



Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Iuri Ribeiro Dias

Os anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia:

Diversidade, Filogeografia e Conservação

Ilhéus - Bahia - Brasil

2016

D541

Dias, Iuri Ribeiro.

Os anfíbios das florestas montanas da mata atlântica da Bahia : diversidade, filogeografia e conservação / Iuri Ribeiro Dias. - Ilhéus : UESC, 2016.

116f. : il.

Orientador : Mirco Solé.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Inclui referências.

1. Anfíbios - Diversidade – Serra Bonita (BA). 2. Anurofauna-Serra Bonita (BA) . 3. Diversidade biológica – Bahia. 4. Filogeografia. 5. Florestas – Conservação – Bahia. I Solé, Mirco. II. Título.

CDD - 597.6098142

Iuri Ribeiro Dias

Os anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia:

Diversidade, Filogeografia e Conservação

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Mirco Solé

Ilhéus - Bahia - Brasil

2016

Iuri Ribeiro Dias

Os anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia:

Diversidade, Filogeografia e Conservação

Ilhéus, 11 de março de 2016.

Dr. Mirco Solé (orientador)

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Dr. Antônio Freire de Carvalho Filho

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Dr. Dennis Rödder

Zoological Research Museum Alexander Koenig (ZFMK)

Dr. Daniel Loebmann

Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Dr. Hélio Ricardo da Silva

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Dedico esta tese ao meu avô Vivaldino Ribeiro Soares

Agradecimentos

Ao Prof. Mirco Solé pela confiança depositada, ensinamentos e apoio ao longo desses 10 anos de orientação harmoniosa e produtiva.

Aos amigos que compartilharam as alegrias e complicações no campo, sem eles a realização desse trabalho não seria possível: Marcos Vila Nova, Rafael Abreu, Marcelo Sena, Erick Santos, Euvaldo Marciano e principalmente Carlos Augusto Costa (Augustão) que me acompanhou em diferentes expedições de campo, com sua clássica frase: "bora subir serra meu fio". Todos eles sempre dispostos a chegarem ao topo ! Serei eternamente grato pela ajuda de todos vocês.

Aos colegas do Laboratório de Vertebrados da UESC e toda galera da herpetologia e da coleção herpetológica da UESC. Em especial a Caio, Danilo e Euvaldo (já somos da velha guarda rs), Tadeu, Marcos e Augustão.

Aos motoristas da UESC (Valtoni, Seu Vitor e Hermes) que nos conduziram as áreas de estudo e conviveram com harmonia, respeito e bom humor durante as atividades de campo.

Ao Prof. Marco Antônio Costa pela disponibilização do espaço no Laboratório de Citogenética da UESC e pela ajuda nas atividades laboratoriais.

Aos amig@s do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da UESC que sempre estavam dispostos a ajudar no que fosse necessário: Tony, Rodolpho, Gabriel, Renan, Patrícia, Tina, Joseane, Daniela e Caio.

À Luciana Watanabe que realizou a purificação e sequenciamento das amostras na Universidade Federal do Pará e sempre me auxiliou nas dúvidas durante as etapas laboratoriais.

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (Projeto nº 0991_20132) pelo auxílio financeiro.

À CAPES pela bolsa do doutorado.

Ao amigo Caio Vinicius de Mira Mendes, pela amizade e ajuda essencial na reta final desse trabalho.

Aos meus pais Ermeval e Suely pelo apoio incondicional, como também de toda minha família.

Em especial, à minha amada Deyna, pelo companheirismo, amor, cuidado, carinho, amizade e por ser essa pessoa com uma infinidade de qualidades que torna minha vida cada dia mais feliz. Ao longo de toda essa jornada sempre estive ao meu lado, acreditando no meu potencial e sempre me estimulando a prosseguir. Desculpe pelas eventuais ausências e pelo mau humor e falta de dedicação desses últimos meses. Te amo muito!!

Sumário

Introdução Geral	01
Referências Bibliográficas	02
Capítulo 1: Inventário integrativo dos anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia revelam alta riqueza de espécies e presença de diferentes linhagens crípticas	03
Resumo.....	04
Introdução	05
Matérial e Métodos	06
Resultados	09
Discussão	18
Referências Bibliográficas	21
Material Suplementar I	27
Material Suplementar II	30
Capítulo 2: Filogeografia de <i>Pristimantis vinhai</i> (Anura: Craugastoridae) revelam alta estruturação genética em uma espécie endêmica da Mata Atlântica do Sul da Bahia, Brasil.	45
Resumo.....	46
Introdução	47
Material e Métodos	48
Resultados	53
Discussão	62
Referências Bibliográficas	68
Apêndice I.....	79
Apêndice II.....	82
Apêndice III.....	83
Apêndice IV.....	84
Capítulo 3: Anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira: conservação, áreas de endemismo e status do conhecimento	85
Introdução	87
Material e Métodos	89
Resultados	91
Discussão	100
Referências Bibliográficas	105
Considerações Finais	115

Introdução Geral

Os resultados encontrados durante a pesquisa sobre a composição e a influência dos gradientes altitudinais na estrutura da comunidade de anfíbios em uma área de altitude (Serra Bonita) da Bahia (Dias 2011; Dias et al. 2014), contribuíram significativamente para a realização deste trabalho. Primeiro, foi encontrada a segunda maior riqueza de anfíbios para a Mata Atlântica, com registros de novas espécies para a ciência e novas ocorrências para o estado. Além disso, contrariando o padrão amplamente difundido na literatura, no qual existe uma diminuição da riqueza de espécies com o aumento da altitude ou um padrão unimodal (Stevens 1992; Rahbek 2005), o número de espécies encontradas nas cotas altitudinais superiores (850 m) foi semelhante ao registrado nas áreas de baixada (250 m). Embora ainda sejam encontrados no estado da Bahia os maiores remanescentes florestais do Nordeste (SOS Mata Atlântica 2014), grande parte desses fragmentos estão associados a encostas e topos de morros. Provavelmente, isso ocorra porque essas áreas não são apropriadas para agricultura ou inviáveis de serem exploradas economicamente devido à dificuldade de acesso ou pela presença de solos inadequados para essas atividades. As áreas de altitude são os locais onde estão concentrados quase metade dos *hotspots* de diversidade do mundo (Kohler & Maselli 2009) e são relativamente pouco explorados cientificamente na Mata Atlântica sul da Bahia (Martinelli 2007).

Essas informações impulsionaram perguntas científicas que tentaram ser respondidas nos diferentes capítulos deste trabalho envolvendo a diversidade de anfíbios: i) o número de espécies encontradas em outras áreas de altitude seria semelhante a registrada na Serra Bonita? ii) As espécies restritas as áreas de altitude nessa área são encontradas em outros topos de morro da região? iii) As espécies não identificadas em nível específico são realmente novas para a ciência? Para responder essas perguntas, no primeiro capítulo realizamos um inventário da anurofauna em nove diferentes áreas de altitude da Mata Atlântica da Bahia. Ademais, para identificar as espécies que apresentam taxonomia complicada e possíveis espécies não descritas, utilizamos uma abordagem integrativa, utilizando características morfológicas e bioacústicas aliadas a análises moleculares para definir o *status* taxonômico dessas espécies.

Anfíbios são reconhecidos pela baixa capacidade de dispersão e alta filopatria (Zeisset & Beebee 2008). Logo, espécies que são limitadas aos topos de morro possivelmente apresentam forte estruturação genética. Contudo, não foi possível utilizar uma espécie exclusiva das áreas de altitude como modelo para tentar reconstruir uma história da biota dos topos de morro da região já que a maioria das espécies de anfíbios que só ocorrem nesses locais é restrita a duas ou três localidades, o que inviabilizou esse tipo de análise. No capítulo 2 utilizamos a espécie *Pristimantis vinhai* (Bokermann, 1975) que é endêmica da Mata Atlântica da Bahia e abundante nas áreas de altitude amostradas, para inferir quais foram os processos que culminaram na atual variabilidade genética encontrada nesta espécie e como os topos de morro da região poderiam ter atuado na diversificação da biota regional, utilizando uma abordagem filogeográfica com genes nucleares e mitocondriais aliados à paleomodelagem.

No capítulo 3, através de mapas de extensão de ocorrência disponíveis para diferentes grupos taxonômicos, identificamos áreas prioritárias para conservação dos anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira utilizando os seguintes critérios: áreas de endemismo, riqueza de espécies e presença de espécies endêmicas e ameaçadas. Diante da crise da diversidade e grande quantidade de anfíbios ameaçados de extinção (Stuart et al. 2008) essas informações fornecem estimativas das prioridades iniciais e podem ser confirmadas posteriormente com um banco de dados mais refinado. Além disso, fornecemos um panorama geral dos estudos já realizados abordando os anfíbios das áreas de altitude do Brasil.

Referências Bibliográficas

Dias, I. R. 2011. Composição e distribuição espacial dos anfíbios ao longo de um gradiente altitudinal na RPPN Serra Bonita, Sul da Bahia. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Zoologia Aplicada da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Dias, I. R., Medeiros, T. T., Vila-Nova, M. F., Solé, M. 2014. Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotpoint within Brazil's Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.

Kohler, T., & Maselli, D. 2009. Mountains and Climate Change. From Understanding to Action. Berne: Geogr. Bernesia

Martinelli G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 587-597.

Rahbek, C. 2005. The role of spatial scale and the perception of large-scale species richness patterns. *Ecology Letters* 8: 224–239.

SOS Mata Atlântica. 2014. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. Disponível em <http://www.sosmatatlantica.org.br> (acessado em 15 julho 2014).

Stevens, G. C. 1992. The elevational gradient in altitudinal range an extension of Rapoport's latitudinal rule to altitude. *The American Naturalis* 140: 893-911.

Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., Young, B. E., 2008. *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, IUCN, Gland, Switzerland and Conservation International, Arlington, Virginia.

Zeisset, I. N. G. A. & Beebee, T. J. C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101(2): 109-119.

Capítulo 1

Inventário integrativo dos anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia revelam alta riqueza de espécies e presença de diferentes linhagens crípticas



a) Wenceslau Guimarães; b) Serra da Jibóia e c) Wenceslau Guimarães

Inventário integrativo dos anfíbios das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia revelam alta riqueza de espécies e presença de diferentes linhagens crípticas

RESUMO

A falta de informações sobre a distribuição geográfica das espécies é uma das principais limitações na elaboração de estratégias de conservação. A dificuldade em acessar as áreas de altitude é um fator limitante adicional para exploração científica dessas regiões. Para tentar suprir o escasso conhecimento existente sobre a composição da anurofauna das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia, foram inventariadas nove diferentes áreas de altitude do estado. A amostragem em cada localidade foi realizada através da vistoria de trinta e três transectos instalados no interior da floresta e em riachos, e por meio de encontros oportunistas. Foram registradas 94 espécies de anfíbios anuros (70 delas encontradas em locais acima de 700 m de altitude) pertencentes a 13 famílias taxonômicas com registros inéditos para a Bahia. Utilizando uma abordagem integrativa através de dados morfológicos, bioacústicos e genéticos, foi possível confirmar que 16 espécies que não foram identificadas até seu nível específico em um primeiro momento, são espécies ainda não descritas para a ciência. Os dados obtidos nesse estudo irão ajudar na compreensão dos padrões de diversidade e da distribuição geográfica dos anfíbios da região, e demonstram que o número de espécies dessas áreas estão subestimados, mesmo com as constantes descrições de novas espécies para a área de estudo. As Florestas Montanas da Bahia são regiões chave para a conservação, com alta riqueza de espécies de anfíbios, que incluem tanto espécies de baixadas, como espécies restritas aos topos de morro. Incentivamos o uso de uma abordagem integrativa nos inventários realizados na região Neotropical, utilizando análises moleculares para acessar a diversidade críptica de suas espécies, possibilitando assim, a definição de quais são as prioridades taxonômicas e fornecendo um melhor panorama da riqueza da área inventariada.

INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica é um dos mais ricos em biodiversidade e também um dos mais ameaçados pela perda e fragmentação de ambientes naturais (Myers et al. 2000; Ribeiro et al. 2009). No entanto, os fragmentos preservados possuem um dos maiores percentuais de espécies endêmicas do mundo (Myers et al. 2000), onde são encontrados quase metade dos anfíbios do Brasil (Haddad et al. 2013).

Mesmo representando apenas um quarto da superfície da terra, as áreas montanhosas abrigam a maioria dos locais megadiversos do mundo (Kohler & Maselli 2009; Fjeldså et al. 2012). Na Mata Atlântica brasileira, as três principais regiões serranas (Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e a Serra do Espinhaço) são consideradas prioritárias para conservação devido a seu alto valor biológico (Giulietti et al. 1997; Martinelli 2007; MMA 2007), onde mais da metade das espécies de anfíbios conhecidas são consideradas endêmicas dessas regiões (Cruz & Feio 2007). Nesses locais está concentrada a maioria dos estudos sobre os anfíbios das áreas de altitude do país (Capítulo III).

Devido a características topográficas, dificuldade de acesso e maior distância dos principais centros de pesquisa do país, os topos de morros e áreas de altitude da Mata Atlântica da Bahia foram historicamente pouco amostradas. O único estudo de maior duração (18 meses) realizado em uma dessas áreas (RPPN Serra Bonita - Camacan), revelou o grande potencial que as mesmas possuem para abrigar uma rica e desconhecida anurofauna. Atualmente, a Serra Bonita é uma das localidades com a maior riqueza de anfíbios da Mata Atlântica (Dias et al. 2014a), com o registro de novas espécies (Napoli et al. 2011) e novas ocorrências para o estado (Orrico 2010; Dias et al. 2011). Isso demonstra a grande lacuna no conhecimento dessas regiões. Para a herpetofauna em geral, apenas dois inventários foram realizados nessas áreas de altitude (Dias et al. 2014a; Dias et al. 2014b) e a maioria dos estudos são limitados à descrição de novas espécies de anfíbios e répteis (e.g. Cruz & Napoli 2010; Curcio et al. 2012; Rodrigues et al. 2013).

Embora os anfíbios sejam um dos grupos taxonômicos mais ameaçados do mundo, seus padrões de diversidade ainda são pouco conhecidos (Hoffmann et al. 2010). Isso acontece, principalmente, devido à falta de informações sobre a distribuição geográfica e a taxonomia do grupo.

Com a atual crise da biodiversidade, contrastando com as altas estimativas de espécies que ainda são desconhecidas para a ciência (o.e., cerca de 10 milhões), os avanços taxonômicos na descrição dessa biodiversidade são imprescindíveis (Chapman 2009; Wheeler et al. 2012). Estudos apontam que devem existir mais de 3.000 espécies de anfíbios não descritas (Giam et al. 2011) o que representa 40% das espécies conhecidas atualmente (Frost 2015).

A insegurança na determinação taxonômica das espécies dificulta o avanço da grande maioria dos estudos biológicos, afetando diretamente na priorização de áreas para conservação (Wiens & Servedio 2000). A taxonomia integrativa utiliza diferentes linhas de evidências como ferramentas para catalogar a diversidade de espécies, tanto características morfológicas, como também dados moleculares, bioacústicos, ecológicos, comportamentais e caracteres de formas larvais, no caso dos anfíbios (Dayrat 2005; Padial et al. 2010). O

uso concomitante de diferentes evidências proporciona maior confiabilidade na definição de linhagens genealógicas independentes e pode acelerar o processo de reconhecimento de novas espécies, além de ajudar na delimitação de espécies crípticas (Fouquet et al. 2007; Vieites et al. 2009; Miralles & Vences 2013). Estudos utilizando essa abordagem, realizados na região neotropical, em Madagascar e na Guiana Francesa, indicaram que a diversidade de anfíbios desses locais é, no mínimo, duas vezes maior do que a reconhecida atualmente (Vieites et al. 2009; Fouquet et al. 2007).

Para suprir parte do conhecimento precário existente sobre a composição da anurofauna, amostramos nove diferentes áreas de altitude na Mata Atlântica da Bahia, focando nas espécies que ocorrem no interior da floresta e em riachos. Além disso, utilizamos uma abordagem integrativa utilizando dados morfológicos e bioacústicos, aliados a análises moleculares para determinar o *status* taxonômico das espécies que não foram identificadas em nível específico. Nossos resultados demonstram que as diferentes áreas amostradas apresentam uma rica anurofauna e que ainda existe uma grande diversidade de espécies não descritas nessa região.

MATERIAL e MÉTODOS

- Áreas amostradas

Nove áreas de altitude foram amostradas na Mata Atlântica do sul da Bahia, são elas: Serra da Jibóia (ST - coordenadas: -12.84949 e -39.47663), Serra do Timbó (ST: -13.10668 e -39.66573), Parque Estadual de Wenceslau Guimarães (WG: -13.57198 e -39.71763), Serra do Corcovado (SC: -14.70288 e -39.59555), Serra da Pedra Lascada (PL: -14.77237 e -39.54088), RPPN Serra Bonita (SB: -15.39514 e -39.56618), Parque Nacional da Serra das Lontras (SL: -15.16243 e -39.34376), município de Macarani na RPPN Mata dos Passarinhos (MAC: -15.79071 e -40.51927) e o Parque Nacional do Alto do Cariri (AC: -16.45296 e -40.05886) (Figura 1). A altitude máxima dessas áreas varia entre 750 e 950 metros. Cada localidade foi amostrada durante sete a oito dias, por dois pesquisadores, entre novembro de 2014 e maio de 2015.

A definição dos limites altitudinais onde as Florestas Montanas começariam ao longo da Mata Atlântica, ainda é controverso. Alguns autores defendem que o limite mínimo é 600 m (Veloso 1992), enquanto outros sugerem 700 m de altitude (Oliveira-Filho & Fontes 2000). Dessa forma, optamos por realizar a amostragem em áreas acima de 650 m de altitude.

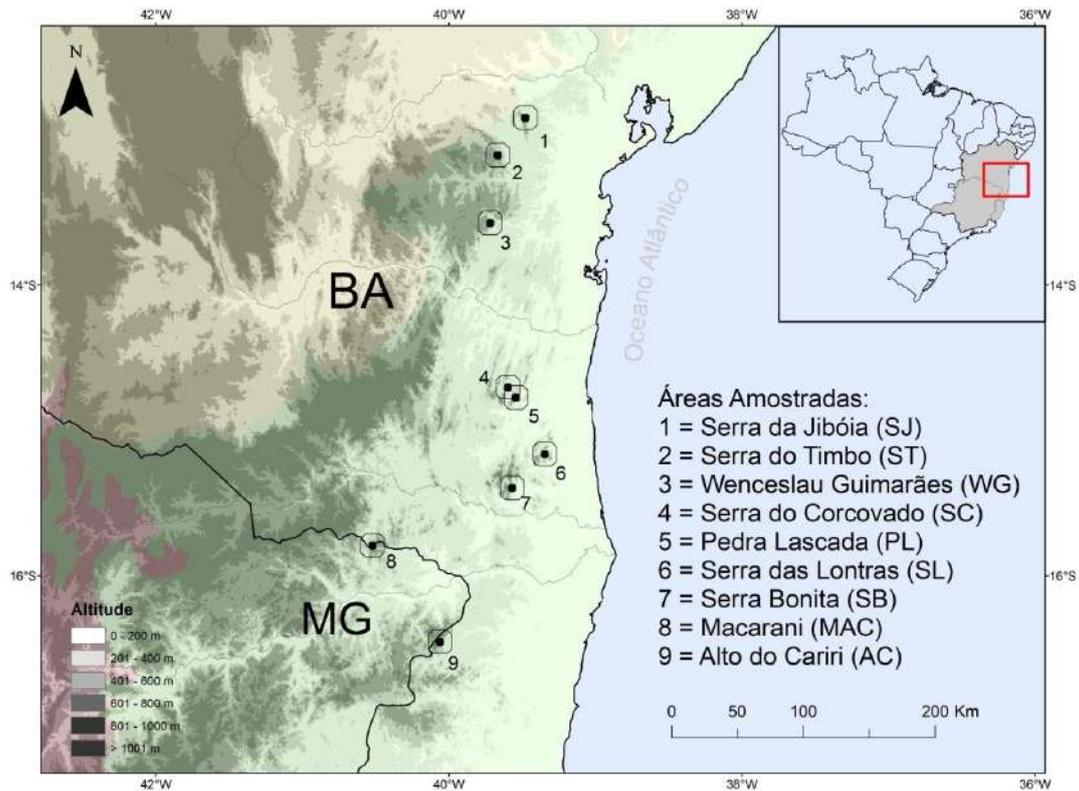


Figura 1. Localidades amostradas nas Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia. BA = Bahia e MG = Minas Gerais. Limites dos biomas Mata Atlântica (verde), Caatinga (amarelo) e Cerrado (vermelho).

- Amostragem

Em cada área foram instalados 30 transectos de 50 m de comprimento no interior da floresta, em áreas acima de 700 m de altitude, que eram vistoriados uma única vez durante 40 minutos por dois pesquisadores. Devido à falta de área disponível para implementar toda a amostragem padronizada em algumas localidades acima de 700 m de altitude, alguns transectos (no máximo 10% deles) foram instalados em áreas entre 650-700 m de altitude. Cada transecção ficava a uma distância mínima de 50 m, uma do outra. Outros três transectos de 150m no interior de riachos foram percorridos uma única vez por um período de 90 minutos. Preferencialmente essas transecções eram instalados em riachos diferentes, quando isso não era possível cada transecto de riacho ficava a uma distância mínima de 100 m um do outro. Dessa forma, em cada área foi realizado um esforço amostral de 20 horas/pesquisador de busca ativa no interior da floresta e 4 horas e 30 minutos em riachos. Devido a problemas logísticos ao longo das amostragens, em duas áreas o esforço amostral foi menor. Na Serra das Lontras foram vistoriados apenas 14 transectos no interior da floresta e nenhum em riacho e no Alto do Cariri foram amostrados 18 transectos florestais e dois transectos em riachos.

O esforço amostral foi direcionado para os anfíbios anuros dos topos de morro. Todavia, como a maioria das áreas visitadas não possuem lista de espécies publicadas para esse grupo taxonômico, fornecemos uma lista geral das espécies registradas durante a expedição que contemplam também os anfíbios anuros

registrados no entorno (incluindo áreas de baixadas) das localidades. Assim, além do esforço de coleta padronizado através das transecções, foram considerados encontros oportunistas durante o deslocamento da equipe ou amostragens pontuais em poças temporárias ou permanentes encontradas na região.

Para avaliar o esforço amostral realizado nos transectos, foram construídas curvas de rarefação com 1000 aleatorizações utilizando o número de indivíduos registrados no programa PAST 3.07. Foram geradas duas curvas, uma utilizando a abundância encontrada nos transectos do interior da floresta e outra com o número de indivíduos registrados nos transectos de riachos.

Utilizamos quatro estimadores de riqueza não paramétricos - Chao 2; Jackknife 1; Jackknife 2 e Bootstrap - (Magurran 1988; Gotelli & Colwell 2001) para extrapolar a riqueza de espécies nos transectos florestais e dos riachos, utilizando dados de presença e ausência em cada área amostrada, aleatorizados 1000 vezes, através do software PAST 3.07.

Todos os animais foram coletados mediante licença expedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (número 41199-1 e 6900-1/13708) com permissão dos administradores das reservas locais. Os espécimes-testemunhos serão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC).

- Análises moleculares

Para auxiliar na identificação e determinação do status taxonômico de possíveis espécies candidatas ou aquelas que pertencem a grupos com taxonomia não resolvida, sequenciamos o fragmento mitocondrial ribossomal 16S (*primers* = 16S_L: 5'- GCC TCG CTT GTT TAC CAA AAA C -3' (Palumbi 1996) e 16S_H: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' - Varela et al. 2007) para 56 espécimes amostrados pertencentes a seis diferentes gêneros (*Adelophryne*, *Fritziana*, *Pristimantis*, *Ischnocnema* e *Physalaemus*). Esse marcador é amplamente utilizado em estudos filogenéticos com anfíbios, auxiliando na delimitação de espécies novas para a ciência (Vences et al. 2005; Fouquet et al. 2007; Vieites et al. 2009).

Árvores filogenéticas foram reconstruídas para cada gênero sequenciado utilizando inferência Bayesiana (Material Suplementar S1). Sequências das espécies de interesse foram obtidas no *GenBank* de estudos relacionados (Faivovich et al. 2005; Canedo & Haddad 2012; Fouquet et al. 2012; Brusquetti et al. 2013; Lourenço et al. 2015; Castroviejo-Fisher et al. 2015). Os nomes utilizados para *Adelophryne* seguem Fouquet e colaboradores (2012). Além disso, tecidos obtidos fora da área de estudo, também foram sequenciados para auxiliar nas análises filogenéticas. Os protocolos utilizados para a extração, amplificação e sequenciamento das amostras podem ser conferidos no Material Suplementar S1, bem como os detalhes de como foram implementadas as análises filogenéticas.

Espécies candidatas foram definidas baseando-se na sua posição filogenética, na distância genética entre elas e as espécies relacionadas e, quando possível, com outra linha de evidência (morfológica e/ou acústica) (Vieites et al. 2009). Quando possível, definimos limiares baseados na distância genética entre espécies irmãs nominais, para cada um dos gêneros analisados (Vieites et al. 2009; Fouquet et al. 2014). A divergência genética entre as espécies de interesse foi calculada utilizando a distância-p não corrigida com 1000 réplicas de *Bootstrap* no programa Mega v 5.0 (Tamura et al. 2011). Adotamos a proposta de Vieites et al. (2009) e classificamos as espécies em candidatas confirmadas (CCS) quando existia outra linha de evidência (morfológica e/ou bioacústica) que sustentasse essa informação, além das análises moleculares ou não-confirmadas (UCS) quando existia apenas evidência molecular e os dados disponíveis eram insuficientes para essa avaliação. O termo espécies crípticas é utilizado nesse trabalho seguindo a definição que são duas ou mais espécies que são distintas, mas são classificadas previamente como iguais, devido à semelhança morfológica geral que impede sua plena identificação de imediato (Bickford et al. 2007; Fouquet et al. 2012). Essa classificação foi adotada, pois não examinamos minuciosamente todos os casos a morfologia das espécies candidatas para definir diferença entre elas e as espécies mais próximas.

RESULTADOS

Foram registradas 94 espécies de anfíbios anuros pertencentes a 13 famílias taxonômicas nas nove áreas amostradas (Tabela 1; Figuras 2-6). Desse total, 70 espécies foram encontradas nas Florestas Montanas (acima de 700 m de altitude) e 24 no entorno. Duas espécies (*Phasmahyla spectabilis* e *Bokermannohyla lucianae*) são classificadas como quase ameaçadas de extinção (NT) e cinco (*Cycloramphus migueli*; *Gastrotheca flamma*; *Phasmahyla timbo*; *Scinax strigilatus* e *Chiasmocleis* cf. *gnoma*) são consideradas com dados insuficientes (DD) para classificação do seu *status* de ameaça segundo a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Portarias MMA nº 444/2014, nº 445/2014).

Através da amostragem padronizada nos transectos foram encontrados 1473 indivíduos, sendo 1301 nos transectos florestais e 172 nos riachos. Das 66 espécies registradas nos transectos, 55 foram encontradas em transectos no interior da floresta (22 exclusivas) e 44 nos transectos dos riachos (11 exclusivas) (Tabela 1). Embora o esforço amostral e a abundância registrada tenham sido bem menores nos riachos, um número alto de espécies foi encontrado nesse ambiente.

Tabela 1. Lista das espécies encontradas em cada uma das nove áreas amostradas nas áreas de altitude da Mata Atlântica da Bahia, indicando a forma de registro de cada espécie. Amostragem em transectos florestais (T) em riachos (R) e em encontros oportunistas (O). Abreviatura das localidades segue o Material e Métodos.

Família / Espécies	Localidades								
	SJ	ST	WG	SC	PL	SL	SB	MAC	AC
AROMOBATIDAE									
<i>Allobates olfersioides</i> (Lutz, 1925)			O						
BRACHYCEPHALIDAE									

<i>Brachycephalus pulex</i> Napoli, Caramaschi, Cruz & Dias, 2011*						T	T		
<i>Ischnocnema verrucosa</i> Reinhardt & Lütken, 1862*			T			T	T	T, R	
<i>Ischnocnema</i> sp. 1 (gr. <i>parva</i>)*						T	T		T
<i>Ischnocnema</i> sp. 2 (gr. <i>parva</i>)*								T	
<i>Ischnocnema</i> sp. 3 (gr. <i>parva</i>)*							T		
BUFONIDAE									
<i>Dendrophryniscus proboscideus</i> (Boulenger, 1882)*								T	
<i>Frostius pernambucensis</i> (Bokermann, 1962)*	T, R	T, R							
<i>Frostius erythrophthalmus</i> Pimenta & Caramaschi, 2007*			T	T	T				
<i>Rhinella crucifer</i> (Wied-Neuwied, 1821)*	T, R	O	T	T	O	O	R	R	T
<i>Rhinella granulosa</i> (Spix, 1824)		O						O	
<i>Rhinella jimi</i> (Stevaux, 2002)	O	O			O				O
CENTROLENIDAE									
<i>Vitreorana</i> cf. <i>eurygnatha</i> (A. Lutz, 1925)*	R		O	O	R		R		R
<i>Vitreorana uranoscopa</i> (Müller, 1924)*			R			O			
CRAUGASTORIDAE									
<i>Haddadus binotatus</i> (Spix, 1824)*	T, R	T, R	T	T, R	T, R	T	T	T, R	T, R
<i>"Eleutherodactylus" bilineatus</i> (Bokermann, 1975)*	T, R	T	T, R	T	T	T	T, R	T, R	
<i>Pristimantis paulodutrai</i> (Bokermann, 1975)*	T, R	T, R	O	O	O				
<i>Pristimantis</i> sp. 1*	T, R	T	T		T, R				
<i>Pristimantis</i> sp. 2*			T						
<i>Pristimantis</i> sp. 3*			T, R		T, R	T	T, R		
<i>Pristimantis vinhai</i> (Bokermann, 1975)*	T, R	T	T, R	T, R	T, R				
CYCLORAMPHIDAE									
<i>Cycloramphus migueli</i> Heyer, 1988*		T							
<i>Thoropa miliaris</i> (Spix, 1824)*								R	R
ELEUTHERODACTYLIDAE									
<i>Adelophryne mucronatus</i> Lourenço-de-Moraes, Solé & Toledo 2012*	T	T	T, R						
<i>Adelophryne</i> sp. 2.*			T						
<i>Adelophryne</i> sp. 4*									T
<i>Adelophryne</i> sp. 8*				T		T	T	T, R	
HEMIPHRACTIDAE									
<i>Fritziana</i> sp.*								T	
<i>Gastrotheca flamma</i> Juncá & Nunes, 2008*	T								
<i>Gastrotheca megacephala</i> Izecksohn, Carvalho-e-Silva & Peixoto, 2009*		O				O		T, R	T, R
<i>Gastrotheca pulchra</i> Caramaschi & Rodrigues, 2007*	T, R	O		T, R	T, R				
<i>Gastrotheca recava</i> Teixeira et al. 2012*	T, R	T, R	T, R	T	R				T, R
HYLIDAE									
<i>Agalychnis aspera</i> (Peters, 1873)*	R								
<i>Aplastodiscus</i> cf. <i>weygoldti</i> (Cruz & Peixoto, 1985)*		R		R	R	O	T	R	T, R
<i>Aplastodiscus ibirapitanga</i> (Cruz, Pimenta & Silvano, 2003)*	R		R		O	O	T		O
<i>Aplastodiscus sibilatus</i> (Cruz, Pimenta & Silvano, 2003)*	T, R								
<i>Bokermannohyla capra</i> Napoli & Pimenta, 2009*	T, R	T, R	T, R	O					
<i>Bokermannohyla circumdata</i> (Cope, 1871)*							T, R		
<i>Bokermannohyla lucianae</i> (Napoli & Pimenta, 2003)*					O	T	R		
<i>Dendropsophus anceps</i> (Lutz, 1929)*				O			T		O
<i>Dendropsophus branneri</i> (Cochran, 1948)	O	O		O	O	O		O	O

<i>Dendropsophus decipiens</i> (Lutz, 1925)	O							O	
<i>Dendropsophus elegans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	O	O	O	O	O	O		O	O
<i>Dendropsophus haddadi</i> (Bastos & Pombal, 1996) *		O				O			
<i>Dendropsophus novaisi</i> (Bokermann, 1968) *		O		R	O				
<i>Dendropsophus minutus</i> (Peters, 1872)		O						O	O
<i>Dendropsophus aff. oliveirai</i>				O					
<i>Dendropsophus sp.</i>				O					
<i>Hypsiboas albomarginatus</i> (Spix, 1824)	O	O	O	O	O	O			O
<i>Hypsiboas albopunctatus</i> (Spix, 1824)								O	O
<i>Hypsiboas crepitans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	O	O		O	O			O	
<i>Hypsiboas exastis</i> (Caramaschi & Rodrigues, 2003) *	T	O	R		O	O			
<i>Hypsiboas faber</i> (Wied-Neuwied, 1821) *	T	O		T	R	O		O	O
<i>Hypsiboas pardalis</i> (Spix, 1824)								O	
<i>Hypsiboas pombali</i> (Caramaschi, Pimenta & Feio, 2004) *		R	R			O			
<i>Hypsiboas semilineatus</i> (Spix, 1824) *			R						
<i>Phasmahyla spectabilis</i> Cruz, Feio & Nascimento, 2008 *				R	R		R		R
<i>Phasmahyla timbo</i> Cruz, Napoli & Fonseca, 2008 *		R	R						
<i>Phyllodytes luteolus</i> (Wied-Neuwied, 1824) *								T	T
<i>Phyllodytes cf. kautskyi</i> Peixoto & Cruz, 1988 *	T, R	T	T	T	O	O	T	O	T, R
<i>Phyllodytes melanomystax</i> Caramaschi, Silva & Britto-Pereira, 1992 *	T, R		O		O				
<i>Phyllodytes wuchereri</i> (Peters, 1873) *	T, R	T	T, R	T	T	O	T		T
<i>Phyllodytes sp. 1</i> *				T, R	T	T	T, R		
<i>Phyllodytes sp. 2</i> *				T	T	T	O		T
<i>Phyllodytes sp. 3</i> *	O			T, R	T	O	T		T
<i>Phyllodytes sp. 4</i> *	O								
<i>Phyllodytes sp. 5</i> *			O, T						
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i> Boulenger, 1882 *		T	T		O			O	T
<i>Phyllomedusa nordestina</i> Caramaschi, 2006	O				O			O	
<i>Scinax alter</i> (Lutz, 1973)					O				
<i>Scinax argyreornatus</i> (Miranda-Ribeiro, 1926) *	T	T							T
<i>Scinax juncae</i> Nunes & Pombal, 2010	O	O			O				O
<i>Scinax cf. x-signatus</i> (Spix, 1824)	O	O	O		O				O
<i>Scinax eurydice</i> (Bokermann, 1968) *	T, R				T	O	T		
<i>Scinax pachychrus</i> (Miranda-Ribeiro, 1937)	O								
<i>Scinax strigilatus</i> (Spix, 1824) *		R	R		R	O	T, R		R
<i>Trachycephalus mesophaeus</i> (Hensel, 1867) *		T	R	O	O		T	O	
HYLODIDAE									
<i>Crossodactylus sp.</i> *	R					O			
LEPTODACTYLIDAE									
<i>Adenomera cf. thomei</i> Almeida & Angulo, 2006 *		O	O				O		
<i>Crossodactylodes septentrionalis</i> Teixeira et al. 2013 *						T			
<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)			O		O			O	O
<i>Leptodactylus cf. latrans</i> (Steffen, 1815) *	O	O	R		O			O	R, T
<i>Leptodactylus natalensis</i> Lutz, 1930 *	R								
<i>Leptodactylus troglodytes</i> Lutz, 1926		O							
<i>Physalaemus erikae</i> Cruz & Pimenta, 2004					O				
<i>Physalaemus kroyeri</i> (Reinhardt and Lütken, 1862)	O	O							

<i>Physalaemus</i> sp. 1 (gr. <i>signifer</i>)*	T								
<i>Physalaemus</i> sp. 2 (gr. <i>signifer</i>)*								O	T
<i>Physalaemus cuvieri</i>	O								
<i>Pseudopaludicola</i> sp.	O	O							
MICROHYLIDAE									
<i>Chiasmocleis</i> cf. <i>gnoma</i> Canedo, Dixo & Pombal, 2004 *		O							
<i>Chiasmocleis</i> cf. <i>schubarti</i> Bokermann, 1952 *		T		T					
ODONTOPHRYNIDAE									
<i>Proceratophrys renalis</i> (Miranda-Ribeiro, 1920) *								T, R	T, R
<i>Proceratophrys schirchi</i> (Miranda-Ribeiro, 1937) *	T, R	T						T, R	
Riqueza - geral	43	43	36	30	40	32	27	32	36
Riqueza - amostragem padronizada	27	22	27	19	18	13	25	16	24

* = espécies registradas > 650 m de altitude



Figura 2. a) *Allobates olfersioides*; b) *Brachycephalus pulex*; c) *Ischnocnema verrucosa*; d) *I.* sp. 1 (gr. *parva*); e) *I.* sp. 2 (gr. *parva*); f) *Dendrophryniscus proboscideus*; g) *Frostius pernambucensis*; h) *F. erythropthalmus*; i) *Rhinella crucifer*;

j) *R. granulosa*; l) *R. jimii*; m) *Vitreorana* cf. *eurygnatha*, n) *V. uranoscopa*; o) *Haddadus binotatus* e p) *Eleutherodactylus bilineatus*.



Figura 3. a) *Pristimantis paulodutraii*; b) *P.* sp. 3.; c) *P. vinhai*; d) *Cycloramphus migueli*; e) *Adelophryne* sp. 4; f) *Fritziana* sp.; g) *Gastrotheca* cf. *flamma*; h) *G. megacephala*; i) *G. pulchra*; j) *G. recava*; l) *Agalychnis aspera*; m) *Aplastodiscus* cf. *weygoldti*; n) *A. ibirapitanga*; o) *A. sibilatus* e p) *Bokermannohyla capra*.



Figura 4. a) *Dendropsophus haddadi*; b) *D. novaisi*; c) *D. minutus*; d) *Hypsiboas exastis*; e) *H. pombali*; f) *H. semilineatus*; g) *Phasmahyla spectabilis*; h) *P. timbo*; i) *Phyllodytes luteolus*; j) *P. cf. kautskyi*; l) *P. wuchereri*; m) *P. sp. 1*; n) *P. sp. 3*; o) *P. sp. 4* e p) *P. sp. 5*.



Figura 5. a) *Phyllomedusa burmeisteri*; b) *Scinax strigilatus*; c) *Crossodactylus* sp.; d) *Adenomera* cf. *thomei*; e) *Crossodactylodes septentrionalis*; f) *Physalaemus* sp. 1 (gr. *signifer*); g) *Chiasmocleis* cf. *gnoma*; h) *Proceratophrys renalis* e i) *P. schirchii*

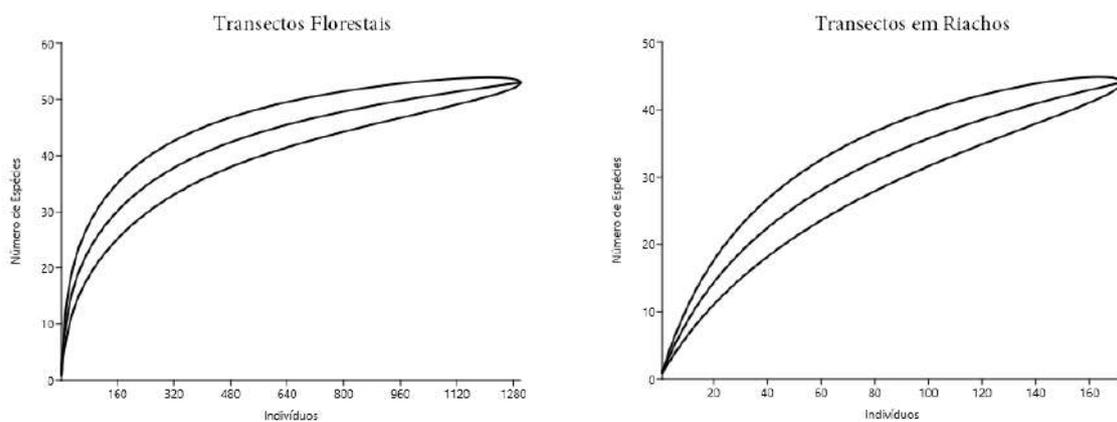


Figura 6. Curvas de rarefação utilizando o número total de indivíduos coletados nos transectos no interior da floresta (esquerda) e em riachos (direita) nas Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia.

De forma geral, as curvas de rarefação não atingiram a assíntota (Figura 6). A curva dos transectos florestais apresentou uma leve tendência à estabilização, mas ainda continua em ascensão, sendo muito mais acentuada a curva de rarefação dos riachos. Os estimadores de riqueza indicaram a possibilidade de encontrar entre 64 e 85 espécies nos transectos florestais e 51 a 65 espécies nos riachos (Tabela 2). Dessa forma, foram amostrados entre 65 e 86% da riqueza proposta pelos estimadores para os transectos.

A lista de espécies geral de cada área, incluindo os encontros oportunistas, apresentou entre 27 e 43 espécies (Tabela 1), similar a outros inventários na região (Silvano & Pimenta 2003; Dias et al. 2014b). O menor número de espécies encontrado na Serra Bonita, reflete o pouco deslocamento realizado pela equipe durante a amostragem. O alojamento nessa área é no alto do morro, relativamente próximo do local onde foram instalados os transectos e sem a presença de poças temporárias e permanentes, que são encontradas na base da serra ocasionando um menor número de espécies registradas por encontros oportunistas.

Tabela 2. Riqueza de espécies registradas nas nove áreas amostradas nos transectos com os valores obtidos através dos quatro estimadores de riqueza utilizados.

	TF	TR	GERAL
Riqueza	55	44	66
Chao 2	73.6 ± 10.6	53.7 ± 6.2	82 ± 8.5
Jacknife1	74.5 ± 5.0	60 ± 5.9	86.4 ± 5.9
Jacknife2	84.8	65.1	95.4
Bootstrap	63.9	51.6	75.6

*TF = Transectos florestais e TR = Transectos em riachos

Entre as áreas amostradas, a Serra da Jibóia, Wenceslau Guimarães e Serra Bonita foram os locais onde foi registrada a maior riqueza de espécies através da amostragem padronizada (Figura 7). A região do Alto do Cariri destaca-se pelo grande número de espécies registradas, mesmo sendo realizado um esforço amostral 40 % menor do que nas outras áreas. A menor riqueza encontrada na Serra das Lontras provavelmente reflete o menor esforço amostral realizado, o qual foi 60% menor que nas outras áreas.

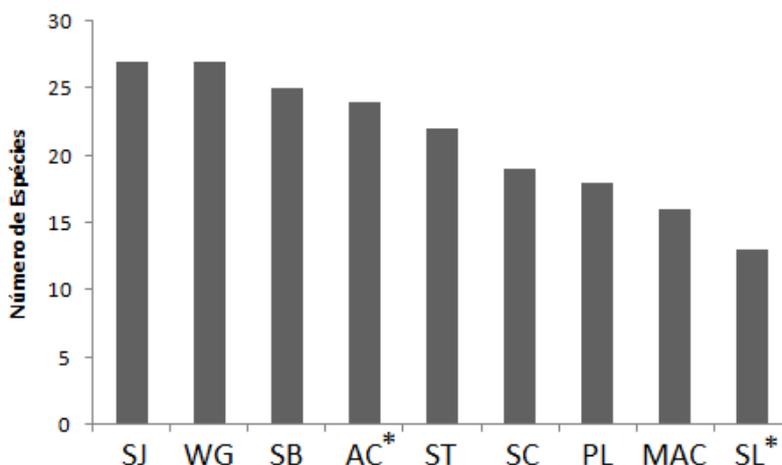


Figura 7. Número de espécies encontradas nos transectos florestais e em riachos (amostragem padronizada) em cada área pesquisada. * = esforço amostral menor.

- Análises moleculares

Durante as atividades de campo, 20 espécies não foram identificadas até o nível específico. Dessas, apenas três (*Pseudopaludicola* sp., *Crossodactylus* sp. e *Physalaemus* sp. 2) não foram sequenciadas nesse estudo. Além disso, *Dendropsophus* sp. representa uma nova espécie do grupo de *D. leucophyllatus*, confirmada através de morfologia, bioacústica e análises moleculares encontrada em áreas de baixada da Serra do Corcovado (Dias et al. no prelo).

As outras 16 espécies foram recuperadas nas análises filogenéticas como linhagens divergentes que não são associadas a nenhuma outra espécie nominal, apresentando alta distância molecular entre as espécies relacionadas e foram consideradas como espécies candidatas. Dessas, cinco espécies são candidatas não confirmadas (UCS), e as outras 11 foram classificadas como candidatas confirmadas (CCS), pois foram encontradas pelo menos uma outra evidência, além da molecular, seja morfológica ou bioacústica, entre elas e as espécies relacionadas (Tabela 3). Maiores informações sobre as análises filogenéticas e sobre as considerações morfológicas e bioacústicas dessas espécies são discutidas com mais detalhes no Material Suplementar S2.

Tabela 3. Resumo das informações utilizadas para delimitar as espécies candidatas confirmadas (CCS) e não confirmada (UCS). **M** = morfologia e **B** = bioacústica.

Espécie	Divergência entre as espécies relacionadas	Divergência dentro da espécie	Outras linhas de evidência entre as espécies relacionadas	Diagnose	Comentários [#]
<i>Fritziana</i> sp.	6.7%	-	M e B	CCS	
<i>Physalaemus</i> sp. (gr. <i>signifer</i>)	6.9 - 9.4 %	-	B	CCS	
<i>Ischnocnema</i> sp. 1 (gr. <i>parva</i>)	5.3 %	2.3 - 5.2 %	-	UCS	Reavaliar populações do AC*.
<i>I.</i> sp. 2 (gr. <i>parva</i>)	5.3 %	-	-	UCS	
<i>I.</i> sp. 3 (gr. <i>parva</i>)	> 13%	-	-	UCS	
<i>Pristimantis</i> sp. 1	4.7 - 6.9%	2.3 %	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 2	4.7 - 6.9%	-	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 3	> 12%	5.1 %	M e B	CCS	
<i>Adelophryne</i> sp. 2	> 12%	3.4 %	-	UCS	Pode ser <i>A. pachydactyla</i>
<i>A.</i> sp. 4	> 10.7 %	1.6 %	M	CCS	
<i>A.</i> sp. 8	> 11 %	2.7 - 3.7 %	M	CCS	
<i>Phyllodytes</i> sp. 1	7.6 %	1.1 - 8.0 %	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 2	> 11 %	-	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 3	> 6.6 %	-	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 4	> 10 %	1.1 %	M e B	CCS	
<i>P.</i> sp. 5	> 8%	-	-	UCS	Morfologia semelhante a <i>P.</i> sp. 1

* AC = Alto do Cariri, # = maiores informações no Material Suplementar II

DISCUSSÃO

Um grande número de espécies foi encontrado nas áreas de altitude da Mata Atlântica da Bahia. Considerando que esse estado possui aproximadamente 190 espécies de anfíbios (Dias et al. 2014; Frost 2015), aproximadamente 50% delas estão presentes nos topos de morro estudados.

Atualmente, a Serra Bonita é uma das localidades com a maior riqueza de anfíbios da Mata Atlântica (Dias et al. 2014a). Através da amostragem dos transectos florestais e em riachos foi possível encontrar 70% das espécies registradas para as áreas de altitude (somente para aquelas encontradas acima de 650 m) da Serra Bonita, onde foi realizado um esforço amostral de 16 meses (Dias 2011). Isso demonstra que a metodologia proposta nesse trabalho foi adequada para amostrar um percentual considerável da comunidade de anfíbios das Florestas Montanas da Bahia. Contudo, as curvas de rarefação não estabilizaram, provavelmente pela presença de muitas espécies encontradas apenas uma ou duas vezes ao longo da amostragem. Todavia, o mais interessante é que na comparação do número de espécies registradas durante a amostragem padronizada do presente estudo, outras localidades revelaram uma riqueza superior (27 espécies tanto em Wenceslau Guimarães, como na Serra da Jibóia) à encontrada na Serra Bonita (25 espécies). Isso reforça a ideia que a realização de estudos sistemáticos mais abrangentes que busquem inventariar localidades de altitude na região, devem encontrar um número alto de espécies de anfíbios, similar ao registrado na Serra Bonita (Dias et al. 2014a), principalmente nas áreas de Wenceslau Guimarães, Serra da Jibóia e no Alto do Cariri.

O encontro de *hotspots* de diversidade de anfíbios na Bahia não é inesperado. Essa região foi estimada como área de estabilidade durante as últimas glaciações para as espécies de anuros de baixada, amplamente distribuídas na Mata Atlântica (Carnaval et al. 2009). Para as espécies menos tolerantes ao calor, as áreas de altitude da região parecem ter funcionado como refúgios bioclimáticos durante os períodos interglaciais (Capítulo II). Além disso, as florestas ombrófilas do leste da Bahia não parecem ter sido impactadas durante a última glaciação (Leite et al. 2015), ao contrário de outras regiões serranas do sudeste (Serra do Mar e Serra da Mantiqueira), onde existem evidências que uma vegetação mais aberta predominou nas partes altas dessas áreas (Behling 2008). A estabilidade climática e a possível permanência de florestas possivelmente permitiriam a manutenção da biota da região por longo prazo e conseqüentemente, maior diversificação de sua fauna.

Entre os registros encontrados ressaltamos a ampliação da distribuição de *Vitreorana uranoscopa* e *Adelophryne mucronatus* para Wenceslau Guimarães que fica 200 km ao norte da Serra Bonita (Dias et al. 2014a). Reportamos a Serra das Lontras como a segunda localidade conhecida para *Brachycephalus pulex* (Napoli et al. 2011). Nesse mesmo local encontramos dois indivíduos de *Crossodactylodes septentrionalis*, espécie que era conhecida apenas do holótipo (Teixeira et al. 2013). Como a espécie foi descrita baseado em uma fêmea, um macho adulto coletado nas atividades de campo está sendo utilizado por outros pesquisadores para descrever um possível dimorfismo sexual em uma revisão taxonômica do gênero.

Também registramos pela primeira vez a ocorrência do gênero *Fritziana* no estado da Bahia. Anteriormente, as espécies desse gênero só eram conhecidas para regiões entre o Rio Grande do Sul e o Espírito Santo (Frost 2015; Franz & Mello 2015).

Apenas quatro espécies (*Brachycephalus pulex*, *Proceratophrys sanctaritae*, *Crossodactylodes septentrionalis* e *Dendrophyniscus oreites*) conhecidas para a Bahia, são restritas as áreas de altitude da Mata Atlântica do estado, sendo que as duas últimas foram descritas baseado apenas no holótipo (Napoli et al. 2011; Teixeira et al. 2013; Recoder et al. 2010; Cruz & Napoli 2010). O número de espécies típicas e provavelmente restritas a esses ambientes no estado é no mínimo três vezes maior e composta principalmente por espécies desconhecidas para a ciência.

Consideramos que 11 espécies encontradas no presente estudo devem ser restritas as Florestas Montanas da Bahia (*Brachycephalus pulex*, *Ischnocnema* sp. 1 (gr. *parva*), *I.* sp. 2 (gr. *parva*), *I.* sp. 3 (gr. *parva*), *Pristimantis* sp. 2, *P.* sp. 3, *Adelophryne* sp. 8, *Fritziana* sp., *Crossodactylodes septentrionalis*, *Physalaemus* sp. 1 (gr. *signifer*) e *Bokermannohyla circumdata*). Nenhuma delas foi encontrada em áreas de baixada pela nossa equipe ou em outros inventários realizados na região (Silvano & Pimenta 2003; Juncá 2006; Bastazini et al. 2007; Camurugi et al. 2010; Dias et al. 2014b). *Ischnocnema verrucosa* é restrita a áreas de altitude na Bahia (Orrico 2009; Dias et al. 2014a; esse estudo), contudo pode ser encontrada em altitudes mais baixas (390m), no município de Areia Branca em Minas Gerais (Silva et al. 2013).

Anfíbios, além de possuírem baixa capacidade de dispersão, necessitam de intervalos específicos de temperatura e umidade para sobreviverem (Buckley & Jetz 2007; Smith & Green 2005). Em um cenário de mudanças climáticas isso pode ser um problema (Pounds et al. 2006), principalmente para as espécies de altitude da região. Embora essas áreas sejam estimadas como os futuros refúgios climáticos, isso deve funcionar para espécies de baixadas que podem fazer deslocamento vertical, em busca de condições climáticas mais adequadas (Brodie et al. 2012). Contudo, para as espécies restritas aos topos do morro, essa possibilidade pode não existir e talvez as mesmas não tenham tempo suficiente para se adaptar a essas novas condições abióticas.

Nossos dados demonstraram que um grande número de espécies consegue utilizar as Florestas Montanas da região. Como dificilmente essas áreas de altitude da Mata Atlântica baiana ultrapassam os 900 m de altitude, as mudanças abióticas associadas ao aumento da altitude podem não ser restritivas para muitas espécies que são típicas de áreas de baixada. Entretanto, essas mudanças de temperatura e umidade parecem ser suficientes para limitar a distribuição de alguns táxons às partes mais elevadas dessas serras, principalmente das espécies de desenvolvimento direto.

Em regiões neotropicais com grande diversidade de espécies, a ausência de informações sobre a distribuição geográfica das espécies é uma das principais limitações na elaboração de estratégias de conservação (Bini et al. 2006). A amostragem de nove diferentes áreas nas Florestas Montanas da Mata

Atlântica baiana, preenche parte dessa lacuna para os anfíbios dessa região, fornecendo dados inéditos e sobre um ambiente ainda pouco explorado e considerado de alta prioridade para conservação.

- *Diversidade críptica e espécies candidatas*

Através de uma abordagem integrativa utilizando dados morfológicos e bioacústicos, aliados a análises moleculares, foi possível determinar uma grande quantidade de espécies não descritas das Florestas Montanas da Bahia, um acréscimo de quase 10% para a anurofauna do estado. Considerando que apenas nos últimos 12 anos foram descritas aproximadamente 25% (n = 44) dos anfíbios do estado (Frost 2015), nossos resultados demonstram que além da diversidade estar subestimada, existe muito trabalho taxonômico a ser feito.

Isso é preocupante, levando em conta o fato que os anfíbios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados do mundo (Stuart et al. 2008) e muitas dessas espécies foram encontradas em áreas de altitude que possuem ambientes diferenciados, com tipologias vegetacionais e condições abióticas que não são comuns na região. Devido à especificidade de hábitat dessas espécies e ocorrência conhecida para poucas localidades é possível que algumas delas já estejam ameaçadas de extinção, antes mesmo de serem reconhecidas pela comunidade em geral. Como a tomada de decisão na priorização de áreas para conservação é baseada, principalmente, nas espécies conhecidas para determinada região e as estimativas de espécies não descritas, geralmente não são levadas em consideração (Vieites et al. 2009), é essencial que essas espécies sejam formalmente descritas e estudadas para avaliar a real situação de suas populações.

Entretanto, os taxonomistas que trabalham com anfíbios possuem um grande desafio pela frente. Muitas espécies desse grupo taxonômico apresentam morfologia extremamente conservada (Bossuyt & Milinkovitch 2000), o que muitas vezes dificulta a implementação de diagnoses baseadas apenas na morfologia externa (Padial et al. 2009). Com a popularização e o avanço das análises moleculares é possível acessar a diversidade de anfíbios de uma forma diferente, sendo uma ferramenta útil, relativamente barata e rápida para auxiliar na identificação de linhagens evolutivas independentes e definir prioridades taxonômicas dentro de regiões com alta riqueza de espécies (Vences et al. 2005; Fouquet et al. 2007; Vieites et al. 2009). Essa abordagem integrativa está sendo realizada em alguns estudos com os anfíbios da Mata Atlântica, incorporando dados bioacústicos, genéticos e morfológicos incluindo osteologia, alcançando resultados satisfatórios na resolução de problemas taxonômicos e na delimitação de espécies crípticas e novas para a ciência para esse bioma (e.g. Teixeira et al. 2012; Gehara et al. 2013; Fouquet et al. 2014; Condez et al. 2016).

Nossa iniciativa de sequenciamento para acessar espécies candidatas na área estudada foi limitada, tanto geograficamente, como pela baixa amplitude de linhagens sequenciadas. Mesmo assim, foram obtidos resultados surpreendentes para as Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia, auxiliando na

identificação das espécies encontradas que possuem taxonomia controversa e permitindo a definição de diferentes espécies candidatas. Projetos de pesquisa mais abrangentes que contemplem o sequenciamento de uma ampla variedade de exemplares ao longo desse bioma, devem ser estimulados para acessar a diversidade críptica encontrada entre os anfíbios da Mata Atlântica. Provavelmente esses estudos demonstrarão que a riqueza da anurofauna desse bioma deve ser muito maior do que a encontrada atualmente, semelhante aos resultados obtidos em outras regiões neotropicais (Fouquet et al. 2007; Vieites et al. 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bastazini, C. V., Munduruca, J. F. V., Rocha, P. L. B., Napoli, M.F. 2007. Which environmental variables better explain changes in anuran community composition? a case study in the restinga of Mata de São João, Bahia, Brazil. *Herpetologica* 63: 459–471.
- Behling, H. 2008. Tropical Mountain Forest dynamics in the Mata Atlantica and northern Andean biodiversity hotspot during the late Quaternary. *Biodiversity and Ecology Series 2*: 26–3.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22:148–155.
- Bini, L. M., Diniz-Filho, J. A. F., Rangel, T. F. L. V. B., Bastos, R. P., Pinto, M. P. 2006. Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. *Diversity and Distributions* 12:475–482.
- Bossuyt, F. & Milinkovitch, M. C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascan and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6585–6590.
- Brodie, J., Post, E., W.F. Laurance. 2012. Climate change and tropical biodiversity: A new focus. *Trends in Ecology & Evolution* 27:145–150.
- Brusquetti, F., Thomé, M. T. C., Canedo, C., Condez, T. H., Haddad, C. F. B. 2013. A new species of *Ischnocnema parva* species series (Anura, Brachycephalidae) from northern state of Rio de Janeiro, Brazil. *Herpetologica* 69: 175–185.
- Buckley, L. B. & Jetz, W. 2007. Environmental and historical constraints on global patterns of Amphibian richness. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274: 1167–1173.
- Camurugi, F., Lima, T. M., Mercês, E. A., Juncá, F. A. 2010. Anuros da Reserva Ecológica da Michelin, Município de Igrapiúna, Estado da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica* 10(2): 305–312.
- Canedo, C., & Haddad, C. F. B. 2012. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 610–620.

- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785–789
- Castroviejo-Fisher, S., Padial, J. M., De la Riva, I., Pombal-Jr, J. P., da Silva, H. R., Rojas-Runjaic, F. J. M., Medina-Méndez, E., Frost, D. R. 2015. Phylogenetic systematics of egg-brooding frogs (Anura: Hemiphractidae) and the evolution of direct development. *Zootaxa* 4004: 1–75.
- Chapman, A. D. 2009. Numbers of Living Species in Australia and the World, Canberra: Australian Biological Resources Study.
- Condez, T. H., Monteiro, J. P. de C., Comitti, E. J., Garcia, P. C. de A., Amaral, I. B., Haddad, C. F. B. 2016. A new species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa* 4083: 40–56.
- Cruz, C. A. G. & Feio, R. N. 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Pp. 117-126. In *Herpetologia no Brasil II*. Nascimento, L.B. & Oliveira, M.E. (Eds.). Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Cruz, C. A. G., & Napoli, M. F. 2010. A new species of smooth horned frog, genus *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae), from the Atlantic Rainforest of eastern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2660: 57–67.
- Curcio, F. F., Nunes, P. M. S., Argolo, A. J. S., Skuk, G., Rodrigues, M. T. 2012. Taxonomy of the South American dwarf boas of the genus *Tropidophis* Bibron, 1840, with the description of two new species from the atlantic forest (Serpentes: Tropidophiidae). *Herpetological Monographs* 26(1): 80-121.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- Dias, I. R. 2011. Composição e distribuição espacial dos anfíbios ao longo de um gradiente altitudinal na RPPN Serra Bonita, Sul da Bahia. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Zoologia Aplicada da Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Dias, I. R., Argôlo, A. J. S., Haddad, C. F. B., Orrico, V. D. (aceito). The 100th: An Appealing New Species of *Dendropsophus* (Amphibia: Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. *Plos One*
- Dias, I. R., Medeiros, T. T., Vila-Nova, M. F., Solé, M. 2014a. Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotspot within Brazil's Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.
- Dias, I. R., Mira-Mendes, C. V., Solé, M. 2014b. Rapid inventory of herpetofauna at the APA (Environmental Protection Area) of the Lagoa Encantada and Rio Almada, Southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 7: 627-637.
- Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. de A., Frost, D. R., Campbell, J. A., Wheeler, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240.

- Fjeldså, J., Bowie, R. C. K., Rahbek, C. 2012. The role of mountain ranges in the diversification of birds. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 43:249–265.
- Fouquet, A., Cassini, C. S., Haddad, C. F. B., Pech, N., Rodrigues, M. T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855–870.
- Fouquet, A., Cassini, C. S., Haddad, C. F. B., Pech, N., Rodrigues, M. T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855–870.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmell, N. J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2(10): e1109.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J. M., Orrico, V. G. D., Lyra, M. L., Roberto, I. J., Kok, P. J. R., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T. 2012. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 547–561.
- Franz, I. & Mello, M. H. 2015. *Fritziana* aff. *fissilis* (Miranda-Ribeiro, 1920) (Anura, Hemiphractidae): the first hemiphractid for the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Check List* 11(2): 1594.
- Frost, D. R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gehara, M., Canedo, C., Haddad, C. F. B., Vences, M. 2013. From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conservation Genetics* 14: 973–982.
- Giam, X., Scheffers, B. R., Sodhi, N. S., Wilcove, D. S., Ceballos, G., Ehrlich, P. R. 2011. Reservoirs of richness: least disturbed tropical forest are centres of undescribed species diversity. *Proceedings of the Royal Society* 279: 67-76.
- Giulietti, A. M., Pirani, J. R. & Harley, R. M. 1997. Espinhaço range region. p. 397–404 In. *Centres of Plant Diversity*. Davis, S. D., Heywood, V. H., Herrera–MacBride, O., Villa–Lobos, J., Hamilton, A. C. (Eds.). The Americas. WWF–IUCN, Washington.
- Gotelli, N. J. & Colwell, R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379–391.
- Haddad, C. F. B., Toledo, L. F., Prado, C. P. A., Loebman, D., Gasparini, J. L., Sazima, I. 2013. *Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology*. Ed. Anolisbooks, São Paulo.

- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A et al. (2010) The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science* 330(6010): 1503–1509.
- Juncá, F. A. 2006. Diversidade e uso de hábitat por anfíbios anuros em duas localidades de Mata Atlântica, no norte do Estado da Bahia. *Biota Neotropica* 6(2): 1–8.
- Kohler, T. & Maselli, D. 2009. *Mountains and Climate Change. From Understanding to Action*. Berne: Geogr. Bernesia
- Leite, Y. L., Costa, L. P., Loss, A. C., Rocha, R. G., Batalha-Filho, H., Bastos, A. C., Quaresma, V. S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M., Pardini, R. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *PNAS* 113: 1008-1013.
- Lourenço, L. B., Targueta, C. P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P. C. de A., de Andrade, G. V., Haddad, C. F. B., Recco-Pimentel, S. M. 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92: 204–216.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Martinelli, G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 587-597.
- Miralles, A. & Vences, M. 2013. New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. *PLoS ONE* 8: e68242.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2007. Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Atualização— Portaria MMA No. 9, de 23 de janeiro de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, série Biodiversidade, Distrito Federal, Brasil.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. 2000. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Napoli, M. F., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G., Dias, I. R. 2011. A new species of flea-toad, genus *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2739:33–40.
- Oliveira-Filho, A. T. & Fontes, M. A. L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32(4b):793-810.
- Orrico, V. D. 2010. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Ischnocnema verrucosa* Reinhardt and Lütken, 1862: Distribution extension to northeastern Brazil. *Check List* 6: 246-247.
- Orrico, V. D. 2010. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Ischnocnema verrucosa* Reinhardt and Lütken, 1862: Distribution extension to northeastern Brazil. *Check List* 6: 246-247.

- Padial, J. M., Castroviejo-Fisher, S., Kohler, J., Vilà, C., Chaparro, J. C. De la Riva, I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta* 38: 431–447.
- Padial, J. M., Miralles, A., Riva, I. & Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7(16): 1-14.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc, pp. 205–247.
- Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G. A., Still, C. J., Young, B. E. 2006. Widespread Amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: 161–167.
- Recorder, R. S., Teixeira, M., Cassimiro, J., Camacho, A., Rodrigues, M. T. 2010. A new species of *Dendrophryniscus* (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2642:36–44.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Rodrigues, M. T., Teixeira Jr, M., Recorder, R. S., Dal Vechio, F., Damasceno, R., Pellegrino, K. C. M. 2013. A new species of *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae) with four fingers from the Atlantic Forest central corridor in Bahia, Brazil. *Zootaxa* 3635(4): 459–475.
- Silva, E. T., Santos, P. S., Coelho, H. L., Viana, R.S., Heitor, R. C., Garcia, P. C. A. 2013. New records of *Ischnocnema verrucosa* Reinhart and Lütken, 1862 and *I. surda* Canedo, Pimenta, Leite and Caramaschi, 2010 (Anura, Brachycephalidae) in Minas Gerais state, Brazil. *Check List* 9:1062-1066.
- Silvano, D. L. & Pimenta, B. V. S. 2003. Diversidade de anfíbios na Mata Atlântica do Sul da Bahia. In: Prado, P. I., Landau, E. C., Moura, R. T., Pinto, L. P. S., Fonseca, G. A. B., Alger, K (Eds) *Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia* CD-ROM, Ilhéus, IESB/CI/CABS/ UFMG/UNICAMP.
- Smith, M. A. & Green, D. M. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in Amphibian ecology and conservation: are all Amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28:110–128.
- Stattersfield A. J., Crosby M. J., Long A. J., Wege, D. C. 1998. *Endemic Bird Areas of the World*. Cambridge (UK): BirdLife International.
- Stuart, S. N., Hoffmann, M., Chanson, J. S., Cox, N. A., Berridge, R. J., Ramani, P., Young, B. E. 2008. *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain, IUCN, Gland, Switzerland and Conservation International, Arlington, Virginia.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Teixeira, M., Jr., Vechi, F. D., Recoder, R. S., Carnaval, A. C. O. Q., Strangas, M., Damasceno, R. P., de Sena, M. A., Rodrigues, M. T. 2012. Two new species of marsupial tree-frogs genus *Gastrotheca* Fitzinger, 1843 (Anura, Hemiphractidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* 3437: 1–23.
- Teixeira, M., Recoder, R. S., Amaro, R. C., Damasceno, R. P., Cassimiro, J., Rodrigues, M. T. 2013. A new *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura:Leptodactylidae: Paratelmatobiinae) from the highlands of the Atlantic Forests of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 3702: 459–472.
- Veloso, H. P. 1992. Sistema fitogeográfico. In *Manual técnico da vegetação brasileira*. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, p. 9-38.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D. R. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2(1):1-12.
- Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F., Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8267-8272.
- Wheeler, Q. D., Knapp, S., Stevenson, D. W. et al. 2012. Mapping the biosphere: Exploring species to understand the origin, organization, and sustainability of biodiversity. *Systematics and Biodiversity* 10(1): 1-20.
- Wiens, J. J. & Servedio, M. R. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proc R Soc B* 267(1444): 631–636.

Material Suplementar

S1 - Protocolo de Extração, Amplificação, Sequenciamento e Análises moleculares

O DNA foi extraído das amostras de tecidos musculares utilizando o kit *Wizard® Genomic Purification* da Promega, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram amplificadas utilizando o primer 16S_L (5'- GCC TCG CTT GTT TAC CAA AAA C -3' - Palumbi 1996) e 16S_H (5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' - Varela et al. 2007). Cada reação de PCR apresentava um volume final de 20 µL, sendo composto por 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,65 µL de solução de dNTP (10 mM para cada nucleotídeo), 0,8 µL de cada primer (10 µM), 0,2 µL de Taq e 1,75 µL de DNA. O número de campo dos tecidos e dos testemunhos, com as localidades, podem ser encontradas na Tabela S1.

As condições de amplificação consistiam de uma etapa inicial de desnaturação com temperatura de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C de desnaturação por 60 segundos, 53-55 °C por 60 segundos de anelamento e 72°C durante 60 segundo de extensão e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos. A amplificação e a qualidade dos produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e corados com Gel Green. Posteriormente, as amostras foram purificadas com PEG 8000 (Polietilenoglicol) conforme o protocolo de Paithankar & Prasad (1991) e sequenciadas através do método de dideoxynucleotídeos terminais com reagentes do Kit Big Dye v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies) no sequenciador automático modelo ABI 3500 XL (Life Technologies).

O alinhamento das sequências foi feito no MAFFT 7 (Kato 2013) utilizando a estratégia de alinhamento Q-INS-i que leva em consideração a estrutura secundária do RNA. Para estimar o melhor modelo evolutivo para a análise filogenética foi utilizado o PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear et al. 2012), através do critério de informação Akaike (AIC). Para todos os casos o modelo evolutivo estimado foi o GTR + I + G. A árvore filogenética foi estimada por inferência Bayesiana no MrBayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) e as corridas foram realizadas no CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller 2010). Realizamos duas corridas independentes com 50-70 milhões de gerações com quatro cadeias de MCMC (Markov Chain Monte Carlo), amostrando a cada 10000 árvores. A convergência e a qualidade das corridas (ESS > 200) foram avaliadas no Tracer 1.6 e um burn-in de 10% foi aplicado para todas as análises.

Tabela S1. Lista dos exemplares sequenciados com as respectiva localidade de coleta.

Espécie	Nº de Campo	Localidade	Município
<i>Adelophryne gladulata</i>	MZUESC 12180	-	Santa Teresa -ES
<i>A. mucronatus</i>	ID706	Estação Ecológica Wenceslau Guimarães	Wenceslau Guimarães
<i>A. mucronatus</i>	ID719	Estação Ecológica Wenceslau Guimarães	Wenceslau Guimarães
<i>A. sp. 2</i>	ID223	Fazenda Provisão	Ilhéus
<i>A. sp. 2</i>	ID672	Estação Ecológica Wenceslau Guimarães	Wenceslau Guimarães
<i>A. sp. 2</i>	ID729	Estação Ecológica Wenceslau Guimarães	Wenceslau Guimarães
<i>A. sp. 2</i>	ID937	Rserva Ecológica da Michelin	Igrapiuna
<i>A. sp. 4</i>	ID620	Alto do Cariri	Guaratinga
<i>A. sp. 8</i>	ID57	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>A. sp. 8</i>	ID79	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>A. sp. 8</i>	ID82	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>A. sp. 8</i>	ID205	Serra do Corcovado	Almadina
<i>A. sp. 8</i>	ID321	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>A. sp. 8</i>	ID334	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>A. sp. 8</i>	ID879	Serra das Lontras	Arataca
<i>A. sp. 8</i>	ID880	Serra das Lontras	Arataca
<i>Fritziana sp.</i>	ID339	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>F. sp.</i>	ID402	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>Ischnocnema sp. 1 (gr. parva)</i>	ID78	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>I. sp. 1 (gr. parva)</i>	ID877	Serra das Lontras	Arataca
<i>I. sp. 1 (gr. parva)</i>	ID878	Serra das Lontras	Arataca
<i>I. sp. 1 (gr. parva)</i>	ID625	Parque Nacional do Alto do Cariri	Guaratinga
<i>I. sp. 2 (gr. parva)</i>	ID164	-	Barra do Choça
<i>I. sp. 2 (gr. parva)</i>	ID165	-	Barra do Choça
<i>I. sp. 2 (gr. parva)</i>	IDIA18	-	Barra do Choça
<i>I. sp. 2 (gr. parva)</i>	ID320	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>I. sp. 3 (gr. parva)</i>	ID84	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>Phyllodytes cf. kautsky</i>	ID265	Pedra Lascada	Barro Preto
<i>P. cf. kautsky</i>	ID1018	-	Itabela
<i>P. cf. kautsky</i>	ID1064	RPPN Michelin	Igrapiuna
<i>P. cf. luteolus</i>	ID314	-	Barra do Choça
<i>P. cf. luteolus</i>	ID635	Parque Nacional do Alto do Cariri	Guaratinga
<i>P. cf. luteolus</i>	ID409	RPPN Mata dos Passarinhos	Macarani
<i>P. sp. 1</i>	ID106	RPPN Serra Bonita	Camacan
<i>P. sp. 1</i>	ID876	Serra das Lontras	Arataca
<i>P. sp. 1</i>	ID200	Serra do Corcovado	Almadina
<i>P. sp. 2</i>	ID105	-	Una
<i>P. sp. 2</i>	ID1010	Acuipe	Ilhéus
<i>P. sp. 3</i>	ID840	Serra da Jiboia	Santa Terezinha
<i>P. sp. 4</i>	ID854	Serra da Jiboia	Santa Terezinha
<i>P. sp. 5</i>	ID699	Estação Ecológica Wenceslau Guimarães	Wenceslau Guimarães
<i>P. wuchereri</i>	ID268	Pedra Lascada	Barro Preto
<i>Physalemus sp. 1 (gr. signifer)</i>	ID758	Serra da Jiboia	Santa Terezinha
<i>P. sp. 1 (gr. signifer)</i>	ID761	Serra da Jiboia	Santa Terezinha

Literatura Citada - S1

Katoh, S. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.

Paithankar, K. R., Prasad, K. S. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 19: 1346.

Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular systematics*. Sinauer Associates 205–247.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Varela, E. S., Beasley, C. R., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, N. S., Tagliaro, C. H. 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal Molluscan Studies* 73: 229-234.

Material Suplementar

S2 - Análises filogenéticas, considerações taxonômicas e definição das espécies candidatas

- *Fritziana*

A árvore filogenética obtida (Figura S1) recuperou a família Hemiphractidae como monofilética com alto suporte em relação a *Allophryne relicta*. Todos os gêneros de Hemiphractidae são agrupados no mesmo clado com alto suporte, exceto *Gastrotheca* com um suporte mediano (0.88). Nenhuma relação entre os gêneros de Hemiphractidae é obtida. A amostra de *Fritziana* sp. MAC agrupou com *F. ohausi* com alto suporte. A distância p não corrigida entre essas duas espécies é de 6.7%. A divergência entre a *F.* sp. MAC e as outras espécies do gênero variou entre 6.7 e 9.9% (Tabela S1).

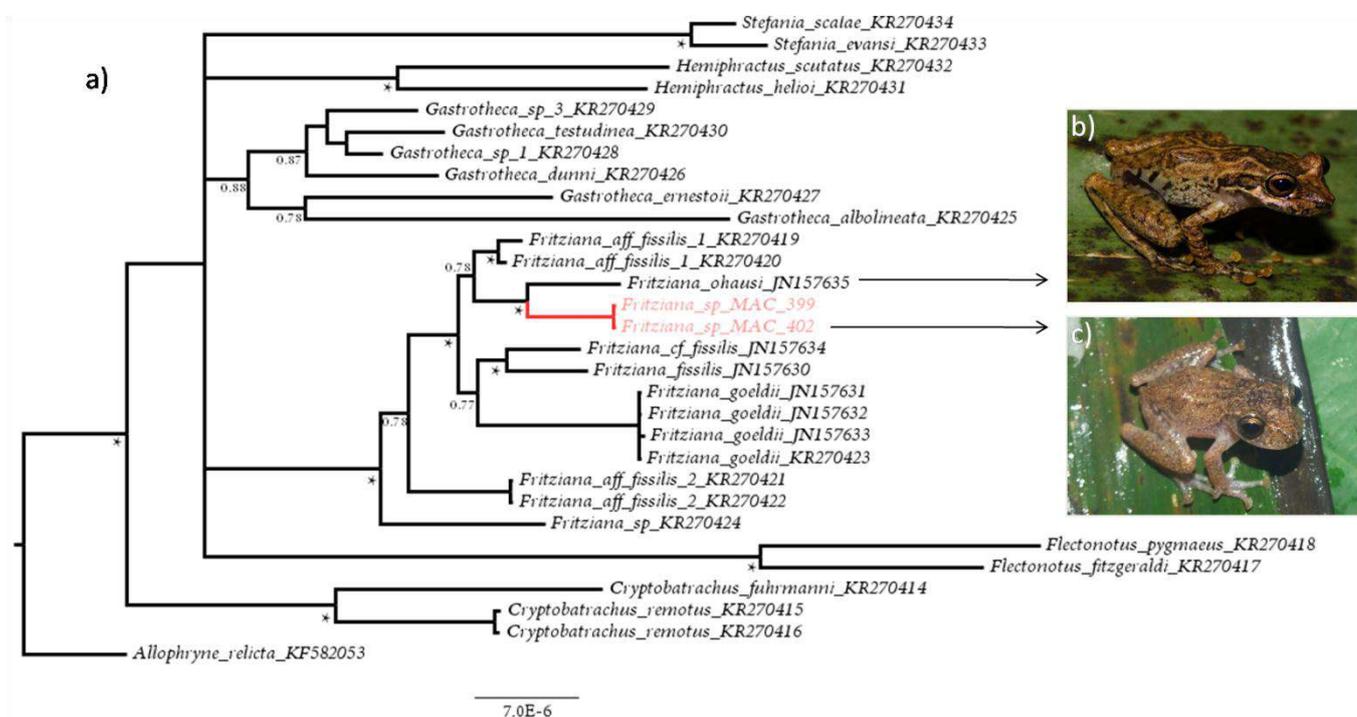


Figura S1. Árvore filogenética (a) obtida por inferência Bayesiana através de 866 pares de bases do fragmento mitocondrial 16S. b) *Fritziana ohausi* de Teresópolis - Rio de Janeiro (Foto: Leandro Drummond) e c) *Fritziana* sp. MAC. Valores de probabilidade posterior são mostrados junto aos nós. * = ≥ 0.99 . Valores abaixo de 0.70 não são mostrados.

Não foi possível determinar um valor de divergência genética entre as espécies nominais de *Fritziana*, pois nenhuma delas é recuperada como espécie irmã. *Fritziana* cf. *fissilis* (JN157634) foi considerada como uma provável espécie nova (Duellman et al. 2011; Castroviejo-Fisher et al. 2015). Sendo assim, consideramos a distância genética entre *Fritziana* cf. *fissilis* e *Fritziana fissilis* de 6.8%, similar a encontrada entre *Fritziana* sp. MAC e *F. ohausi* e elencamos essa espécie como candidata. Embora existam espécies consideradas novas dentro de *Fritziana*, Castroviejo-Fisher e colaboradores (2015) não conseguiram encontrar caracteres diagnósticos entre essas espécies.

Tabela S1. Distância p não corrigida entre as espécies de *Fritziana* baseado em 531 pares de bases do gene mitocondrial 16S.

	Espécie	GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Fritziana</i> sp. MAC	MAC_402*	-							
2	<i>Fritziana ohausi</i>	JN157635	6.7	-						
3	<i>Fritziana</i> aff. <i>fissilis</i> 1	KR270419	7.2	8.0	-					
4	<i>Fritziana</i> cf. <i>fissilis</i>	JN157634	8.6	6.8	7.0	-				
5	<i>Fritziana fissilis</i>	JN157630	9.3	9.3	6.3	6.8	-			
6	<i>Fritziana goeldii</i>	JN157633	9.9	9.5	8.4	10.1	9.1	-		
7	<i>Fritziana</i> aff. <i>fissilis</i> 2	KR270421	8.4	9.5	7.2	8.7	8.9	11.4	-	
8	<i>Fritziana</i> sp.	KR270424	9.6	9.9	8.6	10.9	10.3	10.5	9.0	-

* número de campo do tecido e do testemunho.

A proximidade entre *Fritziana ohausi* e *Fritziana* sp. MAC já era esperada. Essas duas espécies possuem canto de anúncio similar e utilizam o mesmo sítio de vocalização, cantam em bambuzais. Entretanto, o canto de anúncio de *F.* sp. MAC (n=10) difere de *F. ohausi* pela maior taxa de repetição das notas (11.4 - 12 notas/seg vs 5 - 6 notas/seg) e por apresentar as notas formadas apenas por um pulso vs 5 a 9 pulsos por nota em *F. ohausi* (Heyer et al. 1990). Além disso, o padrão de coloração é diferente e o ventre é liso em *F.* sp. MAC vs manchado em *F. ohausi* (Heyer et al. 1990; Folly et al. 2014). Dessa forma, classificamos essa espécie como uma espécie candidata confirmada baseado na distância genética, morfologia e bioacústica.

- *Physalaemus* sp. 1 (gr. *signifer*)

A análise filogenética, incluindo os espécimes de *Physalaemus* encontrados na Serra da Jibóia não alterou muito os resultados obtidos por Lourenço e colaboradores (2015) na recente filogenia do gênero para o clado *P. signifer* que foi recuperado com *P. nattereri* na base do agrupamento (Figura S2). Dentro desse clado, dois agrupamentos principais foram obtidos: 1) as espécies do grupo de *P. deimaticus*, com *P. maculiventris* como espécie irmã desse agrupamento com suporte mediano (0.72) e 2) um clado bem suportado das espécies do grupo de *P. signifer* (grupos *sensu* Nascimento et al. 2005). As amostras de *P.* sp. 1 obtidos nesse estudo foram recuperados como clado mais basal dentro do grupo de *Physalaemus signifer* (*sensu* Nascimento et al 2005). *Physalaemus* sp. 1 apresenta entre 6.9 e 9.4% de divergência genética entre ela e as outras espécies do clado (Tabela S2). Essa distância genética é superior do que a encontrada entre as espécies nominais irmãs do clado que varia entre 1.6% (*P. camacan* vs *P. crombie*) e 4.6% (*P. atlanticus* vs *P. moreirae*).

O canto de anúncio de *Physalaemus* sp. 1 é pulsionado sem a presença de harmônicos o que diferencia ela de quase todas as espécies do grupo *P. signifer* (ver compilação dos cantos em Pimenta et al. 2005; Costa & Toledo, 2013). Apenas *P. bokermanni*, *P. camacan* e *P. maculiventris* possuem canto semelhante, porém com a duração do canto maior (entre 0.2-0.87) do que a registrada para *P.* sp. 1. (0.11-0.12, n=30). Essas espécies não são relacionadas a *P.* sp. 1 na filogenia obtida. Embora *P. camacan* seja conhecida apenas para a Bahia, conforme ressaltado acima, o canto de anúncio é bem mais longo (0.38-0.87 - Pimenta et al. 2005) sendo possível diferenciar o canto de *P.* sp. 1 e *P. camacan* apenas pelo ouvido. *P. bokermanni* ocorre no

estado de São Paulo (Thomé et al. 2007) e *P. maculiventris* entre Santa Catarina e o Espírito Santo (Frost 2015; Lourenço et al. 2015) que ficam a mais de 900 km de distância das amostras coletadas. Dessa forma, baseado nas características bioacústicas e da alta divergência genética encontrada, classificamos essa espécie como candidata confirmada.

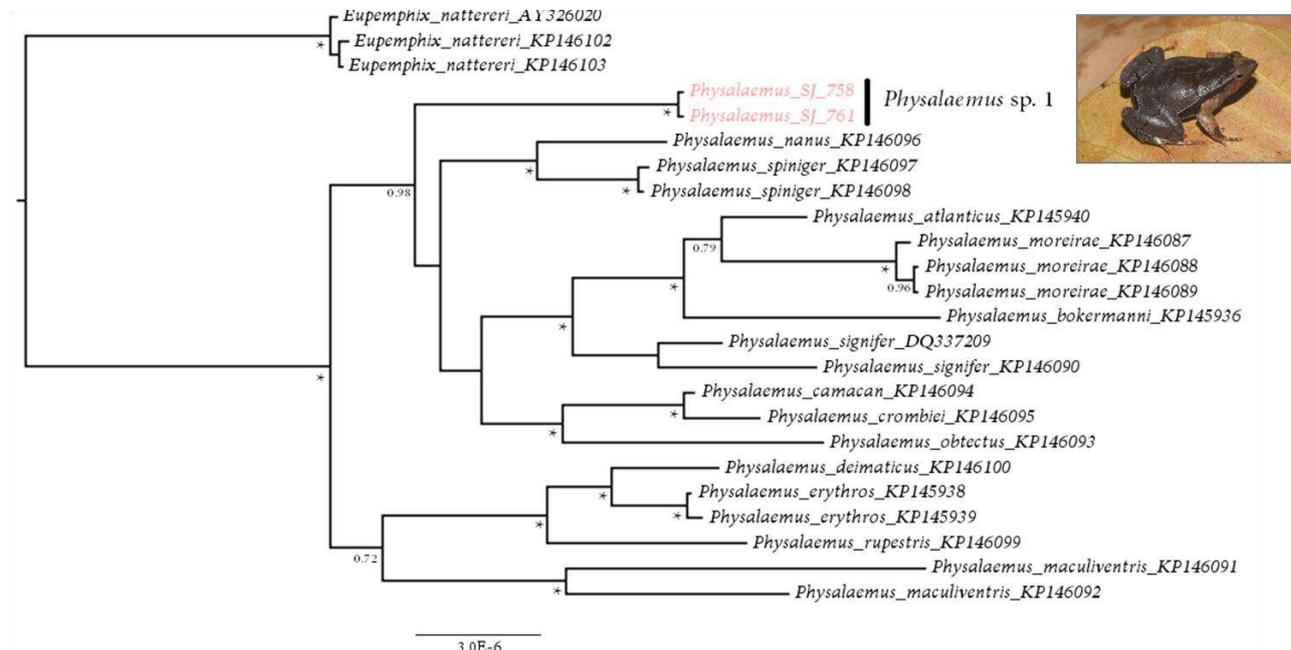


Figura S2. Árvore filogenética do clado de *Physalaemus signifer* obtida por inferência Bayesiana através de 855 pares de bases do fragmento mitocondrial 16S. Valores de probabilidade posterior são mostrados junto aos nós. * = ≥ 0.99 . Valores abaixo de 0.70 não são mostrados.

Tabela S2. Distância p não corrigida entre as espécies do clado de *Physalaemus signifer* utilizando 809 pares de bases do gene mitocondrial 16S.

Espécies	GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Physalaemus</i> sp. 1 SJ	SJ_758*	-														
2 <i>P. camacan</i>	KP146094	7.2	-													
3 <i>P. crombiei</i>	KP146095	7.7	1.6	-												
4 <i>P. nanus</i>	KP146096	6.9	6.0	6.6	-											
5 <i>P. spiniger</i>	KP146098	7.1	6.4	6.9	4.0	-										
6 <i>P. moreirae</i>	KP146089	9.4	8.4	9.5	8.4	8.8	-									
7 <i>P. atlanticus</i>	KP145940	8.2	8.0	8.4	7.3	6.9	4.6	-								
8 <i>P. bokermanni</i>	KP145936	8.9	9.0	9.5	8.5	8.3	6.8	5.7	-							
9 <i>P. signifer</i>	KP146090	8.7	8.2	8.8	7.8	7.4	8.1	6.9	9.0	-						
10 <i>P. obtectus</i>	KP146093	7.8	5.9	6.6	6.6	6.4	9.3	8.0	9.1	9.0	-					
11 <i>P. rupestris</i>	KP146099	9.8	9.4	10.3	9.4	9.3	11.0	10.4	10.8	10.4	9.7	-				
12 <i>P. deimaticus</i>	KP146100	9.9	8.2	9.1	9.0	8.0	10.5	10.3	11.1	9.7	9.0	5.4	-			
13 <i>P. erythros</i>	KP145938	9.1	7.6	8.7	8.8	8.3	10.4	10.3	11.0	9.5	9.1	5.1	3.0	-		
14 <i>P. maculiventris</i>	KP146092	9.4	9.4	10.2	8.8	9.0	11.4	10.7	11.0	9.7	9.0	8.5	9.0	9.0	-	
15 <i>Eupemphix nattereri</i>	KP146102	13.0	12.2	13.4	11.7	11.4	12.9	12.2	13.2	12.2	13.2	13.4	12.1	12.1	13.0	-

* número de campo do tecido e do testemunho.

- *Ischnocnema* sp. 1 a 3 (gr. *parva*)

Inserimos as sequências obtidas de *Ischnocnema* do gr. *parva* na matriz do trabalho de Brusquetti e colaboradores (2013). Embora com suporte mediano (0.75), recuperamos um agrupamento referente as espécies associadas ao grupo de *I. parva*, contudo a relação interna entre os clados não é obtida (Figura S3). As sequências dos exemplares da Bahia formaram três grupos distintos. As amostras de Serra Bonita, Serra das Lontras e Alto do Cariri (*Ischnocnema* sp .1) foram recuperadas no mesmo clado com alta divergência entre a amostra do Alto do Cariri e as demais desse grupo (entre 4.4 e 5.2%). Esse agrupamento é irmão das amostras obtidas em Macarani e Barra do Choça (*Ischnocnema* sp. 2. - divergência dentro do grupo entre 0-0.009%). Uma outra linhagem isolada foi obtida sendo representada por apenas um indivíduo da Serra Bonita (*Ischnocnema* sp. 3) com alta divergência genética entre ela e as outras amostras obtidas na Bahia (entre 13 e 14.2% - Tabela S3).

Não foi possível determinar um limiar entre as espécies nominais relacionadas desse grupo. Em um estudo mais abrangente utilizando seis marcadores moleculares nucleares e mitocondriais com 70 amostras relacionadas a *I. parva* de diferentes localidades do sudeste, foram determinadas sete espécies não descritas e a menor divergência entre as espécies candidatas elencadas foi de 3.9% para o 16S (Barth 2013). As linhagens recuperadas no nosso estudo apresentam uma distância molecular maior (Tabela S3).

Das três linhagens encontradas na Bahia, apenas da população de Serra Bonita de *Ischnocnema* sp. 1 foi coletado um número maior de indivíduos. Embora exista uma combinação de padrão de colorido e morfometria que separa essa população de *I. sp. 2* (espécie irmã) e das demais. O único indivíduo coletado no Alto do Cariri e que foi agrupado no mesmo clado apresenta características diferentes. Dessa forma, as diferenças morfológicas encontradas podem ser variações intraespecíficas ou a população do Alto do Cariri pode representar uma outra espécie candidata. Essa população apresenta alta divergência genética entre ela e os demais representantes do clado. Utilizando outras abordagens filogenéticas (Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança), em todas as análises essa amostra foi recuperada junto das espécies de *I. sp. 1* (dados não mostrados). Para a espécie *I. sp. 3* apenas dois indivíduos jovens foram amostrados o que dificultou as comparações. Dessa forma, classificamos todas as três espécies encontradas na Bahia como candidatas não confirmadas. A espécie *Ischnocnema* sp. 2 é mais associada com as áreas interioranas, de transição entre Florestas Ombrófilas e Semidecíduais em Macarani e Barra do Choça. As outras duas espécies (*I. sp. 1* e *I. sp. 3*) são encontradas nas serras litorâneas do sul da Bahia em Serra das Lontras, Serra Bonita e Alto do Cariri.

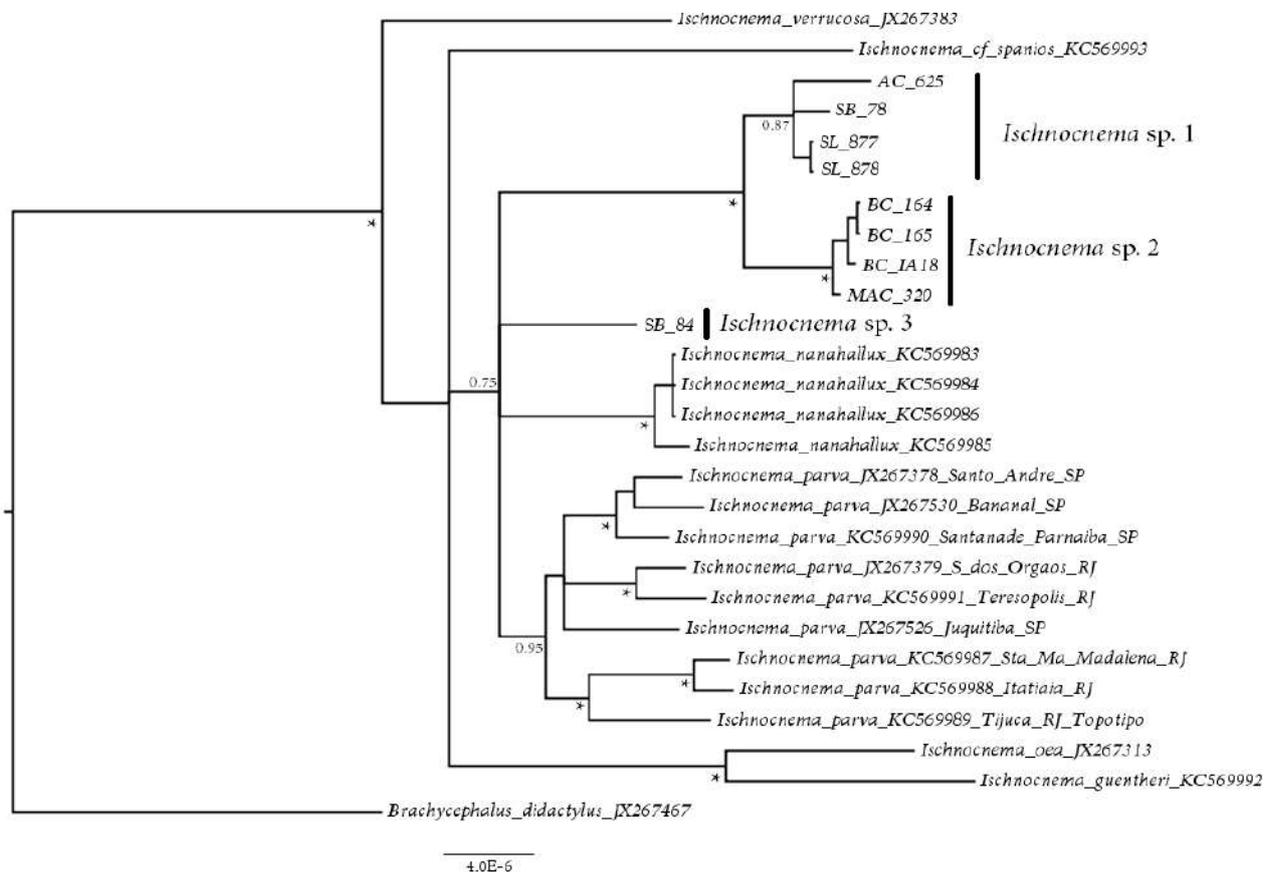


Figura S3. Árvore filogenética obtida por inferência Bayesiana através de 559 pares de bases do fragmento mitocondrial 16S. Valores de probabilidade posterior são mostrados junto aos nós. * = ≥ 0.99 . Valores abaixo de 0.70 não são mostrados.

Tabela S3. Distância p não corrigida entre as espécies do grupo de *Ischnocnema parva* utilizando 506 pares de bases do gene mitocondrial 16S.

Espécie	GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>Ischnocnema</i> sp. 1	AC_625*									
2 <i>I. sp. 1</i>	SL_878*	4.4	-							
3 <i>I. sp. 1</i>	SB_78*	5.2	2.3	-						
4 <i>I. sp. 2</i>	BC_165*	7.2	5.3	6.6	-					
5 <i>I. sp. 3</i>	SB_84*	13.4	13.8	14.2	13.0	-				
6 <i>I. nanahallux</i>	KC569983	13.6	13.7	15.1	12.5	10.7	-			
7 <i>I. parva</i> (topotipo)	KC569989	16.1	15.7	16.3	12.5	10.9	11.3	-		
8 <i>I. parva</i> (S dos Órgãos -RJ)	JX267379	12.1	10.4	11.9	10.2	10.8	9.9	8.4	-	
9 <i>I. parva</i> (Bananal-SP)	JX267530	13.5	13.1	13.9	10.8	11.2	10.8	9.7	8.8	-

* números de campo dos tecidos e dos testemunhos.

- *Adelophryne*

As espécies do gênero *Adelophryne* vivem na serapilheira e devido a seu tamanho reduzido e agilidade (Hedges et al. 2008), são consideradas de difícil amostragem (MacCulloch et al. 2008; Lourenço-de-Moraes et al. 2012; Fouquet et al. 2012). Durante as atividades de campo, uma grande quantidade de indivíduos pertencentes a esse gênero foi encontrado, contudo sua identificação através da morfologia externa não é trivial. Foram obtidas sequências de 16 indivíduos de *Adelophryne* de oito diferentes localidades na Bahia (Serra Bonita, Serra das Lontras, Serra do Corcovado, Wenceslau Guimarães, Macarani, Alto do Cariri, Ilhéus e Igrapiúna). Além disso, sequenciamos um parátipo de *A. glandulata* (MZUESC 12180) de Santa Teresa no Espírito Santo. Fouquet e colaboradores (2012) demonstraram que a diversidade do gênero está subestimada e encontraram seis espécies candidatas de *Adelophryne* (*Adelophryne* sp. 1 a 6) na Mata Atlântica. Nossos resultados conseguiram resgatar cinco dessas linhagens em localidades não reportadas nesse estudo (Figura S4). Os valores de divergência entre os diferentes clados encontrados na Mata Atlântica variaram entre 9.4 e 24.1% (Tabela S4).

Algumas dessas linhagens já foram associadas a espécies nominais. Lourenço-de-Moraes e colaboradores (2012) atribuíram *Adelophryne* sp. 6 a *A. mucronatus*. Durante a descrição de *A. meridionalis* foi sugerido que a mesma e *A. sp. 5* poderiam ser a mesma espécie, devido a proximidade geográfica das amostras (Santana et al. 2012). Os nossos resultados filogenéticos recuperam *A. sp. 5* junto com *A. glandulata*. Sendo assim, a posição filogenética de *A. meridionalis* continua incerta.

Fouquet e colaboradores (2012) tentaram associar os indivíduos seqüenciados da Serra do Teimoso e da Serra das Lontras a *Adelophryne pachydactyla* devido à proximidade geográfica com a localidade tipo e a características morfológicas compatíveis com essa espécie. Os autores não forneceram quais foram as evidências morfológicas que levaram eles a chegarem a essa conclusão. *Adelophryne pachydactyla* foi descrita baseado em um único exemplar diminuto com 11.1 mm de comprimento rostro cloacal apresentando como característica mais marcante a presença de duas falanges no dedo IV (Hoogmoed et al. 1994). Um indivíduo coletado na Serra Bonita, pertencente a esse clado (SB_82), foi diafanizado e o mesmo apresenta três falanges no dedo IV (Ricardo Lourenço-de-Moraes, Comunicação pessoal) o que inviabiliza a atribuição das amostras desse clado a *A. pachydactyla*. Dessa forma, consideramos que trata-se de mais uma espécie candidata, que tratamos aqui como *Adelophryne* sp. 8, uma das maiores espécies do gênero (CRC entre 13 - 16 mm) amplamente distribuída nas áreas de altitude do sul da Bahia. Essa espécie é irmã de *A. mucronatus* que foi descrita como portadora de um "flap" anal, enquanto *A. sp. 8* não apresenta tal característica.

Os exemplares associados a *Adelophryne* sp. 2 são os que mais se assemelham com a descrição de *A. pachydactyla*. São indivíduos pequenos (CRC entre 10.5 - 12 mm, n = 6), aparentemente com duas falanges no dedo IV (o que necessita de confirmação através de diafanização) com pele lisa, tímpano visível e uma pequena mancha mais clara no antebraço (Hoogmoed et al. 1994). Além disso, um exemplar da provável

localidade-tipo (município de Ilhéus) de *A. pachydactyla* foi recuperado nesse mesmo agrupamento. Embora características similares foram encontradas, não fizemos um estudo detalhado da morfologia dessa espécie para associar a *A. sp. 2* com *A. pachydactyla*. Mesmo assim, reforçamos a necessidade de uma revisão morfológica minuciosa utilizando um número grande de exemplares, principalmente da localidade tipo, para redescrever a espécie *A. pachydactyla* para conhecermos sua variação morfológica, baseado na sua descrição original. Só assim será possível definir o status taxonômico das espécies que possuem duas falanges no dedo IV na região. Como a espécie irmã de *A. sp. 2* é outra espécie candidata sem informação disponível sobre sua morfologia, não conseguimos atribuir nenhuma característica que separe essas duas espécies e classificamos *A. sp. 2* como uma espécie candidata não confirmada.

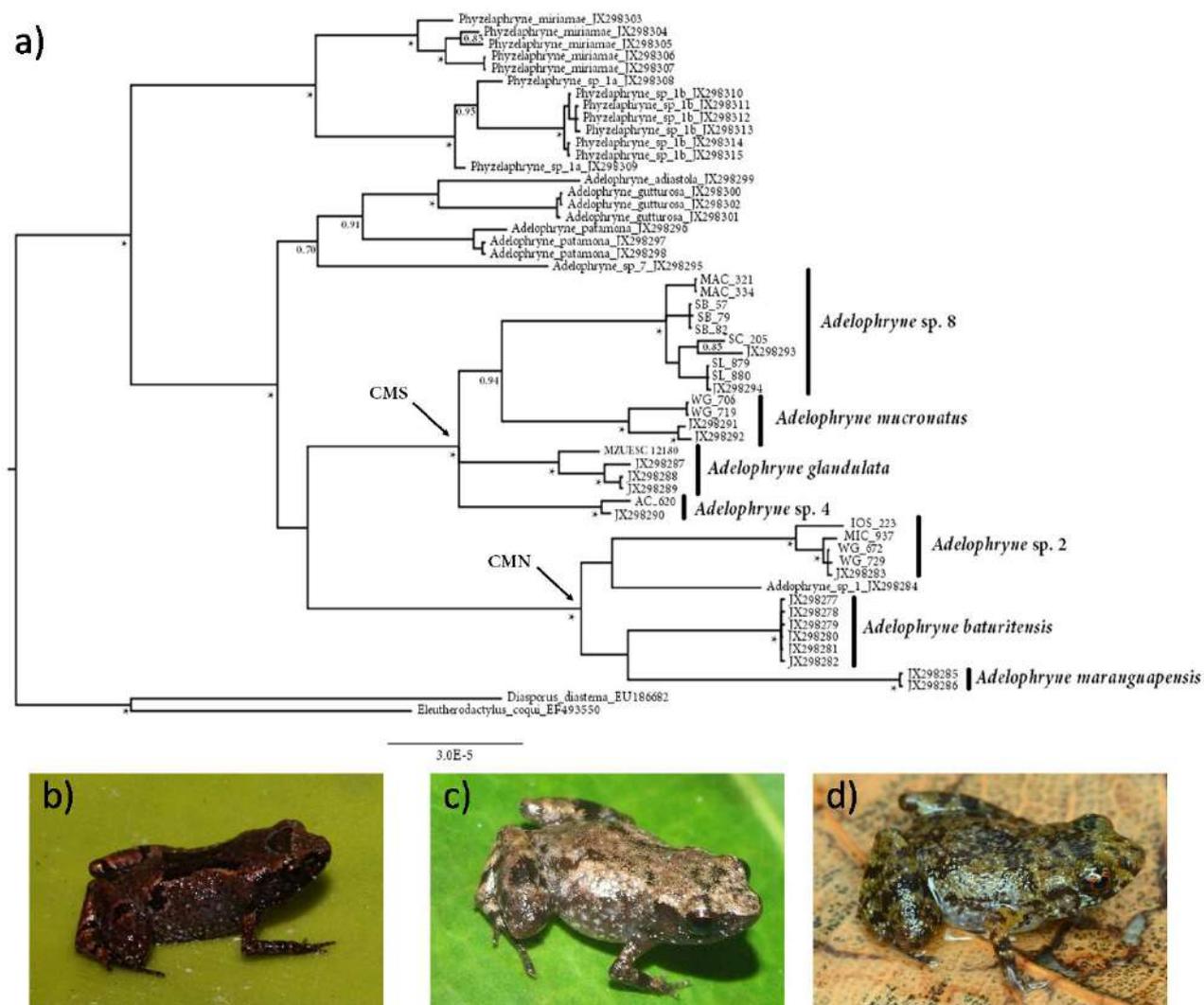


Figura S4. Reconstrução filogenética (a) baseada em inferência Bayesiana utilizando 800 pares de bases do gene mitocondrial 16S. Valores de probabilidade posterior são mostrados junto aos nós. * = ≥ 0.99 . Valores abaixo de 0.70 não são mostrados. b) *Adelophryne sp. 8* da Serra do Corcovado. c) *Adelophryne sp. 4* do Alto do Cariri e d) *Adelophryne sp. 2* de Wenceslau Guimarães (Foto de Rafael de Abreu). CMS = Clado da Mata Atlântica Sul e CMN = Clado da Mata Atlântica Norte segundo Fouquet et al. (2012).

Por último, a amostra obtida no Alto do Cariri ficou agrupada com a *Adelophryne* sp. 4. no clado Sul da Mata Atlântica. Utilizando um conjunto de dados mais abrangente essa espécie é bem sustentada como irmã de *A. glandulata* (*A. sp. 5* em Fouquet et al. 2012) o que não foi recuperado em nossas análises, provavelmente devido ao uso de um único marcador. Essa espécie pode ser diferenciada de *A. glandulata* pela ausência da glândula que inicia da parte posterior do olho até o membro anterior, principal característica dessa espécie. Sendo assim, classificamos essa espécie como candidata confirmada.

Tabela S4. Distância p não corrigida entre as espécies de *Adelophryne* da Mata Atlântica baseado em 445 pb do gene mitocondrial 16s.

Espécie	GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Adelophryne</i> sp. 1	JX298284	-														
2 <i>A. sp. 2</i>	JX298283	13.0	-													
3 <i>A. sp. 2</i>	IOS_223*	12.7	3.4	-												
4 <i>A. sp. 4</i>	JX298290	18.1	21.0	21.0	-											
5 <i>A. sp. 4</i>	AC_620*	17.5	20.4	20.0	1.6	-										
6 <i>A. glandulata</i>	JX298287	17.6	24.1	23.4	13.1	13.4	-									
7 <i>A. glandulata</i>	MZUESC 12180#	17.9	22.4	22.2	10.7	11.2	5.8	-								
8 <i>A. mucronatus</i>	JX298291	18.8	23.6	22.2	11.0	11.0	12.9	11.2	-							
9 <i>A. mucronatus</i>	WG_719	17.4	22.9	22.0	9.6	9.4	13.6	11.4	4.3	-						
10 <i>A. sp. 8</i>	JX298294	21.9	22.7	22.7	12.1	12.2	15.1	13.0	11.7	12.4	-					
11 <i>A. sp. 8</i>	MAC_334*	21.9	22.2	22.2	12.3	12.6	15.6	14.0	12.1	12.8	3.2	-				
12 <i>A. sp. 8</i>	SB_79*	22.5	23.9	24.0	11.4	11.4	14.8	13.0	11.4	11.6	3.7	2.7	-			
13 <i>A. sp. 8</i>	SL_879*	21.9	22.7	22.7	12.1	12.2	15.1	13.0	11.7	12.4	0.0	3.2	3.7	-		
14 <i>A. baturitensis</i>	JX298281	12.4	14.1	14.5	19.2	18.6	20.6	19.8	20.5	19.8	21.2	21.6	22.5	21.2	-	
15 <i>A. maranguapensis</i>	JX298285	12.9	16.9	17.6	21.5	21.9	20.0	20.0	20.4	20.0	21.3	20.2	20.6	21.3	13.6	-

* números de campo dos tecidos e dos testemunhos. = Número de tombo do Museu de Zoologia da UESC

- *Phyllodytes*

O gênero *Phyllodytes* é composto atualmente por 11 espécies, sendo que seis delas (*P. kautskyi*, *P. luteolus*, *P. maculosus*, *P. melanomystax*, *P. tuberculosus*, *P. wuchereri*) ocorrem na Bahia (Frost 2015). Essas espécies utilizam bromélias durante todo o seu ciclo de vida, o que dificulta a sua amostragem, devido ao fato, que a maioria delas utilizam bromélias arbóreas situadas a mais de três metros de altura. Outros inventários realizados no sul da Bahia não conseguiram associar os exemplares coletados a espécies nominais, e propuseram que a diversidade no gênero deve ser bem maior do que a conhecida atualmente (Dias et al. 2014a; Dias et al. 2014b).

Durante as expedições de campo, foi possível coletar 15 exemplares pertencentes a 13 diferentes localidades incluindo a aquisição de dados bioacústicos para a maioria dos morfotipos amostrados. Com exceção de *Phyllodytes punctatus* e *P. brevisrostris*, as demais espécies do gênero possuem o canto de anúncio descrito (ver resumo em Campos et al. 2014; Cruz et al. 2014; Marciano-Jr et al. - em preparação), facilitando as comparações entre as diferentes espécies.

Segundo Faivovich et al. (2005) o gênero *Phyllodytes* está inserido na tribo Lophiohylini. Sendo assim, inserimos diferentes gêneros dessa tribo para testar as relações e a monofilia de *Phyllodytes* e usamos três

problemática, junto com a obtenção de dados bioacústicos e morfológicos.

Tabela S5. Distância p não corrigida entre as espécies de *Phyllodytes* baseado em 725 pb do gene mitocondrial 16s.

	Espécies	Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>Phyllodytes</i> sp. 1	SB_106*	-														
2	<i>P. sp. 1</i>	SL_876*	1.1	-													
3	<i>P. sp. 1</i>	SC_200*	7.9	8.0	-												
4	<i>P. sp. 5</i>	WG_699*	9.3	9.3	8.0	-											
5	<i>P. sp. 2</i>	ID1010*	12.6	12.9	12.3	11.4	-										
6	<i>P. sp. 3</i>	SJ_840*	10.1	10.3	8.6	8.3	12.0	-									
7	<i>P. sp. 4</i>	AY843721	11.7	11.6	10.2	10.6	13.2	9.9	-								
8	<i>P. sp. 4</i>	SJ_854*	11.8	11.7	10.6	10.7	13.1	10.0	1.1	-							
9	<i>P. cf. kaustskyi</i>	1018_ITA	10.7	10.3	10.2	10.6	13.7	9.0	10.4	10.7	-						
10	<i>P. cf. kaustskyi</i>	1064_MIC	11.5	11.1	10.7	10.6	13.4	10.4	10.2	10.6	3.9	-					
11	<i>P. luteolus</i>	AY843721	7.6	7.7	6.6	6.9	11.7	7.5	9.0	9.3	7.6	8.7	-				
12	<i>P. luteolus</i>	AC_635*	7.9	7.7	6.3	7.2	11.7	6.6	9.0	9.2	7.9	9.4	3.2	-			
13	<i>P. luteolus</i>	MAC_409*	8.3	7.9	6.8	7.0	12.0	6.8	9.4	9.6	8.0	9.4	3.4	0.7	-		
14	<i>P. wuchereri</i>	PL_268*	8.3	8.6	7.2	7.3	11.9	7.9	8.7	9.1	8.6	8.9	3.8	4.2	4.4	-	
15	<i>P. castanholinha</i>	Una_1063*	6.0	6.1	8.0	8.9	13.7	8.9	10.4	10.5	10.3	11.0	7.7	7.2	7.3	7.9	-

* números de campo dos tecidos e dos testemunhos.

A morfologia dos indivíduos atribuídos a *Phyllodytes cf. kaustskyi* é condizente com a diagnose da espécie (Peixoto & Cruz 1988), contudo o canto das populações de Igrapiúna apresentam algumas diferenças bioacústicas quando comparado com a descrição do canto dessa espécie (Simon & Gasparini 2003) e optamos por considerá-la como *P. cf. kaustskyi*. Esse agrupamento foi posicionado como irmão de *Phyllodytes* sp. 4 com distância genética entre esses dois clados é maior que 10%. Pelo tamanho reduzido essa espécie pode ser diferenciada de *P. cf. kaustskyi* e da maioria das espécies do gênero, bem como através de suas características bioacústicas (Figura S6). Essa linhagem foi encontrada em Una e na Serra da Jibóia (800 m de altitude), aproximadamente a 270 km de distância e apresenta baixa divergência genética entre elas (1.1%). Isso demonstra que essas populações devem ter mantido fluxo gênico recente e essa espécie deve ser amplamente distribuída, utilizando tanto ambientes de restinga, como também campos rupestres em elevada altitude. Ao contrário do que foi observado em *Phyllodytes* sp. 1, populações relativamente próximas (~ 70 km de distância) como a da Serra do Corcovado e Serra Bonita apresentam alta divergência genética (7.9%). Isso indica que provavelmente o contato entre essas populações aconteceu em um período mais antigo, outro fato que pode ter colaborado com isso é que aparentemente essa espécie é típica de áreas de altitude o que poderia dificultar o fluxo gênico entre as populações.

A espécie *Phyllodytes* sp. 2 é a mais basal em nossas análises e facilmente distinguível de todas do gênero pela combinação do comprimento rostro-cloacal, padrão dorsal, formato da cabeça e presença coloração na região inguinal. Por fim, *Phyllodytes* sp. 3, além de possuir o canto distinto das outras espécies (Figura S6), pode ser diferenciada pelo grande tamanho, formato da cabeça e padrão de colorido uniforme.

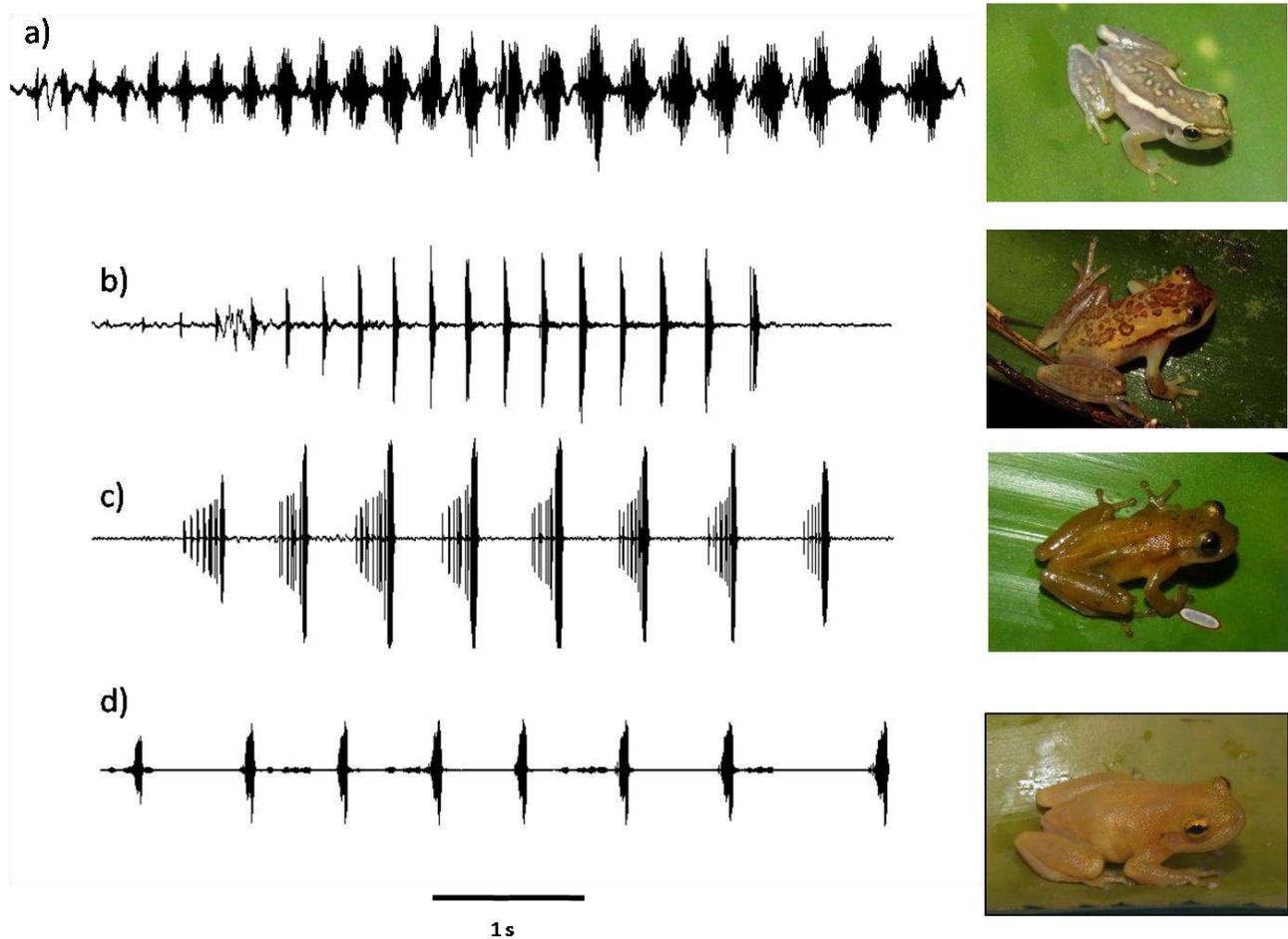


Figura S6. Oscilograma do canto de anúncio de *Phyllodytes wuchereri* (a) da Pedra Lascada e das espécies candidatas *P. sp. 1* (b) da Serra do Corcovado, *P. sp. 4* (c) e *P. sp. 3* (d) da Serra da Jibóia. Todos os cantos possuem duração total de 0.5 segundos.

- *Pristimantis*

Três linhagens divergentes foram recuperadas utilizando as sequências coletadas nas áreas de altitude dessa trabalho (Capítulo 2 - Tabela 4 e Apêndice IV) o que duplica a diversidade atual conhecida de *Pristimantis* da Mata Atlântica (Canedo & Haddad 2012). A espécie *Pristimantis sp. 1* ficou posicionada como espécie irmã de *P. vinhai*, embora com baixo suporte. Utilizando outros métodos filogenéticos (Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança) o posicionamento obtido dessas duas espécies sempre foi o mesmo (dados não mostrados). Essa espécie é prontamente diferenciada de *P. vinhai* pelo padrão da faixa pós-ocular e características bioacústicas. Todavia, ela é morfologicamente muito similar a *P. paulodutraei*, porém com cantos de anúncios distintos (Figura S7). Essa morfologia críptica provavelmente dificultou a sua plena identificação anteriormente, já que essa espécie é amplamente distribuída no interior de florestas da Bahia sendo relativamente comum nesses ambientes.

Pristimantis sp. 2 foi encontrada apenas em uma área de altitude em Wenceslau Guimarães (800 m). Embora não tenhamos realizados gravações de *P. sp. 2*, as outras espécies relacionadas (*Pristimantis*

paulodutra, *P. vinhai*, *P. sp. 1*) foram encontradas vocalizando no mesmo lugar e ao mesmo tempo, o que tornou perceptível a diferença entre o canto de anúncio de *P. sp. 2* e as espécies citadas. Sendo assim, sugerimos que é uma espécie candidata confirmada.

A espécie *Pristimantis sp. 3* é a mais divergente entre as linhagens da Mata Atlântica com distância genética superior a 12 % das demais espécies que ocorrem nesse bioma. Em nossas análises essa espécie foi recuperada como irmã de *P. zeuctotylus* (divergência entre as duas de 12%) espécie que ocorre no noroeste da América do Sul, principalmente na região amazônica da Venezuela e das Guianas (Frost 2015), dentro do grupo de *Pristimantis conspicillatus* (Hedges et al. 2009). Esse grupo era composto por 37 espécies com distribuição geográfica entre a Colômbia e as Guianas (Hedges et al. 2009) e atualmente, as espécies conhecidas do grupo de *Ischnocnema ramagii* (*I. ramagii* e *I. paulodutra*) + *I. vinhai* da Mata Atlântica foram incluídas nesse agrupamento (Canedo & Haddad 2012). Diante da grande diversidade de espécies de *Pristimantis* desse grupo encontrada fora da Mata Atlântica, a relação dessa espécie com as demais, precisa ser reavaliada com um conjunto de dados mais abrangente. Entretanto, essa espécie apresenta morfologia e canto de anúncio distinta das outras espécies do gênero, sendo diagnosticada como espécie candidata confirmada. *Pristimantis sp. 3* é típica das Florestas Montanas da Mata Atlântica da Bahia.

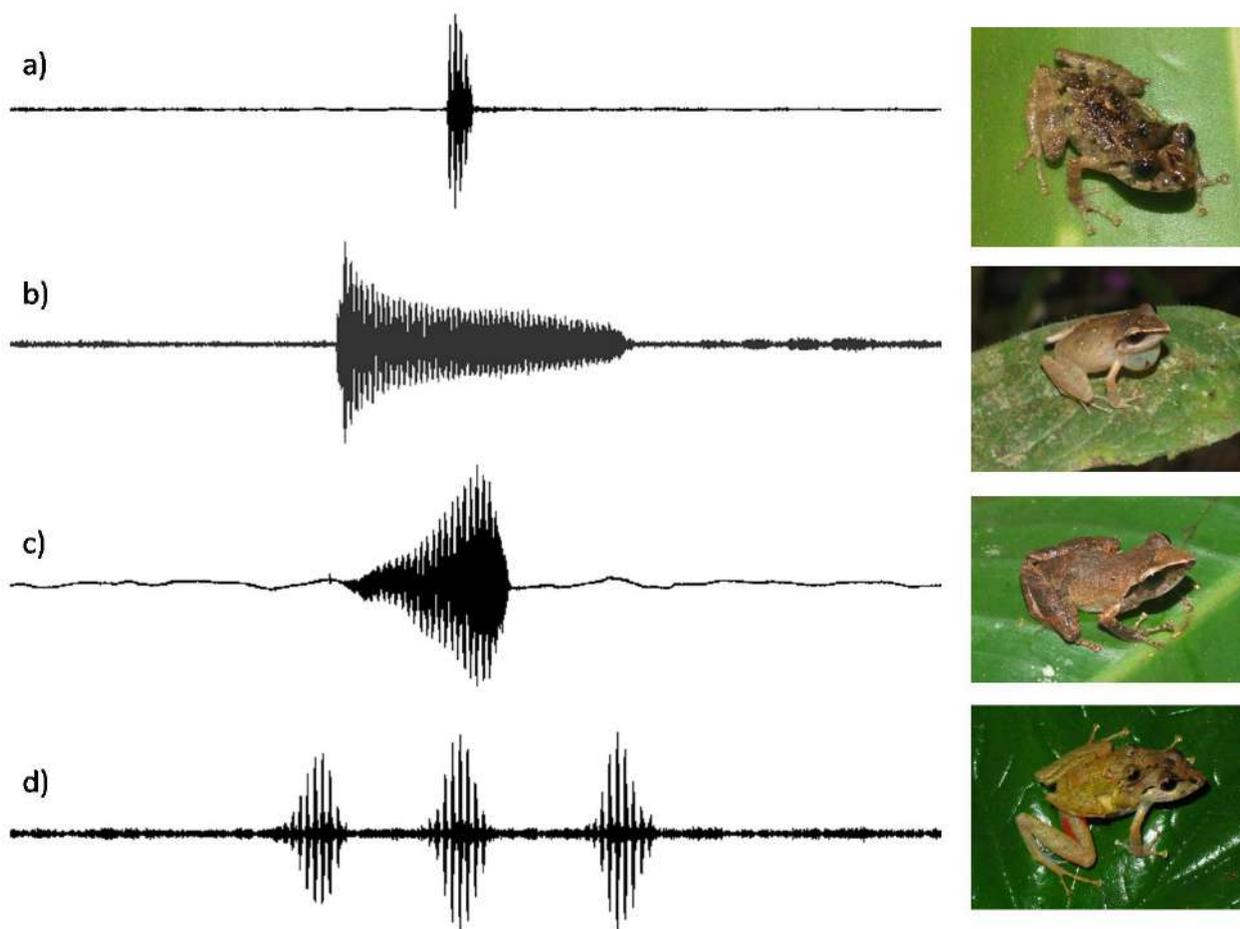


Figura S7. Oscilograma do canto de anúncio de *Pristimantis sp. 3* (a) da Pedra Lascada, *P. paulodutra* (b) de Ilhéus, *P. sp. 2* (c) da Serra do Timbo e de *P. vinhai* (d) da Serra Bonita.

Literatura Citada - S2

Barth, A. 2013. Análises citogenéticas e moleculares em espécies da ordem Anura da Mata Atlântica Brasileira. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz. 82 pp.

Brusquetti, F., Thomé, M. T. C., Canedo, C., Condez, T. H., Haddad, C. F. B. 2013. A new species of *Ischnocnema parva* species series (Anura, Brachycephalidae) from northern state of Rio de Janeiro, Brazil. *Herpetologica* 69: 175–185.

Campos, T. F., Lima, M. G., Nascimento, F. A. C., Santos, E. M. 2014. Larval morphology and advertisement call of *Phyllodytes acuminatus* Bokermann, 1966 (Anura: Hylidae) from northeastern Brazil. *Zootaxa* 3779(1): 93–100.

Canedo, C. & Haddad, C. F. B. 2012. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 610–620.

Castroviejo-Fisher, S., Padial, J. M., De la Riva, I., Pombal, Jr. J. P., da Silva, H. R., Rojas-Runjaic, F. J. M., Medina-Méndez, E., Frost, D. R. 2015. Phylogenetic systematics of egg-brooding frogs (Anura: Hemiphractidae) and the evolution of direct development. *Zootaxa* 4004: 1–75.

Costa, T. R. N. & Toledo, L. F. 2013. *Physalaemus spiniger* (Anura: Leiuperinae): A Frog with an Extensive Vocal Repertoire. *Journal of Herpetology* 47: 530–538.

Cruz, D., Marciano-Jr, E., Napoli, M. F. 2014. Advertisement and courtship calls of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3774(1): 097–100.

Dias, I. R., Medeiros, T. T., Vila-Nova, M. F., Solé, M. 2014a. Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotspot within Brazil's Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.

Dias, I. R., Mira-Mendes, C. V., Solé, M. 2014b. Rapid inventory of herpetofauna at the APA (Environmental Protection Area) of the Lagoa Encantada and Rio Almada, Southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 7: 627-637.

Duellman, W. E., Jungfer, K.-H., Blackburn, D. C. 2011. The phylogenetic relationship of geographically separated "*Flectonotus*" (Anura: Hemiphractidae), as revealed by molecular, behavioral, and morphological data. *Phyllomedusa*. Belo Horizonte 10: 15–29.

Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. de A., Frost, D. R., Campbell, J. A., Wheeler, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240.

Folly, M., Hepp, F. S. F. dos S., de Carvalho-e-Silva, S. P., Duellman, W. E. 2014. Taxonomic status and redescription of *Flectonotus ulei* (Anura: Hemiphractidae), with a key for the species of *Fritziana*. *Zoologia* 31: 393–399.

Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J. M. I., Orrico, V. G. D., Lyra, M. L., Roberto, I. J., Kok, P. J. R., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T. 2012. From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 547–561.

Frost, D. R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Hedges, S. B., Duellman, W. E., Heinicke, M. P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737: 1–182.

Heyer, W. R., Rand, A. S., Cruz, C. A. G., Peixoto, O. L., Nelson, C. E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia. São Paulo* 31: 231–410.

Hoogmoed, M. S., Borges, D. M., Cascon, P. 1994. Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. *Zoologische Mededelingen. Leiden* 68: 271–300.

Lourenço, L. B., Targueta, C. P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P. C. de A., Andrade, G. V., Haddad, C. F. B., Recco-Pimentel, S. M. 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92: 204–216.

Lourenço-de-Moraes, R., Solé, M., Toledo, L. F. 2012. A new species of *Adelophryne* Hoogmoed and Lescure 1984 (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 3441: 59–68.

MacCulloch, R. D., Lathrop, A., Kok, P. J. R., Minter, L. R., Khan, S. Z., Barrio-Amorós, C. L. 2008. A new species of *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae) from Guyana, with additional data on *A. gutturosa*. *Zootaxa* 1884: 36–50.

Marciano-Jr, E., Dias, I. R., Cruz, D., Napoli, M., Solé, M. (em preparação). Girino e canto de anúncio de *Phyllodytes maculosus* do sul da Bahia, Brasil.

Nascimento, L. B., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G. 2005. Taxonomic review of the species group of the genus *Physalameus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jimenez-de-la-Espada,

1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1836 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arquivos do Museu Nacional. Rio de Janeiro 63: 297–320.

Peixoto, O. L. & Cruz, C. A. G. 1988. Descrição de duas espécies novas do gênero *Phyllodytes* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae). Revista Brasileira de Biologia 48: 265–272.

Pimenta, B. V. S., Cruz, C. A. G., Silvano, D. L. 2005. A new species of *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic Rain Forest of southern Bahia, Brazil. Amphibia-Reptilia 26: 201–21

Santana, D. J., Fonseca, E. M., Neves, M. de O., Carvalho, R. M. H. 2012. A new species of *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic forest, southeastern Brazil. Salamandra 48: 187–192.

Simon, J. E. & Gasparini, J. L. 2003. Descrição da vocalização de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto and Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão 16: 47–54.

Thomé, M. T. C., Oyamaguchi, H. M., Brasileiro, C. A. 2007. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Physalaemus bokermanni*: Distribution extension. Check List 3(1): 1-3.

Capítulo 2

Filogeografia de *Pristimantis vinhai* (Anura: Craugastoridae) revelam alta estruturação genética em uma espécie endêmica da Mata Atlântica do Sul da Bahia, Brasil.



Pristimantis vinhai (Bokermann, 1975)

Filogeografia de *Pristimantis vinhai* (Anura: Craugastoridae) revelam alta estruturação genética em uma espécie endêmica da Mata Atlântica do Sul da Bahia, Brasil.

RESUMO

Pristimantis vinhai é uma espécie endêmica da Mata Atlântica da Bahia. Essa mesma região foi estimada como refúgio climático por diferentes estudos realizados nesse bioma. Entretanto, a estrutura genética de espécies de anfíbios restritas a esse refúgio ainda não foi estudada. Utilizando uma abordagem filogeográfica através de quatro genes nucleares e mitocondriais aliados com paleomodelagem, verificamos se existe estruturação genética entre as populações dessa espécie e quais foram os possíveis eventos históricos que poderiam ter influenciado os resultados alcançados. Foram sequenciados 85 indivíduos de 20 diferentes localidades na Bahia. As análises filogenéticas recuperaram seis linhagens divergentes na região e 77% da variação genética foi encontrada devido à diferença entre os grupos recuperados. A paleomodelagem estimou as áreas de altitude da região como refúgios climáticos para essa espécie, os quais foram confirmados através da maior diversidade genética encontrada nesses locais. Além disso, ao contrário dos outros estudos realizados na Mata Atlântica, os resultados da paleomodelagem indicaram que as populações dessa espécie foram fragmentadas durante os períodos interglaciais, nos quais o clima estava mais quente e seco. Nossos resultados indicam que a história evolutiva de *Pristimantis vinhai* foi moldada, tanto pelas oscilações climáticas do Pleistoceno, como também por eventos mais antigos, pois a datação das divergências iniciais dessa espécie apontaram para o final do Mioceno. Dessa forma, nenhum processo isolado parece ter influenciado a variabilidade genética encontrada atualmente nessa espécie, e sim um conjunto de eventos históricos que atuaram em diferentes períodos ao longo da existência de *Pristimantis vinhai*.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para os pesquisadores que estudam a biodiversidade é entender quais foram os processos que culminaram na grande diversidade biológica encontrada nos trópicos (Balakrishnan 2005; Rull 2008; Antonelli & Sanmartín 2011). A Mata Atlântica (MA), um dos cinco mais importantes *hotspots* do mundo, é um dos representantes desses locais com alta riqueza e endemismos (Myers et al. 2000), onde a taxa de descoberta de novas espécies, de diferentes grupos de vertebrados, ainda é alta (e.g., Dias et al. 2013; Mauricio et al. 2014; Ribeiro et al. 2015; Pavan 2015; Graboski et al. 2015). Indo na contramão da conservação e em um ritmo muito mais acelerado está a atual situação desse bioma com grande parte da sua floresta nativa convertida em áreas para atividades agropastoris (Ribeiro et al. 2009) apagando registros importantes de sua biota e processos ainda não estudados.

Diferentes estudos foram realizados na Mata Atlântica para desvendar quais foram os principais processos responsáveis pela diversificação da sua biota e quando eles ocorreram nessa região (e.g., Grazziotin et al. 2006, Cabanne et al. 2007, 2008, 2011; Carnaval et al. 2009; Fitzpatrick et al. 2009; Ribeiro et al. 2011; Thomé et al. 2010; d’Horda et al. 2011; Maldonado-Coelho 2012; Tonini et al. 2013; Leite et al. 2016). As oscilações climáticas do Quaternário são frequentemente utilizadas para explicar os padrões encontrados na estruturação genética das espécies da Mata Atlântica (e.g. Cabanne et al. 2008; Carnaval et al. 2009; d’Horda et al. 2011) mediante associação com a teoria dos refúgios florestais (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1970; Brown & Ab’Sáber 1979). Essa hipótese prediz que a diminuição da umidade e temperatura durante os períodos glaciais na região tropical ocasionaria uma retração florestal, formando ilhas de florestas úmidas (refúgios) circundadas por áreas abertas. Isso ocasionaria fragmentação da distribuição e isolamento das espécies dependentes de florestas e conseqüentemente, especiação alopátrica, caso esse cenário durasse tempo suficiente para isso. O inverso aconteceria nos períodos interglaciais, com a expansão das florestas úmidas devido ao clima mais quente e úmido.

Entretanto, alguns estudos não são totalmente congruentes com a teoria do refúgios, onde os eventos vicariantes foram datados para antes do Quaternário (Grazziotin et al. 2006, Thomé et al. 2010, Amaro et al. 2012) e foram associados com atividades tectônicas que coincidiram com a localização das discontinuidades filogeográficas encontradas (Thomé et al. 2010; Batalha-filho et al. 2010; Amaro et al. 2012). Outros estudos recorreram à hipótese dos rios (Wallace 1852) como barreiras geográficas para explicar seus resultados (Pellegrino et al. 2005; Ribeiro et al. 2011). Dessa forma, é provável que a alta riqueza de espécies encontradas atualmente na Mata Atlântica não possa ser atribuída a nenhum processo isolado e sim a atuação concomitante ou não, de diferentes processos ao longo da história evolutiva do bioma (Rull 2011).

Estudos de paleomodelagem da Mata Atlântica estimaram a região central do bioma, principalmente no estado da Bahia, como uma grande área de estabilidade florestal durante o Último Máximo Glacial - UMG (Carnaval & Moritz 2008; Porto et al. 2013; Leite et al. 2016). Nessa região é encontrado um alto número de

endemismos da fauna e da flora (Haffer 1974; Brown 1991; Thomas et al. 1998) e especialmente para os anfíbios são conhecidas 30 espécies endêmicas (Silvano & Pimenta 2004; Dias et al. 2014a), das quais, dez são restritas à localidade tipo (Carcerelli & Caramaschi 1992; Hoogmoed et al. 1994; Canedo et al. 2004; Cruz et al. 2007; Juncá & Nunes 2008; Recoder et al. 2010; Napoli et al. 2011; Caramaschi 2012; Caramaschi et al. 2013; Teixeira et al. 2013). Para as espécies dependentes de florestas e endêmicas dessa região, devido à persistência de grandes áreas florestadas contínuas ao longo do tempo, as oscilações climáticas do Quaternário devem ter tido pouca influência sobre suas populações e seria esperado encontrar nenhuma ou baixa estruturação genética para essas espécies que possuem distribuição restrita ao refúgio ou processos de diversificação anteriores a esse período. Entretanto, nenhum estudo filogeográfico abordando espécies de anfíbios endêmicas dos refúgios estimados foi realizado até o momento.

Dessa forma, no intuito de preencher em parte essa lacuna, estudamos a filogeografia de *Pristimantis vinhai* (Bokermann, 1975), espécie endêmica da Mata Atlântica do sul da Bahia, utilizando genes mitocondriais e nucleares aliados a paleomodelagem para entender quais foram os processos que moldaram a variação genética desse táxon e se houve alguma influência das oscilações climáticas do Pleistoceno sobre a variabilidade genética encontrada, contribuindo assim para melhor compreensão da historia evolutiva do bioma e de espécies que são restritas aos possíveis refúgios estimados.

MATERIAL E MÉTODOS

- Espécie estudada e Amostragem

Pristimantis vinhai é uma espécie endêmica da Mata Atlântica do sul da Bahia, ocorrendo entre os municípios de Santa Teresinha na Serra da Jibóia (Juncá 2006) até o município de Itamaraju, no extremo sul da Bahia (Silvano & Pimenta 2003). Espécie de tamanho pequeno - entre 19 e 25 mm de comprimento rostro-cloacal - possui desenvolvimento direto (Bokermann 1975) sendo encontrada geralmente em ambientes florestados preservados. Contudo pode ser registrada também em cabruças (áreas de cultivo de cacau sombreadas por árvores nativas ou exóticas).

Anfíbios são bons modelos para realizar estudos filogeográficos devido a sua fraca capacidade de dispersão e alta filopatria (Beebe 1996) apresentando estruturação genética em curtas distâncias e retendo sinais dos eventos históricos que moldaram sua atual distribuição (Zeisset & Bebee 2008), além de serem fáceis de coletar.

Durante as amostragens realizada entre 2014 e 2015, foram amostrados 85 indivíduos de *Pristimantis vinhai* contemplando toda a distribuição geográfica conhecida dessa espécie (Figura 1), incluindo a localidade-tipo no município de Ilhéus (Bokermann 1975). Além disso, outras espécies de *Pristimantis* encontradas durante as atividades de campo foram coletadas, sequenciadas e incluídas nas análises filogenéticas (Apêndice I).

As amostras de tecidos foram retiradas do músculo e armazenados em álcool absoluto. O material testemunho será depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz. Para as análises filogenéticas também foram utilizadas as sequências disponíveis no GenBank relacionadas com a espécie focal do trabalho, assim como para as outras espécies utilizadas como grupo externo (Apêndice II)

- Extração e Sequenciamento do DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit *Wizard® Genomic Purification* da Promega conforme as instruções do fabricante. Duas regiões mitocondriais (NADH subunidade 2 - ND2 e o 16S rDNA - 16S) e dois fragmentos nucleares (gene ativador da recombinação I: RAG-1 e Tirosinase: TYR) foram amplificados via PCR, utilizando os *primers* descritos na tabela 1. Cada reação de PCR apresentava um volume final de 20 µL, sendo composto por 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,65 µL de solução de dNTP (10 mM para cada nucleotídeo), 0,8 µL de cada primer (10 µM), 0,2 µL de Taq e 1,75 µL de DNA.

As condições de amplificação consistiam de uma etapa inicial de desnaturação com temperatura de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos conforme a tabela 1 para cada tipo de primer e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos. A amplificação e a qualidade dos produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corados com Gel Green. Posteriormente, as amostras foram purificadas com PEG 8000 (Polietilenoglicol) conforme o protocolo de Paithankar e Prasad (1991). O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Filogenômica na Universidade Federal do Pará, através do método de dideoxynucleotídeos terminais com reagentes do Kit Big Dye v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies) no sequenciador automático modelo ABI 3500 XL (Life Technologies).

Tabela 1. Sequências e ciclo de PCR dos primers utilizados nas análises moleculares.

Região Gênica	Primers	Sequência	Fonte	Ciclo de PCR (35x)		
				1	2	3
16S	16S_L	5'- GCC TCG CTT GTT TAC CAA AAA C -3'	Palumbi 1996	94 °C	53 °C	72 °C
16S	16S_H	5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3'	Varela et al. 2007	60s	60s	60s
ND2	ND2_ELEUF1	5'- CAC CCA CGM GCC ATT GAA GC -3'	Carnaval &	94 °C	53 °C	72 °C
ND2	ND2_ALAR	5'- TAA AGT GTC TGA GTT GCA TTC A -3'	Bates 2007	30s	30s	120s
TYR	Tyr1C_F	5'- GGC AGA GGAW CRT GCC AAG ATG T -3'	Bossuyt e	94 °C	57 °C	72 °C
TYR	Tyr1G_R	5'- TGC TGG GCR TCT CTC CAR TCC CA -3'	Milinkovitch, 2000	30s	30s	40s
RAG-1	Rag1Isch_F2	5'- TGT TGG BAT CAT TGA YGG CYT WTC -3'	Barth et al.	94 °C	54 °C	72 °C
RAG1	Rag1Isch_R2	5'- GGC TTT GCA GAA ACT CCC TTA ACT C -3'	dados não publicados	60s	60s	60s

1. desnaturação; 2. anelamento; 3. extensão

- Análises das Sequências

Os cromatogramas foram verificados visualmente utilizando o software CodonCode Aligner 6.0.2 e o consenso das sequências dos fragmentos nucleares foram obtidos através do software DNA Baser

Assemble V4. Os sítios heterozigotos identificados através de picos duplos sobrepostos em ambas as fitas dos genes nucleares foram inicialmente codificados com o código da IUPAC correspondente. Posteriormente as sequências de DNA foram alinhadas, utilizando o algoritmo ClustalW implementado no BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) e inspecionadas e corrigidas visualmente.

Os haplótipos dos genes nucleares foram reconstruídos através do programa PHASE (Stephens et al. 2001; Stephens & Donnelly 2003) com o auxílio do SeqPHASE (Flot 2010). Cinco corridas independentes com 1000 iterações com diferentes pontos iniciais (*seeds*) foram realizadas para cada fragmento nuclear e posteriormente verificado a congruência entre as diferentes corridas. Foram utilizados os haplótipos que apresentavam probabilidade de reconstrução de $p > 0.6$ já que foi demonstrado que a utilização desse limiar produz pouco ou nenhum aumento dos falsos positivos (Harrigan et al. 2008; Garrick et al. 2010). O teste PHI implementado no SPLITSTREE 4 foi utilizado para testar se havia recombinação nos genes nucleares (Bruen et al. 2006).

- Estrutura genética

A análise filogenética foi realizada utilizando os quatro genes concatenados (uma matriz de dados com 2578 pares de bases - pb) através de Inferência Bayesiana. Como grupo externo foram utilizadas sequências de *Haddadus binotatus*, "*Eleutherodactylus*" *bilineatus* e *Barycholos ternetzi* e de diferentes espécies do gênero *Pristimantis* (Apêndice II) que resultou em uma árvore com 128 terminais. A árvore bayesiana foi implementada no MrBayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) e as corridas foram realizadas no portal CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller 2010). O modelo evolutivo mais apropriado e o melhor esquema de partição foi estimado através do PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear et al. 2012), utilizando o critério de informação Akaike (AIC). O melhor esquema de partição estimado para os genes foi: GTR + I + G para o 16S; GTR + G para o 1º códon e GTR + I + G para o 2º e 3º códon do ND2; HKY + I para o 1º e 2º códon e GTR + G para o 3º códon de TYR e HKY + I para o 1º e 2º códon e GTR + I + G para o 3º códon do RAG-1. A análise foi realizada com duas corridas independentes com 70 milhões de gerações com quatro cadeias de *Monte Carlo Markov* (MCMC), amostrando uma árvore a cada 1000 gerações. A convergência entre as cadeias (Effective Sample Size; ESS > 200), o tamanho adequado do *burnin* e a performance geral das corridas foram avaliadas no Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2014). Os primeiros 20% das árvores foram descartadas como *burn-in* e a árvore consenso foi visualizada utilizando o FigTree 1.4.2 (Rambaut 2009).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando os agrupamentos recuperados nas análises anteriores, através de 10.000 replicações no programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 2005). Os valores de *Fst*, na comparação par a par, entre os grupos foi obtida no mesmo programa.

As redes de haplótipos foram geradas para os genes nucleares utilizando o software HaploViewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>), através de uma árvore de máxima parcimônia produzida no

DNAPARS, disponível no pacote PHYLIP v.3.695 (Felsenstein 2005), seguindo as recomendações de Salzburger e colaboradores (2011) utilizando os filogrupos obtidos nas análises filogenéticas.

A distância genética média entre os principais agrupamentos recuperados nas análises acima foi obtida utilizando a distância-p não corrigida com 1000 replicas de *Bootstrap* no programa Mega v 5.0 (Tamura et al. 2011) para o 16S e o ND2. Também foram incluídas nessa análise outras espécies de *Pristimantis*.

- Paleomodelagem climática

No intuito de estimar potenciais áreas estáveis para *P. vinhai* durante o Pleistoceno foram desenvolvidos modelos de distribuição de espécies (MDE) sob condições climáticas atuais e em cenários climáticos do passado, no médio Holoceno (6000 anos (6k) atrás) e para o Último Máximo Glacial (UMG - 21000 anos (21k) atrás). A modelagem foi baseada em 25 pontos georeferenciados que contemplam toda a distribuição conhecida da espécie (Apêndice III).

Para a modelagem da distribuição potencial presente foram utilizados dados climáticos obtidos na página do WorldClim (Hijmans et al. 2005) com resolução espacial de 2.5 arc. min. resultantes de condições médias bioclimáticas (Beaumont et al. 2005) compiladas durante o período de 1950 e 2000. Modelos globais de simulações climáticas, seguindo o cenário r1i1p1, para o médio Holoceno (6 k) e para o Último Máximo Glacial (21 k) foram obtidos do projeto PMIP3 (Braconnot et al. 2012; Harrison et al. 2015) (médio-Holoceno: FGOALS-g2, GISS-E2-R, IPSL-CM5A-LR, MIROC-ESM, MPI-ESM-P, MRI-CGCM3, CCSM4, CNRM-CM5, CSIRO-Mk3-6-0, BCC-CSM1-1, CSIRO-Mk3L-1-2; Último Máximo Glacial: CCSM4, CNRM-CM5, COSMOS-ASO, FGOALS-g2, IPSL-CM5A-LR, MIROC-ESM, MPI-ESM-P, MRI-CGCM3).

Com base em dados brutos de temperatura e precipitação, um conjunto abrangente com 19 variáveis bioclimáticas foram computados e rescalonados para uma resolução de 2.5 arc. min. aplicando o método Delta (Peterson & Nyári 2007). Para testar se existia colinearidade entre as variáveis na área de estudo, foi realizado um teste par a par utilizando correlação de Spearman. Quando duas variáveis apresentavam uma alta correlação entre elas ($R^2 > 0.75$), uma delas era retirada da análise para minimizar os efeitos negativos da colinearidade nas projeções (Heikkinen et al. 2006). O banco de dados final compreendeu as seguintes variáveis climáticas: temperatura média anual (bio1), isothermalidade (bio3), sazonalidade da temperatura (bio4), temperatura máxima do mês mais quente (bio5), temperatura mínima do mês mais frio (bio6), amplitude térmica anual (bio7), precipitação anual (bio12), precipitação do trimestre mais úmido (bio16), precipitação do trimestre mais seco (bio17) e precipitação do trimestre mais quente (bio18).

Para o desenvolvimento da modelagem de distribuição potencial da espécie (MDE) foi utilizado o algoritmo *Maximum Entropy* implementado pelo programa MaxEnt 3.3.3k (Elith et al. 2006; Elith et al. 2011; Phillips et al. 2006) aplicando a configuração padrão. Como plano de fundo ambiental foi selecionado uma área retangular maior que englobava todos os registros da espécie. Para o cálculo da MDE os registros da

espécie foram divididos aleatoriamente 100 vezes e 80% deles utilizados para calibração e 20% para avaliação do modelo usando a área sob a curva ROC (AUC; Swets 1988), em que a média de todos os 100 MDE foi utilizada para processamento posterior. Liu e colaboradores (2005) recomendaram a não fixação de um limiar de presença-ausência. Dessa forma, nós selecionamos o valor mínimo de presença durante o treinamento em nossa saída logística. Áreas que requerem extrapolação na MDE, para além da amplitude ambiental do treinamento, foram quantificados utilizando similaridade multivariada de superfícies ambientais (MESS) (Elith et al. 2010). Para mostrar as prováveis áreas de estabilidade durante os três períodos, foram multiplicados a distribuição potencial (saída logística) nas condições atuais, do médio Holoceno (6k) e do Último Máximo Glacial (21k). Assim, o mapa resultante indica áreas com alta probabilidade que são caracterizadas por elevada probabilidade de ocorrência em todos os três intervalos de tempo.

- Estimativas do tempo de divergência

Para estimar o tempo de divergência foi utilizada uma abordagem coalescente através da árvore de espécies implementada no BEAST 1.8.2 (Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data; Helen & Drummond 2010). McCormack e colaboradores (2011) mostraram que a datação por esse método é mais acurado do que através da árvore de genes. Para essa análise foram utilizados apenas os indivíduos que apresentavam sequências para todos os genes. Como a análise assume que os marcadores utilizados são independentes e os genes mitocondriais são ligados, o ideal seria entrar com esses marcadores concatenados. Contudo, a taxa de mutação dos dois genes (ND2 e 16S) são diferentes e tal procedimento inviabilizaria a utilização da taxa de mutação conhecida para o ND2. Dessa forma, "desligamos" os modelos de relógio e de substituição entre as quatro partições (16S, ND2, RAG-1 e TYR) e "ligamos" apenas as árvores dos mitocondriais para não violar as premissas do método. As análises foram conduzidas utilizando o relógio estrito com o *prior* "Yule process", árvore inicial estimada por UPGMA e com o modelo evolutivo HKY para todos os genes. Devido ao pouco conhecimento sobre os fósseis dos anfíbios que impossibilita a aplicação de pontos de calibração para a árvore, aplicamos a taxa de mutação para o ND2 (0.00957 mutações/sítios/milhões de anos (m.a.) - Crawford 2003) estimada para *Eleutherodactylus* que é amplamente utilizada em estudos filogeográficos com anuros (e.g. Carnaval & Bates 2007; Carnaval et al. 2009; Thomé et al. 2010). A taxa de mutação dos outros genes foi estimada através de uma distribuição lognormal com os parâmetros *default*. As análises foram baseadas em duas corridas independentes com 150 milhões de gerações e amostragem a cada 1000 árvores com *burn-in* de 20%. O desempenho da corrida e a convergência das cadeias (ESS > 200) foram analisados no programa Tracer 1.6 (Rambaut et al. 2014). Os resultados foram combinados e a árvore consenso obtida através do TreeAnnotator sendo visualizada posteriormente no FigTree 1.4.2 (Rambaut 2009).

- Estatísticas sumárias, testes de neutralidade e demografia histórica

Para avaliar a diversidade genética de *P. vinhai* foram calculados o número de sítios variáveis (S), o número de haplótipos (h) e a diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd). Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e o F_s de Fu (Fu 1997) foram utilizados para testar evidências de expansão demográfica em cada clado recuperado nas análises filogenéticas. Todas essas estatísticas foram calculadas no DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). O teste de significância foi obtido através de 10000 simulações coalescentes no mesmo programa.

Além disso, para testar se a diversidade genética era maior nos locais considerados como áreas de estabilidade climática pela paleomodelagem do que nas áreas estimadas como de baixa adequabilidade, comparamos a diversidade nucleotídica (π) entre esses locais e realizamos o teste t de student no PAST 3.07 para comparar as médias obtidas e se elas eram estatisticamente diferentes ($p < 0.05$). Para essas comparações nós utilizamos apenas os clados recuperados nas análises filogenéticas onde foram encontradas áreas estáveis e não estáveis no mesmo agrupamento. Como essas localidades compartilham uma história evolutiva em comum, achamos que essa abordagem iria refletir melhor possíveis diferenças na diversidade nucleotídica encontrada. As localidades que foram estimadas como refúgios e áreas de baixa adequabilidade podem ser conferidas no Apêndice I. Além disso, calculamos os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e o F_s de Fu (Fu 1997) para cada uma dessas áreas para detectar possíveis eventos de expansão demográfica.

Para estimar como o tamanho efetivo populacional de *P. vinhai* variou ao longo do tempo, em especial durante as oscilações climáticas do Pleistoceno, realizamos uma análise multilocus pelo método Bayesiano coalescente EBSP (Extended Bayesian Skyline Plot - Heled & Drummond 2008) implementado no Beast 1.8.2. Para essa análise utilizamos todas as sequências dos genes ND2, RAG-1 e TYR. Implementamos o relógio molecular estrito com a taxa de mutação estimada para o ND2 de 0.00957 mutações/sítios/milhões de anos (m.a.) (Crawford 2003) com o modelo HKY para todos os genes. A taxa de mutação dos outros genes foi estimada através de uma distribuição lognormal com os parâmetros *default*. Foram realizadas duas corridas independentes com 200 milhões de gerações de MCMC (Monte Carlo Markov chain) amostrando a cada 10000 gerações. A performance (ESS > 200) das corridas foi verificada no Tracer 1.6.

RESULTADOS

- Caracterização das sequências

Amostras de 20 localidades de *Pristimantis vinhai* que contemplam toda a distribuição geográfica da espécie foram sequenciadas (Figura 1) obtendo 781 pb de ND2 (N=85), 532 pb do 16S (n = 76), 708 pb de RAG-1 (n = 68) e 549 pb de TYR (n = 32). Nenhum códon de parada foi observado nos genes codificantes e

apenas o 16S apresentou *indels/gaps* em suas sequências. Para os genes mitocondriais (ND2 e 16S concatenados; n = 69) foram encontrados 303 sítios polimórficos que resultaram em 47 haplótipos.

A reconstrução haplótipica utilizando o PHASE resolveu um total de 52 amostras (104 cromossomos; $p > 0.6$) do RAG-1 e todas as amostras de TYR (64 cromossomos; $p > 0.6$). As 16 sequências de RAG-1 que apresentaram baixa probabilidade de PHASE foram removidas das análises populacionais. As amostras resolvidas pelo PHASE apresentaram 46 haplótipos com 56 sítios informativos para o RAG-1 e 40 haplótipos e 48 sítios informativos para o TYR. O teste PHI rejeitou a hipótese de recombinação para todos os genes nucleares (RAG-1: $p = 0.11$ e TYR: $p = 0.46$). O resumo das estatísticas sumárias para todos os genes pode ser conferido na tabela 2.

Tabela 2. Estatísticas sumárias para os genes utilizados nesse estudo.

Gene	Tamanho (pb)	N	S	h	Hd \pm SD	π \pm SD	D	Fs
mtDNA	1313	69	303	47	0.986 \pm 0.005	0.0706 \pm 0.00137	-	-
N		14	49	10	0.890 \pm 0.081	0.01560 \pm 0.00107	1.43	1.541
C		22	128	17	0.974 \pm 0.022	0.02728 \pm 0.00221	-0.08	0.783
SW1		16	24	9	0.917 \pm 0.042	0.00645 \pm 0.00056	0.70	0.734
SW2		4	2	3	0.833 \pm 0.222	0.00076 \pm 0.00026	-0.70	-0.887
S1		10	24	6	0.867 \pm 0.085	0.00761 \pm 0.00090	0.83	2.129
S2		3	2	2	0.667 \pm 0.314	0.00102 \pm 0.00048	-	-
RAG-1	708	104	56	46	0.966 \pm 0.007	0.00736 \pm 0.00041	-	-
N		22	13	8	0.732 \pm 0.090	0.00210 \pm 0.00052	-2.06*	-3.06*
C		34	23	19	0.947 \pm 0.021	0.00530 \pm 0.00039	-1.15	-9.53*
SW1		14	22	8	0.912 \pm 0.049	0.01113 \pm 0.00155	0.37	0.84
SW2		7	10	6	0.952 \pm 0.096	0.00552 \pm 0.00129	-0.23	-1.64
S1		26	7	6	0.769 \pm 0.046	0.00251 \pm 0.00040	-0.09	-0.17
S2		-	-	-	-	-	-	-
TYR	549	64	48	40	0.948 \pm 0.021	0.00904 \pm 0.00065	-	-
N		8	13	5	0.857 \pm 0.108	0.00904 \pm 0.00167	-0.05	0.77
C		22	24	18	0.978 \pm 0.021	0.00812 \pm 0.00062	-1.21	-11.89*
SW1		14	10	9	0.879 \pm 0.079	0.00420 \pm 0.00083	-1.03	-4.20*
SW2		6	10	6	1.000 \pm 0.096	0.00716 \pm 0.00155	-0.61	-2.65*
S1		12	2	4	0.455 \pm 0.170	0.00110 \pm 0.00045	-0.24	-1.69*
S2		2	0	1	0	0	0	0

n = número de sequências; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; SD = desvio padrão; D = D de Tajima; Fs = Fs de Fu; Valor de $p = *$ < 0.05 ; $** < 0.1$.

- Estrutura filogeográfica

A reconstrução filogenética, utilizando os dados concatenados para todos os genes, através de inferência Bayesiana (Figura 1) recuperou *Pristimantis vinhai* como uma linhagem monofilética e irmã de um clado formado por *Pristimantis* sp. 1, contudo com baixo suporte. Quatro agrupamentos principais basais com alto suporte estatístico foram encontrados : I) Clado Norte (N) com as amostras entre a Serra da Jibóia e Wenceslau Guimarães; II) Clado Central (C) englobando as localidades entre Igrapiúna (Reserva Ecológica

Michelin) até a Serra das Lontras; III) Clado Sudoeste (SW) com as amostras entre Serra Bonita e Macarani em um subgrupo maior (SW1) e uma subestruturação com as amostras de Ibicaraí (SW2) e o IV) Clado Sul (S) com as amostras do extremo sul da Bahia, entre Porto Seguro e Itamaraju (S1) e outro com as amostras de Una (S2).

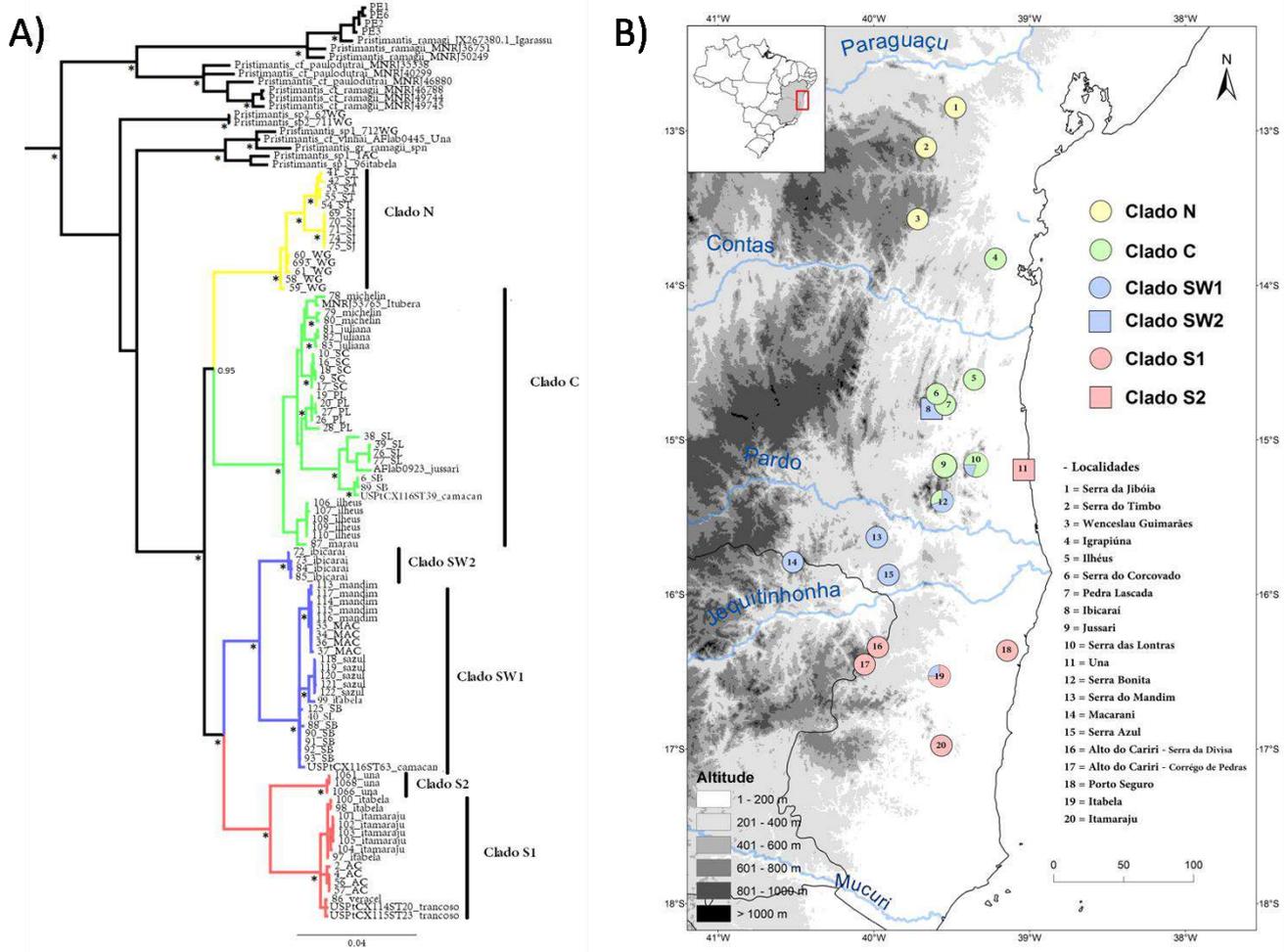


Figura 1. A) Árvore obtida por inferência Bayesiana com todos os genes concatenados (16S, ND2, RAG-1 e TYR) baseado em 2578 pb. Os suportes dos ramos mostram os valores de probabilidade posterior do MrBayes onde * ≥ 0.99 , valores abaixo de 0.95 não são mostrados. A barra representa o número de substituição por sítios. A árvore foi cortada para facilitar a visualização das relações dentro de *P. vinhai*. A árvore completa pode ser visualizada no Apêndice IV. B) Localidades amostradas de *Pristimantis vinhai*. As cores representam os principais agrupamentos obtidos

A estrutura genética encontrada foi concordante com a distribuição geográfica, na qual a maioria das amostras que ocorriam na mesma região foi recuperada no mesmo agrupamento. Entretanto, as amostras do município de Ibicaraí (Clado SW2) foram coletadas a menos de 20 km da Pedra Lascada (Clado C) e não foram recuperadas no mesmo clado e as amostras do município de Una que são geograficamente mais próximas de localidades do Clado C foram recuperadas junto com as do Clado Sul.

Nas proximidades do Rio Jequitinhonha e Pardo foram encontradas zonas de contato entre as linhagens C e SW1 que ocorrem em simpatria na Serra Bonita e na Serra das Lontras e entre SW1 e S1 encontradas juntas no município de Itabela (Figura 1).

A divergência genética encontrada entre esses grupos (distância-p) variou de 2.6-6.6 % para o 16S e entre 5-12.8% para o ND2 (Tabela 3) o que pode ser considerado alto, principalmente pela proximidade geográfica das linhagens recuperadas e pequena amplitude geográfica do estudo. Além disso, na filogenia foram encontradas outras três linhagens, bem suportadas de *Pristimantis* (Figura 1 e Apêndice IV). Duas delas mais relacionadas com *P. vinhai* (*P. sp. 1* e *P. sp. 2*) e uma outra mais distante (*P. sp. 3*) com alta divergência genética entre elas e os outros *Pristimantis* da Mata Atlântica. A distância genética ficou entre 4.7 a 13.4% para o 16S e 14.7 a 15.9% para o ND2 (Tabela 4).

Tabela 3. Distância genética entre os principais grupos recuperados nas análises filogenéticas baseado em 532 pb para o 16S (diagonal inferior) e em 781 pb para o ND2 (diagonal superior).

Clados	N	C	SW	SW2	S2	S
N	-	11	11	9.7	11.9	11
C	5.1	-	11.6	11	12.8	12
SW	6.6	4.8	-	5	10.9	10.1
SW2	5.7	3.9	2.6	-	10.9	9.7
S2	5.9	5.2	5.3	4.9	-	8.1
S	5.6	5	5.4	4.4	2.9	-

Tabela 4. Distância genética entre as espécies de *Pristimantis* reconhecidas para a Mata Atlântica e as três espécies novas encontradas nesse estudo, baseado em 514 pb de para o 16S (diagonal inferior) e 781 pb para o ND2 (diagonal inferior).

Espécie	Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>Pristimantis vinhai</i>	IOS_107	-	15.9	-	14.7	14.7	-	-	-	-
2 <i>Pristimantis sp. 1</i>	AC_1	6.3	-	-	15.0	15.0	-	-	-	-
3 <i>Pristimantis sp. 1</i>	WG_712	6.9	2.3	-	-	-	-	-	-	-
4 <i>Pristimantis sp. 2</i>	WG_62	4.7	6.7	6.3	-	-	-	-	-	-
5 <i>Pristimantis sp. 2</i>	WG_711	4.7	6.7	6.3	0.0	-	-	-	-	-
6 <i>Pristimantis cf. paulodutra</i>	JX267360	8.7	8.4	7.5	7.3	7.3	-	-	-	-
7 <i>Pristimantis ramagii</i>	JX267380	8.1	9.6	9.2	6.3	6.3	7.3	-	-	-
8 <i>Pristimantis sp. 3</i>	SL_417	13.4	12.8	12.2	11.8	11.8	12.8	13.2	-	-
9 <i>Pristimantis sp. 3</i>	SL_443	12.8	12.4	11.8	11.8	11.8	12.5	14.2	5.1	-

Todas as amostras disponíveis no GenBank como *Pristimantis cf. vinhai* do trabalho de Canedo & Haddad (2002) foram agrupadas com nossas amostras de *P. vinhai*, exceto uma sequência (GenBank: JX267492.1) pertencente a Una que foi recuperada junto de uma espécie nova *Pristimantis sp. 1*.

A rede de haplótipos para o RAG-1 recuperou os principais agrupamentos descritos acima com pouco compartilhamento de haplótipos entre o clado C e SW (Figura 2), porém alguns haplótipos foram mais relacionados com outros clados do que com o seu. Para a TYR, a rede haplotípica foi menos informativa na separação dos principais grupos, com um maior compartilhamento entre os clados S e SW e também entre os clados C e SW (Figura 2).

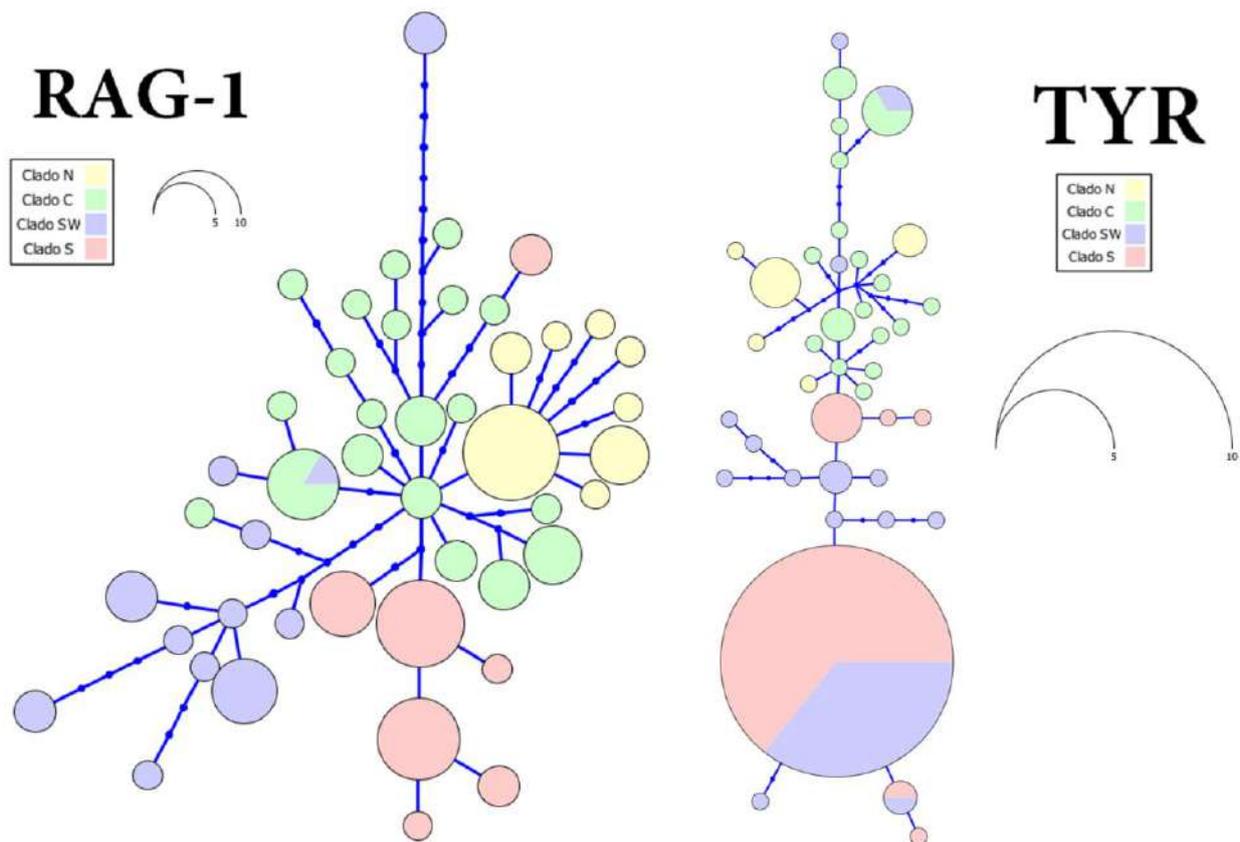


Figura 2. Rede de haplótipos dos genes nucleares. Cada círculo representa um haplótipo e o tamanho de sua frequência. As cores representam os agrupamentos recuperados nas análises filogenéticas. Ramos com apenas uma mutação não são mostradas. Cada círculo pequeno na linha representa uma mutação.

Os resultados da AMOVA, utilizando os genes mitocondriais, mostraram que 77.1% da variação encontrada nos dados era proveniente das diferenças genéticas entre os grupos (N, C, SW1, SW2, S e S2) evidenciando forte estruturação genética entre os clados recuperados nas análises filogenéticas (Tabela 5). Os valores de *Fst* nas comparações par a par entre os grupos (Tabela 6) também foi alto, sendo que a maior diferença foi encontrada entre o Clado S2 e SW2 (*Fst* = 0.98) e a menor entre o Clado N e C e entre C e SW2 (para ambos *Fst* = 0.75). Esses resultados indicam baixo fluxo gênico entre os grupos e populações altamente heterogêneas. Todos os resultados da AMOVA e *Fst* foram significativos com $p < 0.05$.

Análise de variância molecular (AMOVA) baseado nos genes mitocondriais.

Fonte de variação	GL	Percentual de Variação	Índice de Fixação
Entre os grupos	5	77.13	$\phi_{CT} = 0.771^*$
Entre as localidades dentro dos grupos	9	18.17	$\phi_{ST} = 0.953^*$
Dentro das localidades	48	4.69	$\phi_{SC} = 0.794^*$
Total	62		

* $p < 0.00001$

Tabela 6. Valores de Fst na comparação par a par entre os grupos recuperados nas análises filogenéticas. Todos os valores foram significativos ($p < 0.05$)

	N	C	SW2	SW1	S2	S
N	-					
C	0.75577	-				
SW2	0.84207	0.75256	-			
SW1	0.8767	0.80594	0.86943	-		
S2	0.856	0.77793	0.98992	0.93883	-	
S1	0.85629	0.79375	0.92018	0.9146	0.89087	-

- Árvore de espécies e estimativas de tempo de divergência

A análise multilocus para a árvore de espécies (Figura 3) gerada no BEAST recuperou a mesma topologia geral obtida na inferência Bayesiana com a diferença que a árvore de espécies recuperou um suporte menor entre os clados S1 e S2; SW1 e SW2. As estimativas de divergência a partir da análise do ancestral comum mais recente mostrou que a diversificação no grupo começou no final do Mioceno (6.13 - 8.57 m.a.).

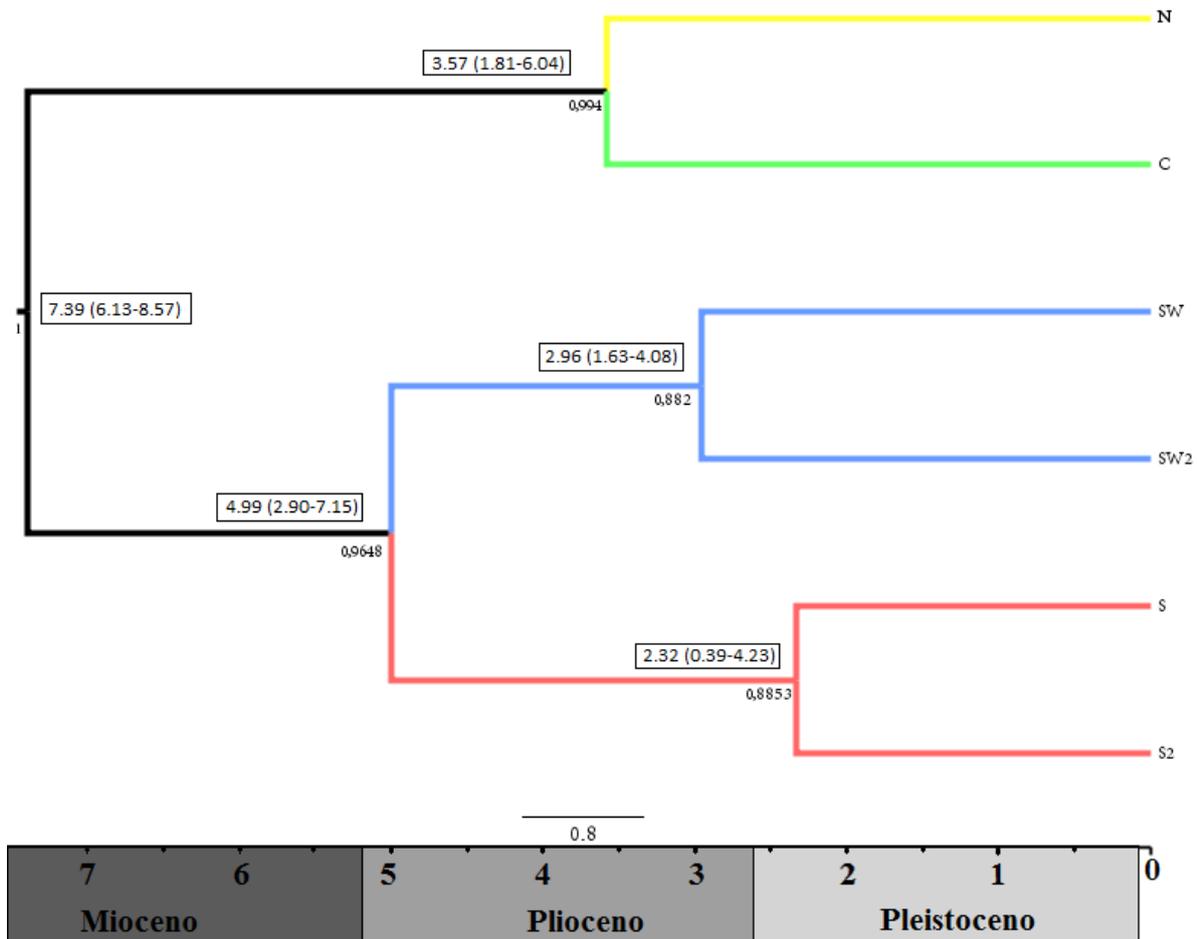


Figura 3. Árvore de espécies com os tempos de divergência em milhões de anos nas caixas retangulares [média (intervalo de confiança)] e valores de probabilidade posterior de cada agrupamento abaixo do nó. As cores dos clados seguem a Figura 1.

- Modelagem e áreas de estabilidade no Pleistoceno

O modelo médio das 100 MDE apresentou um alto valor de AUC ($AUC_{\text{Training}} = 0.98$, $AUC_{\text{Test}} = 0.96$), onde a variável bio 17 (Precipitação do trimestre mais seco) apresentou a maior contribuição (63,1%), seguida pela bio 5 (Temperatura máxima do mês mais quente) com 15,2% e a bio 4 (Sazonalidade da temperatura) com 6,1%. Todas as outras variáveis contribuíram com menos de 5% na MDE final. De acordo com as projeções da MDE a distribuição potencial de *Pristimantis vinhai* se restringe à sua área geral de ocorrência, onde a parte noroeste é mais contínua do que a parte sul. Esse padrão geral permaneceu relativamente estável durante o "médio-holoceno". A projeção para o último máximo glacial (UMG) sugere uma distribuição potencial muito mais ampla, incluindo grandes áreas de adequabilidade na parte central da distribuição e ao longo da costa (Figura 4).

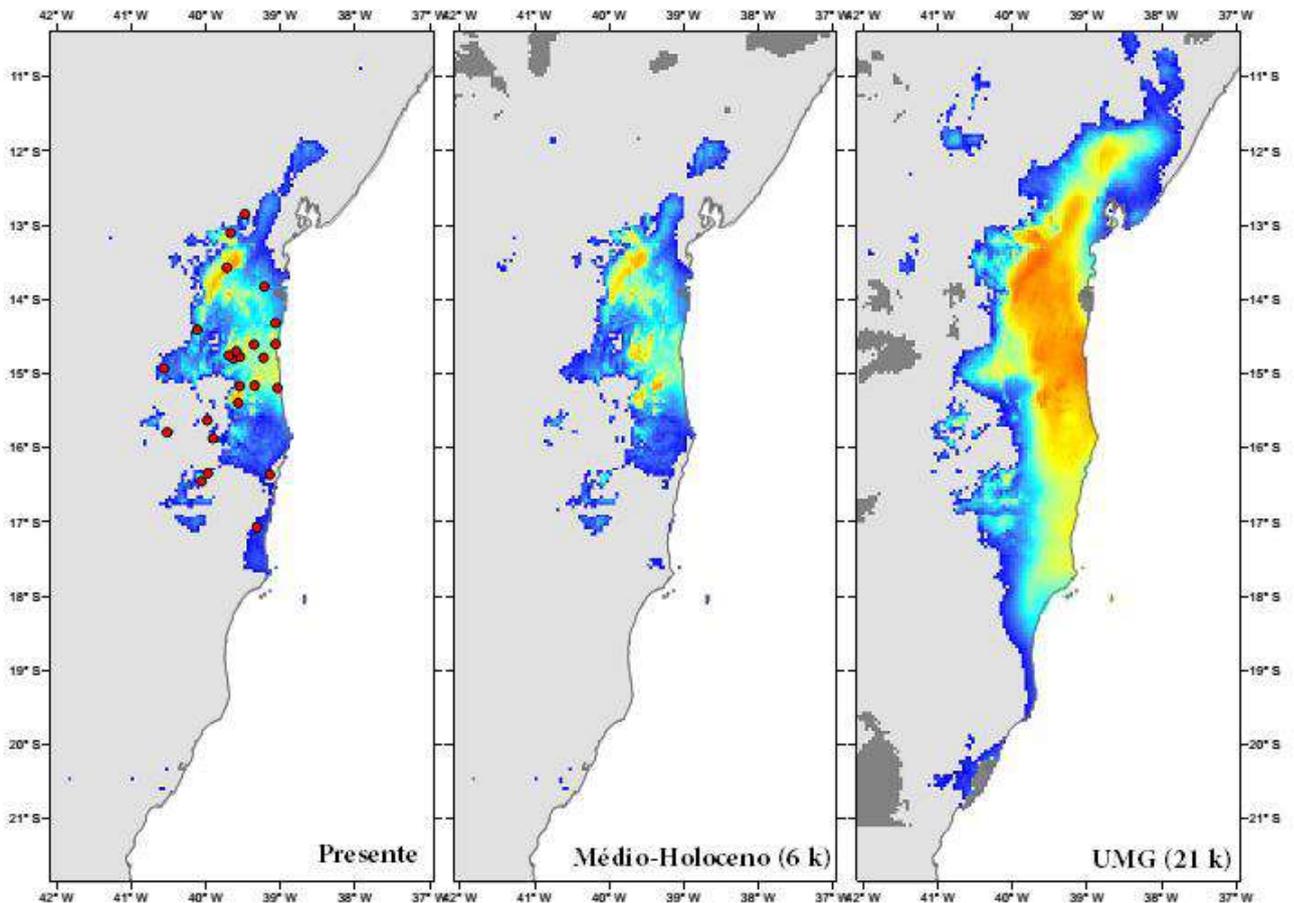


Figura 4. Modelagem de nicho ecológico mostrando a distribuição geográfica potencial de *Pristimantis vinhai* no presente, no médio-holoceno e no Último Máximo Glacial (UMG). Os pontos vermelhos representam os 25 registros utilizados na modelagem. Cores quentes representam locais estimados com alta probabilidade de ocorrência.

Olhando para as áreas que permaneceram estáveis durante os três períodos de tempo (Figura 5), cinco áreas foram estimadas como possíveis refúgios para essa espécie durante o período analisado. Todas elas estão localizadas em áreas de altitude (>700 m) que são identificadas de norte para o sul a seguir: 1) a maior área contínua estável segue uma escarpa de áreas altas que vai da região de Wenceslau Guimarães até o município de Jequié, sendo limitada ao sul pelo rio de Contas; 2) área de altitude na divisa entre os municípios de Ibirataia e Apuarema; 3) Serra do Corcovado, Serra da Pedra Lascada e regiões elevadas no município de Ibicaraí; 4) Serra das Lontras e 5) Serra Bonita e Serra do Teimoso.

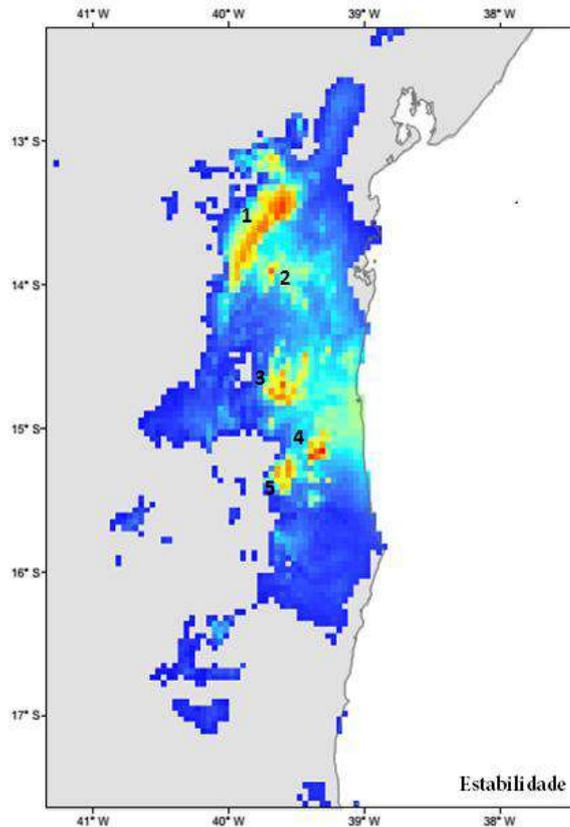


Figura 5. Áreas de estabilidade climática previstas pela paleomodelagem de *Pristimantis vinhai* todas em áreas de altitude (> 700 m). Cores quentes representam locais estimados com alta probabilidade de ocorrência em todos os modelos. 1 = Wenceslau Guimarães até o município de Jequié; 2 = divisa entre os municípios de Ibirataia e Apuarema; 3) Serra do Corcovado, Serra da Pedra Lascada e Ibicaraí; 4) Serra das Lontras e 5) Serra Bonita e Serra do Teimoso

- Diversidade genética

De forma geral, a diversidade genética encontrada nos refúgios foi maior do que nas áreas não estáveis (Tabela 7) e a diferença foi estatisticamente significativa para todos os genes (Figura 6). Duas exceções foram as comparações relativas ao gene RAG-1 para o clado N e para o gene TYR no clado C. Entretanto, a diferença era muito pequena e não foi estatisticamente significativa.

- Demografia Histórica

Assinaturas de expansão demográfica foram encontradas para áreas estáveis utilizando os genes nucleares. Valores negativos e significativos foram obtidos para os refúgios estimados no Clado N e C com o gene RAG-1 e para o Clado SW com o gene TYR (Tabela 7). Apenas um sinal de expansão populacional foi encontrado nas áreas de instabilidade para o gene TYR no clado C.

As estimativas de variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo obtidas através da análise de EBSF sugeriu um acentuado declínio populacional que iniciou aproximadamente há 120 mil anos atrás no auge do último período interglacial, após o final do penúltimo máximo glacial (Figura 7).

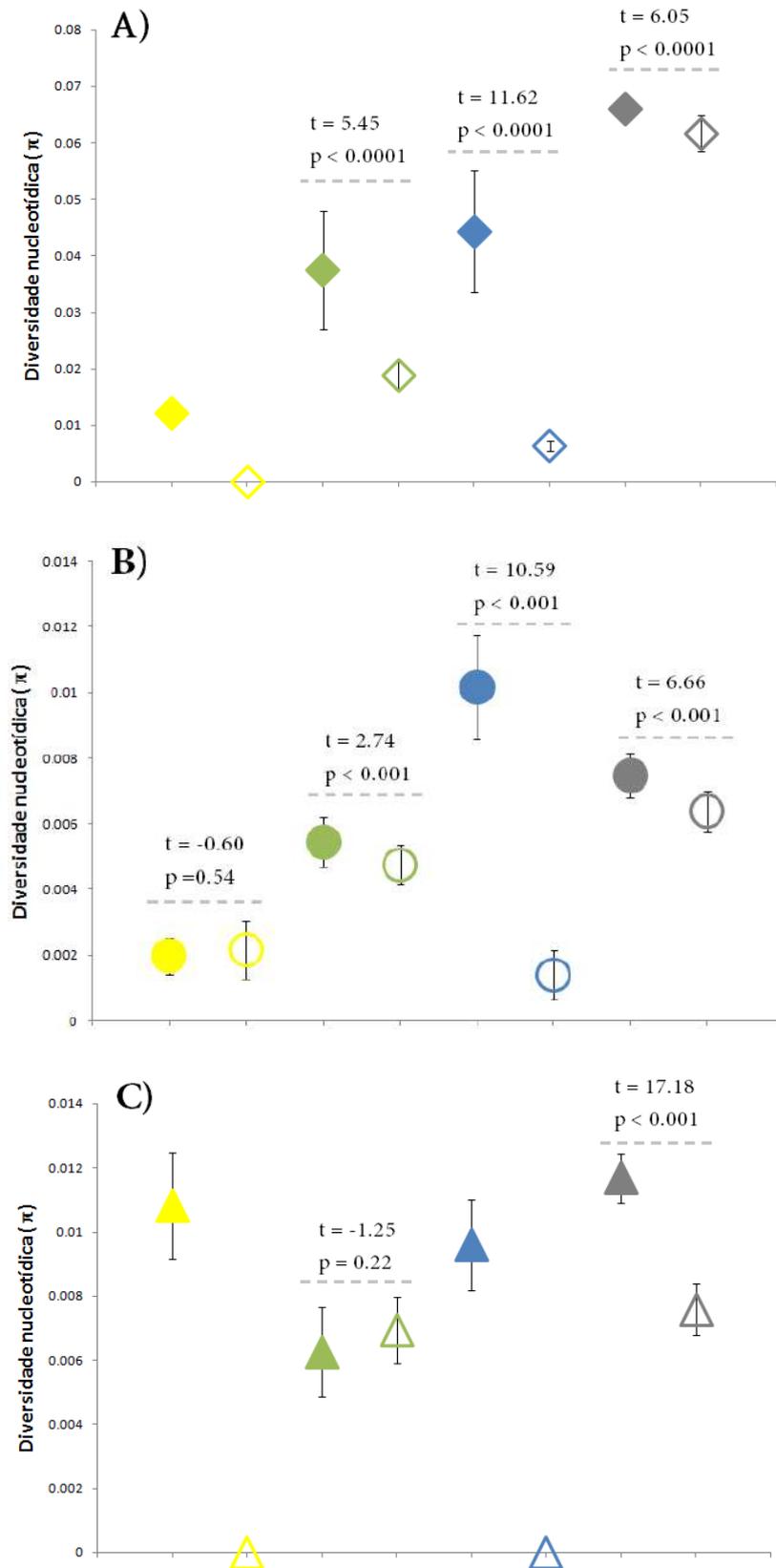


Figura 6. Comparação da diversidade nucleotídica média (barras = desvio padrão) entre as áreas estáveis (símbolos preenchidos) e não estáveis (símbolos não preenchidos) previstas pela paleomodelagem utilizando os genes mitocondriais 16S e ND2 concatenados (A), RAG-1 (B) e TYR (C). Valor da estatística do teste t de student e o valor de p para cada comparação é fornecido no gráfico. As cores representam cada clado e seguem a figura 1. Símbolos em cinza representam a comparação utilizando todas as sequências de cada gene em ambas as áreas.

Tabela 7. Diversidade genética e estatísticas sumárias utilizadas na comparação entre as áreas estimadas como refúgios e de instabilidade pela paleomodelagem para *Pristimantis vinhai*.

	Áreas	n	S	h	Hd ± SD	π ± SD	D	Fs
mtDNA								
N	estáveis	9	34	9	1 ± 0.052	0.01220 ± 0.00162	1.405	-1.776
	não-estáveis	5	0	1	0	0	0	0
C	estáveis	10	160	7	0.933 ± 0.062	0.03740 ± 0.01050	-0.850	5.280
	não-estáveis	11	66	9	0.945 ± 0.066	0.01885 ± 0.00244	0.373	1.126
SW	estáveis	11	145	9	0.964 ± 0.051	0.04430 ± 0.01078	0.573	3.075
	não-estáveis	9	16	4	0.806 ± 0.089	0.00635 ± 0.00092	2.014	4.241
Geral	estáveis	30	230	24	0.984 ± 0.013	0.06599 ± 0.00185	1.343	2.167
	não-estáveis	25	201	14	0.933 ± 0.029	0.06160 ± 0.00321	1.666	11.867
RAG-1								
N	estáveis	16	9	6	0.717 ± 0.099	0.00198 ± 0.00056	-1.777*	-1.673**
	não-estáveis	6	4	3	0.733 ± 0.155	0.00217 ± 0.00090	-0.676	0.540
C	estáveis	18	19	13	0.928 ± 0.052	0.00544 ± 0.00075	-1.317**	-6.083*
	não-estáveis	16	15	9	0.900 ± 0.050	0.00477 ± 0.00059	-0.992	-2.122
SW	estáveis	16	24	11	0.950 ± 0.036	0.01016 ± 0.00158	-0.185	-1.570
	não-estáveis	4	2	2	0.500 ± 0.265	0.00141 ± 0.00075	-0.709	1.099
Geral	estáveis	50	39	29	0.954 ± 0.016	0.00748 ± 0.00068	-1.384**	-16.06*
	não-estáveis	26	25	14	0.942 ± 0.023	0.00638 ± 0.00062	-1.136	-3.742**
TYR -1								
N	estáveis	6	13	5	0.933 ± 0.122	0.01081 ± 0.00166	0.257	-0.055
	não-estáveis	2	0	1	0	0	0	0
C	estáveis	8	9	6	0.929 ± 0.084	0.00625 ± 0.00139	-0.059	-1.301
	não-estáveis	12	17	11	0.985 ± 0.040	0.00693 ± 0.00103	-1.407**	-6.870*
SW	estáveis	16	23	15	0.992 ± 0.025	0.00958 ± 0.00142	-0.981	-9.816*
	não-estáveis	4	0	1	0	0	0	0
Geral	estáveis	30	35	25	0.986 ± 0.013	0.01167 ± 0.00076	-1.004	-16.464*
	não-estáveis	18	21	13	0.948 ± 0.039	0.00758 ± 0.00081	-1.245	-5.616*

n = número de sequências; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; SD = desvio padrão; D = D de Tajima; Fs = Fs de Fu; Valor de P = * <0.05; ** < 0.1.

DISCUSSÃO

Ao contrário dos outros estudos realizados na Mata Atlântica que utilizaram espécies amplamente distribuídas e que geralmente enfrentaram problemas de amostragens fragmentadas ao longo da ocorrência do organismo estudado (Martins 2011; Silva et al. 2012) este estudo foi realizado em uma escala menor, utilizando uma espécie endêmica com ocorrência limitada a uma pequena área geográfica, contudo em uma região chave, com grande importância biogeográfica para melhor compreensão da diversificação das espécies do bioma. Resultados recentes demonstraram a divisão da Mata Atlântica em duas regiões climáticas distintas (Carnaval et al. 2014) levantando questionamentos se espécies com distribuição restrita não seriam mais adequadas para fornecer perspectivas sobre a diversificação de cada região (Brunes et al. 2015).

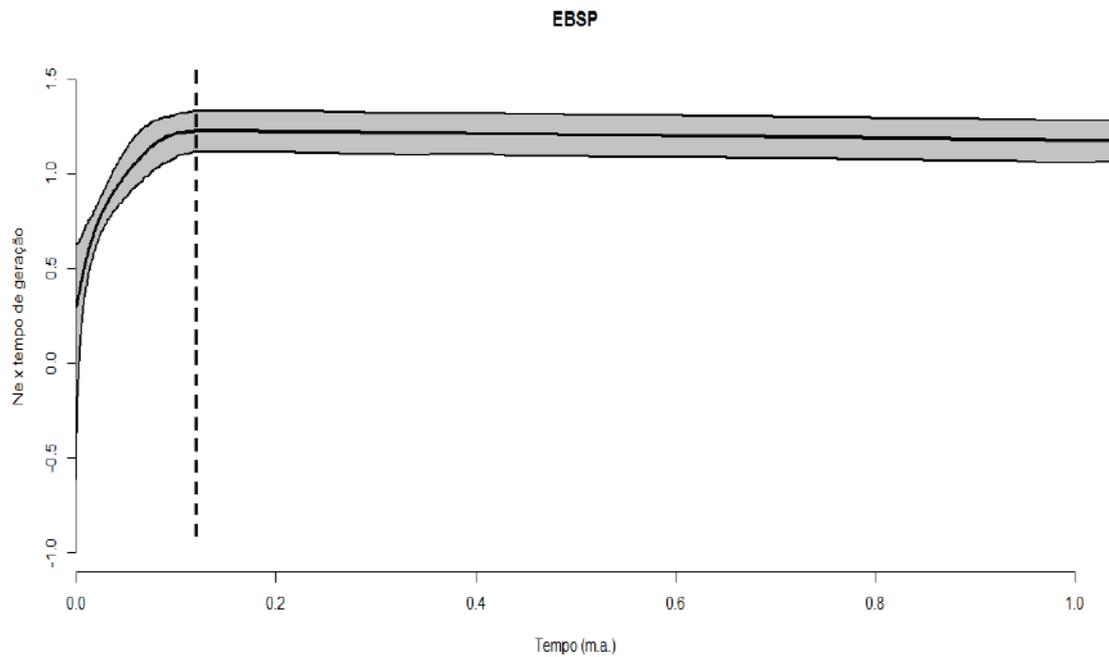


Figura 7. Estimativa da variação do tamanho efetivo populacional de *Pristimantis vinhai* ao longo do tempo utilizando o EBSP (Extended Bayesian Skyline Plot). A linha tracejada indica o tempo onde iniciou o declínio populacional aproximadamente há 120 mil anos atrás. A linha horizontal do meio representa a mediana da estimativa e a área em cinza o intervalo de confiança (95% de Highest Posterior Density).

- Refúgios dentro de refúgios

A teoria dos refúgios prevê retração florestal durante as glaciações pleistocênicas, devido à diminuição da umidade com o avanço das geleiras, e conseqüentemente diminuição dos ambientes úmidos florestados que seriam fragmentados pela expansão de áreas abertas, isolando as áreas florestais e sua biota nesses refúgios, promovendo diversificação das espécies por alopatria (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1970). Entretanto, para a Mata Atlântica da Bahia alguns estudos estão demonstrando, através de modelagem paleoclimática, que grandes áreas florestais persistiram durante o último máximo glacial em toda sua extensão (Carnaval & Moritz 2008; Porto et al. 2013; Leite et al. 2016), inclusive que as áreas florestais expandiram sua distribuição devido a exposição da placa continental, aumentando a área disponível e com condições ambientais favoráveis para essas florestas progredirem (Leite et al. 2016).

Dessa forma, aparentemente não houve retração florestal e esse não foi um fator limitante para a espécie estudada na sua região de ocorrência, pelo menos durante os últimos 140 mil anos (Leite et al. 2016), já que existem evidências de expansão florestal, através de dados palinológicos, também para o último interglacial (Ledru et al. 2009). Espécies de desenvolvimento direto não dependem de corpos d'água para reprodução, porém a ausência de áreas florestadas contínuas poderia limitar sua capacidade de dispersão.

Os refúgios identificados nesse estudo possivelmente não foram resultado da persistência de áreas florestadas nesses locais, mas de condições climáticas mais favoráveis para a espécie em regiões úmidas e com temperatura mais amena, nos períodos interglaciais, encontradas nas áreas de altitude. Segundo a

modelagem, durante o UMG houve grande expansão das áreas com alta adequabilidade para essa espécie. Ao contrário do que é geralmente descrito na literatura para outras espécies da Mata Atlântica (Turchetto-Zolet et al. 2013), as populações de *P. vinhai* possivelmente foram fragmentadas durante os períodos interglaciais, onde o clima estava mais quente e seco. Esse padrão ainda não tinha sido reportado para espécies dependente de florestas na América do Sul (Turchetto-Zolet et al. 2013). Resultado semelhante foi encontrado para uma espécie de lagarto endêmico de áreas de altitude da Austrália (Bell et al. 2010). Espécies típicas de áreas de altitude nos trópicos devem ter aumentado os seus limites de distribuição, ocupando altitudes mais baixas durante os períodos de climas mais frios, permitindo assim, um maior fluxo gênico entre as populações da espécie (Wiens 2004; Streicher et al. 2009).

Atualmente, essa espécie é encontrada em diferentes fragmentos florestais, tanto em áreas de altitude, como em áreas de baixada (Silvano & Pimenta 2003; Juncá 2006; Camurugi et al. 2010; Dias et al. 2014a; Dias et al. 2014b). Isso mostra que essa espécie consegue ocupar ambientes previstos como de menor adequabilidade ambiental mostrando alta resiliência. Entretanto, um estudo realizado na Serra Bonita, município de Camaçari - Bahia, comparando a estrutura da comunidade de anfíbios em quatro diferentes cotas altitudinais (250m, 450m, 650m e 850m) mostrou que *P. vinhai* era a espécie dominante em quase todas as cotas, porém sua abundância era quase duas vezes maior em 850 m de altitude (Dias 2011). Sendo assim, é provável que as populações dessa espécie prosperaram e mantiveram efetivos populacionais maiores dentro dos refúgios estimados (altitude > 700 m) refletindo a maior diversidade genética encontrada nessas áreas. Contudo, devido às características ecológicas da espécie, é provável que as populações dos refúgios não ficaram totalmente isoladas e que existia algum fluxo gênico com as populações adjacentes, onde a espécie conseguia se manter, porém com maior dificuldade devido às condições climáticas menos adequadas que refletia em efetivos populacionais mais baixos e uma menor diversidade genética.

Se as áreas de adequabilidade para espécie diminuíssem durante os períodos mais quentes e secos, seria esperado encontrar um declínio no tamanho efetivo populacional associado aos ciclos interglaciais. A análise de EBSP corrobora essa hipótese mostrando um acentuado declínio populacional que coincide justamente com o pico do último interglacial (120 mil anos atrás), após o penúltimo ciclo glacial que ocorreu, aproximadamente, entre 130 e 190 mil anos atrás (Lisiecki & Raymo 2005). Ciclos glaciais e interglaciais foram comuns ao longo do Pleistoceno (Raymo 1994) embora com variações na magnitude e duração (Lisiecki & Raymo 2005) eles devem ter influenciado a distribuição da espécie também de forma cíclica.

Também seria esperado encontrar sinais de expansão demográfica dentro dos refúgios. Encontramos valores significativos para o F_s de F_u e o D de Tajima para o RAG-1 para as áreas estáveis do clado N e C e para o F_s de F_u no clado SW para o gene TYR. Nenhum sinal de expansão demográfica foi encontrado nas áreas não estáveis, exceto utilizando o TYR para as áreas de baixa adequabilidade do Clado C.

À primeira vista esse é um resultado que foge daqueles esperados pela teoria dos refúgios já que era esperada uma evidência de expansão populacional em áreas instáveis (Carnaval et al. 2009). Isso seria aplicado em um contexto, no qual no período interglacial essas populações estariam expandindo seus limites de distribuição devido a condições climáticas mais favoráveis. O cenário que os nossos dados sugerem é justamente o inverso.

Nossos dados suportam a hipótese que múltiplos pequenos refúgios tiveram papel importante ao longo da história evolutiva dessa espécie. Essas pequenas áreas podem ser consideradas como microrefúgios com características ambientais favoráveis, onde populações sobreviveram fora da sua área de distribuição principal (o macrorefúgio) protegidas das condições ambientais desfavoráveis em nível regional (Rull 2009).

Experimentos fisiológicos utilizando *Pristimantis vinhai* indicaram que essa espécie apresenta uma temperatura crítica máxima termal (CTMax) de 29.7 ± 0.9 C° que seria semelhante as outras espécies de desenvolvimento direto analisadas. Entretanto, a CTMax dos adultos da família Hylidae é muito maior (até 9 graus a mais) do que as espécies de desenvolvimento direto (Danilo Ruas, comunicação pessoal). Dessa forma, os microrefúgios estimados em áreas de altitude da região podem ter influenciado a história biogeográfica de outras espécies endêmicas de anfíbios de desenvolvimento direto da Mata Atlântica da Bahia que apresentam características ecológicas e tolerância termal similares a *P. vinhai*. É possível que essas espécies sigam o mesmo padrão encontrado neste estudo, com uma provável redução das áreas de maior adequabilidade nos ciclos interglaciais e com as áreas de altitude funcionando como pequenos refúgios com temperatura mais amena. A maior tolerância térmica encontrada para as espécies da família Hylidae é condizente com o cenário, no qual é previsto que essas espécies restringiram sua área de ocorrência e fragmentaram suas populações, através da permanência em refúgios durante o UMG, com posterior expansão populacional nos períodos interglaciais mais quentes (Carnaval et al. 2009).

Sintetizando, nossos resultados demonstram que a dinâmica das oscilações climáticas do Quaternário influenciou a estrutura genética de *P. vinhai* e corroboram as áreas estimadas na paleomodelagem como refúgios devido a i) maior diversidade genética nas áreas consideradas estáveis quando comparada às não estáveis; ii) declínio do efetivo populacional em períodos interglaciais e iii) sinais de expansão demográfica dentro dos refúgios devido ao provável fluxo de indivíduos de áreas adjacentes (não estáveis) para locais com maior adequabilidade climática. No entanto, as áreas estáveis foram locais com maior adequabilidade climática e não refúgios florestais e as populações de *P. vinhai* não ficaram totalmente isoladas nos períodos de menor adequabilidade climática devido a persistência de áreas florestais e a alta resiliência da espécie que conseguiria utilizar regiões climaticamente menos favoráveis.

Entretanto, nossas estimativas de datação dos principais eventos de cladogênese dentro de *P. vinhai* revelaram diversificação acentuada no final do Mioceno (6-8.5 milhões de anos atrás) e a separação dos Clados N e C (~ entre 1.8-6.0 m.a.) e dos Clados SW e S (~ 2.9 - 7.15 m.a.) foram estimadas entre o final do Mioceno e o início do Pleistoceno, antes do UMG. Outros estudos utilizando espécies da Mata Atlântica

obtiveram estimativas semelhantes (Grazziotin et al. 2006; Fitzpatrick et al. 2009; Thomé et al. 2010; Amaro et al. 2012; Fusinatto et al. 2013; Amaral et al. 2013; Tonini et al. 2013). Em uma recente revisão, Rull (2008) encontrou que a maioria dos estudos com anfíbios da região neotropical estimaram um tempo de divergência das espécies estudadas com datação anterior ao Quaternário.

Dessa forma um conjunto de processos parece ter moldado a estrutura genética encontrada em *P. vinhai*, atuando em escalas temporais diferentes. Tanto as oscilações climáticas do Quaternário, como eventos do Terciário tardio foram importantes para a diversificação da espécie estudada. Mesmo que não seja possível descartar a hipótese que as separações entre os principais grupos tenham ocorrido em função do isolamento dessas linhagens em refúgios, já que flutuações climáticas podem ter sido importantes também durante o Terciário (Haffer 1993; Haffer 1997).

A separação inicial entre os clados N e C dos clados SW e S, ocorreu no final do Mioceno. Não conseguimos atribuir nenhuma barreira ou atividade tectônica evidente na área de estudo que poderia ter ocasionado a separação das linhagens nesse período. O final do Mioceno coincide com atividades tectônicas que resultaram no soerguimento final dos Andes que tiveram impacto na diversificação de diferentes grupos taxonômicos na Amazônia (Hoorn et al. 2010), e provavelmente ocasionou mudanças climáticas ao longo de toda América do Sul (Insel et al. 2009).

Dentro da área de estudo desse trabalho estão presentes três rios principais: Rio de Contas, Rio Pardo e o Rio Jequitinhonha. Nossos resultados demonstram que nenhum deles parece ter funcionado como barreira biogeográfica principal para essas populações, pois a maioria das linhagens conseguiram ultrapassar os limites do rio em algum momento da sua história. Embora para a região Amazônica os rios desempenhem papel importante na estruturação genética da sua biota (Cheviron et al. 2005; Noonan & Wray 2006; Ribas et al. 2012; Fernandes et al. 2012; Maldonado-Coelho et al. 2013), assim como para algumas espécies da Caatinga (Werneck et al. 2015), para a Mata Atlântica, os rios não parecem funcionar como barreiras geográficas importantes na limitação do fluxo gênico para os organismos desse bioma (Cabanne et al. 2007; Maldonado-Coelho 2012; Batalha-Filho et al. 2016).

- Sistemática molecular

Durante esse estudo, foi possível delimitar a distribuição geográfica de *Pristimantis vinhai* através do seu registro em 28 localidades (Apêndice III). Endêmica da Bahia, essa espécie ocorre do nível do mar até 900 m de altitude e sua área de ocorrência ao Norte chega até as imediações do Rio Paraguaçu, passa por todo o litoral até o Extremo sul da Bahia no município de Veredas e a Oeste chega até os municípios de Barra do Choça e Boa Nova.

Atualmente, são reconhecidas três espécies de *Pristimantis* (*P. ramagii*, *P. paulodutraii* e *P. vinhai*) ocorrendo na Mata Atlântica (Canedo & Haddad 2012), e assim como para toda a diversidade de anfíbios neotropicais (e.g. Fouquet et al. 2007; Vieites et al. 2009), esse número de espécies está subestimada.

Apenas na área de estudo desse trabalho, foi possível identificar, pelo menos mais três linhagens evolutivas independentes dentro de *Pristimantis* (*Pristimantis* sp. 1, *P.* sp. 2. e *P.* sp. 3) o que duplica a diversidade do gênero nesse domínio morfoclimático. Uma delas já tinha sido apontada como uma espécie candidata no estudo de Canedo & Haddad (2012) (como *Pristimantis* sp. 1, aqui tratada como *Pristimantis* sp. 3) sendo encontrada em diferentes topos de morro amostrados. *Pristimantis* sp. 1 é amplamente distribuída no leste da Bahia em regiões florestadas e está em processo de descrição. *Pristimantis* sp. 2 foi encontrada apenas a 900 m de altitude em Wenceslau Guimarães. Todas essas três linhagens, além de apresentarem alta divergência genética entre elas e as demais espécies do gênero da Mata Atlântica, possuem canto de anúncio distinto que dão suporte a hipótese que elas representam novas espécies para a ciência (Capítulo I).

Uma alta divergência genética foi encontrada dentro de *Pristimantis vinhai* chegando a quase 7% para a região do gene 16S e 12% para o ND2. Embora não tenham sido identificadas diferenças acústicas ou morfológicas durante as atividades de campo, o que foge do escopo desse trabalho, não descartamos a possibilidade que alguns desses agrupamentos representem linhagens crípticas. Esse resultado ressalta a importância da realização de um estudo mais detalhado da morfologia e bioacústica dos exemplares recuperados nos clados das análises filogenéticas, no intuito de avaliar se essa alta divergência resultou em características morfológicas/bioacústicas distintas que extrapolam a variação intraespecífica aceitável para essa espécie.

Padial e colaboradores (2009) encontraram distâncias genéticas intraespecíficas para o 16S variando entre 0 a 11% estudando 15 espécies de *Pristimantis* dos Andes e uma variação interespecífica entre 3 a 22%. Eles argumentaram que essa alta divergência genética encontrada pode estar associada a complexa topografia e orogenia de onde essas espécies vivem nos Andes (acima de 1500m de altitude), bem como as mudanças climáticas recentes, que podem ter isolado e ocasionado diferenciação genética dessa espécies.

Fatores semelhantes podem ter contribuído para a alta divergência genética encontrada dentro de *P. vinhai*. A persistência por longo prazo em áreas climaticamente mais favoráveis, principalmente em topos de morros, possibilitando o acúmulo de diferenciação genética. Contudo, aparentemente existia algum fluxo gênico entre as diferentes populações, como pode ser observado na existência de zonas de contato entre quase todos os agrupamentos recuperados.

Nesse estudo foi possível delimitar seis linhagens altamente divergentes dentro de *Pristimantis vinhai* e que oscilações climáticas do Quaternário e possivelmente eventos tectônicos do final do Mioceno influenciaram na atual distribuição da variabilidade genética encontrada nessa espécie. Além disso, foi possível demonstrar a importância das áreas de altitude da região que parecem funcionar como microrefúgios para espécies menos tolerante ao calor. A região da Serra do Corcovado (município de Almadina), Serra da Pedra Lascada (município de Barro Preto) e os topos de morros em Ibicaí e na divisa entre os municípios de Ibirataia e Apuarema, áreas estimadas como refúgios climáticos, não possuem nenhuma unidade de

conservação federal ou estadual para contribuir na preservação desses ambientes. Nossos resultados demonstram que essas áreas são chaves para manutenção da diversidade genética e taxonômica das espécies da Mata Atlântica do sul da Bahia e que esforços devem ser direcionados para proteger ainda mais esse tipo de ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, F. R., Albers, P. K., Edwards, S. V., Miyaki, C. Y. 2013. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology* 22: 3996-4013.

Amaro, R. C., Rodrigues, M. T., Yonenaga-Yassuda, Y. & Carnaval, A. C. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 880–888.

Antonelli, A. & Sanmartín, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403-414.

Balakrishnan, R. 2005. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Syst. Biol.* 54: 689– 693.

Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G., Fernandes-Salomão, T. M. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534–547.

Batalha-Filho, H., Cabanne, G. S., Miyaki, C. Y. 2012. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892–902.

Batalha-Filho, H., Miyaki, C. Y. 2016. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *J Zoolog Syst Evol Res*. DOI: 10.1111/jzs.12118.

Beaumont, L. J., Hughes, L., Poulsen, M. 2005. Predicting species distributions: use of climatic parameters in BIOCLIM and its impact on predictions of species' current and future distributions. *Ecological Modelling* 186: 250-269.

Beebee, T. J. C. 1996. *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London.

Bell, C. R., Parra, J. L., Tonione, M., Hoskin, C. J., Mackenzie, J. B., Williams, S. E., Moritz, C. 2010. Patterns of persistence and isolation indicate resilience to climate change in montane rainforest lizards. *Molecular Ecology* 19: 2531–2544.

- Bokermann, W. C. A. 1975 "1974". Três espécies novas de *Eleutherodactylus* do sudeste da Bahia, Brasil (Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 34: 11–18.
- Bossuyt, F., & Milinkovitch, M.C. 2000. Convergent adaptive radiations in Madagascar and Asian ranid frogs reveal covariation between larval and adult traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 6585–6590.
- Braconnot, P., Harrison, S. P., Kageyama, M., Bartlein, P. J., Masson-Delmotte, V., Abe-Ouchi, A., Otto-Bliesner, B., Zhao, Y. 2012. Evaluation of climate models using palaeoclimatic data. *Nat Clim Change* 2: 417-424.
- Brown, K.S. & Ab'Saber, A. N. 1979. Ice-age refuges and evolution in the Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas* 5: 1-30.
- Brown, K. S. 1991. Conservation of neotropical environments: insects as indicators. In: Collins N. M., Thomas, J. A. (Eds) *Conservation of Insects and Their Natural Environments*, R.E.S. Symposium Nr. 15. Academic Press, London, UK, 350–404.
- Bruen, T. C., Philipe, H., Bryant, D. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172: 2665-2681.
- Brunes, T. O., Sequeira, F., Haddad, C. F. B., Alexandrino, J. 2010. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1120–1133.
- Brunes, T. O., Thomé, M. T. C., Alexandrino, J., Haddad, C. F. B., Sequeira, F. 2015. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic forest. *Organisms Diversity & Evolution* 15: 695-710.
- Cabanne, G. S., D'Horta, F. M., Meyer, D., Silva, J. M. C., Miyaki, C. Y. 2011. Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 103: 801–820.
- Cabanne, G. S., d'Horta, F. M., Sari, E. H. R., Santos, F. R., Miyaki, C. Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 760–773.
- Cabanne, G. S., Santos, F. R., Miyaki, C. Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 91: 73–84.

- Camurugi, F., Lima, T. M., Mercês, E. A., Juncá, F. A. 2010. Anuros da Reserva Ecológica da Michelin, Município de Igrapiúna, Estado da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica* 10(2): 305–312.
- Canedo, C. & Haddad, C. F. B. 2012. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 610–620.
- Carcerelli, L. C. & Caramaschi, U. 1992. Ocorrência do gênero *Crossodactylus* Duméril & Bibron, 1941 no nordeste brasileiro, com descrição de duas espécies novas (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 52(3): 415-422.
- Canedo, C., Dixo, M., Pombal, J. P. 2004. A new species of *Chiasmocleis* Méhelÿ, 1904 (Anura, Microhylidae) from the Atlantic rainforest of Bahia, Brazil. *Herpetologica* 60: 495-501.
- Caramaschi, U. 2012. New species of beaked toad, *Rhinella* (Anura: Bufonidae), from the State of Bahia, Brazil. *Zoologia* 29: 343-348.
- Caramaschi, U., Orrico, V. G. D., Faivovich, J., Dias, I. R., Solé, M. 2013. A new species of *Allophryne* (Anura: Allophrynidae) from the Atlantic Rain Forest Biome of eastern Brazil. *Herpetologica* 69: 480–491.
- Carnaval, A. C. & Bates, J. M. 2007. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution* 61: 2942–2957.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Carnaval, A. C. O. Q. & Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- Carnaval, A. C., Waltari, E., Rodrigues, M. T., Rosauer, D., VanDerWal, J., Damasceno, R., Prates, I., Strangas, M., Spanos, Z., Rivera, D., Pie, M. R., Firkowski, C. R., Bornschein, M. R., Ribeiro, L. F., Moritz, C. 2014. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society* 281: 20141461.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J., Capparella, A. P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implication for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Biology and Evolution* 36: 338–357.
- Crawford, A. J. 2003. Relative rates of nucleotide substitution in frogs. *Journal of Molecular Evolution* 57: 636–641.

Cruz, C. A. G., Caramaschi, U., Napoli, M. F. 2007. A new species of *Chiasmocleis* (Anura, Microhylidae) from the Atlantic rain forest of northeastern Bahia, Brazil. *South American Journal of Herpetology* 2: 47-52.

D'horta, F., Cabanne, G. S., Meyer, D., Miyaki, C. Y. 2011. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1932–1935

Dias, D., Esbérard, C. E. L., Moratelli, R. 2013. A new species of *Lonchophylla* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Atlantic Forest of southeastern Brazil, with comments on *L. bokermanni*. *Zootaxa* 3722(3): 347.

Dias, I. R. 2011. Composição e distribuição espacial dos anfíbios ao longo de um gradiente altitudinal na RPPN Serra Bonita, Sul da Bahia. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Zoologia Aplicada da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Dias, I. R., Medeiros, T. T., Vila-Nova, M. F., Solé, M. 2014a. Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotspot within Brazil's Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.

Dias, I. R., Mira-Mendes, C. V., Solé, M. 2014b. Rapid inventory of herpetofauna at the APA (Environmental Protection Area) of the Lagoa Encantada and Rio Almada, Southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 7: 627-637.

Elith, J., Graham, C. H., Anderson, R. P., Dudik, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R. J., Huettmann, F., Leathwick, J. R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L. G., Loiselle, B. A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J. M. M., Perterson, A. T., Phillips, S. J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Shapire, R. E., Soberón, J., Williams, S., Wisz, M. S., Zimmermann, N. E. 2006. Novel methods improve prediction of species distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.

Elith, J., Kearney, M., Phillips, S. 2010. The art of modelling range-shifting species. *Methods Ecol Evol* 1: 330-342.

Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudik, M., Chee, Y. E., Yates, C. J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17: 43-57.

Excoffier, L., Laval, G, Schneider, S. 2005. Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1: 47-50.

Fernandes, A. M., Wink, M., Aleixo, A. 2012. Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *Journal of Biogeography* 39: 1524-1535

- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the Author. Seattle, WA: Department of Genome Sciences, University of Washington.
- Fitzpatrick, S. W., Brasileiro, C. A., Haddad, C. F., Zamudio, K. R. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology* 18: 2877–2896.
- Flot, J-F. 2010. Seqphase: a web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources* 10: 162–166.
- Forlani, M. C., Bernardo, P. H., Haddad, C. B. F., Zaher, H. 2010. Herpetofauna of the Carlos Botelho State Park, São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 10(3): 265- 309.
- Fusinatto, L. A., Alexandrino, J., Haddad, C. F. B., Brunes, T. O., Rocha, C. F. D., Sequeira, F. 2013. Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic forest. *PLoS ONE* 8: e79504.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmell, N. J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE* 2(10): e1109.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background Selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Garrick, R. C., Sunnucks, P., Dyer, R. J. 2010. Nuclear gene phylogeography using PHASE: Dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology* 10:118.
- Graboski, R., Filho, G. A. P., Silva, A. A. A., Prudente, A. L. C., Zahes, H. 2015. A new species of *Amerotyphlops* from Northeastern Brazil, with comments on distribution of related species. *Zootaxa* 3920(3): 443–452
- Grazziotin, F. G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., Bonatto, S. L., 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology* 15: 3969– 3982.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer, J. 1974. Avian speciation in tropical South America. *Publication of the Nuttall Ornithological Club* 14: 1–390.
- Haffer, J. 1993. Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. *Biogeographica* 69: 15–45.

- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6: 451–476.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98
- Harrigan, R. J., Mazza, M.E., Sorenson, M. D. 2008 Computation vs. cloning: evaluation of two methods for haplotype determination. *Molecular Ecology Resources* 8: 1239–1248.
- Harrison, S. P., Bartlein, P. J., Izumi, K., Li, G., Annan, J., Hargreaves, J., Braconnot, P., Kageyama, M. 2015. Evaluation of CMIP5 palaeo-simulations to improve climate projections. *Nature Climate Change* 5: 735-743.
- Heikkinen, R. K., Luoto, M., Araújo, M. B., Virkkala, R., Thuiller, W., Sykes, M. T. 2006. Methods and uncertainties in bioclimatic envelope modeling under climate change. *Progress in Physical Geography* 30: 751-777.
- Heled, J. & Drummond, A. J. 2008. Bayesian Inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Bio.* 8: 289.
- Heled, J. & Drummond, A. J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570–580.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
- Hoogmoed, M. S., Borges, D.M. & Cascon, P. 1994. Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. *Zoologischer Mededeling Leiden* 271-300.
- Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F. R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Sarkinen, T., Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* 330: 927-931.
- Insel, N., Poulsen, C., Ehlers, T. 2009. Influence of the Andes Mountains on South American moisture transport, convection, and precipitation. *Clim. Dynam.* 35: 1477–1492.
- Juncá, F. A 2006. Diversidade e uso de hábitat por anfíbios anuros em duas localidades de Mata Atlântica, no norte do Estado da Bahia. *Biota Neotropica* 6(2): 1–8.
- Juncá, F. A. & Nunes, I. 2008. A new species of marsupial frog of the genus *Gastrotheca* Fitzinger (Anura: Amphignatodontidae) from the state of Bahia, Northeastern Brazil. *Zootaxa* 1907: 61-68.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701.

Leite, Y. L., Costa, L. P., Loss, A. C., Rocha, R. G., Batalha-Filho, H., Bastos, A. C., Quaresma, V. S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M., Pardini, R. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *PNAS* 113: 1008-1013.

Ledru, M. P., Mourguiart, P., Riccomini, C. 2009. Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 271: 140–152.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Lisiecki, L. E. & Raymo, M. E. 2005. A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic $\delta^{18}\text{O}$ records. *Paleoceanography* 20: 1-17.

Liu, C., Berry, P. M., Dawson, T. P., Pearson, R. G. 2005. Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography* 28: 385-393.

Maldonado-Coelho, M. 2012. Climatic oscillations shape the phylogeographical structure of Atlantic forest fire-eye antbirds (Aves: *Thamnophilidae*). *Biol. J. Linn. Soc.* 105: 900–924.

Maldonado-Coelho, M., Blake, J. G., Silveira, L. F., Batalha-Filho, H., Ricklefs, R. E. 2013. Rivers, refuges and population divergence of fire-eye antbirds (*Pyrglena*) in the Amazon Basin. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 1090–1107.

Martins, F. M. 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biological Journal of the Linnean Society* 104(3): 499–509.

Maurício, G. N., Belmonte-Lopes, R., Pacheco, J. F., Silveira, L. F., Whitney, B. M., Bornschein, M. R. 2014. Taxonomy of “Mouse-colored Tapaculos” (II): An endangered new species from the montane Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil (Passeriformes: *Rhinocryptidae*: *Scytalopus*). *The Auk* 131(4): 643-659.

McCormack, J. E., Huang, H., Knowles, L. L. 2009. Maximum likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic Biology* 58: 501–508.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.

Napoli, M. F., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G., Dias, I. R. 2011. A new species of flea-toad, genus *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2739: 33-40.

Noonan, B. P., Wray, K. P. 2006. Neotropical diversification: the effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. *J. Biogeogr.* 33: 1007–1020.

Padial, J. M., Castroviejo-Fisher, S., Kohler, J., Vilà, C., Chaparro, J. C. De la Riva, I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. *Zoologica Scripta* 38: 431–447.

Paithankar, K. R., Prasad, K. S. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 19: 1346.

Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc, pp. 205–247.

Pavan, S. E. 2015. A New Species of *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *American Museum Novitates* 3832: 1-15.

Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Waite, A. N., Morando, M., Yassuda, Y. Y., Sites-Jr, J. W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13–26.

Peterson, A. T., Nyári, Á. S. 2007. Ecological niche conservatism and pleistocene refugia in the Thrush-like Mourner, *Shiffornis* sp., in the Neotropics. *Evolution* 62: 173-183.

Phillips, S. J., Anderson, R. P., Schapire, R. R. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.

Porto, T. J., Carnaval, A. C., da Rocha, P. L. B. 2013. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions* 19: 330–340.

- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Ramasamy, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., Naik, V. G. 2014. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. Springerplus.
- Rambaut, A. 2009. FigTree version 1.3.1 [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk> .
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., Drummond, A. J. 2014. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Raymo M. E. 1994. The initiation of Northern Hemisphere glaciation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 22: 353–383.
- Recoder, R. S., Teixeira-Jr, M., Cassimiro, J., Caramacho, A., Rodrigues, M. T. 2010. A new species of *Dendrophryniscus* (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2642: 36-44.
- Ribeiro, L. F., Bornschein, M. R., Belmonte-Lopes, R., Firkowski, C. R., Morato, S. A. A. 2015. Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ* 3:e1011.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y. & Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 681–689.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Ribeiro R. A., Lemos, J. P., Ramos, A. C. S., Lovato, M. B. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17(11): 2722–2729.
- Rull, V. 2009. Microrefugia. *Journal of Biogeography* 36, 481e484.

- Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 508–513.
- Salzburger, W., Ewing, G. B., von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952–1963.
- Silvano, D. L., Pimenta, B. V. S. 2003. Diversidade de anfíbios na Mata Atlântica do Sul da Bahia. In: Prado, P. I., Landau, E. C., Moura, R. T., Pinto, L. P. S., Fonseca, G. A. B, Alger, K. (Eds) *Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia CD-ROM*, Ilhéus, IESB/CI/CABS/ UFMG/UNICAMP.
- Silva, S. M., Moraes-Barros, N., Ribas, C. C., Ferrand, N., Morgante, J. S. 2012. Divide to conquer: a complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(1), 39–55
- Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics* 73: 1162-1169.
- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978–989.
- Streicher, J. W., Crawford, A. J., Edwards, C. W. 2009. Multilocus molecular phylogenetic analysis of the montane *Craugastor podiciferus* species complex (Anura: Craugastoridae) in Isthmian Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 620-630.
- Swets, K. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240: 1285-1293.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Teixeira, M., Recoder, R. S., Amaro, R. C., Damasceno, R. P., Cassimiro, J., Rodrigues, M. T. 2013. A new *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura:Leptodactylidae: Paratelmatobiinae) from the highlands of the Atlantic Forests of southern Bahia, Brazil . *Zootaxa* 3702: 459–472.
- Thomas, W. W., Carvalho, A. M. V., Amorim, A. M. A., Garrison, J., Albeláez, A. L. 1998. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 7: 311–322.
- Thome, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera, F. A., Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018–1031.

Tonini, J. F. R.; Costa, L. C., Carnaval, A. C. 2013 Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 51: 114-121.

Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193–1213.

Vanzolini, P. & Williams, E. E. 1970. South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool. São Paulo* 19: 1- 298.

Varela, E. S., Beasley, C. R., Schneider, H., Sampaio, I., Marques-Silva, N. S., Tagliaro, C. H. 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal Molluscan Studies* 73: 229-234.

Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F., Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 8267-8272.

Wallace A. R. 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zool. Soc. London* 20: 107-110.

Werneck, F. P., Leite, R. N., Geurgas, S. R., Rodrigues, M. T. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicuridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evolutionary Biology* 15: 94.

Wiens J. J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58: 193–197.

Zeisset, I. & Beebee, T. J. C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109–119.

Apêndice I. Lista dos espécimes sequenciados durante esse estudo com localidade, número de campo e quais genes foram analisados para cada amostra.

Espécie	Município	Localidade	Cód.	Clado	Ref.	Nº de Campo	16S	RAG	ND2	TYR
<i>P. vinhai</i>	Guaratinga	Parque Nacional do Alto do Cariri	2_AC	S1	não	554	2	R161	N2	T2
<i>P. vinhai</i>	Guaratinga	Parque Nacional do Alto do Cariri	4_AC	S1	não	607	4	R162	N4	-
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	6_SB	C	sim	108	6	R163	N6	-
<i>P. vinhai</i>	Almadina	Serra do Corcovado	9_SC	C	sim	175	9	-	N9	-
<i>P. vinhai</i>	Almadina	Serra do Corcovado	10_SC	C	sim	177	-	R116	N110	-
<i>P. vinhai</i>	Almadina	Serra do Corcovado	16_SC	C	sim	180	-	-	N16	-
<i>P. vinhai</i>	Almadina	Serra do Corcovado	17_SC	C	sim	185	17	R3	N17	T17
<i>P. vinhai</i>	Almadina	Serra do Corcovado	18_SC	C	sim	192	18	R4	N18	-
<i>P. vinhai</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	19_PL	C	sim	231	19	R5	N19	-
<i>P. vinhai</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	20_PL	C	sim	246	-	R6	N20	-
<i>P. vinhai</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	26_PL	C	sim	251	26	R7	N26	-
<i>P. vinhai</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	27_PL	C	sim	259	-	R8	N27	-
<i>P. vinhai</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	28_PL	C	sim	302	28	R9	N28	T28
<i>P. vinhai</i>	Macarani	RPPN Mata dos Passarinhos	33_MAC	SW1	não	315	33	R10	N33	-
<i>P. vinhai</i>	Macarani	RPPN Mata dos Passarinhos	34_MAC	SW1	não	335	34	R11	N34	T34
<i>P. vinhai</i>	Macarani	RPPN Mata dos Passarinhos	36_MAC	SW1	não	359	36	R13	N35	T36
<i>P. vinhai</i>	Macarani	RPPN Mata dos Passarinhos	37_MAC	SW1	não	360	-	R40	N37	-
<i>P. vinhai</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	38_SL	C	sim	418	38	R41	N38	T38
<i>P. vinhai</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	39_SL	C	sim	422	-	R42	N39	-
<i>P. vinhai</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	40_SL	SW1	sim	424	40	R43	N40	-
<i>P. vinhai</i>	Amargosa	Serra do Timbo	41_ST	N	sim	456	41	R44	N41	-
<i>P. vinhai</i>	Amargosa	Serra do Timbo	42_ST	N	sim	469	-	R45	N42	-
<i>P. vinhai</i>	Amargosa	Serra do Timbo	53_ST	N	sim	470	53	R46	N53	T53
<i>P. vinhai</i>	Amargosa	Serra do Timbo	54_ST	N	sim	494	54	R47	N54	-
<i>P. vinhai</i>	Amargosa	Serra do Timbo	55_ST	N	sim	515	55	R48	N55	-
<i>P. vinhai</i>	Guaratinga	Parque Nacional do Alto do Cariri	56_AC	S1	sim	617	56	R49	N56	-
<i>P. vinhai</i>	Guaratinga	Parque Nacional do Alto do Cariri	57_AC	S1	sim	632	57	R50	N57	-
<i>P. vinhai</i>	Wenceslau Guimarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	58_WG	N	sim	645	58	R51	N58	-
<i>P. vinhai</i>	Wenceslau Guimarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	59_WG	N	sim	662	59	R52	N59	T59
<i>P. vinhai</i>	Wenceslau Guimarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	60_WG	N	sim	677	60	R53	N60	-
<i>P. vinhai</i>	Wenceslau Guimarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	61_WG	N	sim	687	61	R54	N61	T61
<i>P. vinhai</i>	Santa Teresinha	Serra da Jibóia	69_SJ	N	não	753	69	R56	N69	-
<i>P. vinhai</i>	Santa Teresinha	Serra da Jibóia	70_SJ	N	não	765	70	R57	N70	-
<i>P. vinhai</i>	Santa Teresinha	Serra da Jibóia	71_SJ	N	não	774	71	R58	N71	T71
<i>P. vinhai</i>	Ibicaraí	RPPN Estância Manacá	72_ibicarai	SW2	sim	864	72	R59	N72	T72
<i>P. vinhai</i>	Ibicaraí	RPPN Estância Manacá	73_ibicarai	SW2	sim	865	73	R60	N73	T73

<i>P. vinhai</i>	Santa Teresinha	Serra da Jibóia	74_SJ	N	não	869	74	R61	N74	-
<i>P. vinhai</i>	Santa Teresinha	Serra da Jibóia	75_SJ	N	não	873	75	R119	N75	-
<i>P. vinhai</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	76_SL	C	sim	886	76	R63	N76	-
<i>P. vinhai</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	77_SL	C	sim	887	77	R64	N77	-
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Reserva Ecológica da Michelin	78_michelin	C	não	984	78	R65	N78	T78
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Reserva Ecológica da Michelin	79_michelin	C	não	985	-	R120	N79	-
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Reserva Ecológica da Michelin	80_michelin	C	não	987	80	R67	N80	-
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Fazenda Juliana	81_juliana	C	não	902	81	R121	N81	-
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Fazenda Juliana	82_juliana	C	não	916	82	R142	N82	T82
<i>P. vinhai</i>	Igrapiúna	Fazenda Juliana	83_juliana	C	não	946	83	R70	N83	-
<i>P. vinhai</i>	Ibicaraí	RPPN Estância Manacá	84_ibicarai	SW2	sim	BA438	84	R122	N84	-
<i>P. vinhai</i>	Ibicaraí	RPPN Estância Manacá	85_ibicarai	SW2	sim	BA439	85	R72	N85	-
<i>P. vinhai</i>	Porto Seguro	RPPN Veracel	86_veracel	S1	não	BA840	86	R73	N86	T86
<i>P. vinhai</i>	Marau	-	87_marau	C	não	BA919	87	R74	N87	-
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	88_SB	SW1	sim	10	88	R123	N88	T88
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	89_SB	C	sim	23	89	R124	N89	T89
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	90_SB	SW1	sim	30	90	R143	N90	T90
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	91_SB	SW1	sim	32	91	R144	N91	T91
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	92_SB	SW1	sim	40	92	R80	N92	-
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	93_SB	SW1	sim	41	93	R81	N93	-
<i>P. vinhai</i>	Itabela	-	97_itabela	S1	não	1013	-	R84	N97	-
<i>P. vinhai</i>	Itabela	-	98_itabela	S1	não	1014	98	R85	N98	T98
<i>P. vinhai</i>	Itabela	-	99_itabela	SW1	não	1029	99	R86	N99	T99
<i>P. vinhai</i>	Itabela	-	100_itabela	S1	não	1030	-	R87	N100	-
<i>P. vinhai</i>	Itamaraju	Monte do Pescoço	101_itamaraju	S1	não	1039	101	R88	N101	T101
<i>P. vinhai</i>	Itamaraju	Monte do Pescoço	102_itamaraju	S1	não	1043	-	R89	N102	-
<i>P. vinhai</i>	Itamaraju	Monte do Pescoço	103_itamaraju	S1	não	1044	103	R90	N103	-
<i>P. vinhai</i>	Itamaraju	Monte do Pescoço	104_itamaraju	S1	não	1047	104	R145	N104	-
<i>P. vinhai</i>	Itamaraju	Monte do Pescoço	105_itamaraju	S1	não	1048	105	R125	N105	-
<i>P. vinhai</i>	Ilhéus	Fazenda Provisão	106_ilheus	C	não	FP01	106	R93	N106	-
<i>P. vinhai</i>	Ilhéus	Fazenda Provisão	107_ilheus	C	não	FP04	107	R94	N107	T107
<i>P. vinhai</i>	Ilhéus	Fazenda Provisão	108_ilheus	C	não	FP11	108	R95	N108	T108
<i>P. vinhai</i>	Ilhéus	Fazenda Provisão	109_ilheus	C	não	FP18	109	R126	N109	-
<i>P. vinhai</i>	Ilhéus	Fazenda Provisão	110_ilheus	C	não	FP20	110	R146	N110	-
<i>P. vinhai</i>	Itarantim	Serra do Mandim	113_mandim	SW1	não	CA198	113	-	N113	-
<i>P. vinhai</i>	Itarantim	Serra do Mandim	114_mandim	SW1	não	CA208	-	-	N114	-
<i>P. vinhai</i>	Itarantim	Serra do Mandim	115_mandim	SW1	não	CA210	-	-	N115	-
<i>P. vinhai</i>	Itarantim	Serra do Mandim	116_mandim	SW1	não	CA219	-	-	N116	-
<i>P. vinhai</i>	Itarantim	Serra do Mandim	117_mandim	SW1	não	CA220	117	-	N117	-
<i>P. vinhai</i>	Potiraguá	Serra Azul	118_sazul	SW1	não	CA121	118	-	N118	-
<i>P. vinhai</i>	Potiraguá	Serra Azul	119_sazul	SW1	não	CA138	119	-	N119	-
<i>P. vinhai</i>	Potiraguá	Serra Azul	120_sazul	SW1	não	CA159	120	-	N120	T120

<i>P. vinhai</i>	Potiraguá	Serra Azul	121_sazul	SW1	não	CA277	121	-	N121	-
<i>P. vinhai</i>	Potiraguá	Serra Azul	122_sazul	SW1	não	CA295	-	-	N122	-
<i>P. vinhai</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	125_SB	SW1	sim	"47"	125	-	N125	-
<i>P. vinhai</i>	Wenceslau Gumarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	693_WG	N	sim	693	693	-	N693	-
<i>P. vinhai</i>	Una	RPPN Ararauna	1061_una	S2	não	1061	106 1	-	N106 1	T1061
<i>P. vinhai</i>	Una	RPPN Ararauna	1066_una	S2	não	1066	106 6	-	N106 6	-
<i>P. vinhai</i>	Una	RPPN Ararauna	1068_una	S2	não	1068	106 8	-	N106 8	-
<i>P. sp. 1</i>	Ibicaraí	RPPN Estância Manacá	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. sp. 1</i>	Itabela	-	96_itabela	-	-	1012	96	R83	N96	-
<i>P. sp. 1</i>	Wenceslau Gumarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	712WG	-	-	712	712	-	-	-
<i>P. sp. 1</i>	Guaratinga	Parque Nacional do Alto do Cariri	1AC	-	-	551	1	R140	N1	T1
<i>P. sp. 2</i>	Wenceslau Gumarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	62WG	-	-	713	62	R55	N62	-
<i>P. sp. 2</i>	Wenceslau Gumarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	711WG	-	-	711	711	-	N711	-
<i>P. sp. 3</i>	Camacan	RPPN Serra Bonita	58SB	-	-	-	58	-	-	-
<i>P. sp. 3</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	SL417	-	-	-	417	-	-	-
<i>P. sp. 3</i>	Arataca	Parque Nacional da Serra das Lontras	SL443	-	-	-	443	-	-	-
<i>P. sp. 3</i>	Wenceslau Gumarães	Parque Estadual de Wenceslau Guimarães	WG703	-	-	-	703	-	-	-
<i>P. sp. 3</i>	Boa Nova	Parque Nacional de Boa Nova	IA31_boanov a	-	-	-	IA31	-	NIA3 1	TIA31
<i>P. sp. 3</i>	Barro Preto	Pedra Lascada	PL267_grav	-	-	-	267	-	-	-
<i>P. ramagii</i>	São Lourenço da Mata - PE	Estação Ecológica do Tapacurpá	PE1	-	-	-	PE1	-	NPE1	-
<i>P. ramagii</i>	São Lourenço da Mata - PE	Estação Ecológica do Tapacurpá	PE2	-	-	-	PE2	-	NPE2	-
<i>P. ramagii</i>	São Lourenço da Mata - PE	Estação Ecológica do Tapacurpá	PE3	-	-	-	PE3	-	-	-
<i>P. ramagii</i>	São Lourenço da Mata - PE	Estação Ecológica do Tapacurpá	PE6	-	-	-	PE6	-	NPE6	-

Cód. = Código da amostra das análises filogenéticas. **Ref.** = Localidade dentro ou fora dos refúgios estimados.

Apêndice II. Número de acesso das sequências retiradas do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas

Espécie	Localidade	Código	16S	ND2	TYR
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Itubera - BA	MNRJ 53765	JX267491.1	-	JX267725.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Jussari - BA	AFlab0923_jussari	JX267343.1	-	JX267719.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Camacan - BA	USPtCX116ST39_Camacan	JX267364.1	-	JX267722.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Camacan - BA	USPtCX116ST63_Camacan	JX267365.1	-	JX267724.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Trancoso - BA	USPtCX114ST20_trancoso	JX267362.1	-	JX267720.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Trancoso - BA	USPtCX115ST23_trancoso	JX267363.1	-	JX267721.1
<i>Pristimantis cf. vinhai</i>	Una - BA	Aflab0445_Una	JX267492.1	-	JX267726.1
<i>Barycholos ternetzi</i>	Teresópolis de Goiás - GO	-	JX267466.1	-	JX267680.1
<i>Eleutherodactylus bilineatus</i>	Boa Nova - BA	-	JX267324.1	-	JX267691.1
<i>Haddadus binotatus</i>	Rosal - ES	-	JX267357.1	-	JX267683.1
<i>Pristimantis cf. paulodutra</i>	Itacaré - BA	MNRJ 35338	JX267296.1	-	JX267705.1
<i>Pristimantis cf. paulodutra</i>	Canavieiras - BA	MNRJ 40299	JX267360.1	-	JX267707.1
<i>Pristimantis cf. paulodutra</i>	Boa Nova - BA	MNRJ 46880	JX267297.1	-	JX267706.1
<i>Pristimantis cf. ramagii</i>	Itaporanga D'Ajuda - SE	MNRJ 46788	JX267299.1	-	JX267710.1
<i>Pristimantis cf. ramagii</i>	Indiaroba - SE	MNRJ49744	JX267300.1	-	JX267711.1
<i>Pristimantis cf. ramagii</i>	Indiaroba - SE	MNRJ 49745	JX267484.1	-	JX267709.1
<i>Pristimantis ramagii</i>	Igarassu - PE	JX267380	JX267380.1	-	-
<i>Pristimantis ramagii</i>	Pilar - AL	MNRJ36751	JX267318.1	-	JX267797.1
<i>Pristimantis ramagii</i>	Murici - AL	MNRJ50249	JX267319.1	-	JX267798.1
<i>Pristimantis condor</i>	Ecuador - Morona-Santaigo	KU217857	EF493701.1	-	EF493504.1
<i>Pristimantis conspicillatus</i>	Ecuador - Sucumbios	QCAZ28448	EF493529.1	-	EF493499.1
<i>Pristimantis cruentus</i>	Panamá - Parque Nacional Darien	EU443188 JN991443 JN991569	JN991443.1	EU443188.1	JN991569.1
<i>Pristimantis euphronides</i>	Grenada: Grand Etan	BWMC6918	EF493527.1	-	EF493489.1
<i>Pristimantis fenestratus</i>	-	KT221610.1	KT221610.1	KT221610.1	-
<i>Pristimantis ridens</i>	Costa Rica - Puntarenas	JN991466 EU443189	JN991466.1	EU443189.1	EU443189.1
<i>Pristimantis sp. 1</i>	Camacan - BA	MTR13615	JX267387.1	-	JX267819
<i>Pristimantis zeuctotylus</i>	Suriname - Sipaliwini	985BPN	JN691247.1	-	JN691951.1

Apêndice III. Coordenadas geográficas dos pontos utilizados na Paleomodelagem.

Município - Localidade	Latitude	Longitude	Altitude
Almadina - Serra do Corcovado	-14.70288	-39.59555	643
Alto do cariri - Córrego de pedras	-16.45296	-40.05886	863
Alto do cariri - Faz. serra da divisa	-16.34171	-39.97288	582
Amargosa - Serra do Timbo	-13.10668	-39.66573	670
Arataca - Serra das Lontras	-15.16243	-39.34376	947
Barra do Choça	-14.92891	-40.55988	887
Barro Preto - Pedra Lascada	-14.77237	-39.54088	606
Boa Nova	-14.40804	-40.11502	941
Camacan - Serra Bonita	-15.39514	-39.56618	845
Floresta Azul	-14.75407	-39.69221	678
Ibicarai	-14.79924	-39.62909	720
Igrapiuna - Reserva Ecológica da Michelin	-13.82863	-39.21883	223
Ilhéus - CEPLAC - Localidade-tipo	-14.78673	-39.22495	44
Ilhéus - Ponta da Tulha	-14.60096	-39.06233	18
Itabela	-16.52945	-39.57719	180
Itacaré	-14.31666	-39.06666	112
Itamaraju	-16.97706	-39.56549	130
Itarantim - Serra do Mandim	-15.62952	-39.98033	604
Jussari	-15.16753	-39.54441	820
Macarani - Mata dos Passarinhos	-15.79071	-40.51927	784
Porto Seguro - RPPN Veracel	-16.36288	-39.14253	77
Potiraguá - Serra Azul	-15.87363	-39.90549	798
Prado - Parque Nacional do Descobrimento	-17.07475	-39.31654	80
Santa Teresinha - Serra da Jibóia	-12.84949	-39.47663	788
Unaa	-15.19437	-39.03654	14
Uruçuca	-14.60914	-39.35554	104
Veredas	-17.21292	-39.62169	179
Wenceslau Guimarães	-13.57198	-39.71763	736

Capítulo 3

Anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira: conservação, áreas de endemismo e status do conhecimento

Anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira: conservação, áreas de endemismo e status do conhecimento

RESUMO

Nas áreas de altitude da Mata Atlântica ainda são encontrados fragmentos florestais que conservam uma rica e endêmica diversidade de anfíbios. Contudo, com a atual crise da diversidade e a crescente expansão populacional é necessário a definição de áreas prioritárias para conservação que direcionem políticas públicas de conservação *in situ*. Neste trabalho, identificamos áreas prioritárias utilizando quatro diferentes critérios: áreas de endemismo, riqueza de espécies, presença de espécies ameaçadas e com distribuição geográfica restrita. Foram utilizados mapas de distribuição geográfica de 509 espécies de anfíbios que possuem extensão de ocorrência nas áreas de altitude da Mata Atlântica. As áreas de endemismos foram definidas através da Análise de Parcimônia de Endemismo (PAE). Além disso, quantificamos as tendências de pesquisa realizadas com anfíbios nas áreas de altitude do Brasil com intuito de identificar possíveis lacunas no conhecimento. Foram identificadas 14 áreas de endemismos e 19 áreas prioritárias para conservação dos anfíbios anuros das áreas de altitude da Mata Atlântica que devem auxiliar em futuras discussões para implementação de novas unidades de conservação no país.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, sendo considerado um dos países que abrigam a maior diversidade do planeta, com cerca de 15 a 20% das espécies descritas no mundo (Myers et al. 2000). Neste contexto, um dos grandes desafios é tentar conciliar o desenvolvimento do país com a conservação da biodiversidade e uso sustentável dos recursos naturais. Para tanto, uma das estratégias adotadas pelo seu governo (Ministério do Meio Ambiente Brasileiro - MMA) é a determinação de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade que podem ser utilizadas para implementação de políticas públicas de conservação *in situ* (MMA 2007).

O estabelecimento e manutenção de áreas protegidas é uma das principais estratégias para conservar a biodiversidade no mundo (Bruner et al. 2001; Lawler & White 2008). Para que o resultado dessas ações seja eficiente, é necessário que essas áreas sejam criadas baseado em critérios científicos que maximizem a proteção da biodiversidade com o melhor aproveitamento possível dos escassos recursos financeiros destinados à conservação (Margules & Pressey 2000; Loucks et al. 2008; Diniz-Filho et al. 2008). Contudo, muitas vezes elas são criadas de forma oportunista (Lemes et al. 2011), em locais isolados ou de baixo valor econômico, sem levar em consideração diversos atributos importantes para a conservação efetiva da biodiversidade (Rodrigues et al. 2004), ou seja, não garantindo a proteção das comunidades biológicas e a manutenção dos processos ecossistêmicos (Margules & Pressey 2000).

A definição das áreas prioritárias para conservação do Brasil foi realizada utilizando diferentes critérios, tais como, riqueza biológica, presença de espécies endêmicas e ameaçadas (MMA 2007). Entretanto, grande parte da informação utilizada eram observações pessoais, ou de estudos não delineados adequadamente, atribuindo certa subjetividade ao processo de priorização (Camardelli & Napoli 2012).

Um dos critérios que vem sendo utilizado para determinar locais relevantes para conservação são as áreas de endemismo (Prevedello & Carvalho 2006; Camardelli & Napoli 2012). Áreas de endemismos são caracterizadas pela congruência, não aleatória, nos limites de distribuição geográfica de no mínimo dois táxons restritos a determinada área (Nelson & Platnick 1981; Morrone 1994). Essas áreas apresentam alto valor para conservação, pois possuem um conjunto de espécies únicas, cuja presença pode estar associada a aspectos biogeográficos históricos e evolutivos (Platnick 1992; Morrone 2000; Myers et al. 2000; Silva et al. 2004; Silva et al. 2005).

Dessa forma, é essencial verificar se essas áreas delimitadas pelo MMA (2007) apresentam congruência com áreas relevantes para conservação de diferentes grupos taxonômicos (Camardelli & Napoli 2012), principalmente para os anfíbios, que estão entre os vertebrados mais ameaçados do mundo (Stuart et al. 2004) com 30% das espécies consideradas ameaçadas de extinção (IUCN, 2014). Esse número pode ser ainda maior, já que 23% das espécies não possuem informações biológicas adequadas para sua plena avaliação, sendo categorizadas como DD (dados insuficientes) pela IUCN (2014). O número de artigos

voltados à conservação dos anfíbios é muito menor quando comparado a aves e mamíferos (Brito 2008). Além disso, os anfíbios estão menos representados na rede global de áreas protegidas quando comparados a aves, mamíferos e tartarugas e poucas áreas destinadas à conservação são instauradas, levando-se em consideração especificamente esse grupo taxonômico (Rodrigues et al. 2004).

A dificuldade na obtenção de dados sobre a distribuição geográfica para muitas espécies é um dos principais desafios para elaboração de estratégias de conservação (Brooks et al. 2004; Pressey 2004), principalmente em locais com grande diversidade, como nos trópicos (Kress et al. 1998; Bini et al. 2006). Todavia, alguns estudos voltados para conservação estão tentando contornar esse problema, utilizando mapas de extensão de ocorrência (e.g. Rodrigues et al. 2004; Trindade-Filho et al. 2012; Dobrovolski et al. 2014) ou modelagem preditiva da distribuição geográfica das espécies (e.g. Li et al. 1999; Engler et al. 2004; Silva 2008; Rödder et al. 2009; Elith & Leathwick, 2009; Leite 2012), com o intuito de indicar as prioridades iniciais, frente à atual crise da biodiversidade (Pimm & Brooks 1997).

Embora as áreas montanhosas representem 16.5 - 27% da superfície da terra (Fjeldså et al. 2012), nelas são encontrados metade dos *hotspots* mundiais de diversidade biológica (Kohler & Maselli 2009), sendo consideradas áreas de alta prioridade para conservação, com grande número de espécies endêmicas e ameaçadas (Stattersfield et al. 1998). Isso não é diferente nas áreas de altitude do Brasil. Dentro da Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do mundo restando apenas 11.7% da sua cobertura florestal original (Ribeiro et al. 2009), as três principais regiões serranas (Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e a Serra do Espinhaço) são reconhecidas pelo seu alto valor biológico (Giulietti et al. 1997; Martinelli 2007; MMA 2007). Para os anfíbios, essas regiões são caracterizadas pela grande quantidade de espécies endêmicas (Cruz & Feio, 2007; Leite et al. 2008; Leite 2012), constante descoberta de espécies novas para ciência (e.g. Napoli et al. 2011; Leite et al. 2012; Teixeira et al. 2013; Martins & Zaher 2013; Barata et al. 2013; Lourenço-de-Moraes et al. 2014) e onde são encontradas as localidades com maior riqueza para esse grupo taxonômico na Mata Atlântica (Dias et al. 2014).

Contudo, o conhecimento biológico acerca dessas áreas ainda é insuficiente, sendo necessário estimular a pesquisa científica com o objetivo de compreender e proteger o funcionamento e a complexidade dessas áreas montanhosas (Martinelli 2007). Sendo assim, é importante avaliar quais são as pesquisas com anfíbios que estão sendo realizadas nestes locais, para identificar possíveis lacunas do conhecimento e auxiliar no melhor desenvolvimento de futuros trabalhos que possam ser desenvolvidos nestas áreas.

Dessa forma, os objetivos desse trabalho são: 1) quantificar as tendências das pesquisas científicas envolvendo os anfíbios nas áreas de altitude do Brasil; 2) definir áreas de endemismos; 3) definir áreas prioritárias para conservação dos anfíbios anuros das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira; e 4) verificar se elas coincidem com as áreas prioritárias definidas pela MMA (2007).

MATERIAL E MÉTODOS

Tendências de pesquisa

Para avaliar o *status* do conhecimento sobre as anfíbios das áreas de altitude do Brasil foram feitas buscas no banco de dados da *Web of Science* utilizando os seguintes termos: "*Mount**", "*Montan**", "*Serra*", "*Altitud**" e/ou "*Highland**" juntamente com "*Amphibia**", "*Anura**", "*Gymnophiona*", "*frog**" e/ou "*anfibi**" mais as palavras "*Brasil*" ou "*Brazil*". As publicações deveriam ter a combinação destes termos no título, resumo ou palavras-chaves, considerando-se todos os anos disponíveis na base de dados utilizada, de 1945 até 2013. Optamos por não limitar a procura apenas para estudos dentro da Mata Atlântica, para possibilitar uma maior abrangência e permitir um panorama geral dos estudos que estão sendo feitos nas áreas de altitude no país.

Posteriormente, cada registro foi analisado individualmente para constatar se a publicação estava dentro do escopo deste trabalho. Dentre os artigos selecionados foram identificados: o ano de publicação; o principal tema de investigação; o bioma e o estado onde foi realizado o estudo. Particularmente para as descrições de novas espécies também foi identificada a altitude onde o holótipo foi coletado. Estudos que contemplavam mais de um bioma ou mais de um estado não foram contabilizados para as respectivas categorias. Estudos realizados em Campos Rupestres foram considerados como uma categoria separada dentro da Mata Atlântica.

Áreas de Endemismos

- Banco de dados

As poligonais da área de ocorrência das espécies de anfíbios anuros foram obtidas na base de dados da IUCN (<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/spatial-data>). Esse conjunto de dados foi sobreposto e recortado de um *shapefile* das áreas acima de 600 metros de altitude (TOPODATA - Valeriano et al. 2008) que estavam dentro dos limites Mata Atlântica (poligonal obtida em SOS Mata Atlântica, 2008), já que essa altitude é o limite mínimo proposto para o início das Florestas Montanas Tropicais do Brasil (Veloso 1992). Dessa forma, somente as espécies que apresentavam extensão de ocorrência nessas áreas (509 espécies) foram selecionadas com sua poligonal de distribuição geográfica, limitada as áreas acima de 600 m de altitude.

O conhecimento incipiente sobre os anfíbios no Brasil, aliado à escassez de dados de ocorrência para a maioria de suas espécies, tornam os mapas de extensão de ocorrência uma alternativa aceitável para buscar padrões gerais em ecologia, mesmo com os altos erros de comissão. Sobretudo, pelo fato desses mapas estarem disponíveis para vários grupos taxonômicos em escala global, permitindo assim uma identificação inicial das prioridades gerais que podem ser refinadas posteriormente (Lemes et al. 2011; Rondinini et al. 2011). Esses dados são amplamente utilizados em estudos de macroecologia para definir

estratégias de conservação e buscar padrões ecológicos globais mas devem ser interpretados com cautela (e.g. Loyola et al. 2014; Lemes and Loyola, 2013; Faleiro et al. 2013; Rondinini et al. 2011; Safi et al. 2011; Brito 2010).

- Determinação das áreas de endemismos e padrões de diversidade

Áreas de endemismos são regiões que apresentam congruência entre a distribuição geográfica entre dois ou mais táxons (Platnick 1991) que pode ser o resultado da evolução de diferentes táxons que compartilham uma mesma área geográfica (Rosen 1988). Como os limites de distribuição de um táxon são determinados por fatores históricos e atuais, pode-se supor que espécies que apresentam simpatria, foram influenciadas por fatores climáticos e históricos semelhantes (Szumik et al. 2002).

Para delimitar as áreas de endemismos foi utilizada a Análise de Parcimônia de Endemismo (Rosen 1988) através de quadrículas, conforme proposto por Morrone (1994). As áreas de altitude (acima de 600 metros), dentro da Mata Atlântica, foram divididas em 464 quadrantes de 0.5° latitude x 0.5° latitude. Essa rede de quadrículas foi sobreposta com a área de ocorrência das espécies e obtida uma matriz de presença (= "1") e ausência (= "0") das espécies em cada quadrícula. Uma quadrícula hipotética foi adicionada à base de dados e utilizada para enraizar a árvore, na qual continha apenas valores "0" (Rosen 1988). As unidades amostrais (quadrículas) foram tratadas como táxons (linhas) e as espécies como caracteres (colunas). A estimativa de riqueza foi obtida utilizando essa matriz de dados, somando-se todas as espécies presentes em cada quadrícula.

A análise de parcimônia foi realizada no programa Nona (Goloboff 1999) em conjunto com o Winclada (Nixon 2002) utilizando-se o algoritmo heurístico TBR (*Tree Bisection and Reconnection*) com os comandos: "hold1000; mult*100; mult*max*". No cladograma consenso estrito, os terminais com quadrículas ou conjuntos de quadrículas sustentadas por duas ou mais espécies restritas (sinapomorfias) foram consideradas áreas de endemismos (Morrone 1994).

- Definição das áreas prioritárias

A definição das áreas prioritárias para conservação de anfíbios nas áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira foi baseada na combinação de quatro critérios cumulativos, igualmente ponderados, seguindo a proposta de Camardelli & Napoli (2012), com modificações. Os quatro parâmetros utilizados foram (a) áreas de endemismos; (b) quadrículas com alta riqueza de espécies (> 80 espécies); (c) quadrículas com a presença de pelo menos duas espécies ameaçadas de anfíbios segundo a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção vigente (Portarias MMA nº 444/2014, nº 445/2014); e (IV) presença de no mínimo três espécies com distribuição geográfica restrita à quadrícula. Posteriormente, as áreas foram ranqueadas, segundo o somatório desses critérios, conforme sua ordem de importância: alta (=2), muito alta (=3) e extremamente alta (=4).

Como critério de desempate, foi feita uma análise de complementaridade (Humphries et al. 1991) considerando apenas as áreas previamente identificadas como prioritárias. Essa análise procura diminuir a sobreposição e a redundância dos alvos de conservação (espécies), representando cada espécie em pelo menos uma área prioritária. O primeiro passo foi selecionar a área que possui o maior número de espécies, entre as classificadas como extremamente alta. Em seguida, as áreas remanescentes foram ordenadas conforme a sua maior adição de novas espécies, não representadas na rede de áreas prioritárias, respeitando a ordem de importância das áreas. Esse procedimento foi repetido sucessivas vezes até que todas as espécies desse conjunto de dados fossem representadas nas áreas prioritárias. Continuando o empate entre duas áreas, foi priorizada aquela área que possuía um maior número de espécies ameaçadas e de espécies com distribuição restrita.

Para definir o grau de proteção existente em cada área definida como prioritária foi quantificada a presença de Unidades de Conservação (UCs) de proteção integral e de uso sustentável dentro das quadrículas selecionadas. Assim como, as recomendações de criações de novas UCs de proteção integral e de UCs sem definição da categoria de proteção, estabelecidas pelo MMA (2007) como ações prioritárias para conservação da Mata Atlântica.

RESULTADOS

Status do conhecimento

Foram encontrados 146 artigos que abordam os anfíbios das áreas de altitude no Brasil. A maioria dos estudos analisados foi conduzida na região sudeste do país, nos estados de Minas Gerais (30%), Rio de Janeiro (20%) e São Paulo (17%). O quarto estado mais estudado foi a Bahia (9%). Os outros estados identificados contribuíram com menos de 5% cada um.

A maioria dos estudos foi realizada na Mata Atlântica (60 %), seguido pelo Cerrado (12%). Destaque especial para os estudos localizados nos Campos Rupestres que representaram 12% do total, a maioria deles feitos ao longo da Serra do Espinhaço. A Amazônia (3%) e a Caatinga (2%) foram as regiões menos estudadas.

De forma geral, houve um incremento dos estudos abordando os anfíbios das áreas de altitude ao longo do tempo, principalmente na última década, atingindo seu ápice nos anos de 2010, 2012 e 2013 (Figura 1). A metade desse conhecimento foi produzida nos últimos quatro anos (2010-2013).

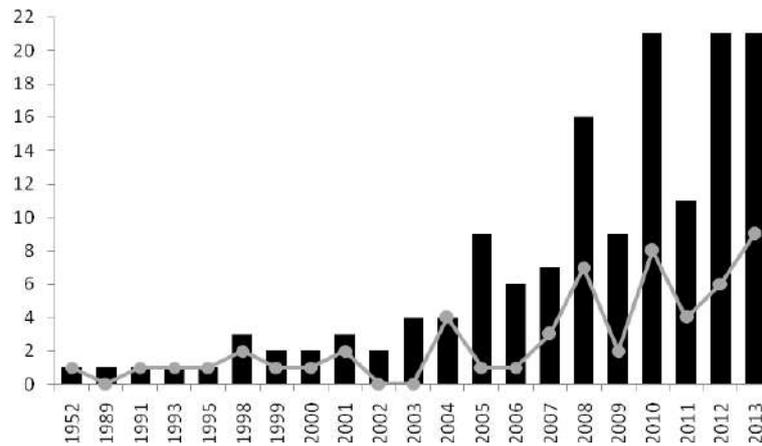


Figura 1. Número das espécies novas (linha) e total de artigos publicados (barras) por ano sobre os anfíbios das áreas de altitude do Brasil entre 1945-2013.

Foram identificadas 12 linhas de pesquisa nos estudos encontrados, sendo que a Taxonomia e Sistemática representou quase 50% das pesquisas (Figura 2). As áreas de Paleontologia, Ecologia Comportamental, Genética e Ecologia de Populações foram as menos estudadas (Figura 2).

Dos 146 artigos encontrados 69 eram sobre Taxonomia e Sistemática, e destes 49 trabalhos descreveram 55 espécies novas para ciência. Embora seja observado certa oscilação na descrição de espécies ao longo do tempo, houve uma tendência geral ao aumento do número desses estudos com o tempo (Figura 2). Dentro do conjunto de dados analisado, os gêneros com o maior número de espécies descritas foram dois da família Hylidae (*Bokermannohyla* - nove espécies e *Scinax* - seis espécies), e um da família Cycloramphidae (*Proceratophrys* - sete espécies).

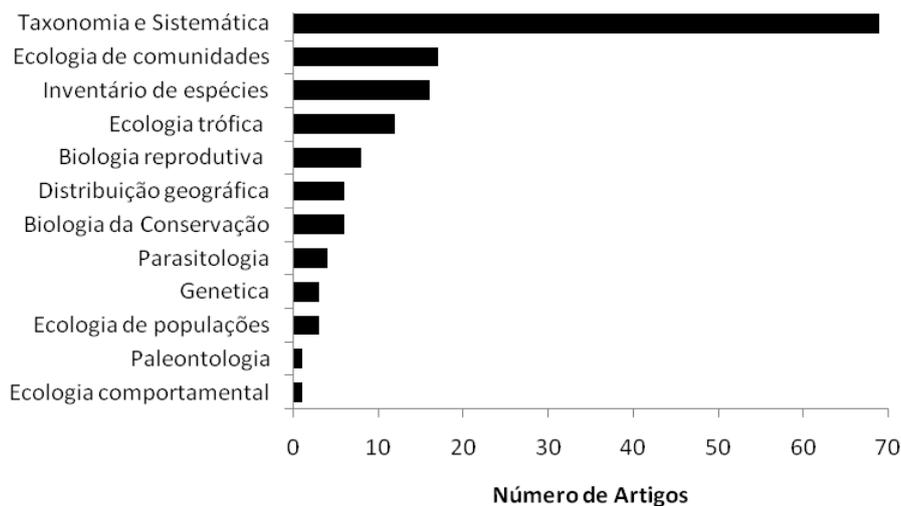


Figura 2. Número de artigos sobre anfíbios das áreas de altitude do Brasil, de acordo com o principal tema de investigação abordado entre os anos de 1945-2013.

Segundo a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 25% destes táxons descritos das áreas de altitude são considerados com dados insuficientes (DD) para a avaliação do seu risco de extinção, 25% são classificados como menos preocupante (LC), duas espécies (*Physalaemus maximus* e *Scinax duartei*) são consideradas Vulneráveis (VU) e *Phasmahyla spectabilis* foi considerada como quase ameaçada de extinção (NT). Aproximadamente metade das espécies descritas (44%) ainda não foram avaliadas.

A maioria das espécies (holótipos) foram descobertas em altitudes intermediárias, entre 800-1100 m (17 táxons) e 1100-1400 m (13 táxons). Em altitude inferiores (500-800 m) foram descritas 12 espécies e em altitudes superiores (1400-2050 m) outros oito táxons. Cinco espécies não tinham valores de altitude associados ao holótipo.

Padrões de diversidade e Áreas de Endemismo

- Padrões de diversidade

A estimativa média de riqueza em cada quadrícula foi de 55 espécies, variando entre 23 e 148 espécies. As quadrículas do sudeste do Brasil foram as que apresentaram as maiores estimativas de riqueza ao longo da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira, principalmente aquelas localizadas no sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e leste de São Paulo (Figura 3).

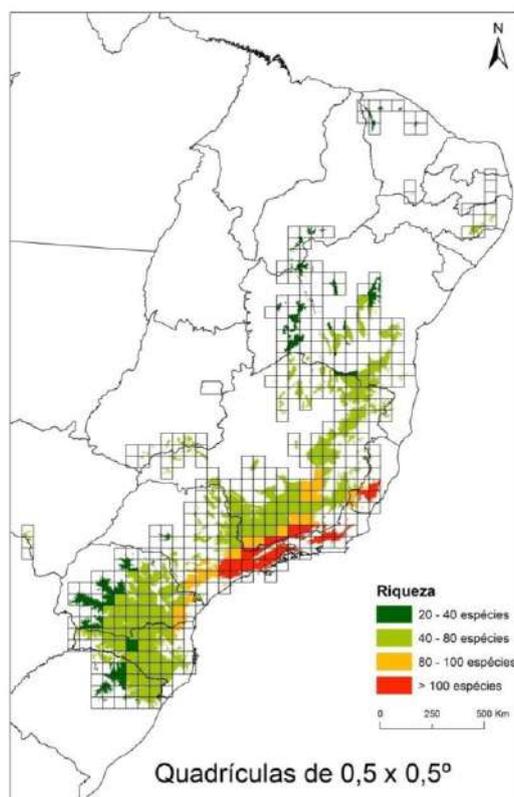


Figura 3. Estimativa da riqueza de anfíbios anuros das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira utilizando o banco de dados da IUCN.

- Áreas de endemismo

A análise de parcimônia de endemismos conduzida com a extensão de ocorrência de 509 espécies de anfíbios anuros resultou no reconhecimento de 14 áreas de endemismos (30 quadrículas) com 44 sinapomorfias e 41 autopomorfias (Figura 4 e 5, Tabela 1) nas áreas de altitude da Mata Atlântica. A árvore consenso estrito foi obtida com 7171 passos com índice de consistência de 0.07 e índice de retenção igual a 0.64. Entre as quadrículas que foram consideradas áreas de endemismos, 66% (n = 20) apresentaram riqueza de espécies alta (> 80 espécies).

De forma geral, podemos considerar a definição de cinco grandes áreas de endemismos para os anfíbios anuros nas áreas de altitude da Mata Atlântica: a Serra do Mar (Q153, Q154, Q191, Q202, Q211, Q212, Q222, Q317, Q318, Q341 e Q340), a Serra da Mantiqueira (Q247, Q294, Q387, Q426 e Q427), a Região do Quadrilátero Ferrífero na Cadeia do Espinhaço (Q296, Q297, Q322 e Q323), uma área na Bahia (Q472) e outra em Pernambuco (Q485, Q486, Q488 e Q489) (Figura 4).

Tabela 1. Espécies de anfíbios que suportam as áreas de endemismos das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira.

Quadrículas	Área de Endemismo	Espécies
Q153 e Q154	Serra do Mar (PR)	<i>Brachycephalus ferruginus</i> <i>Cycloramphus mirandaribeiroi</i>
Q 191	Serra da Juréia/Itatins (SP)	<i>Cycloramphus juimirim</i> <i>Hylodes dactylocinus</i>
Q202	Guarapitanga (SP)	<i>Brachycephalus nodoterga</i> <i>Phrynomedusa bokermanni</i>
Q211, Q212 e Q222	Serra do Mar (SP)	<i>Megaelosia massarti</i> <i>Paratelmatobius cardosoi</i> <i>Paratelmatobius poecilogaster</i>
Q247	Itatiaia (divisa do ES, SP e RJ)	<i>Bokermannohyla ahenea</i> <i>Bokermannohyla gouveai</i> <i>Cycloramphus carvalhoi</i> <i>Holoaden bradei</i> <i>Hylodes glaber</i> <i>Ischnocnema holti</i> <i>Paratelmatobius lutzii</i>
Q294	Serra de Ibitipoca (MG)	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i> <i>Physalaemus rupestris</i>
Q296	Serra do Caraça (MG)	<i>Physalaemus erythros</i> <i>Scinax curicica</i>
Q297, Q322 e Q323	Quadrilátero Ferrífero (MG)	<i>Bokermannohyla nanuzae</i> <i>Physalaemus evangelistai</i>
Q317 , Q318, Q340 e Q341	Serra do Órgãos (RJ)	<i>Aplastodiscus musicus</i> <i>Cycloramphus ohausi</i> <i>Cycloramphus stejnegeri</i> <i>Hylodes charadranaetes</i> <i>Ischnocnema erythromera</i> <i>Ischnocnema gualteri</i> <i>Scinax melloi</i>
Q387	Serra do Caparaó (MG e ES)	<i>Cycloramphus bandeirensis</i> <i>Hylodes vanzolinii</i>
Q 426	Domingos Martins (ES)	<i>Dendropsophus ruschii</i> <i>Scinax kautskyi</i>
Q427	Santa Teresa (ES)	<i>Crossodactylodes izecksohni</i> <i>Euparkerella tridactyla</i>

		<i>Ischnocnema epipeda</i>
		<i>Ischnocnema oea</i>
		<i>Scinax arduus</i>
		<i>Zachaeus carvalhoi</i>
Q472	Serra das Lontras (BA)	<i>Cycloramphus migueli</i>
		<i>Dendrophryniscus proboscideus</i>
Q485, 486, 488, 489	Planalto da Borborema (PE)	<i>Phyllodytes gyrinaethes</i>
		<i>Phyllodytes edelmoi</i>

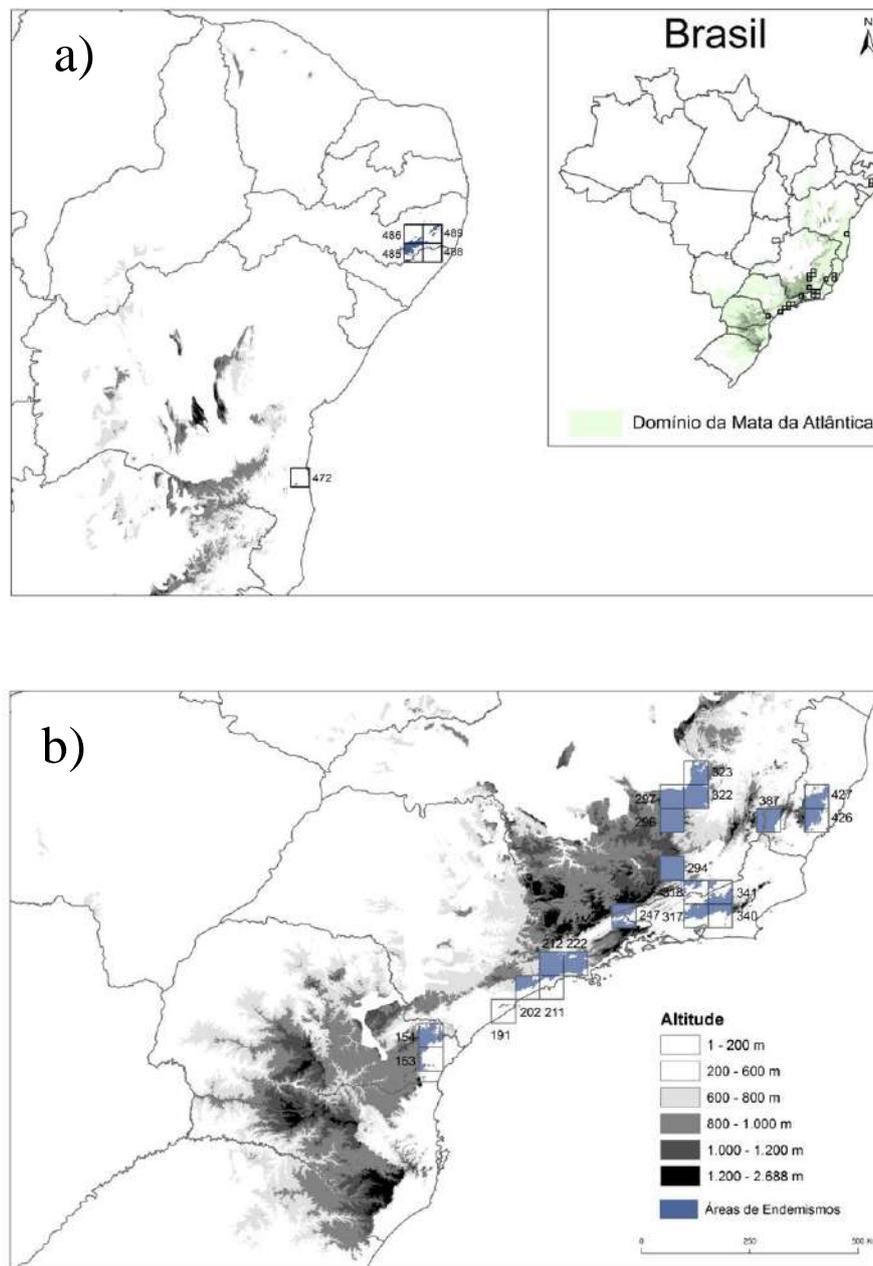


Figura 4. Mapa com a distribuição das quadrículas identificadas com áreas de endemismos para os anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica em **a)** evidenciando a parte do nordeste e em **b)** a parte sul e sudeste do Brasil. As áreas de endemismo são apenas os locais identificados em azul no mapa.

- Áreas prioritárias para conservação

Segundo os critérios utilizados, foram identificadas 19 áreas prioritárias para conservação dos anfíbios nas áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira (Tabela 2, Figura 6).

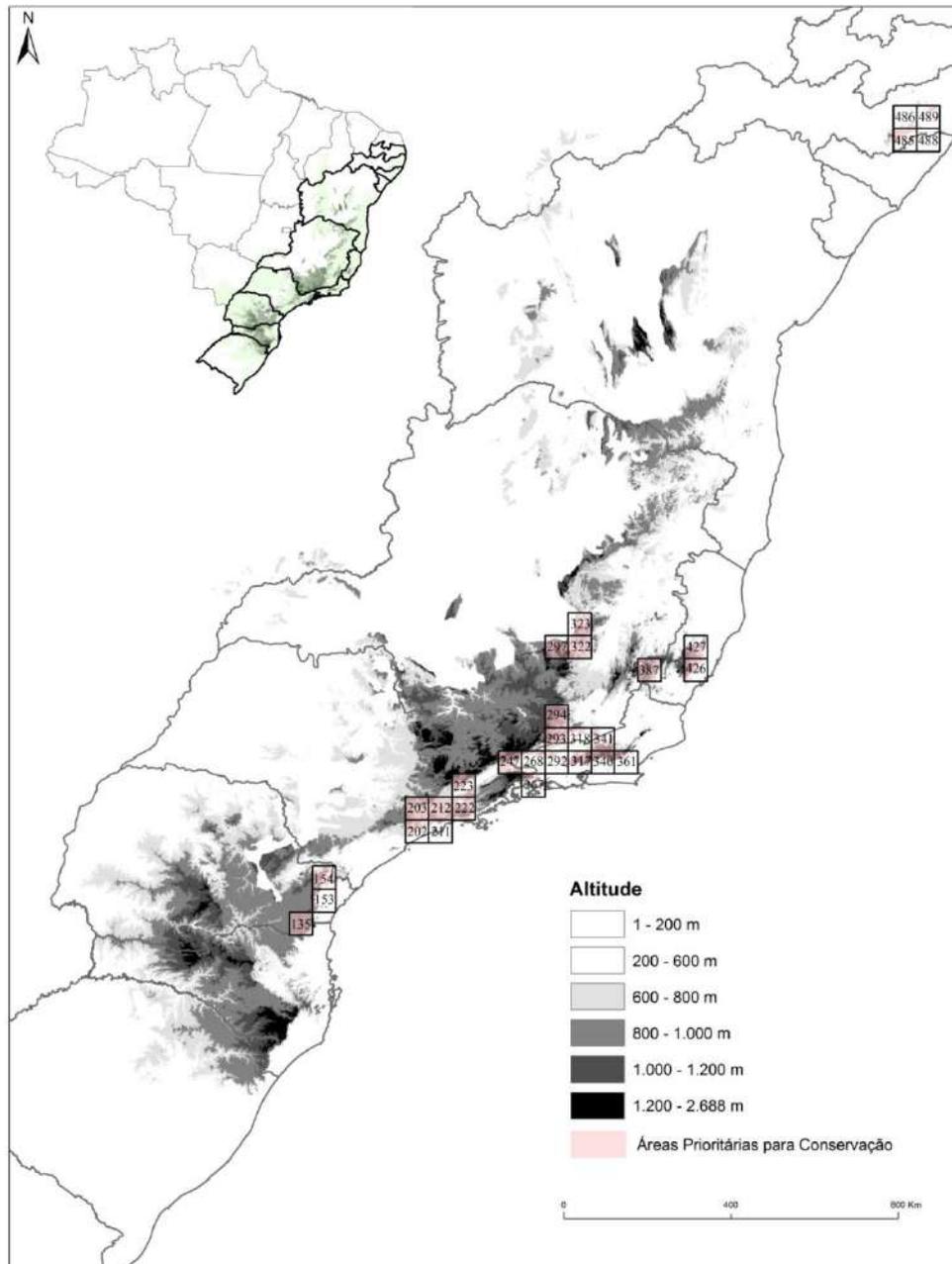


Figura 6. Mapa com a distribuição das quadrículas identificadas como prioritárias para conservação dos anfíbios anuros nas áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira.

Tabela 2. Áreas definidas como prioritárias para conservação dos anfíbios anuros nas áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira. Categorias de importância com o mesmo peso (0 = ausência; 1 = presença). Espécies restritas: 1 = áreas com pelo menos três táxons restritos à quadrícula. Espécies ameaçadas: 1 = áreas com pelo menos duas espécies consideradas ameaçadas segundo a Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção. Grau de Importância: EA = Extremamente alta; MA = Muito Alta e A = Alta. O complemento residual é a diferença entre o número total de espécies apresentadas na análise (n= 392) e o número de espécies presentes em cada área.

Ordem de Prioridade	Área Prioritária	Quadrículas	Riqueza (>80 espécies)	Espécies Restritas	Áreas de Endemismo	Espécies Ameaçadas	Σ	Número de Espécies	Complemento residual	Grau de Importância
1	Serra dos Orgãos (RJ)	Q317, 318, 340 e 341	1	1	1	1	4	156	236	EA
2	Serra do Mar (SP)	Q211, 212 e 222	1	1	1	1	4	132	190	EA
3	Quadrilátero Ferrífero (MG)	Q297, 322 e 323	1	1	1	1	4	94	158	EA
4	Serra do Mar (PR)	Q153 e 154	1	1	1	1	4	90	130	EA
5	Itatiaia (Divisa do ES, SP e RJ)	Q247	1	1	1	1	4	139	110	EA
6	Serra de Ibitipoca (MG)	Q294	1	1	1	1	4	84	106	EA
7	Região de Santa Teresa (ES)	Q427	1	1	1	0	3	112	78	MA
8	Planalto da Borborema (PE)	Q485,486,488,489	0	0	1	1	2	55	56	A
9	Tijucas do Sul (PR)	Q135	1	0	0	1	2	83	17	A
10	Monteiro Lobato (SP)	Q223	1	0	0	1	2	115	14	A
11	Domingos Martins (ES)	Q426	1	0	1	0	2	100	11	A
12	Macaé de Cima (RJ)	Q267	1	0	0	1	2	128	9	A
13	Serra da Cantareira (SP)	Q202	1	0	1	0	2	106	7	A
14	Serra do Caparaó (MG e ES)	Q387	1	0	1	0	2	82	5	A
15	Resende (RJ)	Q268	1	0	0	1	2	135	4	A
16	Valença (RJ)	Q292	1	0	0	1	2	128	3	A
17	Amparo (RJ)	Q361	1	0	0	1	2	113	2	A
18	Serra do Japi / Morro Grande (SP)	Q203	1	0	0	1	2	113	1	A
19	Rio Preto (MG)	Q293	1	0	0	1	2	101	0	A

Seis áreas obtiveram a pontuação máxima (4 pontos) e foram priorizadas como de extrema importância biológica (em ordem de classificação): Serra dos Órgãos no Rio de Janeiro (Q317, Q318, Q340 e Q341), Serra do Mar em São Paulo (Q211, Q212 e Q222), região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Q297, Q322 e Q323), Serra do Mar no Paraná (Q153 e Q154), a região de Itatiaia na divisa dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Q247) e a Serra de Ibitipoca também em Minas Gerais (Q294). Dentre as sete áreas classificadas como de muito alta ou de extrema importância biológica, todas também foram identificadas como áreas de endemismos e de alta riqueza de espécies (> 80 espécies).

As áreas prioritárias que apresentaram o maior número de UCs de proteção integral foram a Serra dos Órgãos - RJ (Q317, Q318, Q340 e Q341), a Serra do Mar - SP (Q211, Q212 e Q222) e o Quadrilátero Ferrífero - MG (Q297, Q322 e Q323). Todavia, 16% (Q135, Q361 e Q426) delas não possuem nenhuma unidade de conservação de proteção integral e quatro (Q264, Q293, Q294 e [Q485,486,488,489]) não possuem nenhuma UC de uso sustentável (Figura 7). Quanto às ações conservacionistas propostas para a Mata Atlântica pelo MMA (2007) para criação de novas UCs de proteção integral ou UCs com categoria ainda não definidas, 26.6% (Q202, Q247, Q267, Q294, Q361) das áreas prioritárias definidas neste estudo não foram contempladas com nenhuma proposta (Figura 7).

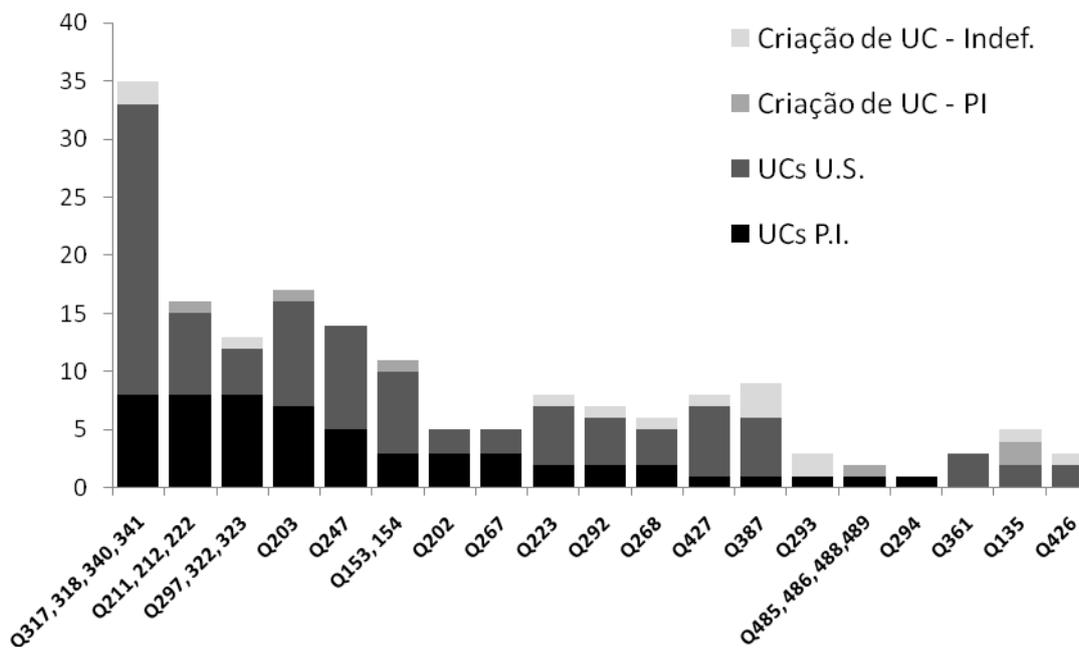


Figura 7. Número de Unidades de Conservação (UCs) de Proteção Integral (P.I.) e de Uso Sustentável (U.S.) e das ações prioritárias (criação de UCs P.I. e ainda não definidas - Indef.) para conservação, propostas pelo MMA (2007), presentes em cada área definida como prioritárias para conservação dos anuros das áreas de altitude do domínio da Mata Atlântica brasileira. O nome da região geográfica de cada quadricula pode ser encontrada na Tabela 2.

DISCUSSÃO

- Status do conhecimento

A localização geográfica das três principais cadeias montanhosas do Brasil provavelmente influenciou na maior ocorrência de estudos direcionados para essas áreas em estados da federação próximos a elas. A Serra do Espinhaço, a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira fazem parte dos estados onde foram realizados a maioria dos estudos (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia) abordando os anfíbios das áreas de altitude. Além disso, a região sudeste concentra (hoje e historicamente) os principais centros de pesquisa e pesquisadores de anfíbios do Brasil, conseqüentemente a quantidade de artigos produzidos abordando a anurofauna desta região é maior do que em qualquer outro local do país (Rossa-Feres et. al. 2011; Campos et al. 2014).

O aumento gradual de estudos com anfíbios em áreas de altitude do Brasil com o passar dos anos, principalmente a partir de 2005, revela um interesse crescente sobre essa temática pelos herpetólogos brasileiros. Grande parte dessa produção científica é recente, já que mais da metade (50.7%) foi publicada nos últimos quatro anos. Os esforços de pesquisa estão direcionados principalmente para a Taxonomia e Sistemática. Como muitas dessas áreas ficam isoladas devido à dificuldade de acesso e ainda possuem fragmentos bem preservados, a probabilidade de encontrar novas espécies para ciência nestes locais é alta, conforme pode ser observado na porcentagem (33.5% do total) de artigos encontrados que descrevem novos táxons para essas áreas. Mesmo com esse grande esforço voltado para estudos taxonômicos, estimativas revelam que o número de espécies de anfíbios na região tropical ainda está subestimado (Giam et al. 2012) sendo necessário ainda mais o estímulo dessa linha de pesquisa e a formação de novos taxonomistas.

Estudos taxonômicos e sistemáticos, incluindo inventários de fauna, são essenciais para uma melhor compreensão dos anfíbios brasileiros e para uma melhor definição dos padrões de riqueza e de distribuição geográfica para este grupo taxonômico (Verdade et al. 2012). Martinelli (2007) listou 52 regiões serranas dentro da Mata Atlântica que apresentam ausência parcial ou total de informação biológica, acrescentando que uma das ações científicas prioritárias é a criação de listas das espécies dessas áreas.

Áreas montanhosas são reconhecidas pela sua grande importância biológica, associada à sua história climática e geológica e também pela variabilidade de fatores bióticos e abióticos que proporcionam diferentes tipos de micro-habitats para as espécies que vivem nestes locais (Martinelli 2007). Dessa forma, são verdadeiros laboratórios naturais com gradientes ambientais que possibilitam o estudo dos processos que regulam as populações e a estrutura das comunidades biológicas. As cadeias montanhosas funcionam como barreiras geográficas e podem fornecer hipóteses sobre os processos evolutivos que moldaram a

diversidade biológica, tais como eventos vicariantes e processos de dispersão (Brown et al. 2006; Cox & Moore 2009).

Em cenários de mudanças climáticas, as áreas de altitude dos trópicos devem funcionar como refúgios bioclimáticos (Brodie et al. 2012). Os mesmos autores ressaltam que esse deslocamento das espécies de baixadas procurando ambientes condizentes com sua tolerância térmica, poderá aumentar a competitividade entre as espécies de baixada e de áreas de altitude. Outra preocupação eminente é sobre as espécies que são típicas de topos de morro, onde predominam temperaturas mais amenas, uma vez que não se sabe como e se elas irão suportar as mudanças climáticas previstas. Assim, estudos conduzidos nestas áreas podem promover avanços científicos de diferentes linhas de pesquisas da biologia, além de ajudar na compreensão de como as mudanças climáticas poderão afetar a biodiversidade, principalmente com estudos de tolerância termal (Duarte et al. 2011).

Nas últimas duas décadas, os relatos de declínios e extinções populacionais de anfíbios aumentaram no mundo (Wake & Vredenburg 2008). A quitridiomíose, uma doença emergente causada pelo fungo quitrídio (*Batrachochytrium dendrobatidis*), é apontada como uma das possíveis causas desses declínios. As espécies de áreas de altitude são mais suscetíveis à contaminação devido ao melhor desenvolvimento do fungo em baixas temperaturas (Young et al. 2004). Esse fato já foi demonstrado para populações da Mata Atlântica que vivem em áreas de altitude, onde existe uma maior prevalência e intensidade de contaminações por esse fungo comparado com áreas de baixadas (Gründler et al. 2012).

De forma geral, existe uma carência de estudos com anfíbios relacionados à Biologia da Conservação (Urbina-Cardona 2008; Brito 2008), inclusive para as áreas de altitude do Brasil. Esses estudos deveriam ser intensificados, principalmente devido à fragilidade desses ambientes, à alta especificidade de hábitat das espécies de anfíbios e estimativas de mudanças climáticas que podem alterar completamente o ambiente dessas espécies.

- Padrões de diversidade e áreas de endemismos

A riqueza de anfíbios encontrados em localidades amostradas dentro da Mata Atlântica varia entre 20 a 93 espécies (Vasconcelos et al. 2010; Almeida et al. 2011; Dias et al. 2014). A estimativa de riqueza, utilizando o banco de dados da IUCN, para as quadrículas variou entre 23 e 143 espécies. Embora nenhuma localidade conhecida apresente uma riqueza de 143 espécies de anfíbios, esses números estão superestimados devido ao tipo de dado utilizado (mapas de extensão de ocorrência) e o tamanho das quadrículas (aproximadamente 25 km²). Contudo, as quadrículas estimadas com alta riqueza de espécies, identificadas neste estudo, são condizentes com o encontrado na literatura. Essas áreas, localizadas principalmente ao longo da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, são consideradas áreas de grande diversidade e importantes para a conservação dos anfíbios da Mata Atlântica (Cruz & Feio 2007), onde ainda são

descritas muitas espécies novas para ciência (e.g. Martins & Zaher 2013; Condez et al. 2014; Mângia et al. 2014).

Conforme ressaltado anteriormente, todas as localidades que apresentam alta riqueza de espécies para anurofauna dentro da Mata Atlântica estão inseridas em regiões serranas (Dias et al. 2014). Por exemplo, o município de Santa Teresa no Espírito Santo (Rödder et al. 2007; Almeida et al. 2011), a Estação Ecológica da Boracéia (Heyer et al. 1990), o Parque Estadual Carlos Botelho (Forlani et al. 2010) e o Parque Estadual Turístico do Alto da Ribeira (Araujo et al. 2010) no estado de São Paulo, a Serra do Brigadeiro em Minas Gerais (Moura et al. 2012) e a Serra Bonita na Bahia (Dias et al. 2014). Exceto a Serra Bonita, todos os outros locais estão inseridos, dentro de quadrículas estimadas, como de alta diversidade de espécies.

As áreas de endemismos identificadas para os anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica são congruentes com outras propostas de trabalho. Os fatores que afetam ou afetaram a distribuição de um táxon, limitando sua ocorrência a determinada região, podem ter influenciado de forma semelhante os diferentes grupos taxonômicos, sendo importante essa congruência nos padrões, para a determinação de uma área de endemismo (Szumik et al. 2002). As regiões da Serra do Mar, Bahia e Pernambuco já foram apontadas como áreas de endemismos para aves, opiliões, borboletas, pequenos mamíferos e primatas (Costa et al. 2000, Silva et al. 2004; Silva and Casteleti 2005; Silva 2008). Sigrist & Carvalho (2008) identificaram nove áreas de endemismos na Mata Atlântica utilizando dados de 19 táxons não relacionados de plantas, invertebrados e vertebrados. Exceto uma área encontrada no litoral norte da Bahia, todas as outras foram também identificadas neste estudo (ver figura 5, Sigrist & Carvalho 2008).

Todas as áreas definidas como áreas de endemismo estão dentro de uma ou mais áreas definidas como prioritárias para conservação da biodiversidade, segundo o MMA (2007). Devido às suas características biogeográficas e à singularidade de suas espécies essas áreas devem ser consideradas prioritárias para conservação (Morrone 2000; Sigrist & Carvalho 2008; Camardelli & Napoli, 2012).

A maioria dos mapas de extensão de ocorrência dos anfíbios disponibilizados pela IUCN foram feitos em 2008 (IUCN, 2008). A distribuição geográfica de algumas espécies está desatualizada. Isso poderia gerar ruídos na análise, ocasionando a determinação de uma área de endemismo, com uma espécie que não é endêmica daquela região. Contudo, esse artefato parece ter influenciado pouco os resultados obtidos neste estudo.

Por exemplo, a Serra das Lontras foi definida pela presença exclusiva de dois táxons: *Cycloramphus migueli* e *Dendrophryniscus proboscideus*. A distribuição geográfica da primeira foi ampliada para o município de Amargosa - Serra do Timbó (Freitas et al. 2007) e a segunda foi encontrada em outra região de altitude, em Macarani (Capítulo 1). A incorporação dessa informação no banco de dados inviabilizaria a manutenção da Serra das Lontras, como área de endemismo. Contudo, nos últimos anos foram descritos outros três táxons

que são conhecidos somente para aquela região, são elas: *Dendrophryniscus oreites*, *Crossodactylodes septentrionalis* e *Brachycephalus pulex* (Recoder et al. 2010; Napoli et al. 2011; Teixeira et al. 2013). Dessa forma, é possível que em uma análise posterior, com a atualização das informações sobre a distribuição geográfica das espécies de anfíbios, sejam encontrados resultados semelhantes ao que encontramos nesse estudo.

Outros dois locais, ao longo das regiões serranas da Mata Atlântica do Brasil, que merecem atenção especial são a Serra do Timbó e da Jibóia no estado da Bahia e a Serra Gaúcha no estado do Rio Grande do Sul. Em uma análise preliminar com nosso banco de dados, utilizando quadrículas de 1° x 1°, essas duas regiões também foram identificadas como áreas de endemismo.

Camardelli e Napoli (2012) identificaram seis áreas de endemismo para os anfíbios na região do semi-árido brasileiro. Entre elas, a Serra do Timbó e a Serra da Jibóia foram identificadas com base em espécies típicas da Mata Atlântica. Dessas duas áreas foram descritas quatro espécies de anfíbios nos últimos anos - *Gastrotheca flamma*, *Proceratophrys sanctaritae*, *Phasmahyla timbo* e *Bokermannohyla capra* (Juncá & Nunes, 2008; Cruz et al. 2008; Napoli & Pimenta, 2009; Cruz et al. 2010), sendo que as duas primeiras espécies são restritas a localidade-tipo e possivelmente novas espécies ocorrem na área (Capítulo I).

A Serra Gaúcha está localizada no nordeste do Rio Grande do Sul, é um dos poucos locais onde podem ser encontradas extensas áreas preservadas de florestas de Araucárias e se destaca pela elevada riqueza de anfíbios (55 espécies) e grande quantidade de endemismos (Kwet et al. 2010). Duas espécies são conhecidas somente para essa região *Dendrophryniscus krausae* e *Melanophryniscus cambaraensis*, sendo a última considerada ameaçada de extinção, e pelo menos outras oito espécies (*Melanophryniscus simplex*; *Hypsiboas joaquina*; *Hypsiboas marginatus*; *Pseudis cardosoi*; *Thoropa saxatilis*; *Hylodes meridionalis*; *Adenomera araucaria* e *Elachistocleis erythrogaster*) apresentam distribuição restrita ao nordeste do Rio Grande do Sul e sudeste de Santa Catarina, na Serra Geral e Serra Gaúcha (Kwet et al. 2010).

Essas duas regiões (Serra do Timbó e Jibóia e a Serra Gaúcha), não foram identificadas como áreas de endemismo neste estudo, devido ao tamanho das quadrículas utilizadas na análise final. Contudo, a ocorrência de sobreposição entre diferentes espécies exclusivas dessas áreas, indica que provavelmente, essas regiões apresentem grande importância dentro de um contexto biogeográfico para os anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica brasileira.

O aprimoramento do banco de dados, através da incorporação das informações publicadas na literatura, em conjunto com dados de coleções científicas do país poderá revelar novas áreas de endemismos em uma escala mais refinada, principalmente no nordeste, onde houve um aumento do número de publicações sobre sua anurofauna (e.g. Moura et al. 2011, Magalhaes et al. 2013, Dias et al. 2014a, Dias et al. 2014b,

Magalhães et al. 2015, Capítulo I) possibilitando uma análise biogeográfica mais refinada dos padrões de distribuição de suas espécies.

As incertezas sobre a distribuição geográfica das espécies e as grandes lacunas de amostragens - conhecido como déficit Wallaceano (Whittaker et al. 2005) - é muito comum em países mega diversos como o Brasil. Todavia, com as taxas atuais de perda de biodiversidade, a tomada de decisão precisa ser feita com os dados disponíveis utilizando estratégias adequadas que maximizem os esforços para a conservação (Diniz-Filho et al. 2008). Sendo assim, aqui identificamos 19 áreas prioritárias para conservação da anurofauna das áreas de altitude a Mata Atlântica que foram escolhidas com o intuito de maximizar a proteção de uma alta riqueza de espécies, contemplar um maior número de espécies ameaçadas e/ou restritas a determinada região, incorporando princípios de complementaridade (Pressey et al. 1994) que permitiram que essas áreas contemplassem a ocorrência de 392 espécies (72% das espécies que ocorrem na Mata Atlântica - Haddad et al. 2013), 85 delas endêmicas ou restritas, e todas as espécies consideradas ameaçadas (24 espécies) que ocorrem em áreas de altitude, além de 15 espécies classificadas como quase ameaçadas (NT).

Entretanto, a atual rede de unidades de conservação do Brasil não contempla de forma homogênea todas essas áreas. Em três delas não foram identificadas nenhuma unidade ou ação voltada para conservação: Amparo (Q361), Tijucas do Sul (Q135) e Domingos Martins (Q426) e mesmo em locais com grande quantidade de UCs apenas uma pequena parte da área é protegida. Entre as áreas identificadas como de extrema importância biológica, a Serra de Ibitipoca (Q294) é a única que apresenta somente uma Unidade de Conservação de proteção integral (Parque Estadual do Ibitipoca) e nenhuma ação proposta para conservação pelo MMA (2007). A Serra de Ibitipoca é a localidade-tipo de quatro espécies de anuros (*Bokermannohyla feioi*; *Bokermannohyla ibitipoca*; *Hylodes amnicola* e *Physalaemus rupestris*) todas elas com distribuição geográfica restrita ou conhecida apenas de sua localidade-tipo (Frost 2014).

A principal estratégia para preservação da biodiversidade é a criação de áreas protegidas (Lawler & White 2008). Os resultados alcançados aqui poderão auxiliar em futuras discussões para implementação de novas unidades de conservação que agreguem critérios geralmente utilizados (riqueza de espécies, espécies endêmicas e ameaçadas), como também de unidades biogeográficas naturais incorporando aspectos históricos de evolução biogeográfica (Nogueira et al. 2011; Guedes et al. 2013; Xavier et al. 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A. P., Gasparini, J. L., Peloso, P.L.V. 2011. Frogs of the state of Espírito Santo, southeastern Brazil - The need for looking at the 'coldspots'. *Check List* 7(4): 542-560.

Araujo, C. O., Condez, T. H., Bovo, R. P., Centeno, F. C., Luiz, A. M. 2010. Amphibians and reptiles of the Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP: an Atlantic Forest remnant of Southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 10(4): 257-274.

Barata, I. M., Santos, M. T. T., Leite, F. S. F., Garcia, P. C. A. 2013. A new species of *Crossodactylodes* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil: first record of genus within the Espinhaço Mountain Range. *Zootaxa* 3731: 552–560.

Bini, L. M., Diniz-Filho, J. A. F., Rangel, T. F. L. V. B., Bastos, R. P., Pinto, M. P. 2006. Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. *Diversity and Distributions* 12: 475–482.

Brito, D. 2008. Amphibian conservation: Are we on the right track? *Biological Conservation* 141: 2912–2917.

Brito, D. 2010. Overcoming the Linnean shortfall: Data deficiency and biological survey priorities. *Basic and Applied Ecology* 11: 709-713.

Brodie, J., Post, E., Laurance, W. F. 2012. Climate change and tropical biodiversity: A new focus. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 145–150.

Brooks, T. M., Fonseca, G. A. B., Rodrigues, A. S. L. 2004. Species, data, and conservation planning. *Conservation Biology* 18: 1682–1688.

Brown, J. H. & Lomolino, M. V. 2006. *Biogeografia*. Sunderland: Sinauer, Tradução Editora Funpec. 2a. ed. 2006.

Bruner, A. G., Gullison, R. E., Rice, R. E., Fonseca, G. A. B. 2001. Effectiveness of parks in protecting tropical biodiversity. *Science* 291: 125–128.

Camardelli M. & Napoli, M. F. 2012. Amphibian conservation in the Caatinga biome and semiarid region of Brazil. *Herpetologica* 68: 31–47.

Campos, F. S., Brito, D., Solé, M. 2014. Diversity patterns, research trends and mismatches of the investigative efforts to amphibian conservation in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(4): 1873-1886.

- Camurugi, F., Lima, T. M., Merces, E. A., Juncá, F. A. 2010. Anurans of the Reserva Ecológica da Michelin, Municipality of Igrapiúna, State of Bahia, Brazil. *Biota Neotropica* 10(2): 305-312.
- Condez, T. H., Clemente-Carvalho, R. B. G., Haddad, C. F. B., dos Reis, S. F. 2014. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the highlands of the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Herpetologica* 70: 89–99.
- Costa, L. P., Leite, Y. R. L., Fonseca, G. A. B., Fonseca, M. T. 2000. Biogeography of South American forest mammals: Endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* 32(4b): 872-881.
- Cox, C. B. & Moore, P. D. 2009. *Biogeografia: uma abordagem ecológica e evolucionária*. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC.
- Cruz, C. A. G. & Feio, R. N. 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Pp. 117-126. *In* *Herpetologia no Brasil II*. Nascimento, L.B. and Oliveira, M.E. (Eds.). Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Cruz, C. A. G. & Napoli, M. F. 2010. A new species of smooth horned frog, genus *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Cycloramphidae), from the Atlantic Rainforest of eastern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2660: 57–67.
- Cruz, C. A. G., Napoli, M. F., Fonseca, P. M. A. 2008. A new species of *Phasmahyla* Cruz, 1990 (Anura: Hylidae) from the state of Bahia, Brazil. *South American Journal of Herpetology* 3(3): 187–195.
- Dias, I. R., Medeiros, T. T., Vila-Nova, M. F., Solé, M. 2014a. Amphibians of Serra Bonita, southern Bahia: a new hotspot within Brazil's Atlantic Forest hotspot. *ZooKeys* 449: 105–130.
- Dias, I. R., Mira-Mendes, C. V., Solé, M. 2014b. Rapid inventory of herpetofauna at the APA (Environmental Protection Area) of the Lagoa Encantada and Rio Almada, Southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 7: 627-637.
- Diniz-Filho, J. A. F., Bini, L. M., Pinto, M. P., Rangel, T. F., Carvalho, P., Bastos, R. P. 2006. Anuran species richness, complementarity and conservation conflicts in Brazilian Cerrado. *Acta Oecologica* 29: 9-15.
- Diniz-Filho, J. A. F., Bini, L. M., Vieira, C., Blamires, D., Terribile, L. C., Bastos, R. P., de Oliveira, G., Barreto, B. D. 2008. Spatial patterns of terrestrial vertebrate species richness in the Brazilian Cerrado. *Zoological Studies* 47: 146–157.
- Dobrovolski, R., Loyola, R. D., Fonseca, G. A. B., Diniz-Filho, J. A. F., Araújo, M. B. 2014. Globalizing Conservation Efforts to Save Species and Enhance Food Production. *BioScience* 539-545.

Duarte, H., Tejedó, M., Katzenberger, M., Baldo, D., Beltrán, J. F., Martí, D. A., Richter-Boix, A., Gonzalez-Voyer, A. 2011. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology* 18: 412-421.

Elith, J. & Leathwick, J. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 677–697.

Engler, R., Guisan, A., Rechsteiner, L. 2004. An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *Journal of Applied Ecology* 41: 263–274.

Faleiro, F. A. M. V., Machado, R. B., Loyola, R. D. 2013. Defining spatial conservation priorities in the face of land-use and climate change. *Biological Conservation* 158: 248–257.

Fjeldså, J., Bowie, R. C. K., Rahbek, C. 2012. The role of mountain ranges in the diversification of birds. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 43: 249–265.

Forlani, M. C., Bernardo, P. H., Haddad, C. B. F., Zaher, H. 2010. Herpetofauna of the Carlos Botelho State Park, São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 10(3): 265-309.

Freitas, M. A., Silva, T. F. S., Fonseca, P. M., Abreu, R. O. 2007. Geographic distribution: *Cycloramphus migueli*. *Herpetological Review* 38: 474.

Frost, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Aug 3, 2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Giam, X., Scheffers, B. R., Sodhi, N. S., Wilcove, D. S., Ceballos, G., Ehrlich, P. R. 2012. Reservoirs of richness: least disturbed tropical forests are centres of undescribed species diversity. *Proceedings of the Royal Society B* 279: 67–76.

Giulietti, A. M., Pirani, J. R., Harley, R. M. 1997. Espinhaço range region. Pp. 397–404 *In* Centres of Plant Diversity. Davis, S.D., Heywood, V. H., Herrera–MacBride, O., Villa–Lobos, J., Hamilton, A. C. (Eds.). The Americas. WWF–IUCN, Washington.

Goloboff, P. 1999. NONA (No Name) ver. 2. Tucumán, Argentina.

Gründler, M. C., Toledo, L. F., Parra-Olea, G., Haddad, C. F. B., Giasson, L., Sawaya, R. J., Prado, C. P. A., Araújo, O. G. S., Zara, F. J., Centeno, F. C., Zamudio, K. R. 2012. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms* 97(3): 173-184.

Guedes, T. B., Sawaya, R. J., Nogueira, C. C. 2013. Biogeography, vicariance and conservation of snakes of the neglected and endangered Caatinga region, northeastern Brazil. *Journal of Biogeography* 12: 1–13.

Haddad, C. F. B., Toledo, L. F., Prado, C. P. A., Loebman, D., Gasparini, J. L., Sazima, I. 2013. *Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology*. Ed. Anolisbooks, São Paulo.

Heyer, W. R., Rand, A. S., Cruz, C. A. G., Peixoto, O. L., Nelson, C. E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31: 231-410.

Humphries, C. J., Vane-Wright, R. I., Williams, P. H. 1991. Biodiversity reserves: Setting new priorities for the conservation of wildlife. *Park* 2: 34–38.

IUCN, Conservation International, and NatureServe. 2008. *An Analysis of Amphibians on the 2008 IUCN Red List* <www.iucnredlist.org/amphibians>

IUCN. 2014. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2014.2. www.iucnredlist.org [accessed on 01 August 2014].

Juncá, F. A. & Nunes, I. 2008. A new species of marsupial frog of the genus *Gastrotheca* Fitzinger (Anura: Amphignatodontidae) from the state of Bahia, Northeastern Brazil. *Zootaxa* 1907: 61-68.

Kohler, T., & Maselli, D. 2009. *Mountains and Climate Change - From Understanding to Action*. Berne: Geogr. Bernesia

Kress, W. J., Heyer, W. R., Acevedo, P., Coddington, J., Cole, D., Erwin, T. L., Meggers, B. J., Pogue, M., Thorington, R. W., Vari, R. P., Weitzman, M., Weitzman, S. H. 1998. Amazonian biodiversity: assessing conservation priorities with taxonomic data. *Biodiversity and Conservation* 7: 1577–1587.

Kwet, A., Lingnau, R., Di-Bernardo, M. 2010. *Pró-Mata: Anfíbios da Serra Gaúcha, sul do Brasil - Amphibien der Serra Gaúcha, Südbrasilien - Amphibians of the Serra Gaúcha, South of Brazil*. 2. ed. Tübingen: Brasilien Zentrum der Universität Tübingen, 148 p.

Nelson, G. J. & Platnick, N. I. 1981. *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. New York: Columbia University Press.

Lawler, J. J. & White, D. 2008. Assessing the mechanisms behind successful surrogates for biodiversity in conservation planning. *Animal Conservation* 11: 270–280.

Leite, F. S. F. 2012. Taxonomia, biogeografia e conservação dos anfíbios da Serra do Espinhaço. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da vida Silvestre da Universidade Federal de Minas Gerais. 123 p.

Leite, F. S. F., Juncá, F. A., Eterovick, P. C. 2008. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4: 158–176.

Leite, F. S. F., Pezzuti, T. L., Garcia, P. C. A. 2012. A new species fo the *Bokermanohyla pseudopseudis* group from the Espinhaço Range, central Bahia, Brazil (Anura: Hylidae). *Herpetologica* 68: 401–409.

Lemes P. L., Faleiro F. A. M. V., Tessarolo G., Loyola, R. D. 2011. Refinando dados espaciais para a conservação da biodiversidade. *Natureza e Conservação* 9(2): 240–243.

Lemes, P. & Loyola, R. D. 2013. Accommodating Species Climate-Forced Dispersal and Uncertainties in Spatial Conservation Planning. *Plos One* 8: e54323.

Li, W. J., Wang, Z. J., Ma, Z. J., Tang, H. X. 1999. Designing the core zone in a biosphere reserve based on suitable habitats: Yanchang Biosphere Reserve and the red-crowned crane (*Grus japonensis*). *Biological Conservation* 90: 167-173.

Loucks, C., Ricketts, T. H., Naidoo, R., Lamoreux, J. Hoekstra, J. 2008. Explaining the global pattern of protected area coverage: relative importance of vertebrate biodiversity, human activities and agricultural suitability. *Journal of Biogeography* 35: 1337–1348.

Lourenço-de-Moraes, R., Ferreira, R. B., Fouquet, A., Bastos, R. P. 2014. A new diminutive frog species of *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Zootaxa* 3846:348–360.

Loyola, R. D., Lemes, P., Brum, F. T., Provete, D. B., Duarte, L. D. S. 2014. Clade-specific consequences of climate change to amphibians in Atlantic Forest protected areas. *Ecography* 37: 65-72.

Magalhães, F. M., Laranjeiras, D. O., Costa, T. B., Juncá, F. A., Mesquita, D. O., Röhr, D. L., Silva, W. P., Vieira, G. H. C., Garda, A. A. 2015. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga IV: Chapada Diamantina National Park, Bahia, Brazil. *Herpetology Notes* 8: 243–261.

Magalhães, F. M., Dantas, A. K. B. P., Brito, M. R., Medeiros, P. H. S., Oliveira, A. F., Pereira, T. C. S. O., Queiroz, M. H. C., Santana, D. J., São-Pedro, V. A., Silva, W. P., Garda, A. A. 2013. Anurans from an Atlantic Forest-Caatinga ecotone in Rio Grande do Norte State, Brazil. *Herpetology Notes* 6: 1–10

Mângia, S., Santana, D. J., Cruz, C. A. G., Feio, R. N. 2014. Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). *Boletim do Museu Nacional Nova Serie Zoologia* 531: 1–33.

Margules, C. R. & Pressey, R. L. 2000. Systematic conservation planning. *Nature* 405: 243–253.

Martinelli G. 2007. Mountain biodiversity in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 587-597.

Martins, I. A. & Zaher, H. 2013. A new species of the highland frog genus *Holoaden* (Amphibia, Strabomantidae) from cloud forests of southeastern Brazil. *Zootaxa* 3599: 178–188.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2007. Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Atualização— Portaria MMA No. 9, de 23 de janeiro de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, série Biodiversidade, Distrito Federal, Brasil.

Morrone, J. J. 1994. On the identification of areas of endemism. *Systematic Biology* 43: 438–441

Morrone, J. J. 2000. La importancia de los Atlas Biogeográficos para la conservación de la biodiversidad. Pp. 69-78 *In* Hacia um proyecto CYTED para el inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica em Iberoamérica. Martín-Piera, F., Morrone, J.J., and A. Melic. (eds.). PriBES 2000. m3m – monografias Tercer milenio, vol. 1. Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza, Espanha.

Moura, M. R., Motta, A. P., Fernandes, V. D., Feio, R. N. 2012. Herpetofauna da Serra do Brigadeiro, um remanescente de Mata Atlântica em Minas Gerais, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 12(1): 209-235.

Moura, G. J. B., Santos, E. M., Oliveira, M. A. B., Cabral, M. C. C. 2011. Herpetofauna de Pernambuco. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 444 p.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. 2000. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature* 403: 853-858.

Napoli, M. F., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G., Dias, I. R. 2011. A new species of flea-toad, genus *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2739: 33–40.

Napoli, M. F. & Pimenta, B. V. S. 2009. A new species of the *Bokermannohyla circumdata* Group (Anura: Hylidae) from the coastal forests of Bahia, northeastern Brazil. *Copeia* 2009:674-683.

Nixon, K. C. 2002. WinClada version 1.0. Published by the author. Ithaca, NY, USA.

Nogueira, C., Ribeiro S., Costa, G. C., Colli, G. R. 2011. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot: distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. *Journal of Biogeography* 38: 1907–1922.

Pimm, S. T. & Brooks, T. M. 1997. The sixth extinction: how large, how soon, and where? Pp. 46–62. *In Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World*. P.H. Raven (Ed.). National Academy Press, Washington.

Platnick, N. I. 1991. On areas of endemism. *Australian Systematic Botany* 4: 1–11.

Platnick, N. I. 1992. Patterns of biodiversity. Systematics, ecology and the biodiversity crisis. *In Eldredge, N. (Ed.)*. New York: Columbia University Press.

Pressey, R. L. 2004. Conservation planning and biodiversity: Assembling the best data for the job. *Conservation Biology* 18: 1677–1681.

Pressey, R. L., Johnson, I. R., Wilson, P. D. 1994. Shades of irreplaceability: Towards a measure of the contribution of sites to a reservation goal. *Biodiversity and Conservation* 3: 242–262.

Prevedello, J. A. & Carvalho, C. J. B. 2006. Conservação do Cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. *Natureza e Conservação* 4: 39-57.

Recoder, R. S., Teixeira, M., Cassimiro, J., Camacho, A., Rodrigues, M. T. 2010. A new species of *Dendrophryniscus* (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2642: 36–44.

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.

Rödder, D., Kielgast, J., Bielby, J., Bosch, J., Garner, T. J. W., Schmidlein, S., Veith, M., Walker, S., Fisher, M. C., Lötters, S. 2009. Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity* 1: 52-66.

Rödder, D., Teixeira, R. L., Ferreira, R. B., Dantas, R. B., Pertel, W., Guarneire, G. J. 2007. Anuran hotspots: the municipality of Santa Teresa, Espírito Santo, southeastern Brazil. *Salamandra* 43(2): 91-110.

Rodrigues, A. S. L., Akcakaya, H. R., Andelman, S. J., Bakarr, M. I., Boitani, L., Brooks, T. M., Chanson, J. S., Fishpool, L. D. C., Fonseca, G. A. B., Gaston, K. J., Hoffmann, M., Marquet, P. A., Pilgrim, J. D., Pressey, R. L., Schipper, J., Sechrest, W., Stuart, S. N., Underhill, L. G., Waller, R. W., Watts, M. E. J., Yan, X. 2004.

Global gap analysis: Priority regions for expanding the global protected-area network. *BioScience* 54: 1092–1100.

Rondinini, C., Di Marco, M., Chiozza, F., Santulli, G., Baisero, D., Visconti, P., Hoffman, M., Schipper, J., Stuart, S. N., Tongnelli, M. F., Amori, G., Falcucci, A., Maiorano, L., Boitani, L. 2011. Global habitat suitability models of terrestrial mammals. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 366(1578): 2633–2641.

Rosen, B. R. 1988. From fossils to the earth history: applied historical biogeography. *In Analytical biogeography: an integrated approach to the study of animal and plants distribution*. Myers, A., & Giller, P. (Eds.). London: Chapman & Hall.

Rossa-Feres, D. C., Sawaya, R. J., Faivovich, J., Giovanelli, J. G. R., Brasileiro, C. A., Schiesari, L., Alexandrino, J., Haddad, C. F. B. 2011. Anfíbios do Estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. *Biota Neotropica* 11(1a): 1-19.

Safi, K., Cianciaruso, M. V., Loyola, R. D., Brito, D., Armour-Marshall, K., Diniz-Filho, A. F. 2011. Understanding global patterns of mammalian functional and phylogenetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 2536-2544.

Sigrist, M. S. & Carvalho, C. J. B. 2008. Detection of areas of endemism on two spatial scales using Parsimony Analysis of Endemicity (PAE): the Neotropical region and the Atlantic Forest. *Biota Neotropica* 8:033-042.

Silva, J. M. C., Rylands, A. B., Fonseca, G. A. B. 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology* 19: 689-694.

Silva, J. M. C. & Casteleti, C. H. M. 2005. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. Pp. 43–59. *In Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. Galindo-Leal, C. and I.G. Câmara (Eds.). Fundação SOS Mata Atlântica e Conservação Internacional, Brazil.

Silva, J. M. C., Souza, M. C., Castelletti, & C. H. M. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography* 13: 85-92.

Silva, M. B. 2008. Biogeografia de Opiliões Gonyleptidae na Mata Atlântica, com Revisão Sistemática de Hernandariinae (Arachnida, Opiliones). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brazil.

SOS Mata Atlântica. 2008. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica. Disponível em <http://www.sosmatatlantica.org.br> (acessado em 15 julho 2014).

- Stattersfield, A. J., Crosby, M. J., Long, A. J., Wege, D.C. 1998. Endemic Bird Areas of the World. Cambridge (UK): BirdLife International.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783–1786.
- Szumik, C., Cuezco, F., Goloboff, P., Chalup, A. 2002. An optimality criterion to determine areas of endemism. *Systematic Biology* 51(5): 806-816.
- Teixeira, M., Recoder, R. S., Amaro, R. C., Damasceno, R. P., Cassimiro, J., Rodrigues, M. T. 2013. A new *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura: Leptodactylidae: Paratelmatobiinae) from the highlands of the Atlantic Forests of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 3702: 459–472.
- Trindade-Filho, J., Carvalho, R. A., Brito, D., Loyola, R. D. 2012. How does the inclusion of Data Deficient species change conservation priorities for amphibians in the Atlantic Forest? *Biodiversity and Conservation* 21: 2709-2718.
- Urbina-Cardona, J. N. 2008. Conservation of Neotropical herpetofauna: research trends and challenges. *Tropical Conservation Science* 1: 359–375.
- Valeriano, M. M., Rossetti, D. F., Albuquerque, P. C. G., Diehl, J. B., Ferreira. 2008. TOPODATA: Bando de Dados Geomorfométricos do Brasil. Disponível em: <http://www.dsr.inpe.br/topodata/> (Acessado em 18 de julho de 2014).
- Vasconcelos, T. S., Santos, T. G., Haddad, C. F. B., Rossa-Feres, D. C. 2010. Climatic variables and altitude as predictors of anuran species richness and number of reproductive modes in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 26: 423-432.
- Veloso, H. P. 1992. Sistema fitogeográfico. In Manual técnico da vegetação brasileira. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, p. 9-38
- Verdade, V.K., Valdujo, P.H., Carnaval, A.C., Schiesari, L., Toledo, L.F., Mott, T., Andrade, G.V., Eterovick, P.C., Menin, M., Pimenta, B.V.S., Nogueira, C., Lisboa, C.S., Paula, C.D., and D.L. Silvano. 2012. A leap further: the Brazilian amphibian conservation action plan. *Alytes* 29:27–42.
- Xavier, A. L., Guedes, T. B., Napoli, M. F. 2015. Biogeography of Anurans from the Poorly Known and Threatened Coastal Sandplains of Eastern Brazil. *PLoS ONE* 10(6): e0128268
- Wake, D.B. and V.T. Vredenburg. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:11466-11473.

Whittaker R.J., Araújo M.B., Jepson P., Ladle R.J, Watson J.E.M., and K.J. Willis. 2005. Conservation Biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions* 11:3–23

Young, B.E., Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., and T.M. Boucher. 2004. *Disappearing Jewels: The status of New World amphibians*. Nature Serve, Arlington, Virginia.

Considerações Finais

- Através da amostragem de nove áreas de altitude da Mata Atlântica da Bahia, locais geralmente pouco explorados cientificamente no estado e que abrigam uma diversidade única e rica de espécies, foram encontradas 94 espécies de anfíbios (~ 50% dos anfíbios do estado), preenchendo uma lacuna de informação sobre quais espécies utilizam esses ambientes e ampliando significativamente os dados de distribuição geográfica desse grupo taxonômico na região.
- Utilizando uma abordagem integrativa (morfologia, bioacústica e análises moleculares) foi descoberto um grande número de espécies não descritas dessa região. Foram elencadas 16 espécies candidatas, um acréscimo de aproximadamente 10% para a riqueza do estado. Algumas delas, provavelmente, restritas às Florestas Montanas da Bahia.
- Os padrões de estruturação genética de uma espécie endêmica (*Pristimantis vinhai*) da Mata Atlântica da Bahia foram estudados, utilizando quatro marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, através do sequenciamento de 85 indivíduos de 20 localidades diferentes. Os resultados apontaram para a existência de sete linhagens divergentes ocorrendo na região, com alta distância genética entre elas, chegando a 6.6% para a região 16S e 12.8% para a região do ND2.
- A paleomodelagem de *Pristimantis vinhai* estimou as áreas de altitude da região como possíveis refúgios climáticos e indicou uma possível fragmentação da distribuição geográfica dessa espécie durante os períodos interglaciais. Os refúgios foram validados quanto à alta diversidade genética encontrada nesses locais, comparado com as áreas instáveis. A análise de variação do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo, indicou um declínio populacional acentuado durante o último interglacial (120 k). Nenhum outro estudo da América do Sul resgatou uma história semelhante embora esse seja o padrão esperado para espécies típicas de climas mais frios ou de montanhas. As diversificações iniciais para essa espécie foram estimadas para o final do Mioceno. Nosso estudo indica que a história evolutiva dessa espécie foi moldada, tanto através das oscilações climáticas do Pleistoceno, como também eventos mais antigos que aconteceram durante o Mioceno.
- Fornecemos um panorama dos estudos com anfíbios em áreas de altitude do Brasil. A maioria dos estudos está voltada para Taxonomia e Sistemática e foram conduzidos principalmente ao longo da Serra do Espinhaço, da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira regiões próximas dos principais centros de pesquisa do país.
- Utilizando os mapas de extensão de ocorrência dos anfíbios da Mata Atlântica, realizamos uma priorização de áreas importantes para a conservação das espécies em áreas de altitude do bioma. Foram apontadas 19 áreas prioritárias para esse grupo taxonômico, utilizando uma abordagem que levou em

consideração a presença de áreas de endemismos, riqueza de espécies e presença de espécies ameaçadas e raras. Embora a maioria desses mapas estejam desatualizados e existam limitações na estimativa da distribuição geográfica das espécies, os resultados alcançados são congruentes com a priorização de regiões reconhecidamente importantes para esse grupo taxonômico. Contudo, apenas duas áreas foram apontadas como prioritárias no nordeste do Brasil. Provavelmente isso é um viés do banco de dados, já que historicamente essa região é menos estudada e existia pouca informação, principalmente sobre os padrões de distribuição geográfica dos anfíbios dessa região, quando os mapas de extensão geográfica foram criados em 2008. Dessa forma, em uma análise posterior com um novo banco de dados atualizado, é possível que resultados semelhantes sejam obtidos para as áreas de altitude da Mata Atlântica do sudeste do país, porém novas áreas prioritárias devem ser apontadas no Nordeste do Brasil.

- O conjunto de dados gerados durante a execução desse trabalho preenche uma grande lacuna sobre a diversidade e os padrões de distribuição geográfica dos anfíbios na Bahia, sendo estas, informações essenciais para a tomada de decisão em ações conservacionistas. Reforçamos a necessidade da ampliação da rede de unidades de conservação do país, sobretudo na Bahia, incorporando ainda mais áreas de altitude, principalmente em um contexto onde esses locais foram estimados como futuros refúgios climáticos em um cenário de aquecimento global. Além disso, recursos financeiros e humanos devem ser investidos, sobretudo pelo governo federal e estadual, para que as unidades de conservação já instauradas no país, alcancem seus objetivos e protejam essas áreas de forma efetiva, de modo a não figurar apenas como uma poligonal, com baixa eficiência, naquilo que se propõe.