<i>Hildebrandtia</i> (3)	AT
				Pyxicephalidae (72)	Cacosterninae (66)	<i>Amietia</i> (15)	AT
					Pyxicephalinae (6)	<i>Aubria</i> (2)	AT
				Ranidae (355)		<i>Rana</i> (48)	NA, OR, PA, SJ
						<i>Lithobates</i> (49)	NT
				Ranaxalidae (10)		<i>Indirana</i> (10)	OR
				Rhacophoridae (345)	Rhacophorinae (341)	<i>Rhacophorus</i> (81)	OR, SJ
						<i>Theloderma</i> (22)	OR