

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LARISSA LIMA CORREIA

DIVERSIDADE MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE
Microcaecilia taylori NUSSBAUM E HOGMOED, 1979
(AMPHIBIA: GYMNOPOHIONA: SIPHONOPIDAE)
NO SUDESTE DO PARÁ, BRASIL

RECIFE

2017

Declaração sobre plágio

Eu, **Larissa Lima Correia**, autora da dissertação intitulada "**Diversidade molecular e morfológica de *Microcaecilia taylori* Nussbaum e Hoogmoed, 1979 (Amphibia: Gymnophiona: Siphonopidae) no sudeste do Pará, Brasil**" a ser defendida através do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, declaro que:

1. A pesquisa apresentada nesta dissertação, exceto onde especificado, representa minha pesquisa original.
2. Esta dissertação não foi submetida anteriormente para obtenção de nenhum grau em nenhuma outra instituição de ensino e pesquisa do país ou do exterior.
3. Esta dissertação não contem dados de terceiros, nem figuras, gráficos ou outras informações, a menos que devidamente especificado e devidamente creditado como sendo fornecido por outra pessoa.
4. Esta dissertação não contem material escrito por terceiros, a menos que devidamente especificado e creditado como sendo fornecido por outros pesquisadores. Onde material escrito por terceiros foi usado, eu:
 - 4.1. Re-escrevi o texto, mas a informação passada foi devidamente referenciada.
 - 4.2. Onde palavras exatas escritas por terceiros foram usadas, as mesmas foram marcadas no texto em itálico ou entre aspas e devidamente referenciadas.
5. Esta dissertação não contem texto, gráficos ou tabelas copiadas e coladas da internet, a menos que especificamente creditado, e a fonte original devidamente referenciada e datada na sessão de Referências Bibliográficas.

Recife 03 de abril de 2017.

LARISSA LIMA CORREIA

**DIVERSIDADE MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE *Microcaecilia taylori*
NUSSBAUM E HOOGMOED, 1979 (AMPHIBIA: GYMNOPOHIONA:
SIPHONOPIDAE) NO SUDESTE DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção de
título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Pedro Murilo Sales Nunes

Coorientadora: Dr^a. Tamí Mott

RECIFE

2017

Catalogação na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Correia, Larissa Lima

Diversidade molecular e morfológica de *Microcaecilia taylori* Nussbaum e Hoogmoed, 1979 (Amphibia: Gymnophyana: Siphonopidae) no sudeste do Pará, Brasil / Larissa Lima Correia. – Recife: O Autor, 2017.

75 f.: il.

Orientadoras: Pedro Murilo Sales Nunes, Tamí Motti

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Anfíbios 2. Biologia - Classificação I. Nunes, Pedro Murilo Sales (orient.) II. Mottí, Tami (coorient.) III. Título.

LARISSA LIMA CORREIA

**DIVERSIDADE MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE *Microcaecilia taylori*
NUSSBAUM E HOOGMOED, 1979 (AMPHIBIA: GYMNOPOHIONA:
SIPHONOPIDAE) NO SUDESTE DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção de
título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 03/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Murilo Sales Nunes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Diego Astúa de Moraes (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rodrigo Augusto Torres (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcelo José Sturaro (Examinador externo)
Museu Paraense Emílio Goeldi

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todos que contribuíram para a realização desse trabalho. Sem dúvida, a conclusão dessa dissertação é fruto do apoio, dedicação e amizade de várias pessoas. Por isso, deixo meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Pedro Nunes e à minha coorientadora Tamí Mott por toda confiança, dedicação e paciência a mim oferecidas ao longo desses dois anos. Por todas as reuniões para discutir sobre o projeto, modifica-lo, reestrutura-lo. Enfim, muita coisa aconteceu até o projeto se tornar o que é agora e, sem dúvida, vocês foram parte essencial nessa trajetória.

À minha família. Aos meu pais e irmãos por todo apoio, compreensão e incentivo. Vocês, com certeza, são protagonistas na minha vida e meus mil agradecimentos não caberiam aqui. Ainda falando em pessoas essenciais, agradeço imensamente à pessoa mais paciente que tenho nessa vida, ao meu namorado João Gabriel. Muito obrigada por todo o seu apoio e dedicação durante esses dois apreensivos anos! Obrigada por me devolver o sorriso quando as coisas pareciam não estar dando certo e por compartilhar-lo com satisfação a cada conquista minha. Só posso te dizer que, sem você, tudo isso teria sido mais difícil e incalculavelmente mais estressante! Então, meu imenso obrigada, amor! Te amo!

Aos meus amigos de laboratório (Luana, Marcos, João e André) que, sem dúvida, tonaram esses dois anos de Mestrado mais cheios de alegria do que imaginei. Obrigada pelas dicas no projeto, pelas conversas jogadas fora e pelo nosso eterno momento do café cheios de companheirismo! Eu não sei como agradecer por ter convivido com pessoas tão leais como vocês, então, deixo aqui o meu simples obrigada cheio de sinceridade e carinho.

Aos amigos da UFPE, Anninha, Rafa, Arthur e Rafael. Apesar de não convivermos durante todo o processo de mestrado, muito obrigada pela amizade de todos vocês! Vocês foram parte muito importante durante o meu primeiro ano em Recife e eu só tenho a agradecer por tê-los conhecido!

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

“The first part of knowledge is getting the names right.”

Provérbio chinês

RESUMO

A integração de diferentes fontes de informação é atualmente reconhecida como a abordagem mais eficiente para investigar questões sistemáticas, uma vez que busca representar a complexidade biológica baseada em linhas de evidências independentes e complementares. *Microcaecilia taylori* é um anfíbio da ordem Gymnophiona que foi descrito, em 1979, com base em três exemplares do Suriname sem anéis secundários. Após 30 anos, a espécie foi registrada para o sudeste do Pará, Brasil. Estes novos exemplares apresentaram uma ampla variação no número de anéis secundários (0 a 21) e assim a diagnose da espécie foi modificada. Neste estudo, o objetivo foi caracterizar a diversidade molecular e morfológica de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, nos municípios de Parauapebas e Marabá, Brasil. Na abordagem molecular, fragmentos de dois genes mitocondriais (cytb e ND4) foram analisados para 127 espécimes visando elucidar suas linhagens evolutivas, diversidade e estruturação genética. Na abordagem morfológica, 18 caracteres morfométricos e nove merísticos de 67 espécimes representando as linhagens evolutivas reveladas pela abordagem molecular foram examinados e Análises de Componentes Principais (PCA) para os dados merísticos e morfométricos separadamente foram conduzidas a fim de revelar a existência de Morfogrupos dentro da amostragem. Evidências moleculares e morfológicas revelaram que *M. taylori* de Parauapebas e Marabá trata-se, na verdade, de um complexo de espécies. A análise bayesiana e a rede de haplótipos recuperaram dois Clados e Haplogrupos (A e B) (cytb: FCT = 0,97, distância genética = 17%; ND4: FCT = 0,98, distância genética = 19,8%). Em congruência, a PCA recuperou dois Morfogrupos (A e B) no espaço merístico, os quais são facilmente distinguíveis pelo caráter “anéis secundários”: ausente no Morfogruo A e variando entre 10 e 21 no Morfogruo B. Desse modo, apoiados em uma taxonomia integrativa por congruência uma nova espécie é descrita (Clado B; *Microcaecilia* sp. nov.) e o caráter diagnóstico de *M. taylori* (representada pelo Clado A) retorna a ser a ausência de anéis secundários.

Palavras-chaves: Taxonomia integrativa. Complexo de espécies. Nova espécie. Cecília.

ABSTRACT

The integration of different lines of evidences is currently recognized as the most efficient approach to investigate systematic questions because it looks for to represent biological complexity based on independent and complementary datasets. *Microcaecilia taylori* is an amphibian of the Gymnophiona order described in 1979 based on three specimens from Suriname without secondary body annuli. After 30 years, the species was found in the southeast of Pará, Brazil. These new specimens showed a significant variation in the number of secondary body annuli (0 to 21) and thus the diagnosis of the species was modified to accommodate this variation. In this study, the aim was to characterize the molecular and morphological diversity of *Microcaecilia taylori* from the municipalities of Parauapebas and Marabá, in the southeast Pará State, Brazil. In the molecular approach, fragments of two mitochondrial genes (cytb and ND4) were analyzed from 127 specimens in order to elucidate their evolutionary lineages, diversity and genetic structure. In the morphological approach, 22 morphometric and nine meristic characters of 67 specimens representing the evolutionary lineages revealed by the molecular dataset were examined and two independent Principal Component Analysis (PCA) (meristic/morphometric) were conducted to investigate the presence of distinctive morphological groups. Molecular and morphological evidences have revealed that *M. taylori* from Parauapebas and Marabá is actually a species complex. The Bayesian analysis and the haplotype network recovered two Clades and Haplogroups (A and B) (cytb: FCT = 0.97, p = 0.00, genetic distance = 17%; ND4: FCT = 0.98, p = 0.00, genetic distance = 19.8%). In congruence, the PCA recovered two Morphogroups (A and B) in the meristic space, which are easily distinguishable by the character "secondary annuli": absent in Morphogroup A and ranging from 10 to 21 in Morphogroup B. In this way, based on an integrative taxonomy by congruence a new species is described (Clade B, *Microcaecilia* sp. nov.) and the diagnostic character of *M. taylori* (represented by Clade A) returns to be the absence of secondary body annuli.

Key words: Integrative taxonomy. Species complex. New species. Caecilians.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração geral de uma Gymnophiona: a) Estruturas da morfologia externa; b) Séries de dentes.....	17
Figura 2 –	Indivíduo de <i>Microcaecilia taylori</i> da Floresta Nacional dos Carajás, estado do Pará, Brasil. Foto: Ricardo Kawashita-Ribeiro.....	19
Figura 3 –	Distribuição geográfica das 127 amostras de <i>Microcaecilia taylori</i> provenientes do sudeste do Pará, Brasil: (A) uma no município de Marabá (M1) e oito no município de Parauapebas (P1-P8).....	22
Figura 4 –	Gônadas de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil: (A) gônadas de um macho, TE = testículo (MUFAL 10258); (B) gônadas de uma fêmea, Oo = oócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento (MUFAL 10559).....	28
Figura 5 –	Filograma recuperado pela inferência bayesiana mostrando as relações filogenéticas para <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil. Relações filogenéticas foram inferidas a partir de 1.350 pares de bases de dois fragmentos de DNA mitocondrial (cytb e ND4).....	32
Figura 6 –	Rede de haplótipos gerada pelo algoritmo Templeton, Crandall e Sing (TCS) a partir do fragmento do gene mitocondrial citocromo b (cytb) de 123 espécimes de <i>Microcaecilia taylori</i> provenientes de oito localidade em Parauapebas (P1-P8) e uma em Marabá (M1), Pará, Brasil.....	36
Figura 7 –	Rede de haplótipos gerada pelo algoritmo Templeton, Crandall e Sing (TCS) a partir do fragmento do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4) de 123 espécimes de <i>Microcaecilia taylori</i> provenientes de oito localidade em Parauapebas (P1-P8) e uma em Marabá (M1), Pará, Brasil.....	37
Figura 8 –	Distribuição dos 61 espécimes adultos de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil, no espaço morfométricos de acordo com os componentes principais (PC1 explicando 32,54% e PC2 12,44% da variância total) na Análise de Componentes Principais (PCA).....	41
Figura 9 –	Distribuição dos 61 espécimes adultos de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil, no espaço merístico de acordo com os componentes principais (PC1 explicando 50% e PC2 18,5% da variância total) na Análise de Componentes Principais (PCA).....	43
Figura 10 –	Holótipo de <i>Microcaecilia</i> sp. nov (MUFAL 10234). Escala = 10 milímetros.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Condições do termociclador para amplificação dos fragmentos mitocondriais citocromo b (cytb) e NADH desidrogenase subunidade 4 mitocondrial (ND4) e HIS-tRNA, segundo San Mauro et al. (2004) e Stoelting et al. (2014), respectivamente.....	23
Tabela 2 –	Parâmetros dos modelos de substituição selecionados pelo critério de informação Akaike (AIC) e utilizados nas análises bayesianas para os fragmentos mitocondriais citocromo b (cytb) e NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4).....	31
Tabela 3 –	Parâmetros moleculares de <i>Microcaecilia taylori</i> no sudeste do Pará, Brasil. Dados de DNA incluem dois fragmentos mitocondriais, cytb e ND4.....	33
Tabela 4 –	Valores de distância genética média entre espécies das famílias Indotyphlidae e Siphonopidae. Os Clados A e B de <i>Microcaecilia taylori</i> estão definidos segundo a filogenia disponível na Figura 5.....	34
Tabela 5 –	Análises de variância molecular (AMOVA) com base em dois fragmentos de gene mitocondriais (cytb e ND4) realizadas para <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil, considerando dois grupos: Clados A (n = 96) e B (n = 27) seguindo a filogenia disponível na Figura 5.....	38
Tabela 6 –	Análises de dimorfismo sexual em 16 caracteres morfométricos de <i>Microcaecilia taylori</i> (24 fêmeas e 37 machos) do sudeste do Pará, Brasil... ..	39
Tabela 7 –	Análises de dimorfismo sexual em seis caracteres merísticos e no caráter comprimento total (TL) de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil. Na tabela são listadas as médias (M), desvio padrão (DP) e variação (mín-máx). Resultados do teste T de Student estão disponíveis na última coluna. Valor de p significativo: $\leq 0,05$	40
Tabela 8 –	<i>Loading</i> s gerados para os componentes principais (PC1 e PC2) na análise de componentes principais (PCA) dos resíduos de 16 caracteres morfométricos aferidos de 61 espécimes de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil.....	41
Tabela 9 –	<i>Loading</i> s gerados para os componentes principais (PC1 e PC2) na análise de componentes principais (PCA) de seis caracteres merísticos de 61 espécimes adultos de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil.....	43
Tabela 10 –	Teste T, ANCOVA e dados morfométricos e merísticos para os Morfogrupos A e B de <i>Microcaecilia taylori</i> do sudeste do Pará, Brasil. Na tabela são listadas as médias (M), desvio padrão (DP) e variação (mín-máx) em milímetros. Valor de p significativo quando $p \leq 0,05$	44
Tabela 11 –	Medida de comprimento total e contagem de caracteres merísticos para espécies de <i>Microcaecilia</i> deste estudo e retiradas de artigos publicados.....	46
Tabela 12 –	Dados morfométricos e merísticos do holótipo e parátipos de <i>Microcaecilia</i> sp. nov. da Floresta Nacional dos Carajás, Pará, Brasil. M = média. DP = desvio padrão. Variação = mínimo e máximo. Todas as médias da série de parátipos foi baseada em 22 espécimes. Sete fêmeas e treze machos.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da taxonomia

Carl von Linné (ou, em português, Carlos Lineu, conhecido como o pai da taxonomia) foi o naturalista que deu origem formal à sistemática por meio do seu sistema binomial de nomenclatura (Rodrigues et al., 2011). Visando uma melhor compreensão da natureza, em 1735, Lineu lançou seu livro *Systema Naturae*, onde propôs o seu sistema de classificação dividindo a Natureza em três reinos: Animalia, Vegetalia e Mineralia. Porém, foi apenas com a décima edição do *Systema Naturae*, em 1758, que se iniciou a aplicação geral da nomenclatura binomial zoológica, onde cada organismo seria conhecido por apenas dois nomes, facilitando, desse modo, a identificação e o reconhecimento universal das espécies. Ainda hoje, a nomenclatura binomial é utilizada e as normas para a denominação científica dos seres vivos foram firmadas posteriormente no I Congresso Internacional de Nomenclatura Científica, em 1898 (de Araújo et al., 2006).

Desde o advento da nomenclatura linneana, a cerca de 250 anos, os taxonomistas têm descrito e nomeado mais de 1,2 milhões de espécies de eucariotos (Mora et al., 2011). Embora seja um número aparentemente elevado aos olhos leigos, desde a década de 90, muitos pesquisadores vêm sugerindo que, na realidade, a maioria das espécies existentes permanecem desconhecidas (Erwin, 1982; Costello et al., 2013) e que, provavelmente, serão extintas antes mesmo de termos a oportunidade de descrevê-las (Leakey e Lewin, 1995; Pimm et al., 2006; Barnosky et al., 2011). Em uma recente estimativa do número de espécies existentes no mundo, Mora et al. (2011) sugerem que esses 1,2 milhões de espécies eucariotas conhecidas no mundo representa apenas uma pequena porcentagem do número real no ambiente terrestre (~14%) e no oceano (~9%) e que, na realidade, devam existir, em todo o mundo, cerca de 8,7 milhões (\pm 1,3 milhões) de espécies.

A revelação de que possuímos um conhecimento incipiente sobre a real biodiversidade reforçou a necessidade de uma atualização na taxonomia clássica morfológica, que fosse capaz de acelerar e aprimorar a descoberta e delimitação de espécies. Na última década, tem sido crescente o número de artigos publicados abordando “conceitos de espécies” e “métodos para delimitação de espécies e suas aplicações” (por exemplo, de Queiroz, 1999; Hey, 2006; de Queiroz, 2007; Hausdorf, 2011; Solís-Lemus et al., 2014).

Wiley (1978) sedimentou o conceito [modificado de Simpson (1961)] de que uma espécie evolutiva pode ser definida como uma linhagem única de populações de um dado organismo que mantêm sua identidade e tem suas próprias tendências evolutivas e destino

histórico. Sob essa perspectiva, somos capazes de descobrir as espécies a medida que as evidências de sua história evolutiva nos permitem (Ghiselin, 1975; Wiley, 1978; Hull, 1980; Frost e Kluge, 1994). O conceito de espécie como linhagem populacional ou metapopulacional passou a apresentar ampla aceitação entre os biólogos evolucionistas (por exemplo, de Queiroz, 2007; Knowles e Carstens, 2007; Wiens, 2007; Mallet, 2008; Petit e Excoffier, 2009; Degnan e Rosenberg, 2009) e, agora, o foco das discussões científicas passou a ser “como identificar corretamente essas unidades evolutivas”.

Após mais de 250 anos de predominância da taxonomia clássica morfológica, mais especificamente entre os séculos XX e XXI, novos métodos (como conjuntos de dados moleculares, novos métodos de imagem, etc.) e novos bancos de dados (on-line, por exemplo) foram conquistando espaço dentro da taxonomia e se tornando tão importantes quanto os métodos morfológicos clássicos e as coleções biológicas (German National Academy of Sciences Leopoldina, 2014). Com isso, surgiu a necessidade de se construir uma taxonomia capaz de integrar esses novos dados e métodos para auxiliar na identificação das espécies (tratadas como unidades evolutivas) (Dayrat, 2005; Valdecasas et al., 2005). Foi, então, em 2005, que a taxonomia integrativa foi formalmente introduzida como uma ciência que visa delimitar e descrever as unidades evolutivas ou espécies integrando informações de diferentes linhas de evidências (dados e/ou métodos) (Dayrat 2005, Will et al., 2005; Pante et al., 2014).

Concomitantemente com a sua formal introdução em 2005, surgiram divergências entre os pesquisadores sobre qual o grau de congruência que as diferentes linhas de evidências deveriam mostrar para que populações ou grupos de populações pudessem ser consideradas espécies distintas (por exemplo, Dayrat, 2005; de Queiroz, 2007; Schlick-Steiner et al., 2010). Tendo essas controvérsias em vista, Padial et al. (2010) reconheceram duas vertentes de pensamentos para guiar decisões taxonômicas baseadas na integração de diferentes fontes de dados: a "integração por acumulação" e a "integração por congruência".

A integração por acumulação, segundo Padial et al. (2010), baseia-se no pressuposto de que as divergências presentes em qualquer das linhas de evidência podem sugerir a existência de uma espécie, desde que constitua caráter taxonômico (de Queiroz, 2007). Desse modo, nesta linha de pensamento, embora desejada, a congruência entre diferentes linhas de evidências não é considerada necessária (de Queiroz, 2007). O critério de acumulação pode revelar espécies recentemente divergentes em radiações adaptativas (Shaffer e Thomson, 2007) devido ao processo gradual de especiação ao longo dos gradientes ecológicos (Nosil et al., 2009; Streelman e Danley, 2003). Entretanto, a principal limitação da abordagem acumulativa é que

o uso não-crítico de uma única linha de evidência pode levar a superestimação no número de espécies.

A integração por congruência, por sua vez, baseia-se no pressuposto de que são necessários padrões de divergência congruentes entre duas ou mais linhas de evidências independentes para se diferenciar espécies (Padial et al., 2010). Entretanto, a principal limitação inerente à exigência do critério de congruência entre diferentes linhas de evidências é o risco de se subestimar o número de espécies, pois o processo de especiação nem sempre é acompanhado por mudanças de caracteres em todos os níveis (Adams et al., 2009), ou, ainda, tender a descobertas de espécies mais antigas, enquanto as espécies que divergiram mais recentemente podem permanecer mascaradas (Shaffer e Thomson, 2007). Apesar de seus pontos negativos, os taxonomistas acreditam que as espécies descobertas com base em uma “taxonomia integrativa por congruência” correspondem mais frequentemente a unidades evolutivas verdadeiramente distintas, pois acredita-se ser muito pouco provável que um padrão de congruência entre linhas de evidências independentes venha a surgir por acaso na natureza (Padial et al., 2010).

Com isso, nos últimos anos, tem-se visto um número crescente de artigos utilizando com eficácia a abordagem integrativa por congruência para a delimitação de espécies em vários grupos taxonômicos, desde insetos hemípteros (Cocuzza et al., 2015) até anfíbios (Channing et al., 2013; Fouquet et al., 2014; Wang et al., 2014; Minoli et al., 2014; Garcia-Rodríguez et al., 2016) e mamíferos (Kovaleva et al., 2014). Entre as três ordens de anfíbios, Gymnophiona é a única na qual a taxonomia integrativa por congruência ainda não foi devidamente aplicada, principalmente devido à dificuldade em se obter dados de diferentes linhas de evidências. Desse modo, ainda atualmente as espécies dessa ordem são tradicionalmente delimitadas pela taxonomia clássica morfológica.

1.2 Ordem Gymnophiona

Os anfíbios da ordem Gymnophiona, conhecidos popularmente como cecílias ou cobras-cegas, são atualmente representados por 205 espécies (Frost, 2017). A maioria dessas ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais: na América do norte (México), América Central, América do Sul, Leste equatorial e oeste da África, Índia, Ilhas Seychelles, Sudeste da Ásia e região Indo-Malásia (Hedges et al., 1993; Duellman e Trueb, 1994; Zug et al., 2001). Esses animais são caracterizados, principalmente, por apresentarem um corpo alongado, anelado e sem membros; olhos cobertos por pele ou por estrutura óssea; um par de tentáculos sensoriais; e um crânio bem ossificado; características que refletem seu hábito de vida predominantemente

fossal (Vitt e Caldwell, 2014). As únicas exceções ao estilo de vida subterrâneo são algumas espécies aquáticas ou parcialmente aquáticas da família Typhlonectidae, na América do Sul, e da família Ichthyophiidae, no sudeste da Ásia (Nussbaum e Wilkinson, 1989; Kupfer et al., 2005).

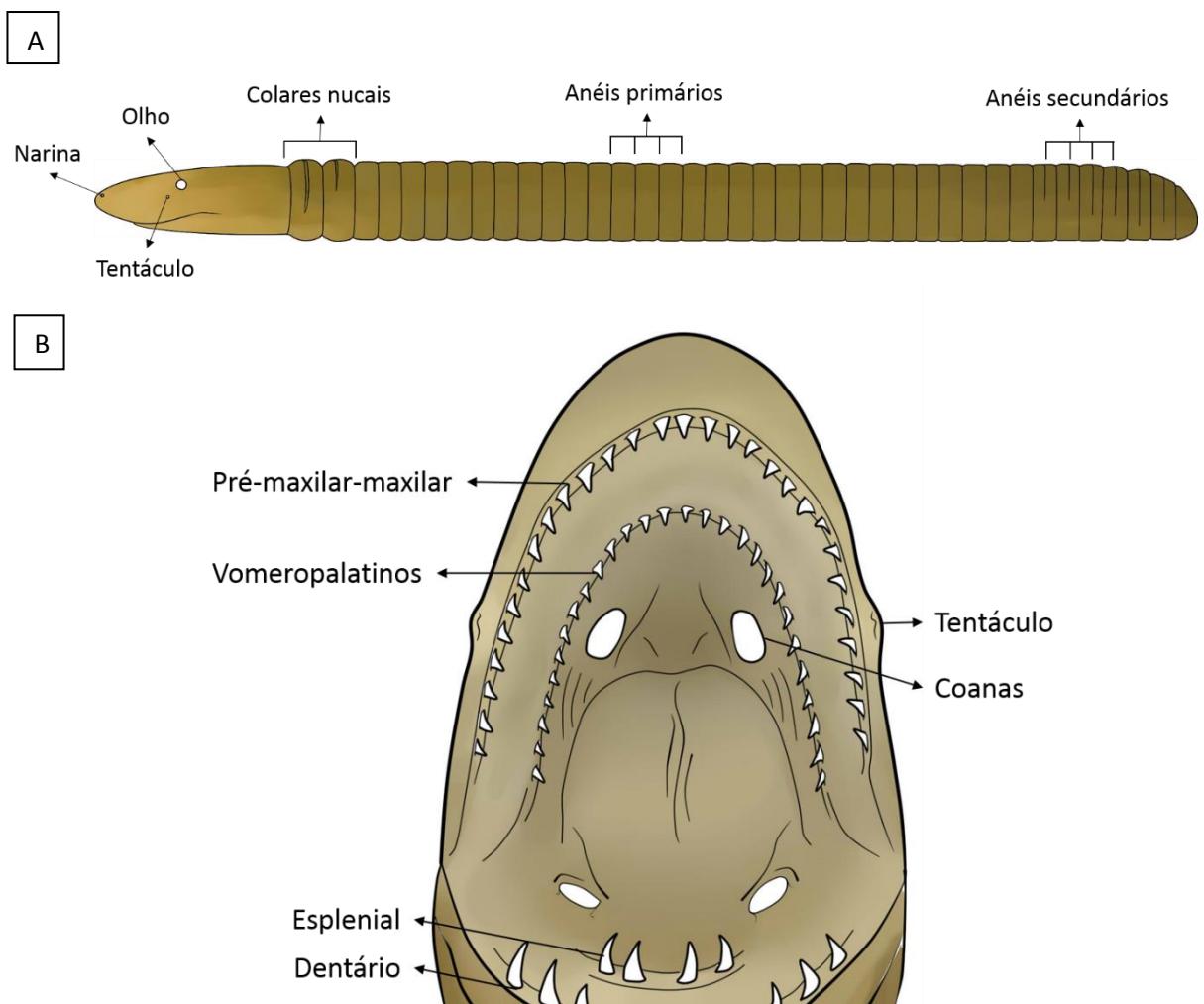
Gymnophiona é a ordem menos conhecida dentre todos os tetrápodes (Gower et al., 2002). Esses animais são considerados raros em coleções científicas e estima-se que cerca de 50% das espécies descritas são conhecidas apenas de sua localidade-tipo ou de alguns poucos registros (Taylor, 1968). Isso é, em grande parte, atribuído ao hábito fossal da maioria das espécies, o qual dificulta coletas e resulta em uma baixa representatividade de espécimes em coleções científicas (Measey, 2004). Entretanto, esforços para a coleta desses elusivos animais na última década tem resultado em amostras razoáveis para a realização de estudos sobre aspectos básicos da biologia, tais como: dieta (Verdade et al., 2000; Maciel et al., 2012), reprodução (Gomes et al., 2012; Raquet et al., 2016), sistemática (Wilkinson et al., 2003; San Mauro et al., 2004; Frost et al., 2006; Roelands et al., 2007; Zhang e Wake, 2009; Kamei et al., 2012a,b), genética de populações (Stoelting et al., 2014; Wang et al., 2015) e desenvolvimento de microssatélites (Li et al., 2010; Barratt et al., 2011; Lewis et al., 2014; Adamson et al., 2016).

A mais recente classificação em nível de família em cecílias reconheceu nove famílias morfologicamente distintas (Wilkinson et al., 2011): Caeciliidae Rafinesque, 1814, Dermophiidae Taylor, 1969, Herpelidae Laurent, 1984, Ichthyophiidae Taylor, 1968, Indotyphlidae Lescure, Renous e Gasc, 1986, Rhinatrematidae Nussbaum, 1977, Scolecomorphidae Taylor, 1969, Siphonopidae Bonaparte, 1850 e Typhlonectidae Taylor, 1968. Um ano após, com base na integração das abordagens molecular e morfológica, Kamei et al. (2012a) corroboraram a classificação propostas por Wilkinson et al. (2011) e descreveram uma nova família, Chikilidae, a partir do estudo de novas espécies encontradas no nordeste da Índia.

Atualmente, os principais caracteres de morfologia externa utilizados para distinguir gêneros e espécies de cecílias são os caracteres relativos à segmentação do corpo (tipo e número de anéis corporais), dentes (tipo de série dentária e número de dentes), posição do par de tentáculos com relação aos olhos e à narina, olhos visíveis ou não visíveis e presença ou ausência de cauda verdadeira (Taylor, 1968; Nussbaum e Wilkinson, 1989; Maciel e Hoogmoed, 2011). Em geral, os anéis corporais de cecílias podem ser classificados em três tipos segundo Taylor (1968) e Maciel e Hoogmoed (2011): (I) colares nucais: estão presentes em um número máximo de dois anéis delimitados anterior e posteriormente por sulcos que podem circundar completa ou incompletamente o corpo e, geralmente, são mais largos que os

anéis corporais; (II) anéis corporais primários: são anéis semelhantes aos da região nucal, porém visivelmente mais estreitos e delimitados por sulcos que, dependendo da espécie, podem circundar completa ou incompletamente o corpo; (III) anéis secundários: anéis formados pela presença de sulcos secundários que se encontram dentro dos anéis primários de algumas espécies e geralmente estão presentes na região posterior do corpo (Figura 1A). As séries dentárias, por sua vez, podem ser classificadas em quatro tipos, também seguindo os mesmos pesquisadores: (I) pré-maxilar-maxilar: série que agrupa os dentes inseridos na pré-maxila e no maxilar; (II) pré-vomeropalatino: agrupa os dentes inseridos no vomer e no palatino; (III) esplenial: série de dentes localizados mais internamente na mandíbula; e (IV) dentário: série de dentes inseridos no dentário (Figura 1B).

Figura 1 – Ilustração geral de uma Gymnophiona: a) Estruturas da morfologia externa; b) Séries de dentes.



Fonte: Elaborada pela autora.

No Brasil, 36 espécies de cecílias de quatro famílias (Caecilidae, Rhinatrematidae, Siphonopidae e Typhlonectidae) já foram registradas (SBH, 2016). Dentro de Siphonopidae, segunda família mais especiosa da ordem, está alocado *Microcaecilia* Taylor, 1968 (Wilkinson et al., 2011). As espécies desse gênero são os únicos sifonopídeos com olhos cobertos por osso (portanto, não visíveis), abertura tentacular mais próxima de onde estariam os olhos do que das narinas e sem diastema (espaço) entre as fileiras de dentes vomerinos e palatinos, possuindo, portanto, uma série única denominada série voremopalatina (Wilkinson et al., 2011).

Originalmente, *Microcaecilia* foi descrita por Taylor (1968) para alocar três espécies de pequenas cecílias neotropicais previamente incluídas nos gêneros *Dermophis* Peters, 1880 e *Gymnophis* Peters, 1874: *Microcaecilia albiceps* (Boulenger, 1882), *Microcaecilia rabei* (Roze e Solano, 1963) e *Microcaecilia unicolor* (Duméril, 1863). Posteriormente, mais duas espécies foram descritas para o gênero *Microcaecilia supernumeraria* Taylor, 1969 e *Microcaecilia taylori* Nussbaum e Hoogmoed, 1979. Após um período de cerca de 30 anos sem qualquer alteração dentro de *Microcaecilia*, 11 novas espécies foram descritas ou alocadas, neste gênero, em um intervalo de apenas cinco anos: *M. grandis* Wilkinson, Nussbaum e Hoogmoed, 2010, *M. iyob* Wilkinson e Kok, 2010, *M. rochae* Maciel e Hoogmoed, 2011, *M. trombetas* Maciel e Hoogmoed, 2011, *Microcaecilia nicefori* (Barbour, 1924), *M. savagei* Donnelly e Wake, 2013, *M. dermatophaga* Wilkinson, Sherratt, Starace e Gower, 2013, *M. marvaleewakeae* Maciel e Hoogmoed, 2013, *M. pricei* (Dunn, 1944), *M. iwokrama* (Wake e Donnelly, 2010) e *M. butantan* Wilkinson, Antoniazzi e Jared, 2015; tornando esse o gênero mais especioso de sua família e o segundo mais especioso dentre os gêneros de cecílias da América do Sul. Desse modo, atualmente, *Microcaecilia* é constituído por 16 espécies nominais de cecílias tão pequenas [máximo comprimento total é de 318 milímetros (Maciel e Hoogmoed, 2011)] que, em inglês, são popularmente conhecidas como *tiny caecilians* (Frost, 2017).

A quinta espécie alocada no gênero, *M. taylori* (Figura 2), foi inicialmente descrita baseada apenas em três espécimes coletados em duas localidades no norte da Floresta Amazônica, em Sipaliwini, Suriname. Esses espécimes apresentam uma variação de 115 a 118 anéis primários e nenhum anel secundário, sendo a ausência de anéis secundários uma característica até então exclusiva de *M. taylori* (Nussbaum e Hoogmoed, 1979). Após cerca de 30 anos sem qualquer novo registro de ocorrência, Maciel e Hoogmoed (2011) relataram a existência da espécie em quatro localidades no sudeste da Amazônia, municípios de Parauapebas, Caxiuarã, Tucuruí e Belo Monte (estado do Pará, Brasil). Esses espécimes apresentaram uma variação no caráter anéis primários de 113 a 130 e no caráter anéis secundários de 0 a 21. De acordo com os autores, por não encontrarem caracteres morfológicos

capazes de diferenciar esses espécimes do holótipo de Suriname e pelo fato do número anéis secundários ser conhecido por variar em outras espécies do gênero, eles optaram por identificar esses espécimes como *M. taylori*. Entretanto, tal decisão causou duas grandes modificações: uma nos caracteres anéis primários e secundários e outra na distribuição geográfica da espécie.

Em geral, as espécies dentro de qualquer gênero de cecília são distintas principalmente com base no número de anéis corporais primários e secundários, juntamente com a coloração do corpo, alguns poucos caracteres dentários (Wilkinson et al., 2011) e a presença de sulcos nos colares nucais (Wilkinson et al., 2013b). Qualquer alteração na variação desses caracteres para diagnose de uma espécie deve ser cautelosamente avaliada. Com base nisso, alguns pesquisadores vêm questionando a grande alteração causada pelo reconhecimento desses espécimes do sudeste do Pará como pertencentes à *Microcaecilia taylori* (Wilkinson et al., 2013b).

Figura 2 – Indivíduo de *Microcaecilia taylori* da Floresta Nacional dos Carajás, estado do Pará, Brasil.



Fonte: Ricardo Kawashita-Ribeiro.

Nos últimos anos, estudos moleculares vêm revelando a presença de uma diversidade subestimada dentro de vários gêneros de cecílias (Gower et al., 2002; Gower et al., 2011; Kamei et al., 2012a,b; Stoelting et al., 2012; Wang et al., 2015) e, em publicações subsequentes, as linhagens evolutivas apontadas pelas abordagens moleculares vêm sendo congruentemente reconhecidas e descritas como novas espécies baseadas também na morfologia (Kamei et al., 2009; Kamei et al., 2012b; Kotharambath et al., 2015). Isso deixa claro que há muito a descobrir dentro desse elusivo grupo de animais e que a taxonomia integrativa, utilizando principalmente dados moleculares e morfológicos, apresenta-se como uma abordagem segura e eficiente para delimitação de espécies.

Entre 2010 e 2013, o projeto “Aproveitamento Científico da Herpetofauna Oriunda de Atividade Mineradora de Parauapebas, Canã dos Carajás, Curionópolis, Marabá e Ourilândia

do Norte, Estado do Pará” proporcionou uma das maiores amostragens de uma única espécie de cecília (espécime e tecido) que se tem notícia para o Brasil. Cerca de 190 indivíduos de *M. taylori* oriundos de nove localidades nos municípios de Marabá e Parauapebas, sudeste do Pará, Brasil, foram coletados, proporcionando, desse modo, uma amostragem ímpar em número amostral e fonte de dados para compreender a diversidade dentro da espécie.

2 OBJETIVO

Caracterizar a diversidade de *Microcaecilia taylori* no sudeste do Pará, Brasil, integrando dados moleculares e morfológicos.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar as linhagens evolutivas e haplogrupos de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará com base em dois genes mitocondriais;
- Analisar a variação da morfologia externa e verificar se há morfogrupos distintos de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará;
- Comparar as linhagens evolutivas, haplogrupos e morfogrupos de forma a verificar a congruência entre as abordagens molecular e morfológica, seguindo o protocolo da taxonomia integrativa por congruência (*sensu* Padial et al., 2010).

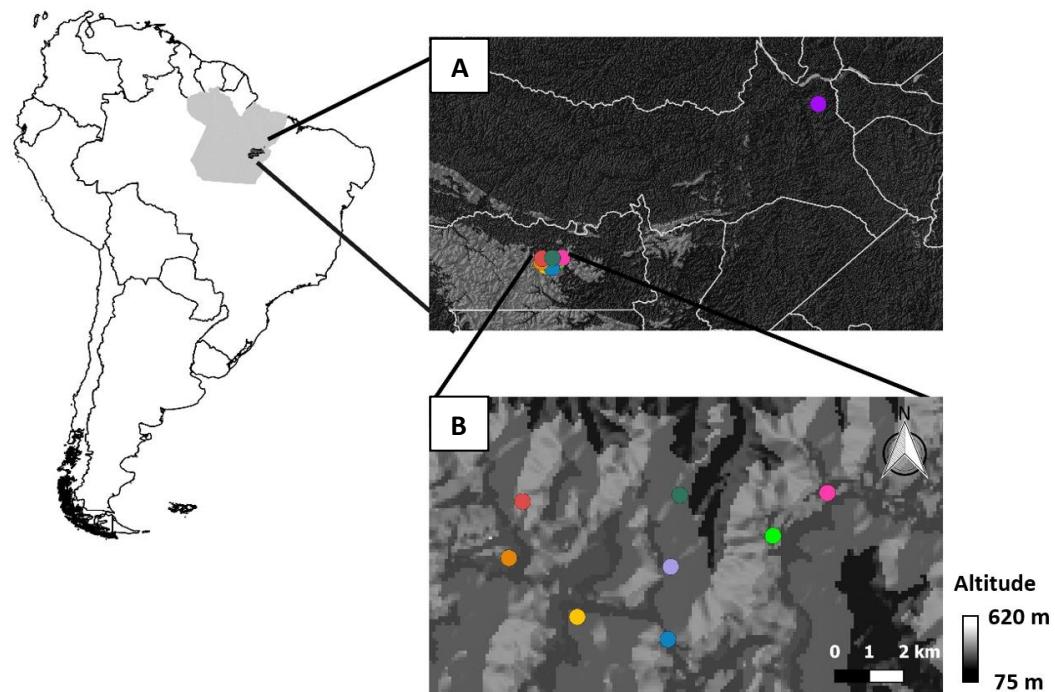
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Abordagem molecular

3.1.1 Amostragem

Foram utilizadas 127 amostras de tecido hepático e muscular de *Microcaecilia taylori* provenientes de nove localidades: oito em Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8) e uma em Marabá (M1), Pará, Brasil (Figura 3; Apêndice A). Todas as amostras utilizadas são provenientes do Banco de Tecidos e da Coleção Herpetológica do Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas (MNHFAL), Maceió, Alagoas, Brasil, e todos os espécimes foram previamente identificados seguindo a revisão taxonômica de Maciel e Hoogmoed (2011).

Figura 3 – Distribuição geográfica das 127 amostras de *Microcaecilia taylori* provenientes do sudeste do Pará, Brasil: (A) uma no município de Marabá (M1) e oito no município de Parauapebas (P1-P8).



Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2 Extração do DNA e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico total das amostras foi extraído utilizando o protocolo de extração com proteinase K e sais (Aljanabi e Martinez, 1997) e conservado em tampão Tris-EDTA (10mM de Tris e 1 mM de EDTA; pH 8,0) ou água ultrapura. Todas as amostras de DNA extraído foram

avaliadas quanto a concentração de DNA (ng/μl) e a razão de absorvância 260/280 através de um espectrofotómetro NanoDrop.

Dois fragmentos do genoma mitocondrial, citocromo b (cytb) e NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4), foram amplificados utilizando *primers* disponíveis na literatura: MNCN-Glu F 5'-GAA AAA CCA CCG TTG TTA TTC AAC TAC A-3' e Amp-P10 R 5'-TTC AGY TTA CAA GAC YGA TGC TTT-3' (San Mauro et al., 2004) para cytb; e ND4 5'-CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC-3' e Leu 5'-CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA-3' (Arévalo et al., 1994) para o ND4. A amplificação de ambos os fragmentos foi realizada através de PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando protocolos de reações otimizadas com um volume final de 25ul, sendo: 12,5ul de PCR *Master Mix* (Promega), 8,4 ul de *free water*, 0,8 ul de cada primer na concentração de 10nM (*forward* e *reverse*), 0,5 ul de Taq DNA Polimerase (*Platinum Taq*) e 2 ul de DNA (15 - 80 ng/ul). Os protocolos de temperatura do termociclador seguiram San Mauro et al. (2004) e Stoelting et al. (2014), para cytb e ND4, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições do termociclador para amplificação dos fragmentos mitocondriais citocromo b (cytb) e NADH desidrogenase subunidade 4 mitocondrial (ND4) e HIS-tRNA, segundo San Mauro et al. (2004) e Stoelting et al. (2014), respectivamente.

Etapas	Temperatura	Tempo
Cytb		
1. Desnaturação inicial	94°C	5'
2. Desnaturação	94°C	60"
3. Pareamento	48°C	60"
4. Extensão	72°C	1'30"
Repetir 35 vezes as etapas de 2 a 4		
5. Extensão final	72°C	7'
ND4		
1. Desnaturação inicial	94°C	7'
2. Desnaturação	94°C	30"
3. Pareamento	48°C	30"
4. Extensão	72°C	1'
Repetir 40 vezes as etapas de 2 a 4		
5. Extensão final	72°C	7'

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose. Para isso, 1,5 μl de azul de bromofenol e 5μl de cada produto da PCR foram homogeneizados e aplicados nos poços do gel de agarose 1% (0,7g de agarose em 70ml de TBE 0,5x: 0,045 mM de Tris-Borato, 0,001 M de EDTA, pH 8,0; corado com 0,5μl de *sybr safe*) para migração juntamente com o marcador de peso molecular (5μl) em uma corrente de 90V por 30 minutos. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com base no marcador de peso molecular de 100pb, visualizados com o auxílio de um transluminador com luz ultravioleta.

Os produtos da PCR que apresentaram *amplicons* foram purificados utilizando o protocolo de purificação por isopropanol (Apêndice B). Todas as etapas de extração do DNA genômico total, PCR, eletroforese em gel de agarose e purificação foram realizados no Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil.

O sequenciamento das amostras purificadas foi realizado unidirecionalmente (5' - 3') no sequenciador *Genetic Analyzer* 3500 da ABI seguindo o protocolo para reação de sequenciamento do kit *BigDye® terminator* V3.1 no Laboratório Central (LabCen) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

3.1.3 Edição e alinhamento das sequências

Todas as sequências obtidas foram editadas utilizando-se o programa BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999). Os eletroferogramas foram visualizados a fim de se verificar a confiabilidade do resultado do sequenciamento e corrigir eventuais erros ou presença de ambiguidade em determinados sítios. Após edição, todas as sequências foram comparadas, através da ferramenta BLAST utilizando a busca de similaridade (*megablast*) (Zhang et al., 2000) na base de dados nucleotídicos disponível no GenBank, para confirmar a amplificação do gene de interesse. Todas as sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994) com as configurações padrões, implementada no programa BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999). Por se tratarem de genes codificadores de proteínas, a tradução das sequências nucleotídicas em sequências de aminoácidos foi realizada para ambos genes a fim de auxiliar no correto alinhamento.

A saturação das substituições ao longo da sequência, ou seja, a presença de múltiplas substituições no mesmo sítio, pode levar à perda do sinal filogenético (Xia et al., 2003). A fim de verificar a qualidade dos dados moleculares quanto à saturação, o programa DAMBE 5.3.74 (Xia, 2013) foi utilizado para gerar um gráfico com o número observado de transições e transversões versus a distância genética utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros. Em tal avaliação, é esperado que à medida que a divergência genética entre as sequências aumenta, o número de transições e transversões também aumentem e que o número de transições se mantenha sempre maior. No entanto, quando tal premissa é violada, tem-se a evidência de saturação nos dados (Simon et al., 1994).

3.1.4 Análises filogenéticas

Os modelos evolutivos que melhor explicam cada uma das partições de dados, cytb e ND4, foram selecionados utilizando o Critério de informação de Akaike (AIC) através do software jModelTest 2.1.5 (Posada, 2008). A análise bayesiana foi conduzida no programa MrBayes v.3.0b4 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) para cada matriz de gene individualmente e, posteriormente, para a matriz combinada assumindo os diferentes modelos e os respectivos parâmetros para cada gene particionado. Como grupo externo, foram incorporadas cinco sequências de espécies da família Siphonopidae do GenBank, sendo uma do gênero *Siphonops* (*S. annulatus*; NC007911) uma de *Luetkenotyphlus* (*L. brasiliensis*; NC023513) e três de *Microcaecilia* (*M. dermatophaga*, *Microcaecilia* sp. e *M. unicolor*; NC023514, GQ244473 e NC023515). A topologia foi enraizada em dois representantes da família Indotyphlidae (*Grandisonia larvata* e *G. sechellensis*; NC023510 e NC023512).

Durante a análise bayesiana, foram utilizadas duas análises simultâneas (nruns=2), onde cada uma executou quatro cadeias de Markov paralelas (uma *cold chain* e três *heated chains*) iniciadas em topologias aleatórias. Para cada análise, o número de gerações foi 5.000.000, sendo as topologias e parâmetros amostrados a cada 1.000 gerações. A convergência entre as análises foi determinada comparando os parâmetros das duas análises simultâneas através do software Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2014) e verificando se o desvio-padrão de divisão (*standard split deviation*) foi menor do que 0,01 e o *effective sample size* foi maior do que 200 para todos os parâmetros. A partir dessas observações, assumiu-se um valor de “*burn-in*” onde 25% dos dados incialmente gerados foram descartados e um consenso de maioria (*majority consensus*) foi realizado para gerar a topologia final. O suporte dos ramos foi obtido através das probabilidades posteriores e, posteriormente, a topologia consenso foi visualizada e editada no programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

3.1.5 Diversidade genética

Os índices de diversidade molecular, tais como, número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (*h*) e diversidade nucleotídica (π) foram estimados para toda amostragem e para cada clado recuperado na filogenia sendo obtidos no programa ARLEQUIN V3.11 (Excoffier et al., 1992). Ademais, com o objetivo de detectar desvios em relação à neutralidade de cada um dos clados recuperados na filogenia, foi utilizado o mesmo programa para realizar dois testes de neutralidade, o Fs de Fu (Fu, 1997) e o D de Tajima (Tajima, 1989). Em geral, esses testes são capazes de constatar se os dados observados

são significativamente diferentes do esperado assumindo o modelo em que as mutações são neutras (Fisher, 1930; Wright, 1931). Desse modo, os testes assumem a hipótese nula de neutralidade que, se refutada, pode indicar que o conjunto de dados analisado estava sob ação de processos evolutivos. De maneira geral, D de Tajima tem seu cálculo baseado na distribuição de sítios segregantes e na diversidade nucleotídica. Nesse índice, valores superiores a zero sugerem que a população tenha sido submetida à seleção balanceadora ou um recente gargalo genético, enquanto valor inferiores a zero sugerem expansão populacional ou seleção purificadora. Já o Fs de Fu é calculado com base na distribuição haplotípica. Nesse índice, valores positivos resultam de poucos alelos e sugerem retração populacional (como em casos de gargalo evolutivo), enquanto valores negativos são evidências de um excesso de alelos, indicando expansão populacional recente ou efeito carona. Entretanto, devido à alta sensibilidade desses testes, a hipótese nula de neutralidade somente será refutada se ambos os índices corroborarem.

As distâncias genéticas entre os clados de *M. taylori* recuperados pela filogenia e entre as demais espécies de Siphonopidae e Indotyphlidae incorporadas do GenBank foram estimadas para cada gene individualmente utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros no programa MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Para estimar como a diversidade genética está hierarquicamente partitionada nas amostras de *M. taylori* do sudeste do Pará, foi conduzida uma análise de variância molecular (AMOVA) para cada gene individualmente através do programa ARLEQUIN V3.11 (Excoffier et al., 1992). Os arquivos de entrada dos dados de haplótipos foram gerados através do programa DNAsp v. 5 (Librado e Rozas, 2009). As AMOVAs foram realizadas utilizando o cenário definido *a priori*, onde os Clados recuperados na filogenia molecular foram definidos como os grupos e as localidades amostradas definidas como as populações. A significância dos componentes de variância e da estatística F foram testados através de 16.000 permutações, como sugerido por Excoffier e Lischer (2015). Para estimar a repartição hierárquica da diversidade genética entre os grupos (Fct), entre as populações dentro dos grupos (Fsc) e dentro das populações (Fst) e testar hipóteses definidas *a priori* sobre tal repartição, a análise utiliza-se de uma matriz de distância calculada entre os pares de haplótipos (Excoffier et al., 1992). Já para a significância dos componentes de variância e da estatística F, a AMOVA se baseia na estatística ϕ , a qual é uma extensão do F de Wright (Wright, 1978) para sequências nucleotídicas.

3.1.6 Relações genealógicas

As relações genealógicas entre as sequências amostradas foram visualizadas em uma rede de haplótipos para cada gene mitocondrial individualmente utilizando o algoritmo Templeton, Crandall e Sing (TCS; Clement et al., 2002) implementado no programa *Population Analysis with Reticulate Trees* (PopART, v.1.7; Leigh e Bryant, 2015) e disponível em <http://popart.otago.ac.nz/>.

Para estimar as relações entre os haplótipos, o programa colapsa sequências idênticas e calcula as frequências dos haplótipos dentro da amostragem total. Uma matriz de distância absoluta é então calculada para todas as comparações por pares de haplótipos e o número máximo de passos mutacionais que constitui uma conexão parcimoniosa entre dois haplótipos é calculada considerando o limite da probabilidade de parcimônia de 0,95, tal como definido em Templeton et al. (1992). Os haplótipos separados por um número de passos mutacionais maior do que o máximo citado acima permanecem desconectados. Na rede, os haplótipos são representados como círculos conectados por linhas indicando o número de mudanças de pares de bases (mutações) entre eles. O tamanho do círculo é sempre proporcional ao número de indivíduos que apresenta esse haplótipo e, aqui, o padrão de cores seguiu a coloração padronizada das localidades amostradas (Figura 3).

3.2 Abordagem morfológica

3.2.1 Amostragem

Para abordagem morfológica, foram selecionados 67 espécimes de *M. taylori* que representassem os Clados recuperados na filogenia molecular. Todos os espécimes examinados estão depositados na Coleção Herpetológica do MHNUFAL (Apêndice A).

3.2.2 Dados morfométricos e merísticos

Foram aferidos 17 caracteres morfométricos e nove merísticos seguindo a terminologia de Maciel e Hoogmoed (2011). **Morfométricos:** comprimento total (TL); largura da cabeça na articulação da mandíbula (HW); comprimento da cabeça (HL); altura da cabeça na articulação da mandíbula (HH); largura no meio do corpo (BW); altura no meio do corpo (BH); largura no primeiro colar nucal (WNC); largura do corpo no quinto anel anterior à abertura da cloaca (WTR); largura do corpo na região da cloaca (WV); projeção do focinho anterior à mandíbula (SP); distância do tentáculo até a narina (TN); distância do tentáculo até o canto da mandíbula (TCM); distância entre os tentáculos (TT); distância entre as narinas (NN); largura na região da

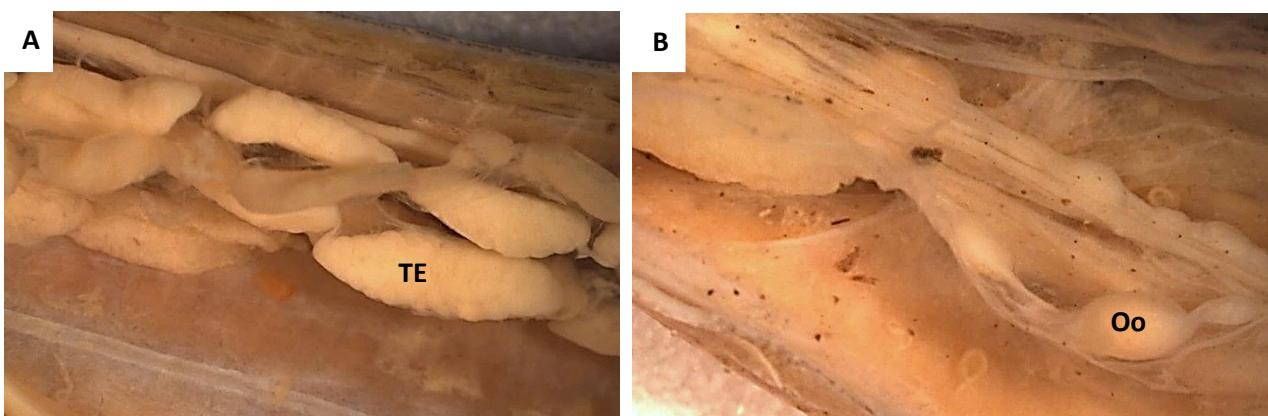
narina (HWN); distância da narina ao topo do focinho (NTS); distância da narina até o canto da mandíbula (NCM). **Merísticos:** *Anéis* - anéis primários (AP); anéis secundários (SG); anéis secundários completos (CSG); anéis primários completos (CPA); anéis interrompidos pela cloaca (AIV); anéis após a cloaca (APV); *Dentes* - dentários (DT); pré-maxilar-maxilar (PMT); pré-vomeropalatinos (PVT).

Os caracteres morfométricos foram aferidos no lado direito do corpo, exceto para três espécimes (MUFAL10362, 10253, 10250) que apresentaram o lado direito danificado. Nesse caso, esses espécimes tiveram os caracteres aferidos no lado esquerdo. Todos os caracteres morfométricos foram aferidos com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0,01mm), exceto o comprimento total, o qual foi aferido com auxílio de uma fita métrica (precisão de 1mm). Os caracteres merísticos, por sua vez, foram todos contados sob um estereoscópio binocular Coleman NSZ-405.

3.2.3 Sexagem

A maturidade sexual e o sexo dos espécimes foram determinados por dissecação e observação direta das gônadas. Espécimes em que as gônadas não se apresentavam diferenciadas, foram classificados como jovens e os demais classificados como machos ou fêmeas. Para definir o sexo, foram observadas características gerais do sistema genital seguindo Exbrayat (2006), onde o sistema genital do macho, geralmente, é composto por testículos pareados, alongados e compostos de uma série de lóbulos ovais interconectados por um ducto central e por vários ductos transversos que transportam o esperma para cloaca (Figura 4A); enquanto o sistema genital da fêmea de cecílias é composto por um par de ovários alongados caracterizados pela presença de folículos e oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, um par de oviduto e uma cloaca (Figura 4B).

Figura 4 – Gônadas de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil: (A) gônadas de um macho, TE = testículo (MUFAL 10258); (B) gônadas de uma fêmea, Oo = oócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento (MUFAL 10559).



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.4 Análises dos dados morfológicos

3.2.4.1 Dimorfismo sexual

Para as análises de dimorfismo sexual, foram utilizados apenas os adultos (fêmeas e machos) de *M. taylori*. Primeiramente, foi realizado um estudo exploratório no intuito de avaliar os pressupostos do Teste T de Student e da análise de covariância (ANCOVA). Para isso, a normalidade das distribuições e homogeneidade das variâncias foram testadas para todos os caracteres através dos testes de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965) e Levene (Levene, 1961), respectivamente. Ademais, foram realizados testes de correlação de Pearson (*r*) para avaliar a existência de correlação entre o comprimento total e os demais caracteres morfométricos.

Com a contemplação dos pressupostos estabelecidos acima, foram realizados os dois testes estatísticos: a ANCOVA foi realizada utilizando o comprimento total como covariante e o sexo como fator para determinar se os demais caracteres morfométricos apresentam dimorfismo sexual quando o efeito da covariante é controlado; e o Teste T foi realizado para verificar a existência de dimorfismo sexual em relação ao comprimento total e seis dos nove caracteres merísticos. Os três caracteres merísticos referentes à dentição não foram inclusos, pois esses estavam danificados na maioria dos espécimes analisados. As análises supracitadas foram todas conduzidas através dos pacotes *stats* v.3.3.1 e *vegan* (Oksanen et al., 2013) no software R v. 3.1.1 (R Core Team, 2013).

3.2.4.2 Análises de Componentes Principais (PCA) e análises estatísticas

Com o objetivo de investigar se os espécimes analisados exibem um padrão de ordenação, ou seja, se esses tendem a se agrupar constituindo morfogrupos, foram realizadas duas Análises de Componentes Principais (PCA): uma para os dados morfométricos, incluindo todos os 17 caracteres aferidos; e outra para os dados merísticos, incluindo seis dos nove caracteres contados (os três caracteres referentes à dentição foram excluídos por apresentarem-se danificados em vários espécimes examinados).

Como não foi identificado dimorfismo sexual para nenhum dos caracteres analisados dentro de *M. taylori* do sudeste do Pará, ambas as PCAs foram realizadas considerando toda a amostragem de espécimes adultos como um único conjunto de dados. Ambas PCAs foram conduzidas no software R v. 3.1.1 (R Core Team, 2013) utilizando os pacotes *stats* v.3.3.1 e *ggfortify* (Horikoshi e Tang, 2016).

De forma geral, a PCA foi utilizada para reduzir as variáveis (morfométricas ou merísticas) a poucos eixos, ou componentes principais (PC), que representam a maior

porcentagem da variação total (McCune e Grace, 2002). Os dois componentes principais mais representativos da variação total (PC1 e PC2) foram utilizados para construir um gráfico bidimensional, onde os *scores*, os quais são as projeções dos espécimes dentro do espaço dos componentes principais, foram plotados. Os *loadings* gerados nas duas PCAs representam a correlação entre as variáveis originais e os escores e, desse modo, foram utilizados como indicadores da magnitude de contribuição de cada variável para cada componente principal.

Para testar se os possíveis Morfogrupos são significativamente distintos quanto aos dados morfométricos e merísticos, foram conduzidos dois testes paramétricos no software R v. 3.1.1 (R Core Team, 2013): A ANCOVA foi realizada utilizando Morfogrupo como fator, comprimento total como covariante e as demais variáveis morfométricas como variável resposta; o Teste T de Student foi realizado para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos dados merísticos e do caráter comprimento total entre os possíveis Morfogrupos. As análises supracitadas foram todas conduzidas através dos pacotes *stats* v.3.3.1 e *vegan* (Oksanen et al., 2013) no software R v. 3.1.1 (R Core Team, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Abordagem Molecular

4.1.1 Relações filogenéticas dentro de *Microcaecilia taylori*

No total, 127 sequências foram editadas e analisadas, totalizando 666 pares de bases (pb) para o gene cytb e 684 pb para o gene ND4. Com base nos gráficos de substituições nucleotídicas versus distância genética, não foi observada saturação dos sítios nucleotídicos para nenhum dos genes mitocondriais analisados (Apêndices C e D). Os modelos evolutivos de melhor ajuste para cada um dos genes segundo o critério de AIC foram GTR+I+G e TPM1uf+I+G para cytb e ND4, respectivamente. Os valores dos parâmetros dos respectivos modelos considerados nas análises estão apresentados na Tabela 2.

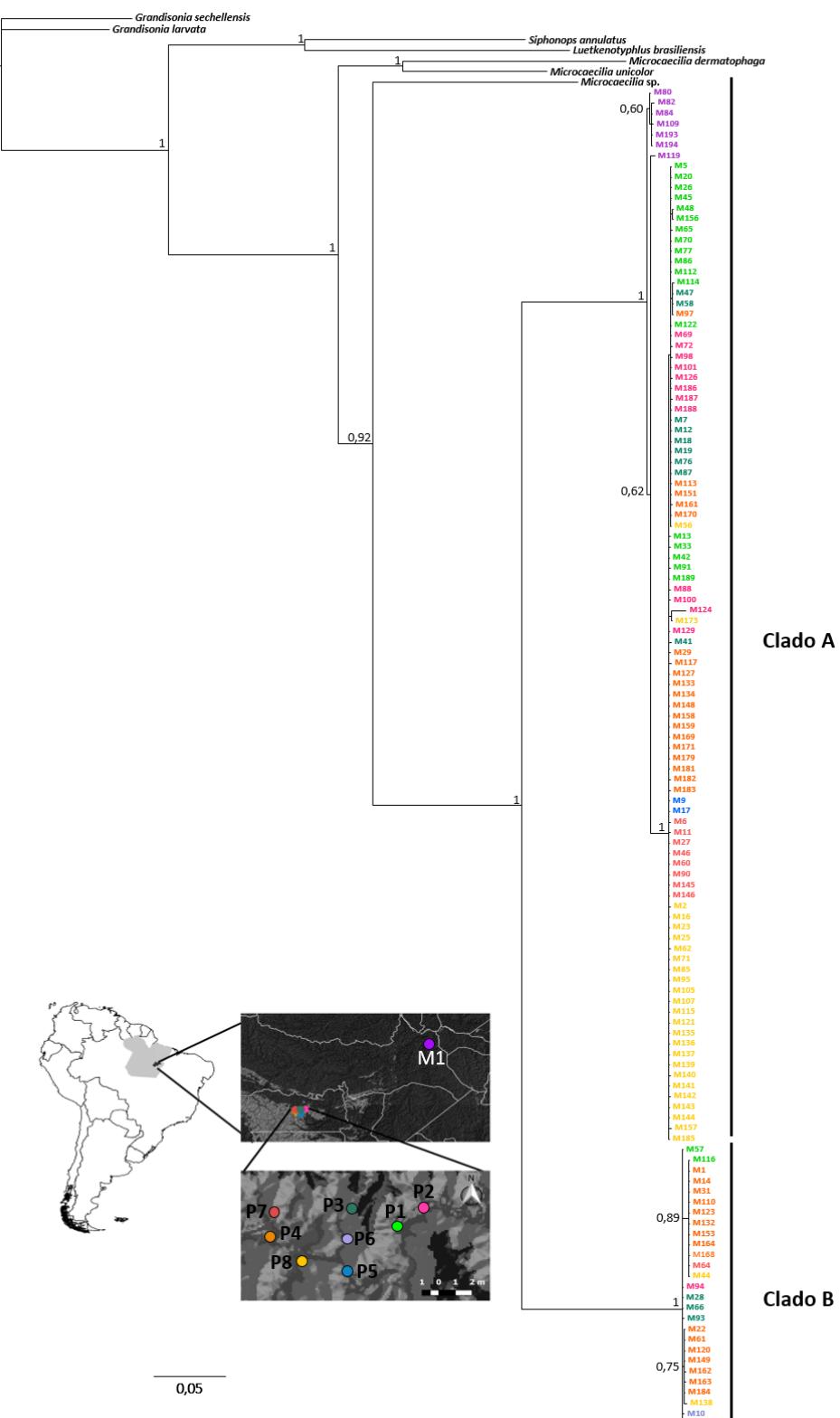
Tabela 2 – Parâmetros dos modelos de substituição selecionados pelo critério de informação Akaike (AIC) e utilizados nas análises bayesianas para os fragmentos mitocondriais citocromo b (cytb) e NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4).

Parâmetros	Modelos evolutivos	
	GTR+I+G	TPM1uf+I+G
-lnL	4786,6072	5285,0974
K	282	279
freqA	0,3244	0,3802
freqC	0,2944	0,2801
freqG	0,1031	0,0658
freqT	0,2781	0,2739
R(a) [A-C]	1,4876	1,0000
R(b) [A-G]	4,9438	14,5315
R(c) [A-T]	1,7395	1,7529
R(d) [C-G]	0,1363	1,7529
R(e) [C-T]	14,1396	14,5315
R(f) [G-T]	1,0000	1,0000

Fonte: Elaborada pela autora.

As topologias das árvores recuperadas pela análise bayesiana para cada gene individualmente e para esses concatenados foram idênticas (Figura 5 e Apêndices E e F). Nas três topologias, o gênero *Microcaecilia* foi recuperado monofilético com alto suporte (pp = 1,00), sendo *M. dermatophaga* e *M. unicolor* recuperadas como as espécies mais basais e *Microcaecilia* sp. recuperada como externa à *M. taylori*. As amostras de *M. taylori* de Parauapebas e Marabá foram recuperadas constituindo dois clados (pp = 1,00). O primeiro clado, denominado Clado A, foi constituído por duas linhagens (pp = 1,00): uma composta por espécimes de Marabá e outra por espécimes de sete das oito localidades de Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P5, P7 e P8). O segundo clado, denominado Clado B, foi constituído por espécimes de sete das oito localidades de Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P6, P7 e P8).

Figura 5 – Filograma recuperado pela inferência bayesiana mostrando as relações filogenéticas para *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil. Relações filogenéticas foram inferidas a partir de 1.350 pares de bases de dois fragmentos de DNA mitocondrial (cytb e ND4). Todos os táxons terminais com inicial M se referem às 127 amostras *Microcaecilia taylori* sequenciadas neste estudo e as cores representam as localidades onde foram coletas: Marabá (M1) e Parauapebas (P1-P8). Os números nos nós representam os valores da probabilidade posterior.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Diversidade genética

As sequências de cyt b para 127 espécimes de *M. taylori* apresentaram um total de 118 sítios polimórficos, resultando em 32 haplótipos. Já as sequências de ND4 para os mesmos 127 espécimes, apresentaram 134 sítios polimórficos, e apenas 18 haplótipos. Os demais índices de diversidade genética, considerando a amostragem total e os Clados A e B separadamente estão apresentados na Tabela 3.

Ambos os testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu, apresentaram valores negativos e significativos para o Clado A, refutando, assim, a hipótese nula de neutralidade e indicando a possibilidade de expansão populacional recente para o Clado A (Tabela 3). Para o Clado B, os valores foram positivos, mas não significativos.

Tabela 3 – Parâmetros moleculares de *Microcaecilia taylori* no sudeste do Pará, Brasil. Dados de DNA incluem dois fragmentos mitocondriais, cyt b e ND4. Clados A e B estão definidos seguindo a filogenia disponível na Figura 5. N = Número total de indivíduos inclusos na matriz de dados analisada. H = Número de haplótipos. S = Número de sítios polimórficos. *h* = Diversidade haplotípica. π = Diversidade nucleotídica. D = D de Tajima. Fs de Fu = Fs. * para D e Fs significa valor de p significativo ($\leq 0,05$).

Gene	Dados	N	H	S	<i>h</i>	π	D	Fs
Cytb	Total	127	32	118	0,8134 ($\pm 0,0255$)	0,0527 ($\pm 0,0255$)	-	-
	Clado A	100	25	35	0,7168 ($\pm 0,0358$)	0,0032 ($\pm 0,0020$)	-2,089*	-16,387*
	Clado B	27	7	9	0,7407 ($\pm 0,0623$)	0,0041 ($\pm 0,0025$)	0,607	0,404
ND4	Total	127	18	134	0,6029 ($\pm 0,0479$)	0,0590 ($\pm 0,0285$)	-	-
	Clado A	100	15	27	0,3899 ($\pm 0,0626$)	0,0028 ($\pm 0,0017$)	-1,888*	-4,856*
	Clado B	27	3	4	0,5527 ($\pm 0,0437$)	0,0017 ($\pm 0,0012$)	0,346	1,946

Fonte: Elaborada pela autora.

As distâncias genéticas estimadas através de Kimura-2-parametros estão disponíveis na Tabela 4. As médias das distâncias genéticas entre os Clados A e B de *M. taylori* foram altas (cyt b: 17%; ND4: 19,8%), de magnitude similar à encontrada entre duas outras espécies de *Microcaecilia*, *M. dermatophaga* e *M. unicolor* (cyt b: 19,6%; ND4: 20,8%) e de magnitude maior à encontrada entre as duas espécies da família Indotyphlidae (cyt b: 16,6%; ND4: 13,8%). As distâncias genéticas estimadas quando comparados cada Clado com cada uma das três espécies de *Microcaecilia* (cyt b: 21,3%-25,5%; ND4: 26,6%-30,6%) foram de magnitude similar à observada quando comparadas às três espécies entre si (cyt b: 19,6%-22,8%; ND4: 20,8%-28,3%).

Tabela 4 – Valores de distância genética média entre espécies das famílias Indotyphlidae e Siphonopidae. Os Clados A e B de *Microcaecilia taylori* estão definidos segundo a filogenia disponível na Figura 5. Acima da diagonal: valores estimados para citocromo b (cytb); Abaixo da diagonal: valores estimados para NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4).

cytb ND4	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Indotyphlidae									
(1) <i>Grandisonia larvata</i>		16,6	29,4	26,9	24,3	23,8	27,8	23,6	26,9
(2) <i>Grandisonia sechellensis</i>	13,8		27,1	30,7	26,3	25,9	26,9	27,3	26,9
Siphonopidae									
(3) <i>Luetkenotyphlus brasiliensis</i>	30,5	29,0		26,1	28,8	29,2	31,4	28,7	28,9
(4) <i>Siphonops annulatus</i>	28,9	27,4	28,3		26,4	24,1	28,0	28,8	27,4
(5) <i>Microcaecilia dermatophaga</i>	35,0	34,9	36,2	36,8		19,6	22,8	25,5	22,8
(6) <i>Microcaecilia unicolor</i>	29,4	30,9	36,4	35,3	20,8		22,2	22,6	21,3
(7) <i>Microcaecilia</i> sp.	30,1	28,8	33,2	32,9	28,3	23,9		21,6	21,5
<i>Microcaecilia taylori</i>									
(8) Clado A	36,2	34,3	33,4	36,1	30,6	26,6	26,6		17,0
(9) Clado B	34,8	35,2	35,8	39,4	29,8	30,1	27,1	19,8	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Relações genealógicas

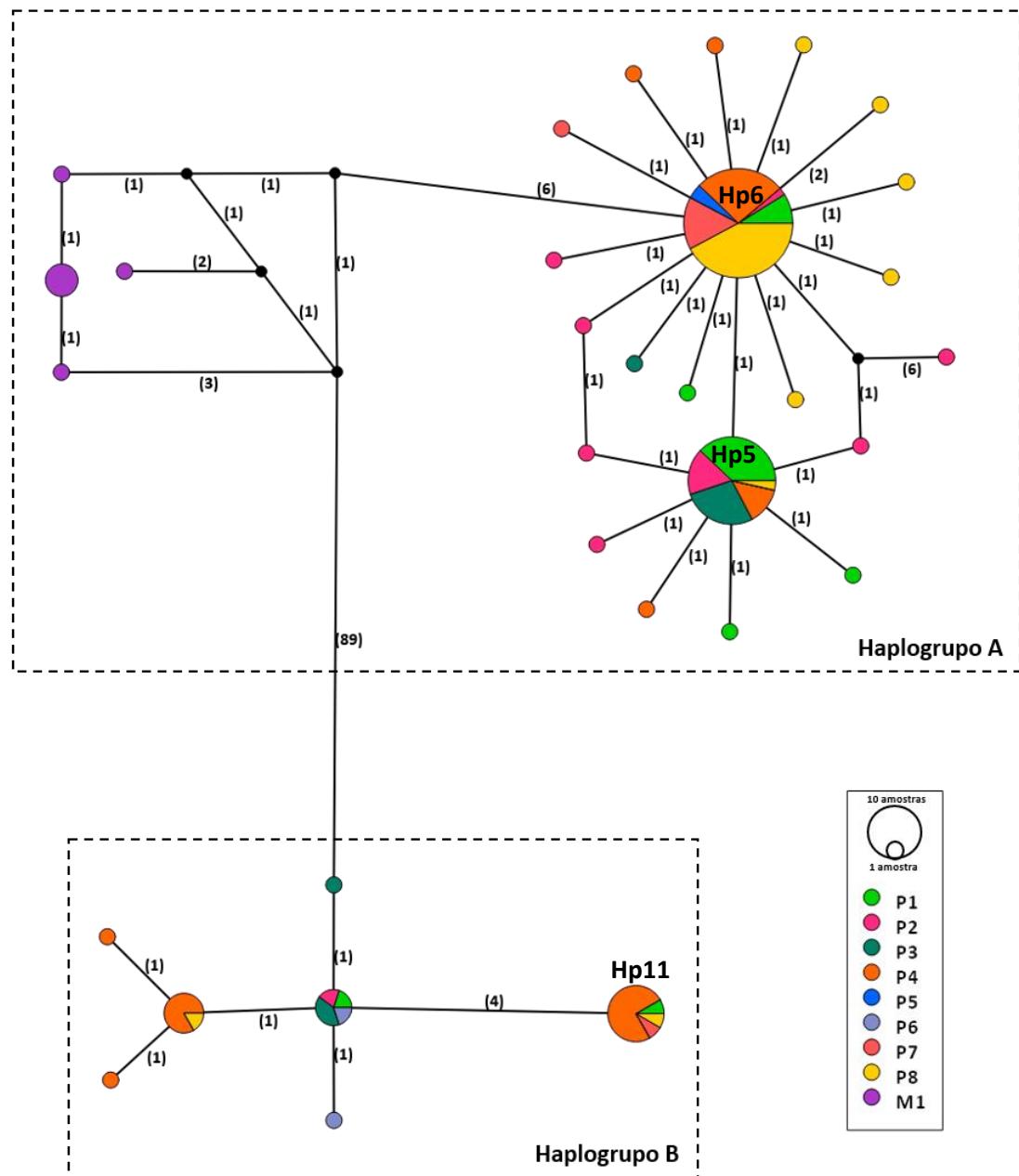
As redes de haplótipos de ambos os genes apresentaram um padrão similar, com a formação de dois grupos de haplótipos, ou Haplogrupos, conectados por um longo ramo. Tais Haplogrupos são constituídos pelos mesmos espécimes dos Clados A e B recuperados na filogenia (ver Figura 5) e, desse modo, foram denominados, respectivamente, Haplogrupos A e B.

Na rede de haplótipos de cytb (Figura 6), o Haplogrupo A foi constituído por 25 haplótipos e o B apenas por sete de 96 e 27 espécimes, respectivamente. O Haplogrupo A foi constituído por haplótipos de Marabá (M1) e de sete das oito localidades de Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8). O haplótipo mais frequente, Hp6, ocorreu em seis das sete localidades de Parauapebas onde foi registrado, representando 35,46% do número de sequências totais e 45% do número de sequências dentro do grupo. Ainda no Haplogrupo A, vários haplótipos recentes (com baixa frequência) estão presentes em torno dos haplótipos mais frequentes, Hp6 e Hp5, formando assim um padrão de estrela. Por sua vez, o Haplogrupo B foi constituído por haplótipos de sete das oito localidades de Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P6, P7, P8), onde o haplótipo mais frequente, Hp11, ocorreu em quatro das sete onde o haplogrupo foi registrado, representando 9,44% do número de sequências totais e 44,44% do número de sequências dentro do grupo.

Na rede de haplótipos de ND4 (Figura 7), os Haplogrupos A e B foram constituídos por 15 e três haplótipos de 96 e 27 espécimes, respectivamente. O Haplogrupo A foi constituído por haplótipos de Marabá (M1) e de sete das oito localidades de Parauapebas (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8) e o Haplogrupo B apenas por haplótipos de Parauapebas. Dentro do Haplogrupo A, o haplótipo mais frequente, Hp5, ocorre em todas as sete localidades de Parauapebas onde o grupo foi registrado, representando 61,41% do número de sequências totais e 78% da amostragem dentro do grupo. Já dentro do Haplogrupo B, o haplótipo mais frequente, Hp9, ocorre em cinco localidades das sete onde o haplogrupo foi registrado, representando 11,02% do número de sequências totais e 51,85% do número de sequências dentro do grupo.

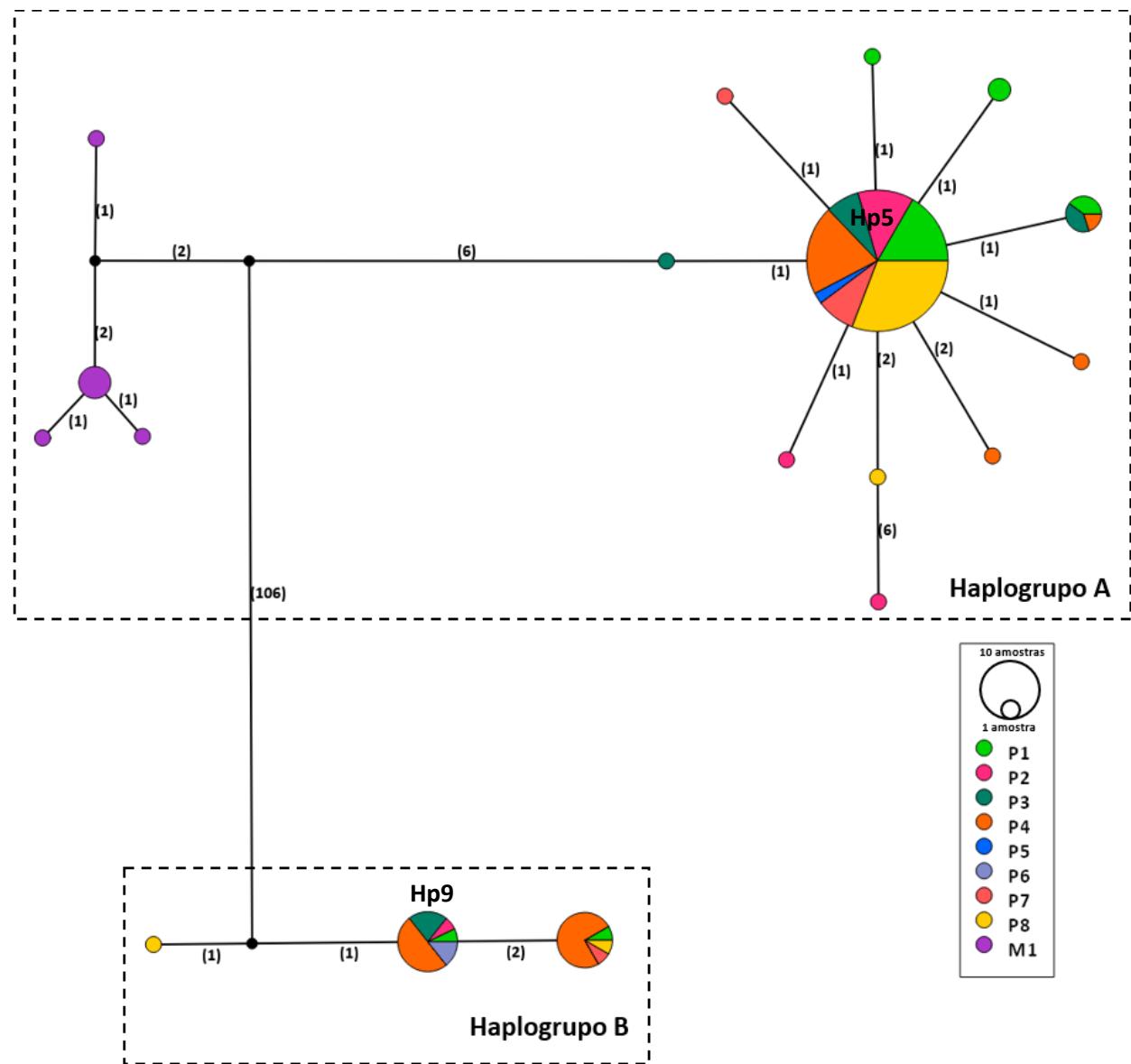
De forma geral, para as redes de ambos os genes, apenas um padrão de associação geográfica foi revelado, para a localidade de Marabá, a qual não apresentou nenhum haplótipo compartilhado com as localidades de Parauapebas. Apesar de nenhum padrão de estruturação geográfica ser observado entre os haplogrupos, os números de passos mutacionais estimados entre eles reforçam a profunda divergência genética. O número de passos mutacionais dentro do Haplogrupo A variou de 1-6 para cytb e ND4 e dentro do Haplogrupo B variou de 1-4 para cytb e de 1-2 para ND4, enquanto entre os dois Haplogrupos o número de passos mutacionais foi estimado em 89 para cytb e 106 para ND4, valor mais de 10 vezes maior que o estimado dentro dos Haplogrupos.

Figura 6 – Rede de haplótipos gerada pelo algoritmo Templeton, Crandall e Sing (TCS) a partir do fragmento do gene mitocondrial citocromo b (cytb) de 123 espécimes de *Microcaecilia taylori* provenientes de oito localidades em Parauapebas (P1-P8) e uma em Marabá (M1), Pará, Brasil. Os números entre parênteses representam o número de passos mutacionais entre cada par de haplótipos. As linhas tracejadas delimitam os Clados A ($n = 96$) e B ($n = 27$) identificados pela inferência bayesiana.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 – Rede de haplótipos gerada pelo algoritmo Templeton, Crandall e Sing (TCS) a partir do fragmento do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4) de 123 espécimes de *Microcaecilia taylori* provenientes de oito localidades em Parauapebas (P1-P8) e uma em Marabá (M1), Pará, Brasil. Os números entre parênteses representam o número de passos mutacionais entre cada par de haplótipos. As linhas tracejadas delimitam os Clados A ($n = 96$) e B ($n = 27$) identificados pela inferência bayesiana.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Análise de variância molecular

Ao testar o cenário de estruturação genética utilizando os dois Clados (A e B) como grupos distintos na AMOVA para os dois genes (cytb e ND4) separadamente, uma forte diferenciação genética entre os Clados foi obtida (Tabela 5). Para ambos os genes, as AMOVAs revelaram que a maior porcentagem da variação genética é atribuída à diferença entre os Clados (97%, $Fct = 0,97$ para cytb; 98%, $Fct = 0,98$ para ND4; $p \leq 0,05$), enquanto uma menor porcentagem da variação genética é atribuída às diferenças entre e dentro das localidades (1,37% e 1,24% para cytb e 1,21% e 0,57% para ND4).

Tabela 5 – Análises de variância molecular (AMOVA) com base em dois fragmentos de gene mitocondriais (cytb e ND4) realizadas para *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil, considerando dois grupos: Clados A ($n = 96$) e B ($n = 27$) seguindo a filogenia disponível na Figura 5. g.l. = Graus de liberdade. Fct = diferença genética entre grupos. Fst = diferença genética entre populações. Fsc = diferença genética dentro das populações dentro dos grupos.

Fontes de variação	g.l.	Soma dos	Componentes	Porcentagem da
		quadrados	de variância	variação
Cytb				
Entre os grupos A e B	1	2058,985	48,22452	97,40
Entre as populações dentro dos grupos	13	75,718	0,67654	1,37
Dentro das populações	112	68,620	0,61268	1,24
Total	126	2203,323	49,51374	
Índice de fixação		$Fct = 0,97396$ ($p = 0,00$)		
		$Fst = 0,98763$ ($p = 0,00$)		
		$Fsc = 0,52477$ ($p = 0,00$)		
ND4				
Entre os grupos A e B	1	2431,288	56,98090	98,23
Entre as populações dentro dos grupos	13	74,340	0,69949	1,21
Dentro das populações	112	36,940	0,32982	0,57
Total	126	2542,567	58,01021	
Índice de fixação		$Fct = 0,98226$ ($p = 0,00$)		
		$Fst = 0,99431$ ($p = 0,00$)		
		$Fsc = 0,67957$ ($p = 0,00$)		

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Abordagem Morfológica

4.2.1 Dimorfismo sexual

Dentre os 67 espécimes de *Microcaecilia taylori* analisados, 24 foram fêmeas, 37 machos e seis espécimes foram jovens. Todos os 16 caracteres morfométricos, referentes a medidas da cabeça e do corpo, e seis merísticos, referentes a contagens de anéis, contemplaram os pressupostos da ANCOVA e do Teste T.

Quanto à presença de dimorfismo sexual em *M. taylori*, os resultados da ANCOVA mostraram que fêmeas e machos não diferem significativamente para nenhum dos caracteres morfométricos aqui analisados (Tabela 6). Igualmente, o Teste T de Student revelou que fêmeas e machos não apresentam diferenças estatisticamente significativas para o comprimento total e para nenhum dos seis caracteres merísticos analisados (Tabela 7).

Tabela 6 – Análises de dimorfismo sexual em 16 caracteres morfométricos de *Microcaecilia taylori* (24 fêmeas e 37 machos) do sudeste do Pará, Brasil. M = médias. DP = desvio padrão (DP). Variação = mínimo-máximo. Resultados da Análise de Covariância (ANCOVA) estão disponíveis na última coluna. Valor de p significativo: $\leq 0,05$.

Caracteres	Fêmeas		Machos		ANCOVA
	M \pm DP	Variação	M \pm DP	Variação	
HW	3,75 \pm 0,39	3,14-4,43	3,95 \pm 0,50	3,05-4,98	F = 0,003; p = 0,95
HL	5,92 \pm 0,58	4,90-6,98	6,15 \pm 0,70	5,07-7,54	F = 0,048; p = 0,82
HH	2,92 \pm 0,31	2,22-3,49	3,07 \pm 0,43	2,45-4,05	F = 0,362; p = 0,54
BW	4,03 \pm 0,62	2,96-5,21	4,34 \pm 0,68	3,04-5,59	F = 0,135; p = 0,71
BH	3,33 \pm 0,55	2,50-4,40	3,34 \pm 0,68	1,93-4,95	F = 0,310; p = 0,58
WNC	4,09 \pm 0,39	3,30-4,68	4,16 \pm 0,58	2,94-5,31	F = 0,201; p = 0,65
WTR	4,10 \pm 0,52	3,33-5,25	4,02 \pm 0,50	3,06-5,21	F = 3,657; p = 0,06
WV	2,72 \pm 0,37	2,15-3,45	2,74 \pm 0,50	1,93-3,87	F = 0,020; p = 0,88
SP	1,05 \pm 0,15	0,61-1,34	1,10 \pm 0,19	0,72-1,45	F = 0,086; p = 0,76
TN	2,03 \pm 0,25	1,57-2,52	2,15 \pm 0,29	1,64-2,83	F = 0,081; p = 0,77
TCM	1,51 \pm 0,31	1,00-2,42	1,60 \pm 0,26	1,16-2,18	F = 0,125; p = 0,72
TT	3,14 \pm 0,24	2,82-3,75	3,30 \pm 0,39	2,49-4,31	F = 1,414; p = 0,23
NN	1,43 \pm 0,14	1,20-1,74	1,46 \pm 0,19	1,05-1,85	F = 2,217; p = 0,14
HWN	1,86 \pm 0,22	1,44-2,40	2,02 \pm 0,33	1,45-3,00	F = 1,555; p = 0,21
NTS	0,85 \pm 0,16	0,67-1,34	0,84 \pm 0,19	0,53-1,23	F = 0,374; p = 0,54
NCM	3,64 \pm 0,38	2,96-4,54	3,93 \pm 0,54	2,79-4,77	F = 0,426; p = 0,51

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 – Análises de dimorfismo sexual em seis caracteres merísticos e no caráter comprimento total (TL) de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil. Na tabela são listadas as médias (M), desvio padrão (DP) e variação (mín-máx). Resultados do teste T de Student estão disponíveis na última coluna. Valor de p significativo: $\leq 0,05$.

Caracteres	Fêmeas (n=24)		Machos (n=37)		Teste Student	T de Student
	M ± DP	Variação	M ± DP	Variação		
TL	197,75 ± 21,72	146-235	194,40 ± 27,45	146-259	t = 0,50284; df = 59; p = 0,61	
AP	123,04 ± 4,16	116-132	122,89 ± 4,89	107-132	t = 0,12353; df = 59; p = 0,90	
SG	5,87 ± 8,58	0-21	6,16 ± 8,83	0-21	t = -0,12532; df = 59; p = 0,90	
CSG	1,45 ± 2,37	0-8	1,64 ± 2,42	0-8	t = -0,30143; df = 59; p = 0,76	
CPA	120,75 ± 4,33	113-130	120,67 ± 4,79	105-129	t = 0,061349; df = 59; p = 0,95	
AIV	1,16 ± 0,63	0-3	1,16 ± 0,55	0-2	t = 0,029256; df = 59; p = 0,97	
APV	0,12 ± 0,33	0-1	0,05 ± 0,22	0-1	t = 0,97831; df = 59; p = 0,33	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

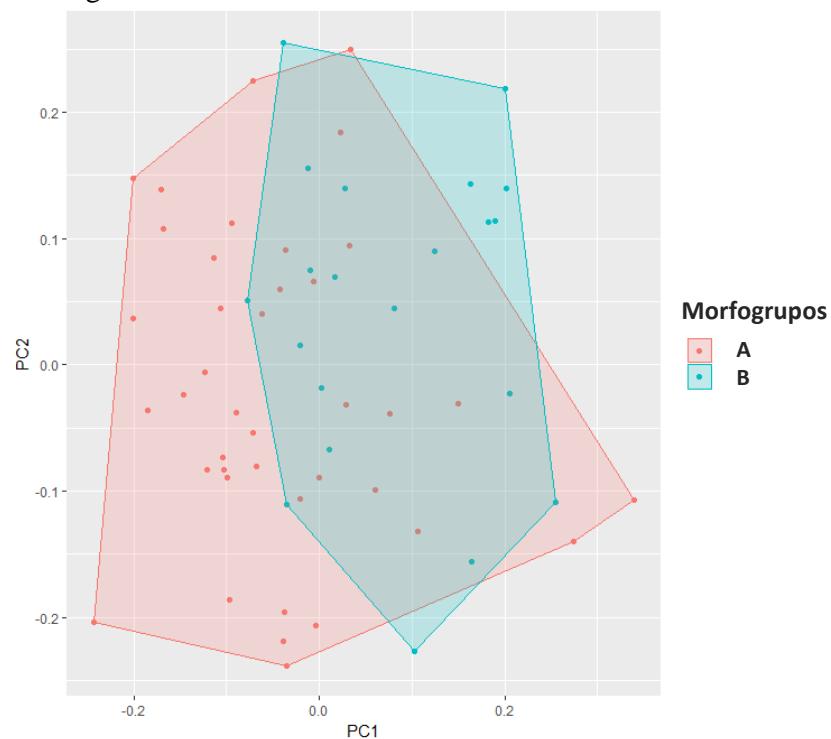
As análises multivariadas dos dados morfológicos foram realizadas através de uma PCA para dados morfométricos e outra para dados merísticos (ver Tabela 8 e 9 para resultados exploratórios). Para os dados morfométricos, os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicaram cumulativamente 44,97% da variância total, sendo PC1 responsável por 32,54% e PC2 por 12,44%. Na inspeção do gráfico (Figura 8) é possível visualizar nítida sobreposição entre os possíveis Morfogrupos A e B, não apresentando nenhum padrão de ordenação dentro do espaço morfométrico. Essa alta sobreposição sugere a presença de grande similaridade nos caracteres morfométricos. Congruentemente, as análises estatísticas comparando os caracteres morfométricos dos Morfogrupos não indicaram diferenças significativas para nenhum dos caracteres analisados (valor de $p>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 8 – *Loadings* gerados para os componentes principais (PC1 e PC2) na análise de componentes principais (PCA) dos resíduos de 16 caracteres morfométricos aferidos de 61 espécimes de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil.

Caracteres morfométricos	PC1	PC2
Largura da cabeça (HW)	-0,3534	0,1180
Comprimento da cabeça (HL)	-0,2717	0,0457
Altura da cabeça (HH)	-0,2607	0,0728
Largura no meio do corpo (BW)	-0,2875	-0,0655
Altura no meio do corpo (BH)	-0,1506	0,1438
Largura do primeiro colar nucal (WNC)	-0,2378	0,2110
Largura do corpo no quinto anel anterior à cloaca (WTR)	-0,1979	-0,0718
Largura do corpo na região da cloaca (WV)	-0,1935	-0,3579
Distância entre ponta do focinho e margem da mandíbula (SP)	-0,1185	0,0744
Distância entre tentáculo e narina (TN)	-0,2807	0,0989
Distância do tentáculo ao canto da mandíbula (TCM)	-0,1543	0,4410
Distância entre os tentáculos (TT)	-0,3703	-0,1018
Distância entre as narinas (NN)	-0,2296	-0,3115
Largura da cabeça na região das narinas (HWN)	-0,2726	-0,3210
Distância da narina à ponta do focinho (NTS)	-0,1101	-0,4982
Distância da narina ao canto da mandíbula (NCM)	-0,3187	0,3273

Fonte: Elaborada pela autora.

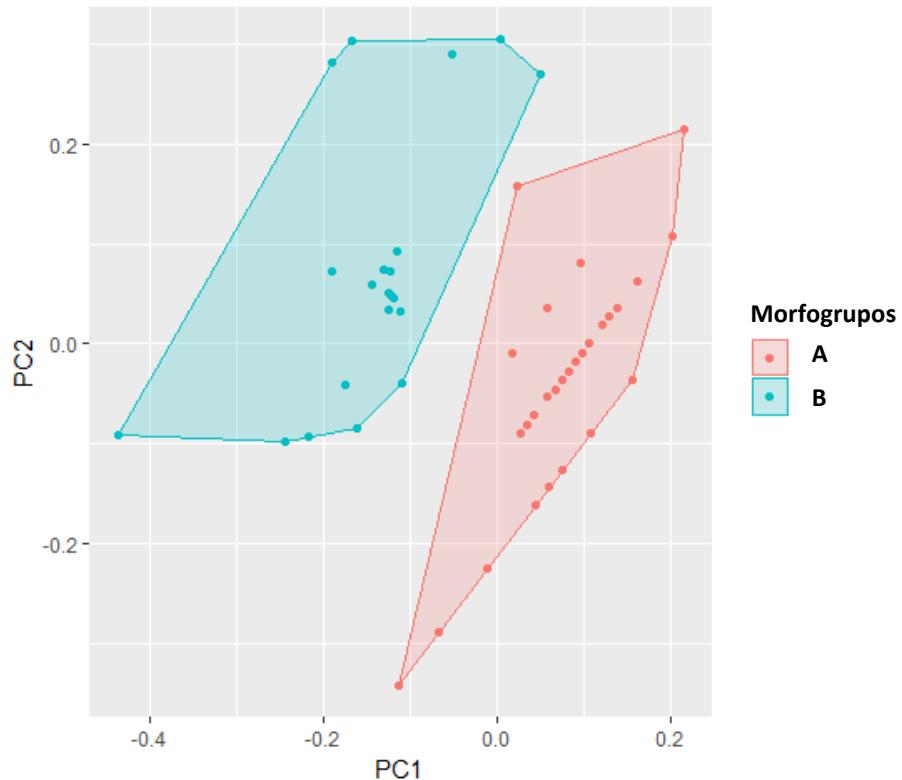
Figura 8 – Distribuição dos 61 espécimes adultos de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil, no espaço morfométricos de acordo com os componentes principais (PC1 explicando 32,54% e PC2 12,44% da variância total) na Análise de Componentes Principais (PCA), realizada os Morfogrupos A ($n = 96$) e B ($n = 27$) identificados *a priori* baseados nos Clados A e B da filogenia disponível na Figura 5.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para os dados merísticos, os dois primeiros componentes principais explicaram cumulativamente 68,50% da variância observada, sendo PC1 responsável por explicar 50% e PC2 por 18,50%. Na inspeção do gráfico gerado pela análise (Figura 9), é clara a presença de um padrão de ordenação dos espécimes no espaço merístico, onde podemos observar a distinção dos Morfogrupos A e B, correspondentes aos Clados ou Haplogrupos A e B da filogenia/ rede de haplótipos. Os caracteres merísticos que mais contribuíram para PC1 foram: anéis primários, anéis primários completos, anéis secundários e anéis secundários completos (Tabela 8). Congruentemente, as análises estatísticas revelaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os Morfogrupos para os caracteres que mais contribuíram para PC1 e para “anéis após a cloaca”, APV, onde: o Morfogrupo A apresentou relativamente maior número de anéis primários e de anéis primários completos; ausência dos caracteres anéis secundários e anéis secundários completos; e, relativamente, um menor números de anéis após a cloaca (Tabela 9).. O intervalo de variação dos anéis primários e anéis primários completos apresentam ampla sobreposição entre os Morfogrupos A e B, com o primeiro apresentando entre 114-134 e o segundo entre 107-131. Entretanto, para os caracteres anéis secundários e secundários completos, os Morfogrupos são facilmente distinguíveis: no Morfogrupo A ambos os caracteres estão ausentes, enquanto no Morfogrupo B esses estão presentes em um intervalo de 10-21 anéis secundários e 1-8 anéis secundários completos (Tabela 9).

Figura 9 – Distribuição dos 61 espécimes adultos de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil, no espaço merístico de acordo com os componentes principais (PC1 explicando 50% e PC2 18,5% da variância total) na Análise de Componentes Principais (PCA), realizada com os possíveis Morfogrupos A ($n = 96$) e B ($n = 27$) identificados *a priori* baseados nos Clados A e B da filogenia disponível na Figura 5.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 – *Loadings* gerados para os componentes principais (PC1 e PC2) na análise de componentes principais (PCA) de seis caracteres merísticos de 61 espécimes adultos de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil.

Caracteres merísticos	PC1	PC2
Anéis primários (AP)	0,4942	0,3135
Anéis secundários (SG)	-0,4447	0,4383
Anéis secundários completos (CSG)	-0,4878	0,2929
Anéis primários completos (CPA)	0,4889	0,3667
Anéis interrompidos pela cloaca (AIV)	-0,1750	-0,5588
Anéis posteriores à cloaca (APV)	-0,2241	0,4205

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10 – Teste T, ANCOVA e dados morfométricos e merísticos para os Morfogrupos A e B de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil. Na tabela são listadas as médias (M), desvio padrão (DP) e variação (mín-máx) em milímetros. Valor de p significativo quando $p \leq 0,05$.

Caracteres	Morfogrupo A (n=40)		Morfogrupo B (n=21)		Teste T e ANCOVA
	M ± DP	Variação	M ± DP	Variação	
AP	124,52 ± 3,59	114-132	119,95 ± 4,85	107-131	t=4,1743; df=59; p=9,977e-05
SG	0 ± 0	0-0	17,19 ± 2,74	10-21	t=-39,844; df=59; p<2,2e-16
CSG	0 ± 0	0-0	4,57 ± 1,66	1-8	t=-17,547; df=59; p<2,2e-16
CPA	122,17 ± 3,57	111-130	117,90 ± 5,04	105-129	t=3,8307; df=59; p =0,0003
AIV	1,12 ± 0,56	0-2	1,23 ± 0,62	0-3	t=-0,7175; df=59; p=0,4759
APV	0,02 ± 0,15	0-1	0,19 ± 0,40	0-1	t=-2,2979; df=59; p=0,0251
TL	195 ± 24,79	146-259	196,71 ± 26,59	146-235	t=-0,2210; df=59; p=0,8258
HW	3,75 ± 0,43	3,05-4,95	4,09 ± 0,47	3,14-4,98	F=0,476; p=0,493
HL	5,87 ± 0,57	4,90-7,28	6,43 ± 0,68	5,38-7,54	F=0,003; p=0,957
HH	2,98 ± 0,41	2,22-4,05	3,07 ± 0,35	2,51-3,68	F=1,242; p=0,270
BW	4,05 ± 0,64	2,96-5,35	4,55 ± 0,62	3,51-5,59	F=0,041; p=0,839
BH	3,20 ± 0,47	2,43-4,43	3,58 ± 0,80	1,93-4,95	F=1,648; p=0,204
WNC	4,04 ± 0,51	2,94 -5,25	4,30 ± 0,50	3,30-5,31	F=0,671; p=0,416
WTR	3,93 ± 0,48	3,06-5,21	4,29 ± 0,46	3,33-5,25	F=0,208; p=0,650
WV	2,64 ± 0,45	2,01-3,87	2,91 ± 0,40	1,93-3,52	F=2,025; p=0,160
SP	1,08 ± 0,17	0,61-1,45	1,08 ± 0,19	0,78-1,45	F=0,841; p=0,362
TN	2,04 ± 0,26	1,57-2,83	2,21 ± 0,28	1,71-2,80	F=0,012; p=0,914
TCM	1,51 ± 0,28	1,00-2,42	1,67 ± 0,27	1,15-2,18	F=1,866; p=0,177
TT	3,19 ± 0,35	2,49-4,31	3,34 ± 0,32	2,68-3,88	F=0,290; p=0,592
NN	1,44 ± 0,19	1,05-1,85	1,46 ± 0,14	1,25-1,74	F=1,803; p=0,185
HWN	1,96 ± 0,32	1,44-3,00	1,96 ± 0,28	1,52 2,40	F=0,047; p=0,829
NTS	0,86 ± 0,17	0,53-1,23	0,82 ± 0,21	0,55 1,34	F=0,019; p=0,891
NCM	3,71 ± 0,47	2,79-4,77	4,02 ± 0,50	2,96-4,73	F=0,311; p=0,579

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. Descrição de uma nova espécie de *Microcaecilia*

Microcaecilia sp. nov.

(Figura 10)

Holótipo: MUFAL 10234 (Figura 10), fêmea com comprimento total de 235 mm, 121 anéis primários e 17 anéis secundários, coletado na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás ($6^{\circ}3'29,191''S$, $50^{\circ}11'50,381''O$), município de Parauapebas, estado do Pará, Brasil, em 19-V-2011. Coletado por Tamí Mott entre galhadas durante processo de supressão vegetal.

Parátipos: Todos os 22 parátipos foram coletados em cinco pontos distintos na FLONA de Carajás pela equipe do Resgate de Fauna da FOCO Consultoria Ambiental durante o processo de supressão vegetal, ver Apêndice G.

Figura 10 – Holótipo de *Microcaecilia* sp. nov (MUFAL 10234). Escala = 10 milímetros.



Fonte: Elaborada pela autora.

Diagnose: A nova espécie é uma *Microcaecilia*, pois possui olhos cobertos por estrutura óssea, abertura do tentáculo mais próxima aos olhos do que à narina e ausência de diastema entre os dentes vomerino e palatino. *Microcaecilia* sp. nov. tem uma variação de anéis primários de 107-131, de anéis secundários de 10-21, série de dentes pré-maxilar-maxilar se estendendo além da margem posterior das coanas.

Para fins comparativos de *Microcaecilia* sp nov. com as demais espécies de *Microcaecilia*, os caracteres referentes às espécies atualmente descritas foram colocados entre parêntesis a seguir. Por apresentar menor número de anéis secundários, *Microcaecilia* sp. nov. difere de *M. rochai* (42-51), *M. iyobi* Wilkinson e Kok, 2010 (43), *M. grandis* Wilkinson, Nussbaum e Hoogmoed, 2009 (42), *M. savagei* Donnelly e Wake, 2013 (86), *M. albiceps* (Boulenger, 1882) (48-62), *M. supernumeraria* Taylor, 1969 (93), *M. trombeta* Maciel e Hoogmoed, 2011 (91), *M. unicolor* (Duméril, 1863) (46-74), *M. nicefori* (Barbour, 1924) (98-111) e *M. pricei* (Dunn, 1944) (26-28). Por apresentar um número maior de anéis secundários, *Microcaecilia* sp. nov difere de *M. dermatophaga* Wilkinson, Sherratt, Starace e Gower, 2013 (6-9), *M. iwokramae* (Wake e Donnelly, 2010) (9) e *M. taylori* (0). *Microcaecilia* sp. nov. difere de *M. butantan* Wilkinson, Antoniazzi e Jared, 2015 por apresentar um menor número de anéis primários (143-157). Difere de *M. marvaleewakeae* Maciel e Hoogmoed, 2013 por apresentar um menor número de anéis secundários (21-31), pela presença um sulco no primeiro colar nucal muito menor do que o presente no segundo colar (*M. marvaleewakeae* apresenta sulco grande e de mesmo comprimento no dorso dos dois colares nucais) e pela presença de um sulco ventral na metade superior do primeiro colar nucal (ausente em *M. marvaleewakeae*). Difere de *M. rabei* (Roze e Solano, 1963) pelo número de anéis primários (105-116), pelo número de anéis secundários (21-34), pela presença de um sulco no primeiro colar (ausente em *M. rabei*) e por seu segundo colar nucal ser parcialmente incompleto ventralmente (completo ventralmente em *M. rabei*). Para mais informações quanto as comparações ver Tabela 11.

Tabela 11 – Medida de comprimento total e contagem de caracteres merísticos para espécies de *Microcaecilia* deste estudo e retiradas de artigos publicados. Dados de *M. albiceps* foram retirados de Taylor (1968); *M. butantan* de Wilkinson et al. (2015); *M. dermatophaga* de Wilkinson et al. (2013); *M. grandis* de Wilkinson et al. (2009); *M. iyob* de Wilkinson e Kok (2010); *M. iwokramae* de Wake e Donelly (2009); *M. marvaleewakeae* de Maciel e Hoogmoed (2013); *M. nicefori* e *M. pricei* de Taylor (1968); *M. rabei* de Taylor (1968) e Nussbaum e Hoogmoed (1979); *M. rochai* de Maciel e Hoogmoed (2011a); *M. savagei* de Donelly e Wake (2013); *M. supernumeraria* de Taylor (1969); *M. taylori* de Nussbaum e Hoogmoed (1979); *M. trombetas* de Maciel e Hoogmoed (2011b); *M. unicolor* de Taylor (1968), Nussbaum e Hoogmoed (1979) e Wilkinson et al. (2009). Valores entre parênteses para *M. taylori* foram obtidos neste estudo.

Espécie de Microcaecilia	TL	AP	SG	CSG	DT	PMT	PPT
<i>M. sp. nov.</i>	146-235	107-131	10-21	1-8	13-23	22-35	22-36
<i>M. albiceps</i>	168-227	115-123	48-62	0-3	16-26	15-19	25-35
<i>M. butantan</i>	159-208	143-157	14-26	0-3	13-19	18-22	24
<i>M. dermatophaga</i>	66-164	107-113	6-9	0-3	18-22	23-31	16-32
<i>M. grandis</i>	318-324	121	41-42	6	20-21	29	28-42
<i>M. iyobi</i>	172	97	43	10	26	35	36
<i>M. iwokramae</i>	111	102	9	6	15	21	25
<i>M. marvaleewakeae</i>	135-213	124-138	21-33	4-8	14-20	18-26	18-29
<i>M. nicefori</i>	198-263	130-166	95-104	51-68	18-22	11-14	18-27
<i>M. pricei</i>	191	106-109	26-28	6	20	21	23
<i>M. rabei</i>	94-187	105-116	21-34	4-9	13-26	17-27	22-31
<i>M. rochai</i>	113-127	122-129	42-51	6-11	12-22	16-31	21-22
<i>M. savagei</i>	153	107	86	18	23	15	26
<i>M. supernumeraria</i>	258	143	93	-	22	15	28
<i>M. taylori</i>	128-172 (107-259)	115-118 (114-134)	0 (0)	0 (0)	17-20 (15-27)	25-30 (20-34)	23-30 (18-34)
<i>M. trombeta</i>	218	116	91	69	15	17	21
<i>M. unicolor</i>	102-240	97-118	46-74	8-64	18-26	15-35	22-37

Fonte: Elaborada pela autora.

Descrição do holótipo: Corpo delgado, comprimento total 52 vezes maior que a largura do corpo. Largura da cabeça da mesma largura que o corpo. Corpo ligeiramente achatado, pouco mais largo que alto (altura e largura no meio do corpo = 4,33 e 4,45 mm); largura relativamente uniforme, estreitando substancialmente apenas na porção posterior do corpo (largura do corpo no nível da cloaca 2,65 mm). Apresenta quilha vertical terminal. Em vista dorsal, a cabeça apresenta uma forma de U com um leve estreitamento próximo à ponta do focinho (largura da cabeça e largura na altura das narinas = 4,43 e 2,01 mm). Em vista lateral, o dorso da cabeça ligeiramente convexo; margens da mandíbula superior (lábio) côncava com leve reentrância na altura da abertura do tentáculo; margens da mandíbula inferior reta. Em vista ventral, focinho projeta além da boca (1,34 mm de distância entre a margem da boca e a ponta do focinho). Olhos não visíveis. Abertura do tentáculo próxima da região onde estaria os olhos, visíveis dorsal e lateralmente. Narinas pequenas e circulares, visíveis dorsal e lateralmente.

Colares nucais dorsal e ventralmente definidos, sendo o segundo colar nucal parcialmente fusionado com o primeiro anel primário ventralmente; primeiro colar com comprimento menor que o segundo. Primeiro sulco nucal dobra-se ligeiramente para dentro do primeiro colar nucal na região dorsolateral. Segundo sulco nucal apresenta uma ligeira curva no meio do corpo em direção ao primeiro colar nucal. Terceiro sulco nucal não apresenta curvas. Um sulco transversal é visível dorsalmente em cada colar nucal, sendo o do primeiro colar menor (0,31 mm) e menos distinto do que o presente no segundo (0,58 mm); discreto sulco transversal visível ventralmente na metade superior do primeiro colar (0,54 mm).

Após os colares, estão presentes 121 anéis primários, sendo 119 completos e 2 interrompidos pela cloaca. Um sulco anular posterior à cloaca. Dezessete anéis secundários, sendo cinco completos e 12 incompletos ventralmente ou ventrolateralmente. Quinze dentículos anais. Série de dentes pré-maxilar-maxilar com 29 dentes monocúspides que se estendem posteriormente além da margem posterior das coanas; dentes anteriores ligeiramente maiores do que os posteriores. Série de dentes pré-vomeropalatino com 26 dentes bicúspides, sendo essa forma mais definida nos dentes posteriores. Série de dentes dentários com 18 dentes monocúspides, onde os dentes mais anteriores são maiores que os posteriores.

Coloração em preservativo do holótipo: caramelo escuro na região dorsal do corpo. No dorso da cabeça, manchas esbranquiçadas ou creme se estendem lateralmente pelas narinas e margem da boca até a região dos tentáculos e de onde estariam os olhos. Ventralmente, apresenta a coloração levemente mais clara; mancha creme se estende desde a margem anterior da boca, envolvendo toda a glote, até o segundo colar nucal, onde forma um “V”. A porção posterior do corpo apresenta tonalidade mais escura que a da porção anterior, tanto dorsal quanto ventralmente; na região da cloaca, mancha creme é observada se estendendo até cerca de dois anéis primários anteriores à mesma.

Coloração em vida: A espécie apresenta coloração rosa por todo o corpo, sendo levemente mais esbranquiçada ventralmente.

Variação: Alguns espécimes apresentaram a quilha terminal pouco distinta, mas presente. Quanto a coloração, as manchas creme no dorso da cabeça não apresentaram um padrão claro, alguns espécimes a apresentaram cobrindo quase toda a cabeça, enquanto em outras, essas se restringiram à região dorsolateral, sendo, portanto, uma expansão da coloração da área tentacular para o dorso da cabeça. Para mais informações sobre variação, ver Tabela 12.

Distribuição: Apenas conhecida da localidade tipo na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, município de Parauapebas, estado do Pará, Brasil.

Tabela 12 – Dados morfométricos e merísticos do holótipo e parátipos de *Microcaecilia* sp. nov. da Floresta Nacional dos Carajás, Pará, Brasil. M = média. DP = desvio padrão. Variação = mínimo e máximo. Todas as médias da série de parátipos foi baseada em 22 espécimes. Sete fêmeas e treze machos.

Caracteres	Holótipo MUFAL 10234	Parátipos	
		Fêmeas	Machos
		M ± DP (Variação)	M ± DP (Variação)
TL	235	201,14 ± 27,76 (146-230)	191,38 ± 25,08 (153-229)
HW	4,43	3,99 ± 0,42 (3,14-4,4)	4,13 ± 0,52 (3,41-4,98)
HL	6,81	6,39 ± 0,52 (5,38-6,98)	6,42 ± 0,79 (5,44-7,54)
HH	3,34	3,09 ± 0,29 (2,61-3,49)	3,04 ± 0,39 (2,51-3,68)
BW	4,45	4,51 ± 0,71 (3,51-5,21)	4,57 ± 0,62 (3,58-5,59)
BH	4,33	3,36 ± 0,74 (2,55-4,4)	1,93-4,95 (3,64 ± 0,84)
WNC	4,66	4,14 ± 0,46 (3,3-4,68)	4,37 ± 0,52 (3,59-5,31)
WTR	4,38	4,46 ± 0,63 (3,3-5,25)	4,19 ± 0,36 (3,53-4,73)
WV	2,65	3,05 ± 0,40 (2,46-3,45)	2,86 ± 0,41 (1,93-3,52)
SP	1,34	1,05 ± 0,20 (0,78-1,33)	1,09 ± 0,19 (0,85-1,45)
TN	2,45	2,18 ± 0,25 (1,71-2,52)	2,21 ± 0,31 (1,75-2,8)
TCM	1,55	1,59 ± 0,30 (1,15-1,94)	1,73 ± 0,26 (1,24-2,18)
TMM	0,27	0,41 ± 0,03 (0,37-0,46)	0,39 ± 0,09 (0,27-0,55)
TT	3,50	3,31 ± 0,28 (2,84-3,75)	3,34 ± 0,37 (2,68-3,88)
NN	1,47	1,5 ± 0,17 (1,28-1,74)	1,44 ± 0,14 (1,25-1,6)
HWN	2,01	1,99 ± 0,28 (1,61-2,4)	1,95 ± 0,30 (1,52-2,38)
NTS	1,04	0,91 ± 0,24 (0,67-1,34)	0,76 ± 0,18 (0,551,12)

NMM	0,99	$1,05 \pm 0,09$ (0,95-1,23)	$1,08 \pm 0,09$ (0,95-1,21)
NCM	4,13	$3,84 \pm 0,49$ (2,96-4,54)	$4,12 \pm 0,51$ (3,34-4,73)
AP	121	$119,42 \pm 2,93$ (116-125)	$120,15 \pm 5,88$ (107-131)
SG	17	$17,57 \pm 2,93$ (14-21)	$17,00 \pm 3,13$ (10-21)
CSG	5	$4,28 \pm 2,13$ (1-8)	$4,69 \pm 1,49$ (2-8)
CPA	119	$117 \pm 3,31$ (113-123)	$118,30 \pm 6,01$ (105-129)
API	2	$2,42 \pm 0,78$ (1-3)	$1,84 \pm 0,89$ (1-4)
AIV	1	$1,28 \pm 0,95$ (1-3)	$1,23 \pm 0,43$ (1-2)
APV	-	$0,42 \pm 0,53$ (0-1)	$0,07 \pm 0,27$ (0-1)
DT	18	$18,28 \pm 1,25$ (16-20)	$18,07 \pm 3,09$ (13-23)
PMT	29	$29,14 \pm 2,54$ (27-34)	$26,62 \pm 3,75$ (22-35)
PPT	26	$30 \pm 3,55$ (27-36)	$27,53 \pm 3,35$ (22-35)

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 Taxonomia integrativa revela a diversidade de *Microcaecilia taylori* *lato sensu*

As abordagens molecular e morfológica revelaram a presença de duas espécies distintas dentro de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil. Na abordagem molecular, a filogenia e as redes de haplótipos recuperaram dois clados ou haplogrupos (A e B) dentro de *M. taylori* (Figuras 5-7) com alta estruturação genética (Tabela 4) e alta divergência genética (17,0% para cytb e 19,8% para ND4). Tais divergências genéticas apresentaram magnitude similar àquelas observadas entre seus congêneres representantes de espécies nominais atualmente válidas (Tabelas 4) e às já estimadas entre espécies congêneres e/ou candidatos à nova espécie de vários grupos taxonômicos (10-11% e 10-20% para cytb e ND4, respectivamente), como salamandras (Parra-Olea et al., 2005), anfisbenídeos (Mulvaney et al., 2005; Vaconcelos et al., 2006; Albert et al., 2007; Sampaio et al., 2015) e serpentes (Mezzasalma et al., 2015). Desse modo, tais resultados moleculares sugerem a presença de ao menos duas espécies distintas dentro de *M. taylori*.

Na abordagem morfológica, os clados A e B mostraram-se similares morfometricamente (Figura 8). Entretanto, em congruência com a abordagem molecular, foram identificados dois Morfogrupos (A e B) sem sobreposição dentro do espaço merístico, sugerindo, assim, a presença de histórias evolutivas independentes dos caracteres merísticos dentro da amostragem de *M. taylori* (Figura 9). Tais Morfogrupos foram distintos pelos caracteres anéis secundários (SG) e anéis secundários completos (SCG), onde: o Morfogrupo A não apresentou anéis secundários e, consequentemente, não apresentou anéis secundários completos; enquanto, o Morfogrupo B apresentou uma variação de 10-21 anéis secundários e 1-8 anéis secundários completos. Em geral, as espécies do gênero *Microcaecilia* são diagnosticáveis principalmente com base no número de anéis primários e secundários, juntamente com a coloração do corpo, sulcos transversais nos colares nucais e alguns outros poucos caracteres dentários (Wilkinson et al., 2011; Wilkinson et al., 2013a,b). Entretanto, o rápido e crescente aumento no número de espécies alocadas no gênero somado a esse limitado conjunto de caracteres taxonômicos diagnósticos das espécies, vem começando a mostrar o quanto problemática essa taxonomia está se tornando. Aqui, apesar dos Morfogrupos se distinguirem apenas por um caráter (anéis secundários), a ausência desse nos espécimes do Clado A comparada com a variação do mesmo caráter em espécimes do Clado B esta diferença é suficiente para não ser considerada uma variação trivial. Desse modo, a congruência entre as duas linhas de evidências independentes (molecular e morfologia) sugere que os dois Clados ou Morfogrupos aqui recuperados tratam-

se, na verdade, de espécies distintas, onde: por não serem encontrados caracteres que distingam os espécimes do Clado A dos espécimes de *M. taylori* da localidade-tipo, no Suriname, o Clado A mantém-se com o nome *M. taylori*; e, por se distinguir molecular e morfologicamente de A, o Clado B deve ser tratado como uma espécie distinta (*M. sp. nov.*).

A hipótese proposta por Maciel e Hoogmoed (2011) de que os espécimes do Pará (Parauapebas, Caxiuanã, Tucuruí e Belo Monte) e os espécimes da localidade-tipo do Suriname são coespecíficos foi recentemente questionada por alguns pesquisadores que ressaltaram duas problemáticas causadas pela inclusão desses espécimes em uma única unidade taxonômica (Wilkinson et al., 2013b). A primeira seria a alteração no número de anéis secundários, o qual foi modificado de ausente para uma alta variação não observada em outras espécies de *Microcaecilia* (0-21); e a segunda seria ampliação de cerca de 600 km na distribuição da espécie, tornando-a atípicamente grande e disjunta. Com a descrição do Clado B como uma nova espécie, como aqui sugerido, a problemática quanto ao caráter anéis secundários se resolve: *M. taylori* volta a ser a única espécie de *Microcaecilia* que não apresenta anéis secundários e o Clado B (*M. sp. nov.*) apresenta a variação de 10-21 anéis secundários. Entretanto, a segunda problemática, quanto a distribuição ampla e disjunta, ainda permanece e uma revisão taxonômica de *M. taylori* incluindo representantes ao longo de toda a distribuição da espécie ainda se faz necessária.

Embora parte da evidência que sustenta a existência de uma nova espécie provenha do uso de dados moleculares, a presença de um caráter morfológico diagnóstico para a nova espécie reforça que esses Clados não eram crípticos (morfologicamente homogêneos), mas sim o resultado do conhecimento incipiente sobre a variação intraespecífica de *M. taylori*, descrita com base apenas em três espécimes. O conhecimento limitado sobre as variações intraespecíficas é comum em *Microcaecilia*, onde 12 das 16 espécies são conhecidas apenas de sua localidade-tipo (estimado através dos dados disponíveis em Frost, 2017), e em outras espécies de cecílias já descritas (por exemplo, Kotharambath et al., 2015). Essa primeira problemática somada ao limitado conjunto de caracteres utilizados na taxonomia vem sendo apontados como os principais causadores de problemas na taxonomia do grupo (Kotharambath et al., 2015; Wilkinson et al., 2015) e, devido a isso, recentemente, inúmeros pesquisadores vêm sugerindo o uso de dados moleculares para uma melhor compreensão da diversidade existente de cecílias e até mesmo para auxiliar na descoberta de possíveis novos caracteres taxonomicamente informativos (Wilkinson et al., 2013b; Wilkinson et al., 2015). Com base nisso, conclui-se que *M. taylori* não é a exceção, mas sim, um caso provavelmente comum dentro de um gênero que apresenta uma taxonomia reconhecidamente problemática.

5.2 Sobre a simpatria entre *Microcaecilia taylori* e *Microcaecilia* sp. nov.

Uma peculiaridade marcante revelada na distribuição da diversidade de *M. taylori lato sensu* foi a ampla sobreposição geográfica, ou simpatria, entre os Clados A e B (ou, aqui referidos como *M. taylori* e *Microcaecilia* sp. nov., respectivamente). *Microcaecilia taylori* ocorre em sete das oito localidades de Parauapebas e em Marabá, enquanto *Microcaecilia* sp. nov. ocorre em sete localidades de Parauapebas. A existência de espécies irmãs ocorrendo em simpatria geralmente pode ser explicada por dois possíveis cenários: especiação simpática ou contato secundário precedido de especiação alopátrica.

No século XX, era praticamente consenso universal que a especiação em geral se dava por alopatria (Jordan, 1905; Kellogg, 1907; Mayr, 1942, 1963). Entretanto, no final do mesmo período, Schliewen et al. (1994) apresentaram evidências convincentes de especiação simpática por alguns peixes ciclídeos africanos e, desde então, exemplos adicionais vem corroborando a presença de especiação sem isolamento geográfico e revelando que a especiação simpática pode ser mais comum do que se pensava no século passado (por exemplo, Dieckmann e Doebeli, 1999; Kondrashov, 1999; Sorenson et al., 2003; Bolnick e Fitzpatrick, 2007; Papadopoulos et al., 2011). De fato, a especiação simpática vem sendo bem estudada em uma espécie fossorial de roedor (*Spalax galili*), onde pesquisadores vêm sugerindo uma relação entre linhagens distintas e diferentes tipos de solo (Polyakov et al., 2004; Hadid et al., 2013; Li et al., 2015; Skliba et al., 2015). Entretanto, para a amostragem de *M. taylori* e *Microcaecilia* sp. nov. utilizada aqui, não se tem nenhum dado ecológico que poderia ser utilizado para avaliar se há descontinuidade ambiental entre as distribuições das espécies. Embora alguns estudos apontem especiação simpática apenas com base em dados filogenéticos, dada a labilidade evolutiva da distribuição geográfica, o fato de *Microcaecilia* sp. nov. e *M. taylori* terem sido recuperada como espécies irmãs aqui não refuta fortemente o cenário alternativo de que as espécies especiaram em alopatria e subsequentemente expandiram suas distribuições para entrar em simpatria (Losos e Glor, 2003).

Nesse segundo cenário possível, poderia ser considerada a ocorrência de um gargalo na linhagem de *M. taylori* seguida de uma expansão populacional e dispersão nas áreas geográficas ocupadas por *Microcaecilia* sp. nov. Essa expansão populacional proposta para a linhagem de *M. taylori* pode ser sustentada pelos testes de neutralidade (Tabela 3) e pela estrutura de estrela observada na rede de haplótipos (Figuras 4 e 5), estrutura indicativa de tal fenômeno (Forster et al., 2001). O mesmo cenário de contato secundário já foi postulado anteriormente para répteis e anfíbios fossoriais, como uma espécie de anfisbenídeo (Albert et al., 2007) e uma de Anura

(Gonçalves et al., 2009) que compartilham o mesmo modo de vida com *Microcaecilia*. Entretanto, análises mais específicas e uma amostragem mais ampla incluindo outras possíveis áreas onde essas espécies co-ocorrem (Caxiunã e Belo Monte, Pará, Brasil; ver distribuição de *M. taylori lato sensu* disponível em Maciel et al., 2011) podem esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na especiação dessas espécies.

5.3 Implicações para conservação

Estes resultados sugerem a existência de entidades distintas com histórias demográficas distintas. Consequentemente, reforçam a necessidade de que tais entidades sejam avaliadas separadamente quanto aos seus status de conservação, pois para se determinar parâmetros básicos, como de proteção e níveis de ameaça, são necessários dados taxonômicos precisos (Rondinini et al., 2006).

6 CONCLUSÃO

A abordagem molecular utilizando dois fragmentos mitocondriais (cytb e ND4) revelou *M. taylori* como um complexo de espécies, sendo essa constituída por dois Clados ou Haplogrupos (A e B) profundamente divergentes. Congruentemente, a abordagem morfológica utilizando caracteres merísticos, revelou a presença de dois Morfogrupos (A e B), os quais são facilmente distinguíveis pelo caráter anéis secundários. Desse modo, com base na congruência de duas linhas de evidências independentes (molecular e morfológica) e seguindo a taxonomia integrativa por congruência (*sensu* Padial et al., 2010), conclui-se que a amostragem de *M. taylori* aqui analisada é composta, na realidade, por duas espécies: entidade A, a qual sugere-se manter o nome *M. taylori*, por não apresentar caracteres para diferencia-la dos espécimes da localidade-tipo; e a entidade B, a qual é considerada aqui como um táxon distinto, diagnosticável molecular e morfologicamente e para o qual não existe nome disponível na literatura.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C. et al. Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution?. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, p. rspb. 2009, 2009.
- ADAMSON, E. A. S. et al. Microsatellite discovery in an insular amphibian (*Grandisonia alternans*) with comments on cross-species utility and the accuracy of locus identification from unassembled Illumina data. **Conservation Genetics Resources**, v. 8, n. 4, p. 541-551, 2016.
- ALBERT, E. M.; ZARDOYA, R.; GARCÍA-PARÍS, M. Phylogeographical and speciation patterns in subterranean worm lizards of the genus *Blanus* (Amphisbaenia: Blanidae). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 7, p. 1519-1531, 2007.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ARÈVALO, E.; DAVIS, S. K.; SITES, J. W. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. **Systematic Biology**, v. 43, n. 3, p. 387-418, 1994.
- BARNOSKY, A. D. et al. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived?. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51-57, 2011.
- BARRATT, C. D. et al. Characterisation of nine microsatellite loci in the caecilian amphibian *Boulengerula uluguruensis* (Gymnophiona), and their cross-species utility in three congeneric species. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 225-229, 2012.
- BERNATCHEZ, L.; DODSON, J. J. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial-DNA restriction analysis. **Evolution**, p. 1263-1271, 1990.
- BOLNICK, D. I.; FITZPATRICK, B. M. Sympatric speciation: models and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, p. 459-487, 2007.
- CASTELLOE, J.; TEMPLETON, A. R. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 3, n. 2, p. 102-113, 1994.
- CHANNING, A. et al. Taxonomy of the super-cryptic *Hyperolius nasutus* group of long reed frogs of Africa (Anura: Hyperoliidae), with descriptions of six new species. **Zootaxa**, v. 3620, n. 3, p. 301-350, 2013.

- CLEMENT, M. J. et al. TCS: estimating gene genealogies. In: **ipdps**. 2002.
- COCUZZA, G. E. M. et al. Congruence between cytochrome oxidase I (COI) and morphological data in *Anuraphis* spp. (Hemiptera, Aphididae) with a comparison between the utility of the 5'barcode and 3'COI regions. **ZooKeys**, n. 529, p. 123, 2015.
- COSTELLO, M. J.; MAY, R. M.; STORK, N. E. Can we name Earth's species before they go extinct?. **Science**, v. 339, n. 6118, p. 413-416, 2013.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean society**, v. 85, n. 3, p. 407-415, 2005.
- DE ARAÚJO, A. P. U.; BOSSOLAN, N. R. S. Noções de Taxonomia e Classificação Introdução à Zoologia. 2006.
- DEGNAN, J. H.; ROSENBERG, N. A. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends in ecology & evolution**, v. 24, n. 6, p. 332-340, 2009.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.
- DE QUEIROZ, K. The General Lineage Concept of Species and the Defining Properties of the Species. 1999.
- DIECKMANN, U.; DOEBELI, M. On the origin of species by sympatric speciation. **Nature**, v. 400, n. 6742, p. 354-357, 1999.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. JHU press, 1994.
- ERWIN, T. L. Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. **Coleopterists Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 74-75, 1982.
- EXBRAYAT, J. M. (Ed.). **Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)**. Enfield, NH, USA, Science Publishers Incorporated, 2006.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin Ver 3.5.2 An integrative software package for population genetics data analysis. **Computational and Molecular Population Genetics Lab, University of Berne, Switzerland**, 2015.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FISHER, R. A. **The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition.** Oxford University Press, 1930.

FORSTER, P. et al. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 10, p. 1864-1881, 2001.

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

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database accessible. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, 2017.

FROST, D. R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-291, 2006.

FROST, D. R.; KLUGE, A. G. A consideration of epistemology in systematic biology, with special reference to species. **Cladistics**, v. 10, n. 3, p. 259-294, 1994.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, A.; ARIAS, E.; CHAVES, G. Multiple lines of evidence support the species status of the poorly known *Diasporus tigrillo* and the recently described *Diasporus citrinobapheus* (Anura: Eleutherodactylidae). **Neotropical Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 59-68, 2016.

GERMAN NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES LEOPOLDINA. **Challenges and Opportunities of Integrative Taxonomy for Research and Society – Taxonomic Research in the Era of OMICS Technologies.** Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e.V. Nationale Akademie der Wissenschaften, 2014.

GHISELIN, M. T. A radical solution to the species problem. **Systematic Biology**, v. 23, n. 4, p. 536-544, 1975.

GOMES, A. D. et al. Review of the reproductive biology of caecilians (Amphibia, Gymnophiona). **South American Journal of Herpetology**, v. 7, n. 3, p. 191-202, 2012.

GONÇALVES, H. et al. High levels of population subdivision in a morphologically conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasi*) result from recent, multiple refugia: evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 24, p. 5143-5160, 2009.

GOWER, D. J. et al. A molecular phylogeny of ichthyophiid caecilians (Amphibia: Gymnophiona: Ichthyophiidae): out of India or out of South East Asia?. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1500, p. 1563-1569, 2002.

GOWER, D. J. et al. Molecular systematics of caeciliid caecilians (Amphibia: Gymnophiona) of the Western Ghats, India. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 3, p. 698-707, 2011.

HADID, Y. et al. Possible incipient sympatric ecological speciation in blind mole rats (*Spalax*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 7, p. 2587-2592, 2013.

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

HAUSDORF, B. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, n. 4, p. 923-931, 2011.

HEDGES, S. B.; NUSSBAUM, R. A.; MAXSON, L. R. Caecilian phylogeny and biogeography inferred from mitochondrial DNA sequences of the 12S rRNA and 16S rRNA genes (Amphibia: Gymnophiona). **Herpetological Monographs**, p. 64-76, 1993.

HEY, J. On the failure of modern species concepts. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 8, p. 447-450, 2006.

Horikoshi M, Tang Y. *ggfortify*: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results. <http://CRAN.R-project.org/package=ggfortify> R package version. 2016;0.2.0

HUELSENBECK, J. P. et al. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

HULL, D. L. Individuality and selection. **Annual review of ecology and systematics**, v. 11, p. 311-332, 1980.

JOHNSON, N. K.; CICERO, C. The role of ecologic diversification in sibling speciation of Empidonax flycatchers (Tyrannidae): multigene evidence from mtDNA. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 10, p. 2065-2081, 2002.

JORDAN, D. S. The origin of species through isolation. **Science**, p. 545-562, 1905.

KAMEI, R. G. et al. Discovery of a new family of amphibians from northeast India with ancient links to Africa. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, p. rspb20120150, 2012a.

KAMEI, R. G. et al. Systematics of the caecilian family Chikilidae (Amphibia: Gymnophiona) with the description of three new species of *Chikila* from northeast India. **Zootaxa**, v. 3666, p. 401-435, 2012b.

KAMEI, R. G. et al. Three new species of striped *Ichthyophis* (Amphibia: Gymnophiona: Ichthyophiidae) from the northeast Indian states of Manipur and Nagaland. **Zootaxa**, v. 2267, n. 1, p. 26-42, 2009.

KELLOGG, V. L. Darwinism to-day; a discussion of present-day scientific criticism of the Darwinian selection theories, together with a brief account of the principal other proposed auxiliary and alternative theories of species-forming. London: George Bell & Sons, 1907.

KNOWLES, L. L.; CARSTENS, B. C. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 887-895, 2007.

KONDRASHOV, A. S.; KONDRASHOV, F. A. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. **Nature**, v. 400, n. 6742, p. 351-354, 1999.

KOTHARAMBATH, R. et al. A new species of Indian caecilian highlights challenges for species delimitation within *Gegeneophis* Peters, 1879 (Amphibia: Gymnophiona: Indotyphlidae). **Zootaxa**, v. 3948, n. 1, p. 060-070, 2015.

KOVALEVA, Y. V.; LITVINOV, Y. N.; EFIMOV, V. M. Shrews (Soricidae, Eulipotyphla) from the Russian Far East and Siberia: Combination and search for congruence of molecular genetic and morphological data. **Biology Bulletin**, v. 41, n. 7, p. 575-588, 2014.

KUPFER, A.; NABHITABHATA, J.; HIMSTEDT, W. Life history of amphibians in the seasonal tropics: habitat, community and population ecology of a caecilian (genus *Ichthyophis*). **Journal of Zoology**, v. 266, n. 3, p. 237-247, 2005.

LEAKEY, R. E.; LEWIN R. **The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind**. Doubleday Books, 1995.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin, I., Ghurye, S.G., Hoeffding, W., Madow, W.G., Mann, H.B. (Eds.), Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling. Stanford University Press, California, pp. 279–292. 1961

LEWIS, C. J. et al. Development of anonymous nuclear markers from Illumina paired-end data for Seychelles caecilian amphibians (Gymnophiona: Indotyphlidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 6, n. 2, p. 289-291, 2014.

LI, G. et al. Isolation and characterization of fifteen polymorphic tetranucleotide microsatellites for *Ichthyophis bannanicus* (Gymnophiona: Ichthyophiidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 129-131, 2010.

LI, Kexin et al. Sympatric speciation revealed by genome-wide divergence in the blind mole rat *Spalax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. 11905-11910, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LOSOS, J. B.; GLOR, Richard E. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 220-227, 2003.

MACIEL, A. O. et al. Diet, microhabitat use, and an analysis of sexual dimorphism in *Caecilia gracilis* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) from a riparian forest in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 1, p. 47-50, 2012.

MACIEL, A. O.; HOOGMOED, M. S. A new species of *Microcaecilia* (Amphibia: Gymnophiona: Siphonopidae) from the Guianan region of Brazil. **Zootaxa**, v. 3693, n. 3, p. 387-394, 2013.

MACIEL, A. O.; HOOGMOED, M. S. Taxonomy and distribution of caecilian amphibians (Gymnophiona) of Brazilian Amazonia, with a key to their identification. **Zootaxa**, v. 2984, n. 1, p. 1-53, 2011.

MALLET, J. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1506, p. 2971-2986, 2008.

MAY, R. M.; HARVEY, P. H. Species uncertainties. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 687-687, 2009.

MAYDEN, R. L.; MATSON, R. H.; HILLIS, D. M. Speciation in the North American genus dionda (teleostei: cypriniformes). Stanford, Califórnia, Stanford University Press, 1992.

MAYR, E.; ANGELO, CLAUDIO. **Isto é biologia: a ciência do mundo vivo**. Editora Companhia das Letras, 2008.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1963.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press 1942.

MCCUNE, B.; GRACE, J. B.; URBAN, D. L. **Analysis of ecological communities.** Gleneden Beach, OR: MjM software design, 2002.

MEASEY, G. J. Are caecilians rare? An east African perspective. **Journal of East African Natural History**, v. 93, n. 1, p. 1-21, 2004.

MEZZASALMA, M. et al. A sisters' story: comparative phylogeography and taxonomy of *Hierophis viridiflavus* and *H. gemonensis* (Serpentes, Colubridae). **Zoologica Scripta**, v. 44, n. 5, p. 495-508, 2015.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean?. **PLoS Biol**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.

MULVANEY, A. et al. Evidence of population genetic structure within the Florida worm lizard, *Rhineura floridana* (Amphisbaenia: Rhineuridae). **Journal of Herpetology**, v. 39, n. 1, p. 118-124, 2005.

NOSIL, P.; HARMON, L. J.; SEEHAUSEN, O. Ecological explanations for (incomplete) speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 3, p. 145-156, 2009.

NUSSBAUM, R. A.; HOOGMOED, M. S. Surinam caecilians, with notes on *Rhinatremabivittatum* and the description of a new species of *Microcaecilia* (Amphibia, Gymnophiona). **Zoologische Mededelingen**, v. 54, n. 14, p. 217-235, 1979.

NUSSBAUM, R. A.; WILKINSON, M. On the classification and phylogeny of caecilians (Amphibia: Gymnophiona), a critical review. **Herpetological Monographs**, v. 3, p. 1-42, 1989.

OKSANEN, Jari et al. Package 'vegan'. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, 2013.

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

PANTE, E.; SCHOELINCK, C.; PUILLANDRE, N. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. **Systematic Biology**, p. syu083, 2014.

PAPADOPULOS, A. S. T. et al. Speciation with gene flow on Lord Howe Island. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 32, p. 13188-13193, 2011.

PARRA-OLEA, G. et al. Two new species of *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae) from the mountains of northern Oaxaca, México. **Copeia**, v. 2005, n. 3, p. 461-469, 2005.

PETIT, R. J.; EXCOFFIER, L. Gene flow and species delimitation. **Trends in Ecology & evolution**, v. 24, n. 7, p. 386-393, 2009.

PIMM, S. et al. Human impacts on the rates of recent, present, and future bird extinctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 29, p. 10941-10946, 2006..

POLYAKOV, A. et al. Mammalian microevolution in action: adaptive edaphic genomic divergence in blind subterranean mole-rats. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 271, n. Suppl 4, p. S156-S159, 2004.

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

RAMBAUT, A. FigTree 1.2. 2. Available at: tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree. Accessed on January, v. 15, p. 2010, 2009.

RAMBAUT, A. et al. Tracer v1. 6. 2014.

RAQUET, M.; BRUN, C.; EXBRAYAT, J. M. Patterns of Apoptosis and Proliferation throughout the Biennial Reproductive Cycle of Viviparous Female *Typhlonectes compressicauda* (Amphibia, Gymnophiona). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 16, 2016.

RODRIGUES, M. E.; DELLA JUSTINA, L. A.; MEGLHIORATTI, F. M. A. O conteúdo de sistemática e filogenética em livros didáticos do ensino médio. **Ensaio Pesquisa em Educação em Ciências**, v. 13, n. 2, p. 65-84, 2011.

ROELANTS, K. et al. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 887-892, 2007.

SAMADI, S.; BARBEROUSSE, A. The tree, the network, and the species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 89, n. 3, p. 509-521, 2006.

SAMPAIO, F. L. et al. Phylogenetic and diversity patterns of *Blanus* worm lizards (Squamata: Amphisbaenia): insights from mitochondrial and nuclear gene genealogies and species tree. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 53, n. 1, p. 45-54, 2015.

SAN MAURO, D. et al. Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 33, n. 2, p. 413-427, 2004.

SCHLICK-STEINER, B. C. et al. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 421-438, 2010.

SCHLIEWEN, U. K.; TAUTZ, D.; PÄÄBO, S. Sympatric speciation suggested by monophyly of crater lake cichlids. **Nature**, v. 368, n. 6472, p. 629-632, 1994.

SEGALLA, M. V. et al. Brazilian amphibians: List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia, São Paulo, Brazil, 2016.

SHAFFER, H. B.; THOMSON, R. C. Delimiting species in recent radiations. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 896-906, 2007.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SIMPSON, G. G. **Principles of animal taxonomy**. Columbia University Press, 1961.

ŠKLÍBA, J. et al. Activity of free-living subterranean blind mole rats *Spalax galili* (Rodentia: Spalacidae) in an area of supposed sympatric speciation. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2015.

SORENSEN, M. D.; SEFC, K. M.; PAYNE, R. B. Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 928-931, 2003.

STOELTING, R. E.; MEASEY, J. G.; DREWES, R. C. Population genetics of the São Tomé caecilian (Gymnophiona: Dermophiidae: *Schistometopum thomense*) reveals strong geographic structuring. **PLoS one**, v. 9, n. 8, p. e104628, 2014.

STREELMAN, T. J.; DANLEY, P. D. The stages of vertebrate evolutionary radiation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 3, p. 126-131, 2003..

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

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

TAYLOR, Edward H. Caecilians of the world. University of. Kansas Press, Lawrence. 1968.

TEAM, R. Core et al. R: A language and environment for statistical computing. 2013.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

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

VACONCELOS, R.; CARRETERO, M. A.; HARRIS, D. J. Phylogeography of the genus *Blanus* (worm lizards) in Iberia and Morocco based on mitochondrial and nuclear markers—preliminary analysis. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, n. 3, p. 339-346, 2006.

VALDECASAS, A. G.; WILLIAMS, D.; WHEELER, Q. D. ‘Integrative taxonomy’then and now: a response to Dayrat (2005). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 93, n. 1, p. 211-216, 2008.

VERDADE, V. K.; SCHIESARI, L. C.; BERTOLUCI, J. A. Diet of juvenile aquatic caecilians, *Typhlonectes compressicauda*. **Journal of Herpetology**, v. 34, n. 2, p. 291-293, 2000.

VITT, Laurie J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press, 2013.

WANG, Hui et al. The phylogeography and population demography of the Yunnan Caecilian (*Ichthyophis bannanicus*): Massive rivers as barriers to gene flow. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0125770, 2015.

WANG, Y. et al. Morphology, molecular genetics, and bioacoustics support two new sympatric *Xenophrys* toads (Amphibia: Anura: Megophryidae) in Southeast China. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93075, 2014.

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

WILEY, E. O. The evolutionary species concept reconsidered. **Systematic Biology**, v. 27, n. 1, p. 17-26, 1978.

WILKINSON, M. et al. A new species of skin-feeding caecilian and the first report of reproductive mode in *Microcaecilia* (Amphibia: Gymnophiona: Siphonopidae). **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e57756, 2013.

WILKINSON, M. et al. A nine-family classification of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **Zootaxa**, v. 2874, p. 41-64, 2011.

WILKINSON, M. et al. Phylogenetic relationships of African caecilians (Amphibia: Gymnophiona): insights from mitochondrial rRNA gene sequences. **African Journal of Herpetology**, v. 52, n. 2, p. 83-92, 2003.

WILKINSON, M.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. A new species of *Microcaecilia* Taylor, 1968 (Amphibia: Gymnophiona: Siphonopidae) from Amazonian Brazil. **Zootaxa**, v. 3905, n. 3, p. 425-431, 2015.

WILKINSON, M.; O'CONNOR, A.; NUSSBAUM, R. A. Taxonomic status of the neotropical caecilian genera *Brasiliotyphlus* Taylor, 1968, *Microcaecilia* Taylor, 1968 and *Parvicaecilia* Taylor, 1968 (Amphibia: Gymnophiona: Siphonopidae). 2013.

WILL, K. W.; MISHLER, B. D.; WHEELER, Q. D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic biology**, v. 54, n. 5, p. 844-851, 2005.

WRIGHT, S. Evolution and the Genetics of Populations, Volume 4, Variability within and among populations. 1978.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97-159, 1931.

YEATES, David K. et al. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy?. **Systematic Entomology**, v. 36, n. 2, p. 209-217, 2011.

ZHANG, P.; WAKE, M. H. A mitogenomic perspective on the phylogeny and biogeography of living caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 479-491, 2009.

ZHANG, Zheng et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZUG, G. R.; VITT, L.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press, 2001.

APÊNDICE A – Amostras de tecido de *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil, utilizados na abordagem molecular (N = 127). Espécimes utilizados na abordagem morfológica apresentam o sexo definido (N =67).

Clado	Localidades		Coordenada	ID das amostras	MUFAL	UFMT	Sexo
A	Marabá Pará, Brasil	M1	5° 25' 24,81" S, 49° 5' 8,16" O	80	10563	-	F
A		M1		82	10555	-	-
A		M1		84	10559	-	F
A		M1		109	10564	-	M
A		M1		119	10560	-	M
A		M1		193	10556	-	J
A		M1		194	10558	-	M
A	Parauapebas, Pará, Brasil	P1	6° 3' 8,12" S, 50° 7' 40,48" O	5	10303	-	-
A		P1		13	10339	-	-
A		P1		20	10265	-	-
A		P1		26	10293	-	-
A		P1		33	10272	-	M
A		P1		42	10470	-	F
A		P1		45	10313	-	M
A		P1		48	10365	-	F
A		P1		65	10298	-	F
A		P1		70	10273	-	M
A		P1		77	10328	-	J
A		P1		86	10269	-	M
A		P1		91	10285	-	M
A		P1		112	10260	-	F
A		P1		114	10289	-	F
A		P1		122	10359	-	M
A		P1		156	10331	-	J
A		P1		189	10305	-	-
A		P2	6° 2' 27,51"S, 50° 6' 48,95"O	69	-	11525	-
A		P2		72	-	11526	-
A		P2		88	-	11537	-
A		P2		98	-	11530	-
A		P2		100	-	11536	-
A		P2		101	-	11529	-
A		P2		124	-	11533	-
A		P2		126	-	11538	-
A		P2		129	-	11527	-
A		P2		186	-	11535	-
A		P2		187	-	11540	-
A		P2		188	-	11539	-

A	P3	6° 2' 29,711" S, 50° 9' 8,574" O	7	10472	-	-
A	P3		12	10266	-	-
A	P3		18	10500	-	-
A	P3		19	10264	-	-
A	P3		41	10267	-	F
A	P3		47	10252	-	M
A	P3		58	10221	-	M
A	P3		76	10223	-	-
A	P3		87	10291	-	M
A	P4	6° 3' 29,191" S, 50° 11' 50,38"O	29	10288	-	-
A	P4		97	10262	-	M
A	P4		113	10228	-	F
A	P4		117	10356	-	M
A	P4		127	10257	-	F
A	P4		133	10301	-	-
A	P4		134	10274	-	-
A	P4		148	10473	-	M
A	P4		151	10235	-	M
A	P4		158	10358	-	-
A	P4		159	10307	-	-
A	P4		161	10282	-	-
A	P4		169	10275	-	-
A	P4		170	10290	-	-
A	P4		171	10278	-	-
A	P4		179	10224	-	-
A	P4		181	10493	-	-
A	P4		182	10494	-	-
A	P4		183	10280	-	-
A	P5	6° 4' 46,04" S, 50° 9' 19,87"O	9	10246	-	-
A	P5		17	10306	-	-
A	P7	6° 2' 35,831" S, 50° 11' 37,44"O	6	10333	-	-
A	P7		11	10485	-	M
A	P7		27	10358	-	-
A	P7		46	10347	-	F
A	P7		60	10357	-	M
A	P7		90	10361	-	F
A	P7		145	10330	-	-
A	P7		146	10342	-	-
A	P8	6° 4' 24,908" S, 50° 10' 45,65"O	2	10220	-	-
A	P8		16	10341	-	-
A	P8		23	10329	-	-
A	P8		25	10296	-	-

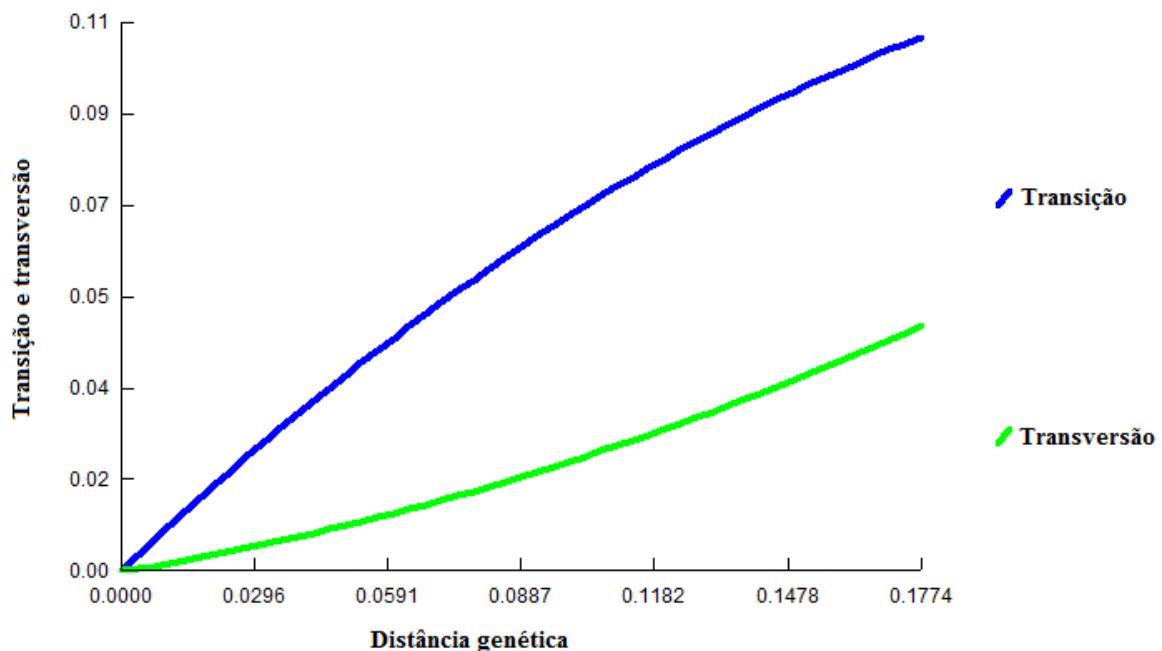
A	P8	56	10237	-	M
A	P8	62	10294	-	F
A	P8	71	10309	-	M
A	P8	85	10227	-	M
A	P8	95	10310	-	F
A	P8	105	10286	-	F
A	P8	107	10326	-	J
A	P8	115	10311	-	M
A	P8	121	10335	-	M
A	P8	135	10354	-	-
A	P8	136	10346	-	-
A	P8	137	10314	-	-
A	P8	139	10344	-	-
A	P8	140	10338	-	F
A	P8	141	10233	-	-
A	P8	142	10231	-	-
A	P8	143	10336	-	-
A	P8	144	10332	-	-
A	P8	157	10360	-	M
A	P8	173	10322	-	-
A	P8	185	10466	-	-
B	P1	6° 3' 8,127" S, 50° 7' 40,488" O	57	10362	-
B	P1		116	10254	-
B	P2	6° 2' 27,51"S, 50° 6' 48,95"O	94	-	11531
B	P3	6° 2' 29,711" S, 50° 9' 8,574" O	28	10225	-
B	P3		66	10489	-
B	P3		93	10253	-
B	P4	6° 3' 29,191" S, 50° 11' 50,381" O	1	10478	-
B	P4		14	10255	-
B	P4		22	10268	-
B	P4		31	10502	-
B	P4		61	10495	-
B	P4		110	10256	-
B	P4		120	10284	-
B	P4		123	10496	-
B	P4		132	10229	-
B	P4		149	10232	-
B	P4		153	10234	-
B	P4		162	10240	-
B	P4		163	10239	-
B	P4		164	10230	-
B	P4		168	10250	-

B	P4		184	10258	-	M
B	P6	6° 3' 37,424"S, 50° 9' 17,282"O	10	-	11761	-
B	P6		24	-	11724	-
B	P7	6° 2' 35,831" S, 50° 11' 37,446" O	64	10350	-	M
B	P8	6° 4' 24,908" S, 50° 10' 45,659" O	44	10327	-	F
B	P8		138	10345	-	F

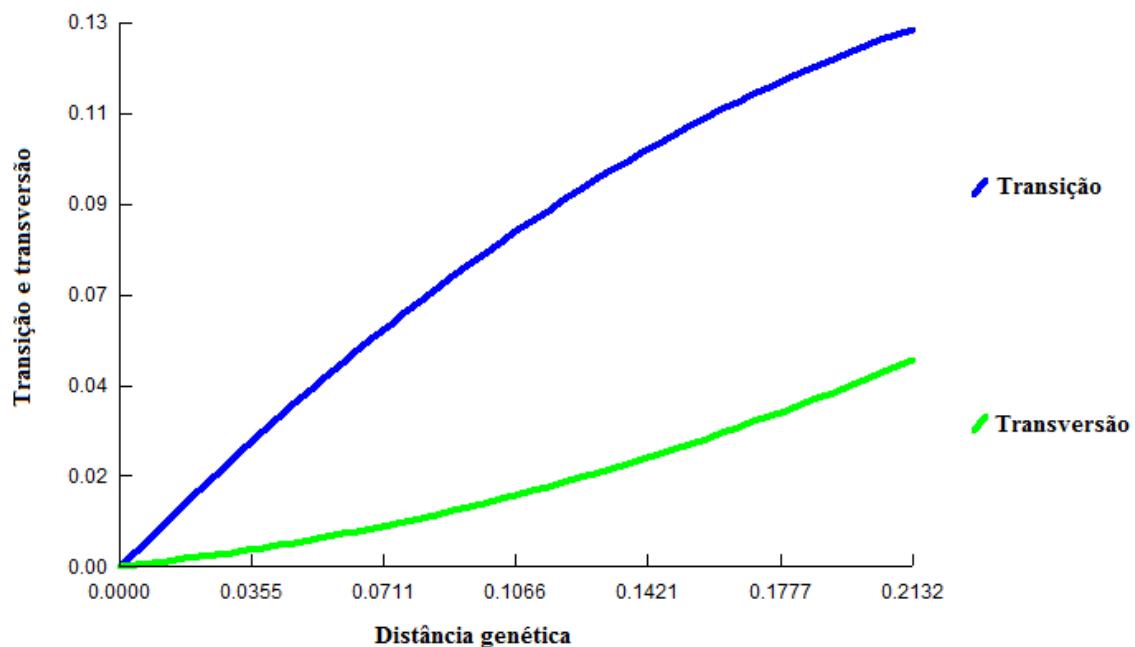
APÊNDICE B – Protocolo de purificação por isopropanol

- 1- Transferir as amostras para tubos eppendorf de 2,0ml previamente identificados;
- 2- Adicionar 72 μ l de isopropanol a 65% em 15-20 μ l dos produtos de PCR;
- 3- Agitar suavemente;
- 4- Colocar os tubos na centrífuga e dar um *short spin* até a velocidade de rotação chegar a 5000rcf;
- 5- Deixar na centrífuga em repouso por 20 minutos;
- 6- Centrifugar a 14000rcf por 15 minutos;
- 7- Descartar o sobrenadante;
- 8- Adicionar 250 μ l de etanol a 60% nos tubos;
- 9- Deixar em repouso na centrífuga por 5 minutos e, em seguida, centrifugar por 5 minutos a 14000rcf;
- 10- Descartar o sobrenadante por pipetagem: encoste a ponteira do lado oposto onde o *pellet* foi precipitado;
- 11- Secar os tubos abertos por 1 minuto no termobloco a 96°C.
- 12- Ressuspender o *pellet* em 15 μ l de H2Oqsp.

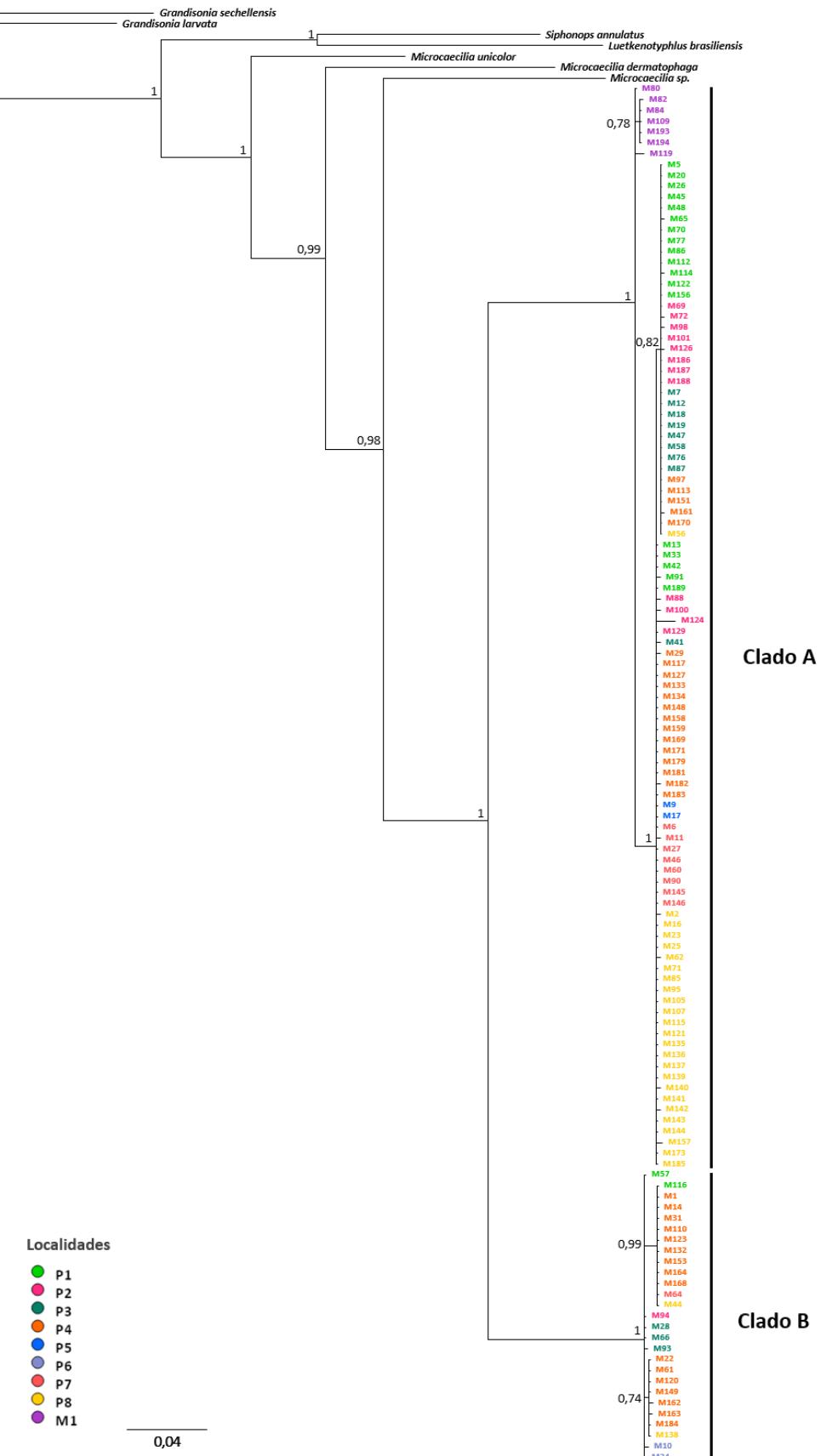
APÊNDICE C – Gráfico da matriz de dados total do fragmento mitocondrial citocromo b, mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo GTR, e a frequência de transições (azul) e transversões (verde).



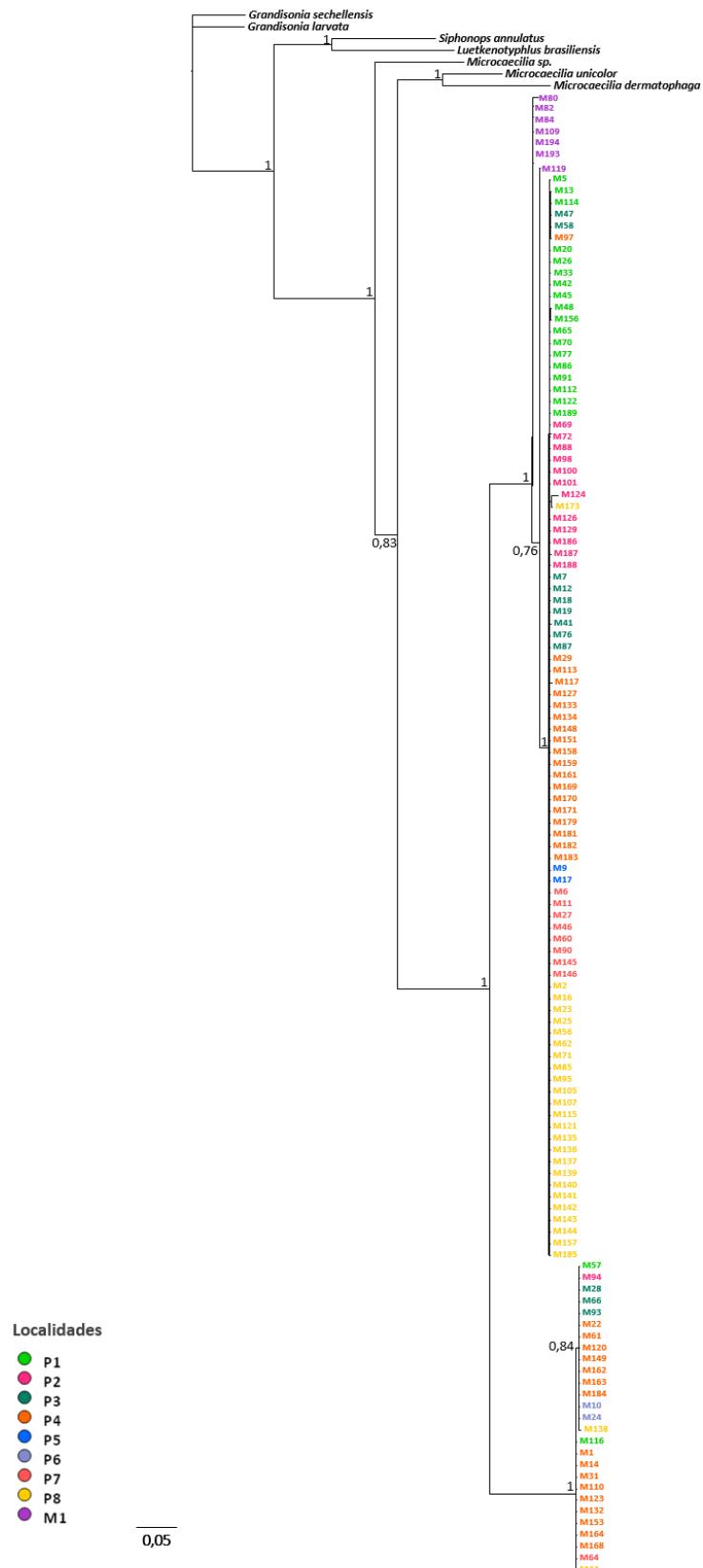
APÊNDICE D – Gráfico da matriz de dados total do fragmento mitocondrial NADH dehydrogenase subunit 4, mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo GTR, e a frequência de transições (azul) e transversões (verde).



APÊNDICE E – Inferência bayesiana com base em um fragmento mitocondrial (cytb) mostrando as relações filogenéticas para *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil.



APÊNDICE F – Inferência bayesiana com base em um fragmento mitocondrial (ND4) mostrando as relações filogenéticas para *Microcaecilia taylori* do sudeste do Pará, Brasil.



APÊNDICE G – Parátipos de *Microcaecilia epíteto* sp. nov. coletados na em cinco pontos na Floresta Nacional de Carajás, município de Parauapebas, estado do Pará, Brasil.

Ponto de coleta (coordenadas)	MUFAL	Data de coleta
P1 (6° 3' 8,127" S, 50° 7' 40,488" O)	10362	10/07/2011
	10254	31/05/2011
P3 (6° 2' 29,711" S, 50° 9' 8,574" O)	10225	08/06/2011
	10253	24/05/2011
	10489	09/06/2011
P4 (6° 3' 29,191" S, 50° 11' 50,381" O)	10229	24/05/2011
	10230	31/05/2011
	10232	31/05/2011
	10234	19/05/2011
	10239	08/06/2011
	10240	24/05/2011
	10250	31/05/2011
	10255	31/05/2011
	10256	08/06/2011
	10268	09/06/2011
	10284	31/05/2011
	10495	08/06/2011
	10496	02/05/2011
P7 (6° 2' 35,831" S, 50° 11' 37,446" O)	10502	02/05/2011
	10350	26/10/2011
	10327	28/10/2011
P8 (6° 4' 24,908" S, 50° 10' 45,659" O)	10345	28/10/2011