

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE**

EUVALDO MARCIANO SANTOS SILVA JÚNIOR

**ANUROS DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA: RETRATO
RELEVANTE DA HILÉIA BAIANA QUANTO AOS ASPECTOS
FILOGEOGRÁFICOS, DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA,
DEMOGRAFIA HISTÓRICA E DESCOBERTA DE NOVAS ESPÉCIES**

**ILHÉUS – BAHIA
2016**

EUVALDO MARCIANO SANTOS SILVA JÚNIOR

**ANUROS DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA: RETRATO
RELEVANTE DA HILÉIA BAIANA QUANTO AOS ASPECTOS
FILOGEOGRÁFICOS, DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA,
DEMOGRAFIA HISTÓRICA E DESCOBERTA DE NOVAS ESPÉCIES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Estadual de Santa Cruz, para obtenção do Título de Doutor em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Dr. Mirco Solé

**ILHÉUS -BAHIA
2016**

S586 Silva Júnior, Euvaldo Marciano Santos.
Anuros da Mata Atlântica do sul da Bahia: retrato relevante da hileia baiana quanto aos aspectos filogeográficos, diversidade e estrutura genética, demografia histórica e descoberta de novas espécies / Euvaldo Marciano Santos Silva Júnior. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.
78 f. : il.

Orientador: Mirco Solé.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.
Inclui referências e apêndice.

1. Anfíbio. 2. Anuro. 3. Anuro – Filogenia. 4. Mata Atlântica. 5. Anuro – Classificação. I. Título.

CDD 597.8

EUVALDO MARCIANO SANTOS SILVA JÚNIOR

**ANUROS DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA: RETRATO
RELEVANTE DA HILÉIA BAIANA QUANTO AOS ASPECTOS
FILOGEOGRÁFICOS, DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA,
DEMOGRAFIA HISTÓRICA E DESCOBERTA DE NOVAS ESPÉCIES**

Ilhéus, 20/04/2016

Dr. Mirco Solé

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Dra. Adriane Barth

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso – IFMT

Dr. Antônio Freire de Carvalho Filho

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Dra. Lídia Nogueira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA

Dra. Michely Diniz

Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por ter permitido que eu encontrasse nessa vida apenas pessoas especiais, que de alguma forma contribuíram com meu desenvolvimento como pessoa. OK, esse trecho é o mesmo que escrevi em minha dissertação de mestrado, mas é que, felizmente, de lá pra cá nada mudou!

Assim, meu obrigado mais que especial aos meus pais, Euvaldo Marciano e Miriam Bandeira pelo apoio incondicional e motivação constante, pela base durante toda minha vida, por terem me dado todo o suporte sempre que precisei, por me darem o conforto de um lar completo de coisas que realmente tem valor: amor, paz, amizade, confiança, ética e todo tipo de princípio moral que todo homem de bem deve dispor.

Às minhas irmãs, Geysa e Fabrícia por fazerem parte de minha vida, acrescentando somente coisas boas e pela torcida fervorosa pelo meu sucesso pessoal e profissional, pelos puxões de orelha e chamadas para a realidade quando eu ameaçava sair dos eixos!

À toda minha família que também sempre está presente em cada conquista.

À minha namorada, amiga, mãe dos meus futuros 15 filhos, Amanda Santiago por estar sempre ao meu lado, me apoiando em tudo que faço, dividindo comigo as melhores sensações da vida, as coisas mais simples, a vida além do comercial de margarina, as coisas mais complexas, a simples convivência diária, as viagens, as músicas, as poesias, as inspirações, meu presente e meu futuro.

Ao professor Mirco Solé por ter me apresentado a esse mundo fascinante dos anfíbios, por ter sempre confiado em meu trabalho, por ter aceitado e viabilizado a proposta deste estudo.

Aos colegas do laboratório Iuri, Débora, Iara, Caio, Danilo, Chico, Tadeu, Martin, Andrés, Victor, Carla (balinha) pela parceria em vários trabalhos de campo, ajuda em laboratório, discussões de ideias ou mesmo pelos momentos de conversa fiada de boteco.

À professora Michely Diniz por me receber em seu laboratório e dedicar parte de seu tempo corrido para me ajudar nas etapas laboratoriais de otimização de protocolo, pelas vibrações positivas na hora do suspense de conferir os géis e por mostrar os caminhos alternativos para contornar os problemas que apareciam. Por esses mesmos motivos agradeço ainda a minha aluna e amiga Monique Araújo, que com toda a correria de sua vida acadêmica em curso, dedicou bastante tempo, inclusive algumas noites e madrugada em laboratório, para que eu conseguisse ter dados para esse trabalho.

Aos meus alunos, ex-alunos da UNIVASF por terem me permitido trabalhar essa outra possibilidade da minha profissão, que é o ensino. Por terem construído comigo meu perfil de professor, por terem aceitado várias vezes ser cobaias das minhas experiências nessa área e, por incrível que pareça, terem gostado. Por terem me ensinado que ensinar é uma troca mútua entre aluno e professor.

Aos meus amigos de sempre, fiéis escudeiros, com os quais sempre pude compartilhar os momentos mais felizes da minha vida (Marlla, Felis, Felipe, Juliana, Pit), mesmo estando alguns distantes (Woly, Érika, Jana, Maria), outros bem distantes mesmo (Chu), mas a amizade não muda, ou só muda pra muda pra melhor!

À Dra. Maria Iracilda Sampaio, pelo apoio a essa proposta e por disponibilizar a equipe e estrutura de seu laboratório na UFPA para o sequenciamento das amostras. À Lídia Nogueira e Lucina Watanabe por também dedicarem parte de seus tempos corridos para se dedicar ao sequenciamento de minhas amostras.

Aos professores Dr. Marco Antônio Costa (UESC), Dr. Marcelo Napoli (UFBA) e Dr. Henrique Batalha (UFBA) por também terem disponibilizado seu tempo e laboratório sempre que precisei. A Camila Trevisan por também ter contribuído na obtenção dos dados moleculares.

Aos gestores das Unidades de Conservação (Parque Nacional do Descobrimento, Reserva Biológica de Uma e Refúgio da Vida Silvestre Rio dos Frades) e RPPNs pelo apoio ao trabalho nessas áreas, principalmente Tiago Leão e Enoc Reis pela disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, à Capes e FAPESB pelo apoio à minha formação e bolsas de estudo. À Fundação Grupo Boticário de Conservação da Natureza pelo apoio financeiro à parte desse estudo.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	8
CAPÍTULO I.....	10
Filogeografia de duas espécies simpátricas de anuros restritas ao Sul da Bahia: diversidade genética, estrutura populacional e demografia histórica.....	11
Resumo.....	11
Introdução.....	11
Métodos.....	13
Sistema de Estudo.....	13
Coleta de Dados e Marcadores Moleculares.....	14
Análises das sequências.....	15
Resultados.....	16
Scinax juncae.....	16
Filogenia intraespecífica e divergência genética.....	16
Rede de Haplótipos.....	19
Demografia Histórica.....	19
Árvore de Espécies e de Gene.....	20
Pristimantis sp.....	22
Filogenia intraespecífica e divergência genética.....	22
Rede de Haplótipos.....	25
Demografia Histórica.....	26
Árvore de Espécies e de Genes.....	26
Discussão.....	28
Filogenia intraespecífica.....	28
Estatísticas sumárias.....	29
Divergência genética.....	30
Redes de Haplótipos.....	31
Estimativas do tempo de divergência: Árvore de espécies vs. Árvore de gene.....	32
Considerações Finais.....	32
Referências.....	33
CAPÍTULO II.....	40

Another new species of <i>Phyllodytes</i> (Anura: Hylidae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil	41
Abstract	41
Introduction	41
Material and Methods.....	42
Results	43
Discussion.....	45
Acknowledgements.....	46
References.....	46
Appendix	49
CAPÍTULO III	52
A new species of <i>Phyllodytes</i> Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest of southern Bahia, Brazil	53
Abstract	53
Introduction	53
Material and Methods.....	54
Results	55
Acknowledgements.....	57
References.....	58
CAPÍTULO IV	64
Nova espécie críptica de <i>Pristimantis</i> (Anura, Craugastoridae) é revelada no sul da Bahia. . 65	65
Resumo.....	65
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	66
Resultados	67
Discussão.....	73
Agradecimentos	74
Referências.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO GERAL

A região sul da Bahia apresenta peculiaridades quanto aos recursos bióticos que possui, uma vez que reúne a maior porção de remanescentes de Floresta Atlântica nativa do Nordeste (Faria *et al.* 2006) e notável diversidade e endemismos de espécies (Haffer 1974; Jackson 1978; Mori *et al.* 1981; Brown 1991). A região é conhecida por apresentar uma das maiores diversidades de espécies arbóreas do mundo (Thomas *et al.* 1998) e por representar um centro de origem e diversificação para diversos elementos da fauna e flora (Coimbra-Filho & Câmara 1996; Thomas & Carvalho 1997; Silva & Casteleti 2003). Ela integra um dos principais *hotspots* mundiais para conservação da biodiversidade – a Floresta Atlântica (Myers *et al.* 2000, Mittermeier *et al.* 2004) – em vista do histórico crítico de devastação de sua cobertura vegetal original (Tabarelli *et al.* 2005). Esta região foi classificada como de extrema importância biológica para diversos táxons, incluindo anfíbios (MMA 2007). No entanto, ainda há muitas espécies de anuros listadas como “deficiente de dados” associadas à mesma (IUCN 2016), ressaltando a urgência em aprofundarmos o conhecimento acerca dessas espécies a fim de incluí-las em planos de conservação adequados.

Estudos de modelagem de distribuição de espécies realizados com anuros da Mata Atlântica levantaram a hipótese de que esta região representou um refúgio para espécies durante o último evento de glaciação ocorrido no Pleistoceno, quando houve retração e subsequente expansão das florestas e, atribuem a esta hipótese a alta diversidade genética apresentada por espécies nessa região (Carnaval & Moritz 2008; Carnaval *et al.* 2009). Não obstante, é esperado que populações de áreas recentemente colonizadas apresentem menor variabilidade genética em relação àquelas vivendo em “refúgios”, exibindo tamanhos populacionais efetivos reduzidos, como consequência do gargalo populacional da colonização – efeito fundador (Crottini *et al.* 2007). Fica claro, portanto, que a contração e expansão da área de distribuição das espécies deixam traços no *pool* genético das populações atuais que podem ser úteis para reconstruir suas histórias evolutivas (Avice 2000). Nesse sentido, Hauswaldt *et al.* (2011) destaca que a associação entre tais fatores biogeográficos históricos e aspectos ecológicos e comportamentais das linhagens evolutivas afeta o padrão genético de suas populações, de modo que a tentativa de compreender os padrões de distribuição atual das espécies deveria considerar tal integração.

A reunião dessas informações para traçar a história genealógica das espécies deu origem a uma nova área do conhecimento denominada Filogeografia (Avice *et al.* 1987), que utiliza o conhecimento de áreas como ecologia de populações, biogeografia e genética de populações (Avice *et al.* 1987). Suas ferramentas vêm sendo amplamente utilizadas na atualidade com a finalidade de explorar o histórico passado das espécies e compreender os processos que governaram as distribuições geográficas das linhagens genealógicas atuais (Vences & Wake 2007; Zeisset & Beebe 2008; Zhang *et al.* 2008). Desde o seu advento, os anfíbios têm servido como grupo ideal de organismos como objeto de estudo, mostrando forte estrutura geográfica de divergência genealógica (Avice 2000), que pode ser atribuída, entre outras características, à sua fraca capacidade de dispersão (Zeisset & Beebe 2008).

Apesar dos altos níveis de diversidade de espécies de anfíbios observados no Brasil e, especialmente, na região sul da Bahia, como pode-se constatar através das recorrentes publicações de descrições de novas espécies para esta região (Napoli *et al.* 2011; Teixeira-Jr *et al.* 2012; Caramaschi *et al.* 2013; Pontes *et al.* 2014), muito pouco se sabe sobre padrões filogeográficos e estrutura genética de suas populações, bem como dos anfíbios na América do Sul de modo geral (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). O acesso a essas informações poderia contribuir de forma mais objetiva nas avaliações de prioridades de conservação de anfíbios em áreas tropicais, uma vez que seus resultados, considerando avaliações de distribuição geográfica da diversidade genética, podem divergir fortemente daqueles relacionados tão somente à distribuição geográfica das espécies atualmente reconhecidas (Fouquet *et al.* 2007).

Num cenário global de declínio de populações em taxas aceleradas, Stuart e colaboradores (2004) ressaltaram que este fenômeno é particularmente preocupante para as espécies neotropicais, dado que muitas espécies ainda permanecem não detectadas. Esse é o caso dos anfíbios, cujo grau de ameaça global chega a 1/3 das espécies (Stuart *et al.* 2004) e onde tem-se observado acentuada diversidade críptica subamostrada, principalmente na região tropical (Wynn & Heyer 2001; Fouquet *et al.* 2007; Gehara *et al.* 2014; Fouquet *et al.* 2016).

O cenário exposto acima nos motivou a desenvolver o presente estudo com duas espécies de anfíbios anuros endêmicos da Floresta Atlântica, primeiramente com os objetivos de caracterizar a diversidade genética dessas espécies no Sul da Bahia, bem como realizar uma abordagem filogeográfica para tentar compreender como eventos históricos moldaram os perfis genéticos das linhagens atuais (Capítulo I). Para isso, foram avaliadas duas espécies de anuros com ocorrência restrita a essa região e com requerimentos ecológicos distintos. Dessa forma, elegemos duas espécies com modos reprodutivos diferentes e habitantes de sítios distintos, quais sejam, uma espécie de perereca (*Scinax juncae*) com modo reprodutivo do tipo 01 *sensu* Duellman & Trueb (1986), associada a áreas abertas ou bordas de mata onde utiliza ambientes lênticos para a reprodução e uma espécie de perereca (*Phyllodytes tuberculosus*) com modo reprodutivo do tipo 06 (*sensu* Duellman & Trueb 1986), associada a ambientes florestados onde utiliza reservatórios de água de bromélias como sítios reprodutivos.

Iniciados os estudos, percebemos que não poderíamos concluir o trabalho com *Phyllodytes tuberculosus* devido à insuficiência de amostras. Apesar de termos coletado quantidade razoável de indivíduos de diferentes populações previamente atribuídas a esta espécie, constatamos nas primeiras investigações genéticas que tais indivíduos pertenciam a entidades taxonômicas distintas e que, por problemas taxonômicos associados à determinação desta espécie, impediram a continuação da pesquisa com esses espécimes. Por outro lado, tivemos a oportunidade de coletar indivíduos de duas espécies ainda desconhecidas para a ciência, sendo uma delas erroneamente atribuída à *Phyllodytes tuberculosus*. Ambas as espécies foram descritas por nós e compõem os capítulos II e III desta tese.

Para compensar a retirada de *Phyllodytes tuberculosus*, incluímos outra espécie de anuro, agora do gênero *Pristimantis*. A espécie também era até então desconhecida pela ciência e foi descoberta por nós durante as expedições de campo. *Pristimantis* sp. é um membro de um grande grupo de anuros do Novo Mundo, conhecidos informalmente como Terrarana e, como todas as espécies desse grupo, apresenta desenvolvimento direto, sem fase de girino. A descrição dessa espécie e comentários gerais sobre seus aspectos ecológicos compõem o capítulo IV desta tese.

MANUSCRITO PARA APRECIACÃO

CAPÍTULO I

Este capítulo apresenta o manuscrito intitulado “**Filogeografia de duas espécies simpátricas de anuros endêmicas do Sul da Bahia: diversidade genética, estrutura populacional e demografia histórica**” que se destina a submissão para publicação no periódico científico internacional **Molecular Ecology**, classificado como **A1** pelo sistema Qualis da Capes. Os resultados aqui discutidos, assim como a discussão e conclusões derivadas, decorrem do desenvolvimento da presente tese. Os critérios de redação e formatação seguem as normas deste periódico.

Filogeografia de duas espécies simpátricas de anuros restritas ao Sul da Bahia: diversidade genética, estrutura populacional e demografia histórica

EUVALDO MARCIANO-JR¹ & MIRCO SOLÉ²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil. E-mail: euvaldo.marciano@gmail.com.

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil.

Resumo

Nós avaliamos os perfis genéticos de duas espécies de anfíbios anuros endêmicos da Floresta Atlântica, a fim de caracterizar seus padrões filogeográficos e entender como as populações dessas espécies responderam historicamente às modificações climáticas e geográficas nessa região. Nós observamos que as respostas de cada espécie aos eventos climáticos/geológicos foram influenciadas principalmente por suas características particulares, mais do que uma função da distribuição espacial comum. Nesse sentido, *Scinax juncae* apresentou estruturação genética menos acentuada do que *Pristimantis* sp., o que pode ser associado aos seus requerimentos ecológicos distintos. Enquanto a primeira é uma espécie típica de áreas abertas e/ou bordas de mata, tolerantes a ambientes antropizados, a última é dependente de ambientes florestados. Historicamente, populações dessas espécies passaram por declínios populacionais seguidos por recuperação quantitativa, provavelmente em função de perda de hábitat adequado durante eventos glaciais que ocorreram nessa região desde o fim do Mioceno até o presente. A estruturação genética observada em ambos os casos no presente estudo alerta para a situação crítica de algumas populações cujos parâmetros de diversidade genética foram extremamente baixos e relacionados a conjuntos haplotípicos, na maioria dos casos, exclusivos. Dessa forma, nós recomendamos fortemente que tais grupos populacionais sejam coerentemente contemplados pelas políticas públicas ambientais federais e estaduais, a fim de garantir a viabilidade dessas populações a curto e longo prazo.

Introdução

A filogeografia vem sendo amplamente utilizada na atualidade com a finalidade de explorar o histórico passado das espécies e compreender os processos que governam as distribuições geográficas das linhagens genealógicas atuais (Vences & Wake 2007; Zeisset & Beebe 2008; Zhang *et al.* 2008). Apesar de estudos filogeográficos direcionarem atenção para eventos históricos que moldaram os perfis genéticos dos grupos taxonômicos recentes, através da investigação do comportamento dos genes sob diferentes processos estocásticos, é de sumária importância a aquisição dessas informações para mapear a sensibilidade dessas espécies aos cenários de mudanças

ambientais atuais (Collevatti *et al.* 2013). Essas informações podem servir de parâmetro para o estabelecimento de políticas de conservação mais efetivas baseadas nas especificidades de cada grupo (Galetti *et al.* 2008; Chen *et al.* 2012).

Existe um corpo crescente de evidências que apontam a influência das glaciações pleistocênicas sobre a formação dos padrões genéticos observados nos grupos recentes (Avice *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2008). Desde o desenvolvimento da Filogeografia como área de conhecimento, o número de trabalhos publicados utilizando seus métodos cresce exponencialmente a cada ano (Avice 2008). Contudo, há um importante viés dessas publicações quanto aos táxons estudados e as regiões geográficas que eles ocupam (ver Beheregarey 2008; Turchetto-Zolet *et al.* 2013). Na maioria dos casos estes estudos são realizados no Hemisfério Norte (Europa e América do Norte) com vertebrados (Hewitt 2000; Milot *et al.* 2000; Alexandrino *et al.* 2002; Hoffman & Blouin 2004). Dessa maneira, algumas generalizações propostas para os padrões filogeográficos que podem ser apresentados pelas espécies são principalmente aplicáveis às espécies de zonas climáticas temperadas (Avice *et al.* 1987).

No Brasil, estudos abordando aspectos filogeográficos de espécies da fauna vêm se tornando frequentes (ver Turchetto-Zolet *et al.* 2013), porém, as generalizações mais comuns sobre os padrões recuperados são, principalmente, associados aos táxons amazônicos, como é o caso dos padrões de estruturação genética relacionados à presença de rios como barreiras à dispersão (Eizirik *et al.* 2001; Valinotto *et al.* 2006; Kaefer *et al.* 2012; Ribas *et al.* 2012; Simões *et al.* 2014). Com relação à Floresta Atlântica brasileira, os estudos são ainda mais incipientes, de modo que qualquer generalização seria prematura, diante da aparente complexidade de padrões e processos de diversificação dentro desse bioma (Batalha-Filho *et al.* 2016). Por outro lado, é possível perceber que a história evolutiva de táxons endêmicos desse bioma parece ter seguido rotas distintas para formar os perfis atuais, isto é, nem sempre é possível detectar congruência entre os padrões observados para os táxons nesse bioma (Amaro *et al.* 2012; Batalha-Filho *et al.* 2010; Brunes *et al.* 2010; Cabanne *et al.* 2007, 2008, 2011; Carnaval *et al.* 2009; d'Horda *et al.* 2011; Fitzpatrick *et al.* 2009; Grazziotin *et al.* 2006; Maldonado-Coelho, 2012; Martins *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2010; Tonini *et al.* 2013).

Seguindo as ideias propostas por Haffer (1969) e Vanzolini & Williams (1970) sobre refúgios do pleistoceno e na tentativa de detectar tais padrões, Carnaval & Moritz (2008) propuseram um modelo que admitia a existência de refúgios florestais na Floresta Atlântica durante os episódios de glaciação do Pleistoceno. Com as mudanças climáticas que tornavam o clima mais frio e seco nas regiões tropicais, as florestas nessas regiões tendiam a contrair seus limites ao passo que vegetação do tipo savana tendia a aumentar e muitas vezes isolar regiões florestais antes contíguas (Behling 2002; Behling *et al.* 2004, 2005; Silva & Pinto-da-Rocha 2010). O inverso acontecia durante os períodos interglaciais. Táxons especializados em florestas deveriam seguir os movimentos florestais como forma de sobreviver às modificações climáticas. Assim, tais remanescentes teriam servido como refúgios durante os eventos glaciais do Pleistoceno.

Desde sua proposta em 2008, o modelo dos refúgios vem sendo frequentemente testado com diversos táxons endêmicos da Floresta Atlântica (Carnaval *et al.* 2009; Thomé *et al.* 2010; d’Horta *et al.* 2011; Batalha-Filho *et al.* 2012; Amaral *et al.* 2013). De acordo com esse modelo, populações que sobreviveram em áreas de refúgio dispersavam durante os períodos interglaciais para novas áreas, podendo aumentar suas populações. Assim, a contração e expansão da área de distribuição das espécies deixaram traços no *pool* genético das populações atuais, permitindo reconstruir suas histórias evolutivas (Avice 2000). Dessa forma, populações recentes e de áreas de não refúgio, deveriam apresentar sinal filogenético de expansão populacional e menores índices de diversidade genética, comparados com populações de áreas de refúgio. De fato, essa hipótese foi corroborada por meio de evidências empíricas para alguns táxons endêmicos da Floresta Atlântica, incluindo os anuros (Carnaval *et al.* 2009). Contudo, outros grupos taxonômicos claramente se desviaram desse padrão, mostrando populações estáveis e geneticamente diversificadas em áreas hipoteticamente de não refúgio (Grazziantin *et al.* 2006, Cabanne *et al.* 2007, Thomé *et al.* 2010, Amaro *et al.* 2012). Nota-se, portanto, que a associação entre fatores biogeográficos históricos e aspectos ecológicos e comportamentais das linhagens evolutivas afeta distintamente o padrão genético de suas populações (Hauswaldt *et al.* 2011, Austin & Zamudio 2008), de modo que a tentativa de compreender os padrões de distribuição atual das espécies deve considerar tal integração.

Num cenário global de declínio de populações silvestres em taxas aceleradas, Stuart *et al.* (2004) ressaltaram que este fenômeno é particularmente preocupante para as espécies neotropicais, dado que muitas espécies ainda permanecem não detectadas. Esse é o caso dos anfíbios, cujo grau de ameaça global chega a um terço das espécies (Stuart *et al.* 2004) e onde tem-se observado acentuada diversidade críptica subamostrada, principalmente na região tropical (Wynn & Heyer 2001; Fouquet *et al.* 2007; Gehara *et al.* 2014; Fouquet *et al.* 2016). Adicionalmente, os anfíbios são animais de baixa vagilidade e geralmente filopátricos, o que os tornam bons modelos para estudos filogeográficos (Newman & Squire 2001; Zeisset & Beebee 2008; Hauswaldt *et al.* 2011).

Isso posto, a proposta desse estudo foi realizar um estudo filogeográfico com duas espécies de anuros endêmicas do sul da Bahia, por meio da caracterização genética de suas populações, apresentando aspectos importantes de seus perfis evolutivos por meio de reconstrução de suas histórias demográficas no sul do estado e estimativa dos tempos de divergência entre as principais linhagens recuperadas em cada espécie. Nós hipotetizamos que pelo fato de compartilharem distribuição geográfica restrita – apenas no sul da Bahia – as espécies deveriam apresentar perfis filogeográficos similares, apesar dos requerimentos ecológicos distintos.

Métodos

Sistema de Estudo

A composição genética de populações de duas espécies de anuros com requerimentos ecológicos distintos e de ocorrência restrita ao Sul da Bahia (*Scinax juncae* e *Pristimantis* sp.) foi identificada a fim de mapear os padrões e níveis estruturais de

diversidade genética nessa região. Adicionalmente, foram conduzidas análises de demografia histórica a fim de entender como os perfis filogeográficos dessas espécies foram formados.

Scinax juncae é um hilídeo de pequeno porte associado a áreas abertas e/ou de borda da Floresta Atlântica, onde utiliza ambientes lênticos para a reprodução; foi recentemente descrito (Nunes & Pombal-Jr 2010) e ainda não apresenta classificação quanto ao seu status de conservação, tanto pela International Union for Conservation of Nature (IUCN) como pelas listas de espécies brasileiras.

Pristimantis sp. é uma espécie críptica de pequeno porte ainda não formalmente descrito e que foi descoberta por nós, durante as expedições de campo para coleta de dados para este trabalho. A espécie pertence ao grupo de espécies de *P. ramagii* (Marciano-Jr *et al.* in prep.) e é associada com ambientes florestados, onde reproduz por meio de desenvolvimento direto na serapilheira.

Coleta de Dados e Marcadores Moleculares

Indivíduos de populações distintas foram coletados ao longo de toda a distribuição geográfica conhecida de cada espécie. Ao todo foram amostrados 56 indivíduos de *Scinax juncae* provenientes de nove localidades e 57 indivíduos de *Pristimantis* sp. de 11 localidades.

Três marcadores moleculares de origens distintas, um mitocondrial e dois nucleares, foram utilizados. O gene mitocondrial codificador de proteína Citocromo Oxidase subunidade I (COI) foi utilizado para as duas espécies em associação com os genes nucleares, também codificadores de proteína, Tyrosinase (TYR), utilizado apenas para *S. juncae* e o gene Ativador da Recombinação-1 (RAG-1), utilizado apenas para *Pristimantis* sp.

Apenas o marcador mitocondrial foi o mesmo para as duas espécies, o que nos permite comparar a resposta das mesmas com relação a esse gene, sob influência dos diferentes eventos estocásticos. O não uso dos mesmos marcadores nucleares para as duas espécies não trás um problema para testar a hipótese desse trabalho, dado que a utilização desses marcadores representa apenas uma evidência adicional para suportar a história evolutiva da espécie e não do gene.

Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA

As amostras de DNA foram extraídas de tecido muscular dos indivíduos utilizando o kit comercial Wizard Genomic kit (PROMEGA). A amplificação das sequências foi realizada via PCR, seguindo as condições de Goebel *et al.* (1999) e Vences *et al.* (2003). Os produtos do PCR foram purificados e posteriormente utilizados na reação de sequenciamento usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems) no Laboratório de Genética da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Análises das sequências

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW implementado no programa MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Para nos certificar do correto alinhamento das mesmas, procedemos às suas traduções em aminoácidos para verificar a ocorrência de pseudogenes. Todas as sequências obtidas serão depositadas no GenBank quando os artigos tiverem sido aceitos. Para estimar o melhor modelo de mutação para todos os genes foi utilizado o Critério de Informação de Akaike (AIC, Akaike 1974) implementado no programa MrModeltest v. 2.2 (Nylander 2004).

Árvores filogenéticas foram estimadas com base nas sequências obtidas dos segmentos gênicos mitocondrial e nucleares, bem como para os dados concatenados, utilizando Máxima Verossimilhança (MV) implementada no programa RAxML-HPC Blackbox (Satamakis 2014) e Inferência Bayesiana (IB) por *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) no programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist *et al.* 2012). As análises foram realizadas em uma corrida de 100 milhões de gerações, amostrando uma árvore a cada 1.000 gerações, sendo que 20% destas árvores foram descartadas como *burn-in*, conforme sugerido pelas corridas independentes no Tracer v. 1.6 (Rambaut & Drummond 2009). As árvores foram enraizadas utilizando-se como grupos externos dados de sequências disponíveis no GenBank e considerando estudos filogenéticos previamente publicados para as duas espécies. Ambas as reconstruções foram realizadas no CIPRES Science Gateway (Miller *et al.* 2010).

Redes de haplótipos para os genes mitocondrial e nucleares foram construídas com o algoritmo Median-Joining no software NETWORK v. 5.0 (Fluxus-EngeneerinG). No caso dos genes nucleares, as fases gaméticas das sequências que se apresentaram em heterozigose foram reconstruídas com o algoritmo PHASE (Stephens *et al.* 2001) no programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas 2009). O padrão de variação genética foi avaliado com o programa DnaSP e com análise de variância molecular (AMOVA) realizada no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2005). Para detectar desvios significantes da hipótese nula de evolução neutra e tamanho populacional constante, foram realizados os testes D de Tajima (Tajima 1989) e Fs de Fu (Fu 1997) com valores de significância obtidos por meio de 1000 simulações coalescentes. Todos os testes e simulações foram conduzidos no DnaSP v. 5.0.

Com base nos resultados de estrutura populacional, foi realizada uma análise de árvore de espécies implementada no programa BEAST v1.6.2 (Drummond *et al.* 2012), utilizando as sequências mitocondrial e nucleares para todas as amostras. Cada linhagem foi definida de acordo com o agrupamento inferido pelas análises de Máxima Verossimilhança e atestadas pela AMOVA. Para calibrar a árvore de espécies foi utilizada uma taxa de substituição de 0,0015/sítio/M.a. para os genes nucleares RAG-1 e TYR, conforme estimado para a sequência do gene RAG-1 de anuros do grupo Terrarana (Heinicke *et al.* 2007). A taxa de substituição de 0,00345/sítio/M.a. foi utilizada para o gene mitocondrial COI, conforme estimado para esse mesmo gene por Macey *et al.* (1998) para sapos asiáticos. Foi especificado um relógio molecular relaxado com distribuição *log* normal não correlacionado. A corrida teve 100 milhões de gerações, amostrando a cada 10 mil gerações, das quais 10% foram descartadas como *burn-in*. Para confirmar os resultados, foram geradas duas análises independentes utilizando diferentes valores de gerações e amostragem de árvores. Os dados foram

checados no programa Tracer v. 1.6 (Rambaut & Drummond 2009), considerando a qualidade da corrida com base nos valores de ESS (Effective Sample Size) exibidos por cada parâmetro estimado ($ESS > 200$). A árvore de espécies foi gerada no programa Tree Annotator v. 1.8 e visualizada no programa FigTree v. 1.4.2.

Para obter estimativas históricas de flutuações no tamanho populacional, foram utilizados os métodos de reconstrução Bayesian Skyline Plot (BSP) para o gene mitocondrial sozinho ou Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) para a análise multilocus (mtDNA + nDNA). Apenas genes para os quais o número de amostras era superior a 10 indivíduos foram considerados nessas análises, desde que apresentassem indício de expansão populacional, conforme resultados dos testes de expansão (F_s de F_u). Nesses casos, as rodadas foram empregadas para o conjunto populacional inteiro e para os agrupamentos confirmados pela AMOVA.

Resultados

Scinax juncae

Filogenia intraespecífica e divergência genética

As análises foram conduzidas para um fragmento de 639 pares de base do gene COI obtidos de 45 indivíduos amostrados ao longo da distribuição geográfica conhecida da espécie, mais um fragmento de 511 pb do gene nuclear TYR obtidos de 17 dos 45 indivíduos acima citados. Adicionalmente algumas análises foram feitas a partir de um banco de dados de ambos os genes concatenados em um fragmento de 1150 pb.

Não houve concordância entre as topologias obtidas com os diferentes conjuntos de dados, embora alguns agrupamentos recuperados na árvore mitocondrial tenham se mantido presentes nas árvores obtidas a partir dos conjuntos de dados nuclear e concatenados. Os baixos valores de suporte observados nas topologias geradas a partir destes, não permitem fazer inferências claras sobre o histórico dessas linhagens. Desse modo, as análises exploratórias a seguir, são baseadas apenas no conjunto de dados mitocondrial.

A filogenia intraespecífica baseada em MV recuperada a partir do COI mostrou a existência de, pelo menos, dois agrupamentos, um no Norte da distribuição e outro ao Sul, sendo este subdividido em dois subgrupos S1 e S2, mais duas amostras do município de Ilhéus (Figura não apresentada). Essa configuração foi igualmente recuperada por meio de Inferência Bayesiana (Fig. 1) e pela rede de haplótipos (Fig. 2), de modo que as análises explanatórias subsequentes foram conduzidas inicialmente com esses agrupamentos.

As 45 amostras reunidas apresentaram 31 sítios polimórficos do total de 574 pares de base com 17 haplótipos (h). A diversidade haplotípica (H_d) foi de 0.854 ± 0.040 e a diversidade nucleotídica (π) de 0.014 ± 0.00088 . Os testes de neutralidade D de Tajima (0.48) e de expansão demográfica F_s de F_u (-0.48) não foram significativos ($p > 0.10$).

Populações de cada agrupamento que apresentaram número de amostras maior que 2 foram analisadas separadamente. Entre as amostras do Sul, a população da RPPN Estação Veracel (Veracel) (N=8), proveniente do município de Porto Seguro, apresentou a maior diversidade genética global com 9 sítios polimórficos em 577 pares

de base, 4 haplótipos, $Hd = 0.64 \pm 0.18$ e $\pi = 0.0039 \pm 0.0018$. O teste de neutralidade apontou forte sinal de expansão demográfica com $D = -1,72$ ($p < 0.01$). A amostra populacional do Parque Nacional do Descobrimento (Descobrimento) ($N=9$), proveniente do município de Itamaraju, apresentou valores intermediários de diversidade genética com 8 sítios polimórficos em 639 pares de bases, 3 haplótipos, $Hd = 0.55 \pm 0.16$ e $\pi = 0.0058 \pm 0.0015$. Os menores valores de diversidade foram registrados para a amostra populacional do Refúgio da Vida Silvestre do Rio dos Frades (Frades) ($N=8$), provenientes do município de Trancoso, com 1 sítio polimórfico em 636 pares de base, 2 haplótipos, $Hd = 0.25 \pm 0.18$ e $\pi = 0.00039 \pm 0.00028$. Os testes de neutralidade para essas duas últimas populações não foram significantes ($p > 0.10$).

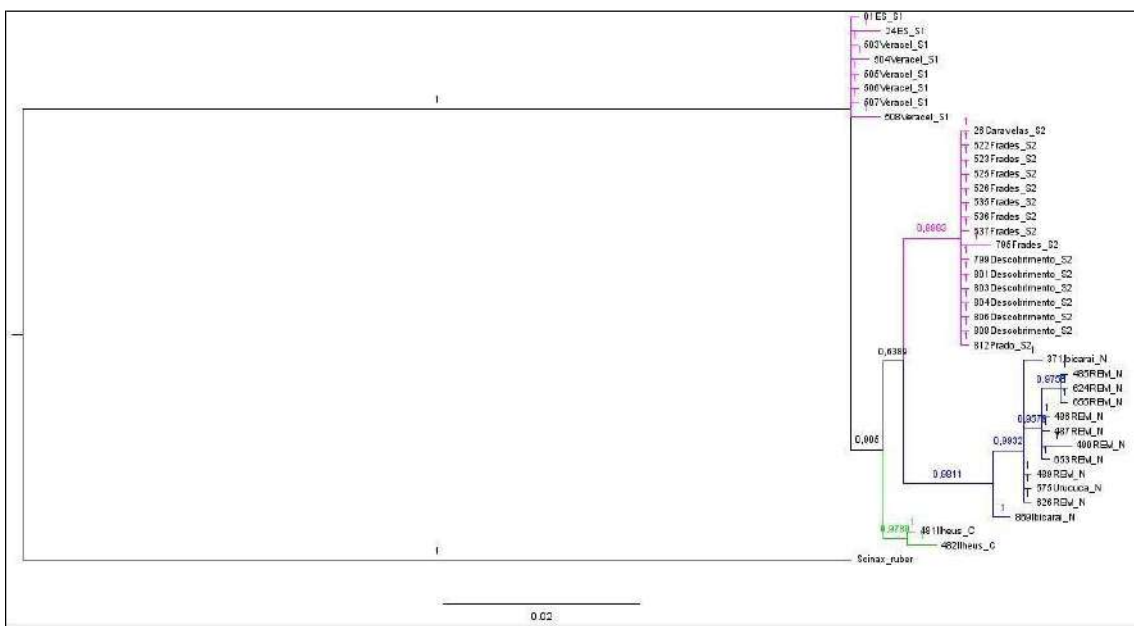


Figura 1. Árvore Bayesiana obtida a partir do gene COI, rodada sem amostras ambíguas. Os números próximos de cada nó representam sua probabilidade posterior. A coloração dos ramos representa as linhagens recuperadas: rosa, clados S1 e S2; azul, clado N e verde, clado C.

O grupo Norte reuniu amostras de 3 localidades distintas: Reserva Ecológica Michelin (REM) do município de Igrapiuna e dos municípios de Uruçuca e Ibicaraí. Para esse grupo foram observados 8 sítios polimórficos em 627 pares de base, 5 haplótipos, $Hd = 0.83 \pm 0.07$ e $\pi = 0.0032 \pm 0.001$. Os testes de neutralidade não foram significativos ($p > 0.10$).

Considerando que algumas amostras de localidades do grupo Sul se distribuíam entre os dois subgrupos dessa região, podendo causar ruídos nas análises de demografia histórica, nós reformulamos a composição dos grupos, removendo essas amostras ambíguas e criando um grupo para as amostras de Ilhéus (C). Os grupos N, S1 e S2 foram mantidos. Essa nova composição, assim como a composição prévia, foi submetida a uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), como forma de definir qual das configurações seria mais coerente com os resultados das análises primárias das

filogenias intraespecíficas. Os resultados das AMOVAs apontaram que, no arranjo prévio, 59.57% da variação genética que explicava a estrutura observada nos dados, estava distribuída entre as populações e 18.86% dentro das populações. Quanto ao novo arranjo, a porcentagem de variação entre populações foi de 90.31% e somente 7.85% estavam distribuídas dentro das populações. Esses dados claramente suportam a reformulação dos grupos, uma vez que, constatada estrutura populacional nos dados, é comum que a maior parte da variação observada esteja distribuída entre as populações do que dentro delas. Outro indicativo que suporta o grupo criado foi o valor obtido pelo cálculo do Índice de Fixação ($F_{st} = 0.92$) significativo ($p=0.00$).

Desse modo, novas análises populacionais para o COI foram conduzidas com o conjunto de dados reformulados. O conjunto final das 38 amostras populacionais restantes apresentou 30 sítios polimórficos (S) do total de 574 pares de base com 14 haplótipos (h). A diversidade haplotípica (H_d) foi de 0.82 ± 0.054 e a diversidade nucleotídica (π) de 0.013 ± 0.011 . Os testes de neutralidade D de Tajima (0.77) e F_s de Fu (0.91) não foram significativos ($p>0.10$). Os valores de diversidade por clado encontram-se resumidos na Tabela 1.

Diversidade Genética em <i>Scinax juncae</i>						
	S	H	$H_d \pm DP$	$\pi \pm DP$	F_s	D_{TAJ}
COI						
Geral (45)	31	17	0.854 ± 0.04	0.014 ± 0.00088	-0.48	0.48
SPA (38)	30	14	0.82 ± 0.05	0.013 ± 0.011	0.91	0.77
N (12)	8	6	0.86 ± 0.064	0.003 ± 0.0007	-1.41	-1.06
C (2)	2	2	1 ± 0.5	0.0031 ± 0.0015	0.69	–
S1 (8)	5	4	0.64 ± 0.18	0.002 ± 0.0007	-0.78	-1.59*
S2 (16)	2	2	0.12 ± 0.1	0.0004 ± 0.0003	0.17	-1.49*
TYR						
Geral (28)	5		0.64 ± 0.087	0.0093 ± 0.0018	-0.38	-0.33
N (6)	2	2	0.53 ± 0.17	0.0087 ± 0.0028	1.73	1.03
C (4)	2	2	0.66 ± 0.2	0.010 ± 0.0033	1.53	1.89
S1 (8)	1	1	1	–	–	–
S2 (10)	3	3	0.62 ± 0.14	0.0087 ± 0.0026	0.6	0.021

Tabela 1. Estatísticas sumárias de diversidade genética realizadas para o conjunto completo de dados de cada marcador molecular, bem como seus respectivos clados. * Estatisticamente significativa ($p<0.05$) – não estimado.

As análises para TYR foram realizadas com o conjunto de dados com fases gaméticas definidas e após aplicação do teste de recombinação implementado no programa Splitstree v. 4.14.2 (Huson & Bryant 2006). Como foram identificados sítios recombinantes ($p<0.05$), a continuação das análises procedeu com o maior bloco de sítios não recombinantes do conjunto. Dessa forma, 28 sequências de 124 pares de base de comprimento foram avaliadas e os resultados encontram-se resumidos na Tabela 1.

Os valores de divergência genética não corrigidos (p -distance) entre todas as amostras variaram entre 0 e 3%, sendo os maiores valores observados entre os grupos N e S (S1 + S2). A maior variação observada entre os grupos S1 e S2 foi de 1.6%.

Rede de Haplótipos

A rede de haplótipos para COI (Fig. 2) destaca a separação clara das amostras em, pelo menos, duas linhagens (N e S) separadas por até 15 passos mutacionais (N e S2), bem como por 4 haplótipos hipotéticos, possivelmente extintos ou não amostrados. A linhagem do Sul, apresenta subdivisão marcada por até 7 passos mutacionais (S1 e S2), igualmente ligados por 3 haplótipos hipotéticos. Com relação ao agrupamento C, 10 passos mutacionais e 2 haplótipos hipotéticos separam essa linhagem do grupo N, enquanto 7 passos e 3 haplótipos hipotéticos o separam do grupo S2.

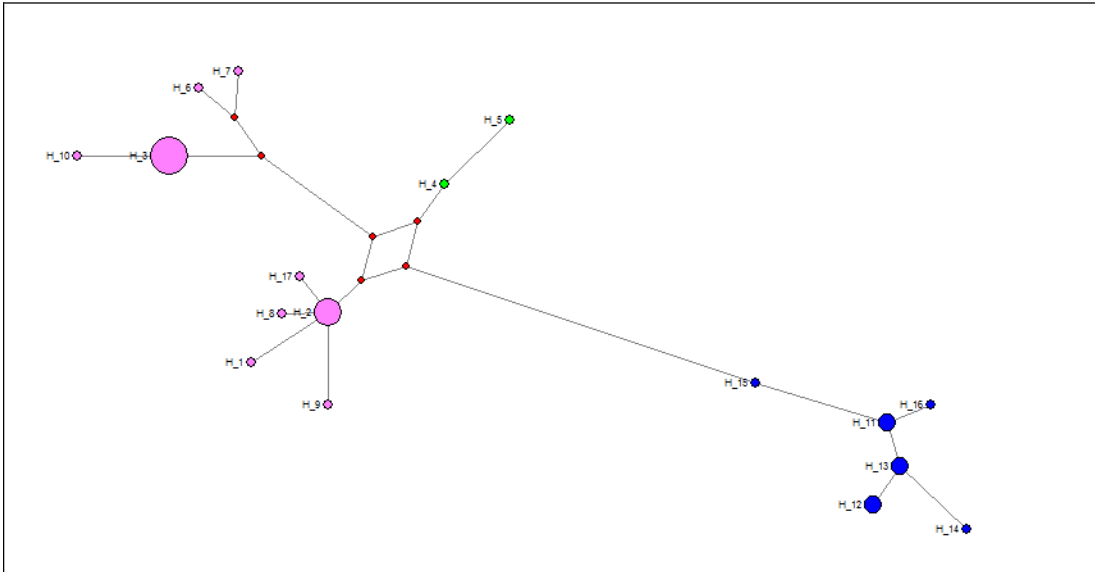


Figura 2. Rede de Haplótipos construída por método *Median-joining* para o gene COI. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras. As cores representam os clados recuperados por Inferência Bayesiana: Azul, clado N; Verde, clado C; Rosa, clados S1 e S2.

Demografia Histórica

Análise BSP realizada para o gene COI com os principais agrupamentos (N e S) apontou sinais de expansão demográfica repentina para as populações do Sul por volta de 220 mil anos antes do presente (Fig. 3 A), enquanto o tamanho populacional do clado Norte não seguiu a mesma tendência (Fig. 3 B). A análise conjunta dos dois clados igualmente apresentou sinal de expansão acentuada, porém por volta dos 250 mil anos antes do presente (Figura não apresentada).

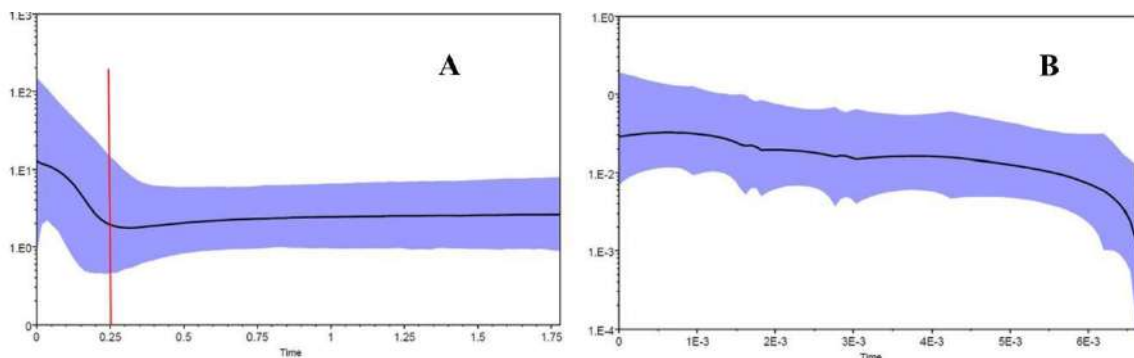


Figura 3. Reconstrução demográfica histórica pelo método de Skyline Plot realizada para os clados Sul (A) e Norte (B).

Não houve variação suficiente no marcador nuclear, de modo que não foi possível realizar análise demográfica histórica para esse marcador.

O mapa com a distribuição geográfica das amostras obtidas e de acordo com os clados recuperados por Inferência Bayesiana é apresentado na Figura 4.

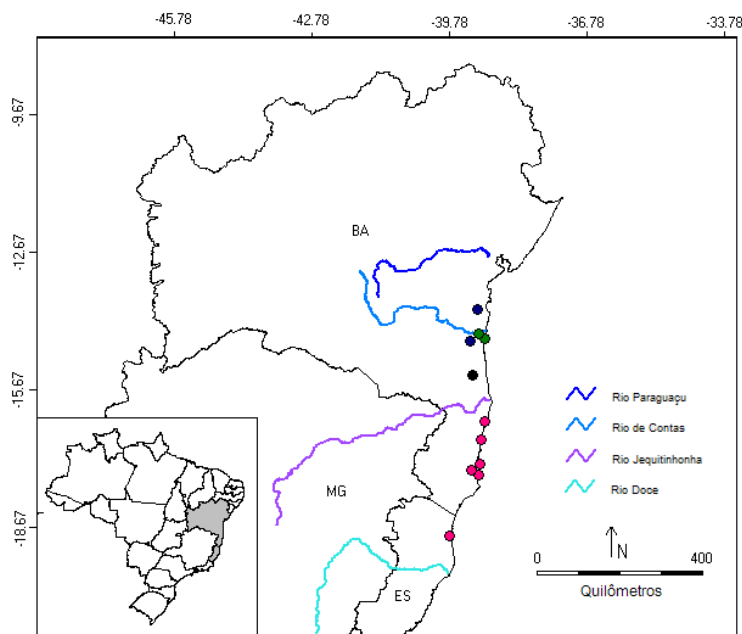


Figura 4. Mapa da distribuição geográfica das amostras de *Scinax juncae* analisadas no presente estudo. Os círculos representam as localidades de coleta e as cores representam os clados recuperados por inferência Bayesiana: Itaúnas (ES), Caravelas, Parque Nacional do Descobrimento-Itamaraju, Prado, Veracel-Porto Seguro e Refúgio da Vida Silvestre do Rio dos Frades- Trancoso (Rosa), Ilhéus e Uruçuca (Verde), Ibicaraí e Reserva Ecológica Michelin-Igrapiúna (Azul escuro). Em preto a amostra de Serra Bonita- Camacan, não inserida em nenhum clado.

Árvore de Espécies e de Gene

A árvore de espécies para COI (Fig. 5) revelou que o primeiro cenário de desconexão entre as linhagens N e [S2 (S1 + C)] provavelmente ocorreu no Plioceno Superior, por volta de 2.94 milhões de anos antes do presente, seguido por mais dois eventos que separaram as linhagens S2 de (S1 + C), há cerca de 1.79 milhões de anos atrás, já no Pleistoceno e, finalmente, S1 e C mais recente, há cerca de 1.12 milhão de anos antes do presente. Contudo, os intervalos de confiança associados a cada nó da ramificação são bastante abrangentes e se sobrepõem em todos os eventos (Figura não apresentada). Quanto à árvore de gene, embora apresentasse topologia similar à da árvore de espécies,

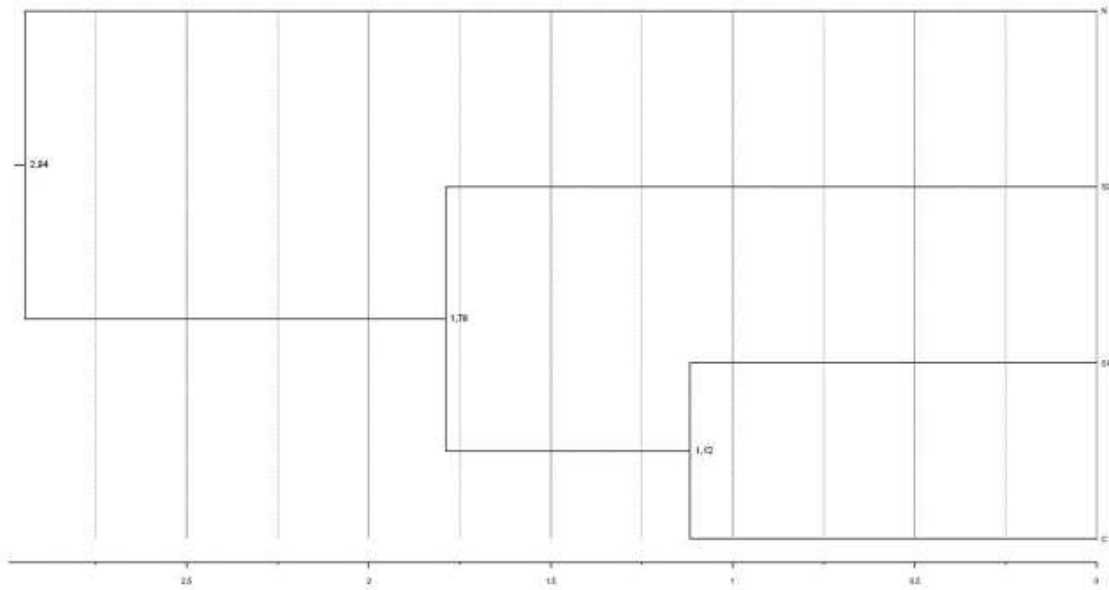


Figura 5. Árvore de espécies estimadas para as linhagens de *Scinax juncae* a partir do gene COI com indicação do tempo médio para o ancestral comum mais recente (tMRCA, sigla em inglês) entre elas.

as estimativas de divergência dataram períodos mais recentes para as principais divergências (Figura não apresentada). O primeiro evento de desconexão entre amostras do grupo N e as demais amostras tendo ocorrido no início do Pleistoceno, provavelmente há 1.83 milhão de anos atrás, entre S2 e (C+S1) há 1.32 milhão de anos e entre C e S1, há 0.96 milhão de anos. Os intervalos de confiança para essas estimativas são igualmente sobrepostos para todos os nós (Figura não apresentada).

A análise com o conjunto de dados concatenados (multilocus) resultou em topologia da árvore de espécies semelhante às obtidas com a análise de COI, mas com estimativas de divergência mais antigas (Fig. 6). O primeiro evento de desconexão aconteceu provavelmente há 3.3 milhões de anos atrás, entre os grupos N e [S2 (S1 + C)], enquanto as separações entre S2 e (S1+C) e entre S1 e C, ocorrem há 2.2 milhões e 1.29 milhões de anos, respectivamente.

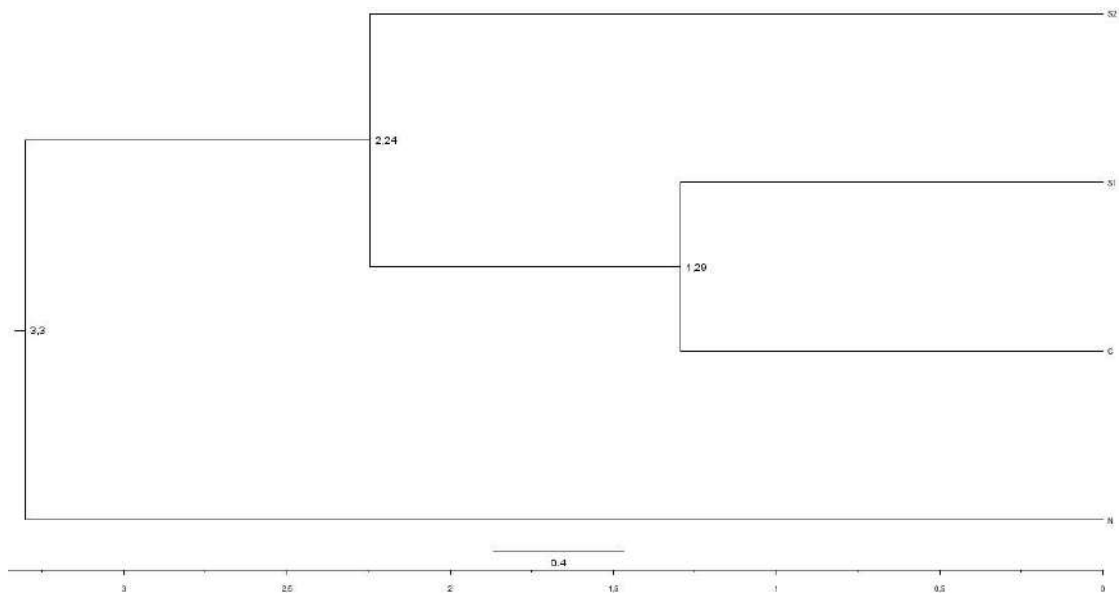


Figura 6. Árvore de espécies multilocus (COI + TYR) para as linhagens de *Scinax juncae* com indicação do tempo médio para o ancestral comum mais recente (tMRCA) entre elas.

Por outro lado, a árvore de genes multilocus resultou em topologia distinta das demais árvores prévias com relação às posições de S2 e N e com as estimativas de divergência mais antigas entre todas as análises (Figura não apresentada). O grupo S2 figura como mais basal e irmão do agrupamento [N (S1 + C)], com divergência para o primeiro evento de desconexão entre os grupos N e demais regiões acontecendo, provavelmente, no final do Mioceno há 6.48 milhões de anos atrás, seguido pela desconexão entre os grupos N e (S1 + C), há 5.75 milhões de anos e, entre S1 e C há 4.74 milhões de anos.

Pristimantis sp.

Filogenia intraespecífica e divergência genética

As análises foram conduzidas para um fragmento de 645 pares de base do gene COI obtidos de 51 indivíduos amostrados ao longo da distribuição geográfica conhecida da espécie, mais um fragmento final de 677 pb do gene nuclear RAG-1 obtidos de 24 dos 51 indivíduos acima citados. Adicionalmente, algumas análises foram feitas a partir de um banco de dados de ambos os genes concatenados em um fragmento de 1323 pb.

A primeira árvore estimada para todas as sequências, a partir do método de MV utilizando informação mitocondrial sob modelo de substituição de sítios GTR + I + Γ , confirmou a monofilia das populações analisadas, apesar de não apresentar suporte para os nós mais próximos da raiz do grupo (Figura não apresentada). Contudo, algumas populações mostraram tendência geográfica de organização nos clados, com exceção de uma amostra da Serra Bonita (SB), município de Camacan, uma da Serra das Lontras (SL), município de Arataca e uma do município de Jucuruçu (JU), que apareciam como politomias na topologia recuperada.

A fim de confirmar essa tendência geográfica, essas amostras foram removidas do banco de dados e nova análise de MV foi realizada. A topologia resultante confirmou a

existência de, pelo menos, três grandes agrupamentos bem suportados: Norte, Central e Sul (Figura não mostrada).

A topologia obtida por meio de inferência Bayesiana (IB), igualmente sob o modelo de substituição empregado na análise de MV, também atestou a monofilia do grupo interno, mas apontou para a existência de seis grupos bem suportados e geograficamente organizados: Norte (1 e 2), Central (1 e 2) e Sul (1 e 2) (Fig. 7). As amostras de SB, SL e JU não se inseriram em qualquer dos grupos e, portanto, foram removidas das análises subsequentes.

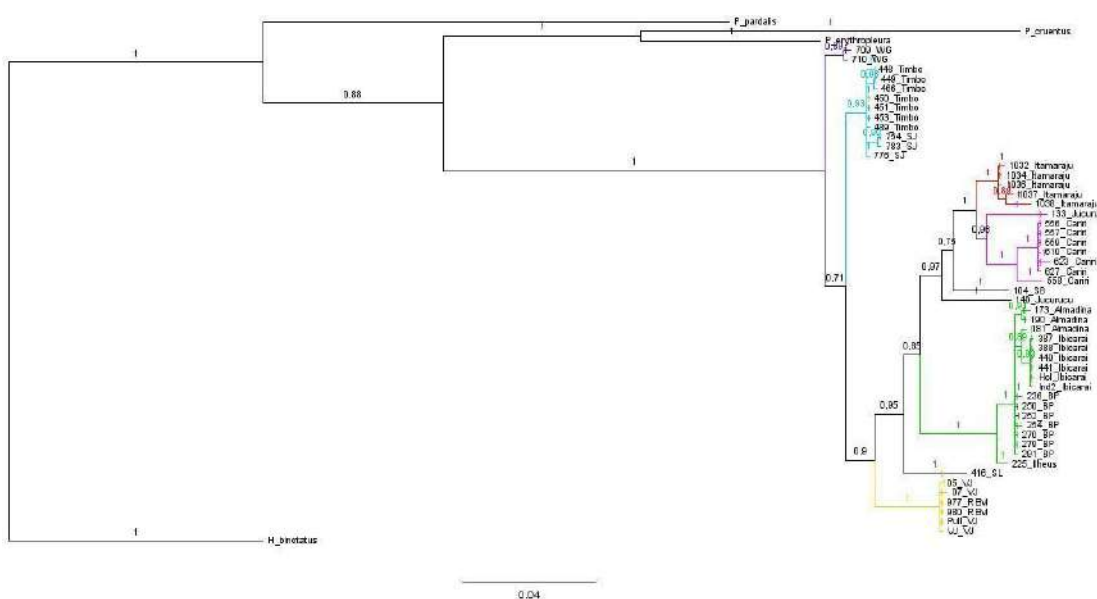


Figura 7. Árvore Bayesiana obtida a partir do gene COI. Os números próximos de cada nó representam sua probabilidade posterior.

As 48 amostras mitocondriais reunidas apresentaram 94 sítios polimórficos (S) do total de 645 pares de base com 24 haplótipos (h). A diversidade haplotípica (H_d) foi de 0.95 ± 0.14 e a diversidade nucleotídica (π) de 0.042 ± 0.0014 . Os testes de neutralidade e expansão demográfica D de Tajima (0.71) e F_s de Fu (2.39) não foram significativos ($p > 0.10$). A análise por clado recuperado pela Inferência Bayesiana revelou que apenas uma localidade do clado S1 (Alto do Cariri, N=7) apresentou desvio significativo da neutralidade, possivelmente indicativo de expansão de distribuição recente. Para essa localidade, os dados de diversidade genética são os seguintes: S=2, h=3, $H_d = 0.52 \pm 0.043$, $\pi = 0.0053 \pm 0.0030$, D de Tajima = -1.63 com $p < 0.05$ e F_s de Fu = 2.52 com $p > 0.10$. Análises de diversidade por clado encontram-se resumidos na Tabela 2.

Uma análise de variância molecular (AMOVA) utilizada para determinar a quantidade de variação no conjunto de dados explicada pela divisão dos grupos, conforme sugerido pela análise Bayesiana intraespecífica, indicou que 83.77% da variação estavam

distribuídos entre os grupos (N, C e S), enquanto que apenas 4.52% corresponderam à variação dentro das populações, gerando um valor de $F_{st} = 0.95$ ($p=0.00$).

Com relação às sequências nucleares, 53.32% da variação observada para o conjunto completo dos dados está distribuída dentro das populações e 48.77% entre as populações, gerando um valor de $F_{st} = 0.47$ ($p=0.00$). O arranjo populacional considerado incluiu as divisões N, C e S (sem subdivisões), bem como uma amostra de SB, portanto, quatro grupos.

Diversidade Genética em <i>Pristimantis</i> sp.						
	S	h	Hd ± DP	π ± DP	F _S	D _{TAJ}
COI						
Geral (51)	109	27	0.95 ± 0.013	0.043 ± 0.0013	1.31	0.12
SPA (48)	94	24	0.95 ± 0.014	0.042 ± 0.0014	2.39	0.71
N1 (2)	1	2	1 ± 0.5	0.0015 ± 0.00078	0.0	–
N2 (10)	4	4	0.73 ± 0.12	0.0019 ± 0.0005	-0.38	-0.39
C1 (6)	1	2	0.33 ± 0.21	0.00052 ± 0.00033	-0.003	-0.93
C2 (17)	12	8	0.81 ± 0.071	0.0035 ± 0.00093	-2.2**	-1.34**
S1 (8)	33	4	0.64 ± 0.18	0.013 ± 0.0066	3.85	-1.57*
S2 (5)	7	4	0.9 ± 0.16	0.005 ± 0.0017	-0.22	-0.33
RAG-1						
Geral (36)	13	12	0.74 ± 0.074	0.0035 ± 0.00042	-3.71*	-0.74
N1 (2)	1	2	1 ± 0.5	0.0014 ± 0.00074	–	–
N2 (6)	2	3	0.73 ± 0.15	0.0013 ± 0.00038	-0.3	0.31
C2 (16)	8	7	0.69 ± 0.12	0.0034 ± 0.00072	-1.26	-0.13
S1 (8)	2	2	0.25 ± 0.18	0.00074 ± 0.00053	0.76	-1.31**
S2 (2)	0	1	–	–	–	–

Tabela 2. Estatísticas sumárias de diversidade genética realizadas para o conjunto completo de dados de cada marcador molecular, bem como seus respectivos clados. * Estatisticamente significativa ($p < 0.05$); ** $0.05 < p < 0.10$ – não estimado.

Os valores de divergência genética não corrigidos (*p-distance*) entre todas as amostras do grupo interno variaram entre 0 e 7.4%, sendo o limite superior da diferença observado entre amostras do grupo S1 e C2. Os valores de distância entre os grupos irmãos N1 e N2, C1 e C2 e S1 e S2, variaram entre 1.4 – 2%, 5.9 – 6.5% e 2 – 3.8%, respectivamente.

Não houve variação substancial entre as amostras quanto ao marcador nuclear, de modo que não foram examinadas as relações de divergência entre as amostras.

O mapa com a distribuição geográfica das amostras de *Pristimantis* sp. obtidas neste estudo e de acordo com os clados recuperados por Inferência Bayesiana é apresentado na Figura 8.

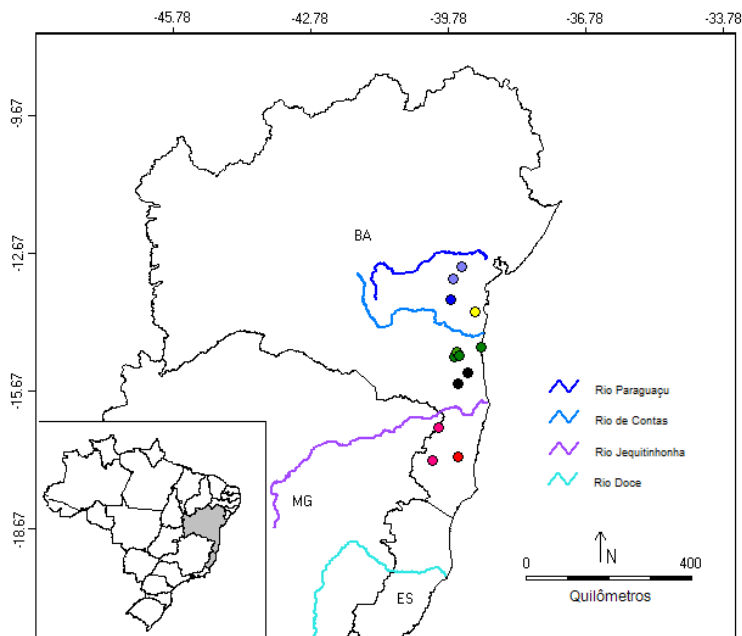


Figura 8. Mapa da distribuição geográfica das amostras de *Pristimantis* sp. analisadas neste estudo. Os círculos representam as localidades de coleta e as cores representam os clados recuperados por inferência Bayesiana: Itamaraju (vermelho), Alto do Cariri e Jucuruçu (Rosa), Almadina, Ibicaraí, Barro Preto e Ilhéus (Verde), Reserva Ecológica Michelin-Igrapiúna (Amarelo), Wenceslau Guimarães (Azul escuro), Serra do Timbó-Amargosa e Serra da Jiboia-Elísio Medrado (Azul claro). Em preto as amostras não inseridas em nenhum clado: Serra da Lontras-Arataca e Serra Bonita-Camacan.

Rede de Haplótipos

A rede de haplótipos, baseada em COI (Fig. 9), atesta os grupos recuperados por meio de Inferência Bayesiana, mostrando a existência de seis agrupamentos bastante divergentes entre si, como pode ser notado pelo número de mutações existentes entre os conjuntos haplotípicos, bem como pela quantidade de haplótipos hipotéticos não amostrados ou já extintos que foram empregados para conectar as amostras. Apenas o haplótipo H4 foi compartilhado por amostras de diferentes localidades: Serra da Jiboia e Serra do Timbó, do município de Amargosa. Os demais haplótipos foram exclusivos ou compartilhados por indivíduos da mesma localidade.

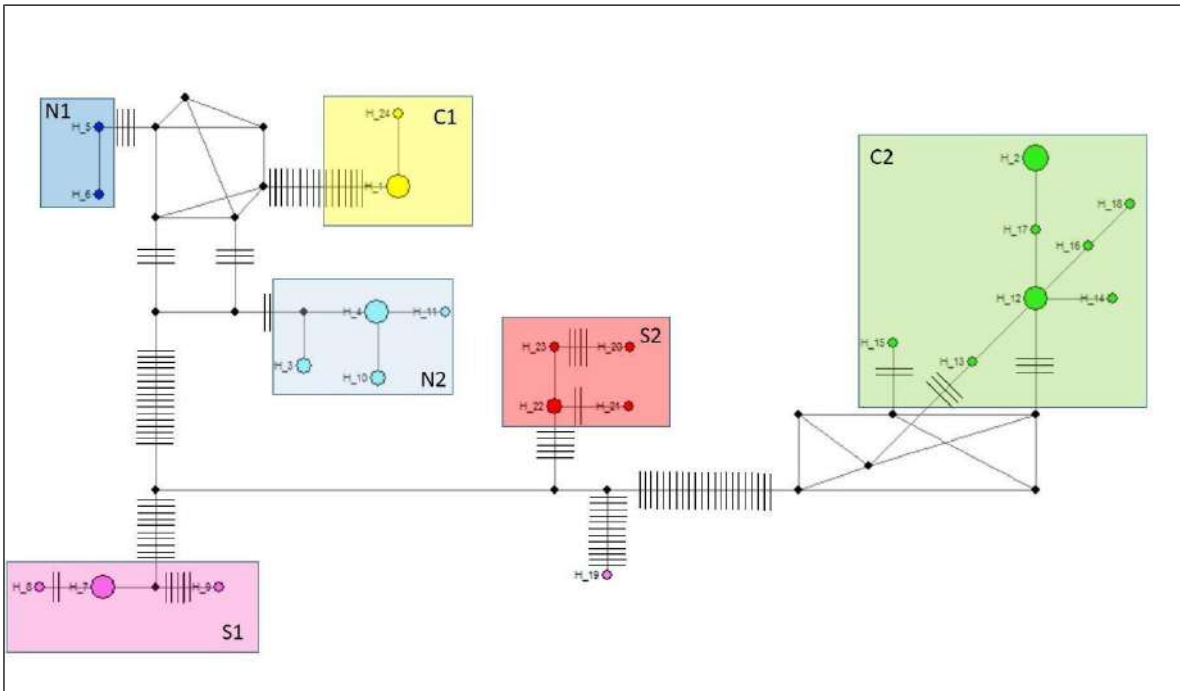


Figura 9. Rede de haplótipos construída por método *Median-joining* para o gene COI. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras compartilhando o haplótipo. As cores representam os clados recuperados por Inferência Bayesiana: Azul escuro, clado N1; Azul claro: clado N2; Amarelo: clado C1; Verde: clado C2; Rosa, clado S1 e Vermelho: clado S2.

A análise do conjunto de dados nucleares com as fases gaméticas definidas não permitiu detectar padrões similares à estrutura da árvore Bayesiana mitocondrial; os grupos foram homogeneamente distribuídos por meio de compartilhamento de vários haplótipos por amostras de uma mesma localidade, assim como por amostras de localidades distintas. O haplótipo H1 foi o mais comum, estando presente em 18 amostras associadas a grupos mitocondriais distintos.

Demografia Histórica

Não foi possível realizar análise demográfica por meio de BSP das populações que apresentaram indícios de expansão, devido ao número de amostras de cada clado ser inferior a 10.

Árvore de Espécies e de Genes

As árvores de espécies e de genes apresentaram topologias semelhantes para cada marcador separadamente, contudo, diferiram entre si. Com relação ao gene mitocondrial, as árvores de espécies e de gene mostraram C2 como linhagem mais basal e irmã ao agrupamento contendo [C1 (N1 + N2) + (S1 + S2)]. Entretanto, as estimativas do tempo dos principais eventos de desconexão entre os grupos foram distintas (Figuras não mostradas). Enquanto a árvore de espécies estimou 10.53 milhões de anos antes do presente para o primeiro evento de separação entre as linhagens C1 e demais, a árvore de genes estimou em 11.32 milhões. Pela árvore de espécies, o segundo evento de

desconexão separou o agrupamento [C1 (N1 + N2)] de (S1 + S2) provavelmente há 8.69 milhões de anos, enquanto na árvore de genes, este evento teria ocorrido há 9.61 milhões de anos. Os eventos seguintes de separação entre as demais linhagens se deram próximo da transição entre Mioceno/Plioceno para as duas análises. As linhagens mais recentes (N1 e N2) teriam divergido há 2.34 milhões de anos, já no Pleistoceno, de acordo com a árvore de espécies ou, ainda no Plioceno, há 3.09 milhões pela árvore de gene.

Considerando o marcador nuclear RAG-1, a topologia recuperada para a árvore de espécies foi ligeiramente diferente da observada para COI quanto ao grupo mais basal e idade estimada dos nós, sendo muito mais recente para RAG-1 (Figura não mostrada). De acordo com este marcador, N1 foi a primeira linhagem a se separar do clado [(N2 + C2) + (S1+S2)] há 1.12 milhão de anos. Em seguida, (N2 + C2) separou-se de (S1 + S2) há 1.03 milhão de anos. A separação mais recente ocorreu entre os grupos S1 e S2, há 0.05 milhão de anos.

Adicionalmente, a análise multilocus (RAG-1 + COI, 1324pb) gerou uma árvore de espécies com dois grupos principais [C1 (C2 (N1 + N2)) + (S1 + S2)] e com valores intermediários estimados para a idade dos nós (Fig. 10). O primeiro evento de separação entre estes grupos foi estimado ter ocorrido há 7.25 milhões de anos, o segundo evento separando S1 de S2, há 4.31 milhões de anos e o terceiro evento, separou C1 de [C2 (N1 + N2)] há 3.63 milhões de anos. Mais recentemente, há 2.2 milhões de anos, C2 separou-se de N1 + N2, e estes, finalmente, teriam se separado há 1.3 milhões de anos. Todas as datas estimadas são inferiores àquelas observadas para a árvore de espécies de COI.

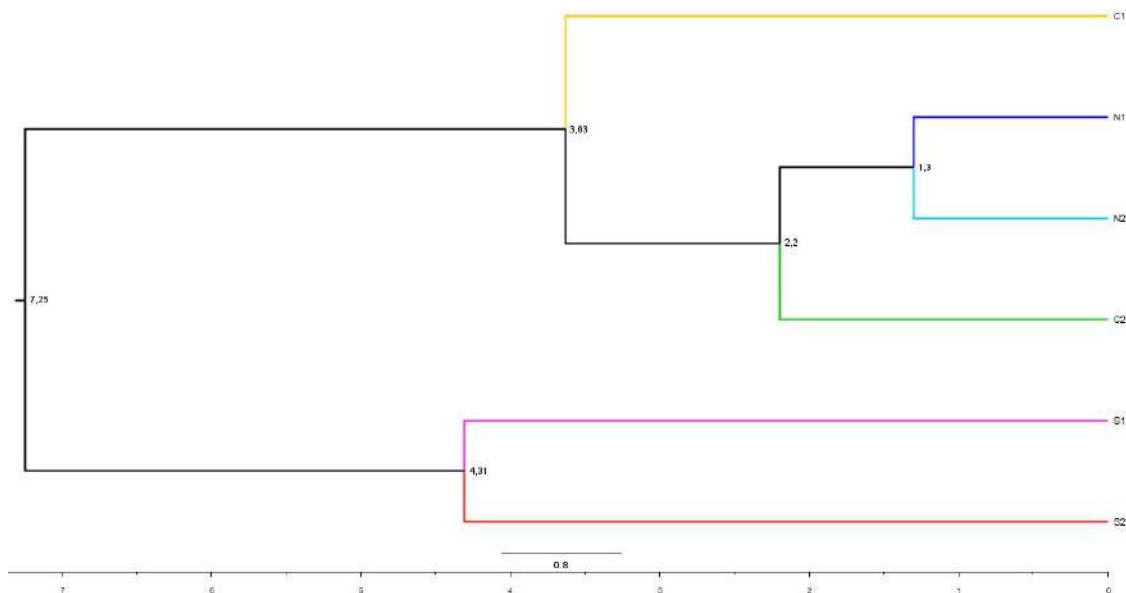


Figura 10. Árvore de espécies multilocus (COI + RAG-1) para as linhagens de *Pristimantis* sp. com indicação do tempo médio para o ancestral comum mais recente (tMRCA) entre elas. As cores nos ramos representam os clados obtidos por Inferência Bayesiana.

Vale ressaltar que esses resultados devem ser examinados com cautela, dado os intervalos de confiança (Highest Density Probability – HDP) abrangentes e em grande parte sobrepostos (Figuras não apresentadas).

Discussão

Os resultados apresentados nesse estudo são compatíveis com a observação de que os anfíbios estão entre os grupos de vertebrados que apresentam os maiores graus de subdivisão populacional existentes (Ward *et al.* 1992), dado que ambas as espécies avaliadas apresentaram estruturação genética, em menor grau para *Scinax juncae* e bastante acentuada em *Pristimantis* sp. Parte dessa característica pode ser atribuída às suas capacidades limitadas de dispersão e comportamento filopátrico (Zeisset & Beebee 2008; Avise 2000). Embora as espécies deste trabalho não representem linhagens filogeneticamente próximas, elas compartilham a mesma distribuição geográfica e, conseqüentemente poderiam apresentar perfis filogeográficos semelhantes (Lapointe & Rissler 2005). Contudo, mais do que somente características ambientais históricas, particularidades ecológicas de cada espécie (Duminil *et al.* 2007; Rodriguez *et al.* 2015) ou mesmo estocasticidade associada a eventos demográficos (Moritz *et al.* 2000), devem ter contribuído para formar suas histórias evolutivas na região. Enquanto *Pristimantis* sp. é uma espécie mais associada a ambientes florestados, onde se reproduz por desenvolvimento direto, *Scinax juncae* se caracteriza como uma espécie tolerante a ambientes perturbados, utilizando poças temporárias em áreas abertas e/ou bordas de mata para a reprodução. De acordo com Rodriguez *et al.* (2015), os padrões filogeográficos apresentados por anuros tropicais são principalmente influenciados pelo tipo de macrohabitat (florestado vs. área aberta) ao qual esses são associados.

Filogenia intraespecífica

As relações intraespecíficas para as espécies alvo do presente estudo foram melhor estabelecidas a partir dos dados mitocondriais. Ainda que alguns nós não tiveram suporte, em ambos os casos, a monofilia das espécies foi recuperada. Quanto aos dados recuperados a partir de informação nuclear, a resolução foi bastante limitada para as duas espécies. Contudo, a monofilia de ambas foi igualmente recuperada. No caso de *S. juncae*, apesar da politomia na relação entre as amostras com uso do gene TYR, os clados tenderam a reunir grupos geograficamente próximos e/ou da mesma linhagem, conforme definido pelos dados mitocondriais, com exceção de um clado contendo amostras dos três grupos mitocondriais N, C e S2. No caso de *Pristimantis* sp. nenhum padrão ficou claro a partir dos dados recuperados por RAG-1.

De modo geral, informações sobre as relações inter e intraespecíficas são discrepantes entre marcadores mitocondriais e nucleares (Spinks & Schaffer 2009). Isso se deve às propriedades particularmente conspícuas da mitocôndria, quais sejam, na maioria dos casos são organelas de origem matrilinear, com genoma em uma única cópia, livres de recombinação e com taxas elevadas de substituição de nucleotídeos (Avise *et al.* 1987). Contrário a estas características estão os genes nucleares, apresentando genoma distribuído em duas cópias, normalmente susceptíveis a eventos de recombinação e com taxas de substituição de nucleotídeos mais lentas (ver Avise *et al.* 1987). Essas

características dos genes nucleares favorecem a retenção de polimorfismo ancestral, criando ruídos importantes em análises filogeográficas, de modo que linhagens seguramente monofiléticas, segundo dados mitocondriais, apresentem-se como incompletamente diferenciadas (Broughton & Harrison 2003; Sequeira *et al.* 2008). Por outro lado, seu uso em estudos de filogeografia continua sendo indicado, dado que a abordagem multilocus – incluindo ao menos um marcador mitocondrial e um nuclear – permite fazer inferências mais robustas sobre a história evolutiva dos objetos de estudo e não apenas a história contada pela linhagem matrilinear dos mesmos (McCormack *et al.* 2010).

Estatísticas sumárias

Nossa abordagem para o cálculo das estatísticas de diversidade genética considerou para cada espécie avaliada os dados totais com todas as amostras disponíveis, bem como um subconjunto de dados que incluía apenas amostras de localidades presentes em apenas um clado. Dessa maneira, algumas amostras de *S. juncae* do Descobrimento, da Veracel, Serra Bonita e de Ilhéus foram removidas desse subconjunto por estarem presentes em ambos os clados S1 e S2, podendo enviesar os resultados das histórias demográficas de cada clado analisado em separado. Por não terem se inserido em qualquer dos clados e por terem se inserido como politomias entre os demais grupos, amostras da SB, Serra das Lontras (SL), município de Arataca e do Jucuruçu foram removidas do banco de dados para essa análise.

Quando considerado o conjunto completo, *S. juncae* apresentou valores de diversidade nucleotídica menores (1.4%) do que aqueles apresentados por *Pristimantis* sp. (4.2%), apesar da forte estruturação genética observada na última. A análise por grupo realizada para *S. juncae* ainda revelou que, de modo geral, o clado N apresenta os maiores valores de diversidade genética (S , h , H_d e π) comparado aos clados do sul, apesar de todos os grupos apresentarem baixos valores de diversidade nucleotídica ($\pi \leq 0.5\%$). Entre os clados do sul, a população da Veracel (S1), apresentou maior diversidade genética, porém com baixo valor de π e sinal de expansão populacional recente. Dado o valor negativo e significativo da estatística D de Tajima, infere-se que a variação genética nessa população foi removida por seleção negativa. No entanto, o pior cenário do ponto de vista de diversidade genética, foi observado para a população do Refúgio da Vida Silvestre do Rio dos Frades (Frades), distante apenas 30km em linha reta do sítio de coleta da Veracel. A diversidade nucleotídica nessa população foi extremamente baixa (0.003%). Considerando que a provável origem da linhagem S2 deste estudo ocorreu no Pleistoceno inferior há 2.24 milhões de anos, de acordo com análise multilocus no

*Beast, portanto, durante um período glacial, a população dos Frades pode não ter gerado variação genética suficiente nos ~140 mil anos seguintes, até o próximo período interglacial que durou menos de 100 mil anos (Lisiecki & Raymo 2005; Hao *et al.* 2012). Dessa forma, durante as sucessivas oscilações climáticas que ocorreram nessa época (pelo menos mais 16 glaciações), as populações dos clados do sul, podem ter respondido de maneira distinta, a depender das condições ambientais dos sítios onde se encontravam, podendo ser áreas de refúgio ou não refúgio. Assim, ao que parece, a população dos Frades, pode ter ficado fora das áreas de refúgio – florestal ou climático – por um certo período de tempo, tendo em seguida, conseguido alcançar uma dessas

áreas no sul da Bahia e expandido sua população a partir de 220 mil anos antes do presente, como sugerido pela análise BSP para o clado Sul de modo geral.

Para *Pristimantis* sp. o maior valor de diversidade nucleotídica (1.3%) foi observado para a população do clado S1, que reúne amostras de Jucuruçu e do Alto do Cariri, município de Guaratinga. A população do clado C1, da Reserva Ecológica Michelin, município de Igrapiúna apresentou o menor valor de diversidade nucleotídica (0.0052%). Embora essa população esteja inserida em uma reserva ecológica, vale ressaltar que, devido a sua variabilidade extremamente baixa e unicidade do ponto de vista genético, os cuidados para sua proteção devem ser reforçados a fim de viabilizar a manutenção de sua população a curto e longo prazo.

Trabalhos prévios com espécies de anuros endêmicas da Floresta Atlântica também apontaram baixa diversidade genética em algumas populações, principalmente para o parâmetro π . No entanto, esses valores superam os observados neste estudo por até duas ordens de magnitude (Carnaval *et al.* 2009; Fitzpatrick *et al.* 2009; Brunet *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2010; Amaro *et al.* 2012; Fusinato *et al.* 2013; Tonini *et al.* 2013). Valores similares aos deste estudo foram relatados por Chen *et al.* (2012) para uma espécie ameaçada de salamandra da Sibéria, destacando como os menores valores já encontrados para um grupo de anfíbio até então. Esses autores justificaram os baixos valores de diversidade com base na possibilidade de frequência elevada de endocruzamentos ou mesmo o favorecimento da homogeneidade genética da população (em vez de diversificação) sob influência das oscilações climáticas do Pleistoceno.

Divergência genética

O intervalo de variação para a divergência genética (*p-distance*) não corrigida foi menor para *S. juncae* (0 – 3%) do que para *Pristimantis* sp. (0 – 7.4%). Esse resultado é compatível com a expectativa, dado que *S. juncae* é uma espécie associada com ambientes abertos e, portanto, presumidamente apresentam maior capacidade de dispersão (Scheffers *et al.* 2014), mantendo assim o fluxo gênico entre as populações. Por outro lado, *Pristimantis* sp., como espécie associada a ambientes florestados, depende de manchas de hábitat adequado conectando populações, para que consiga manter o fluxo gênico. Dessa forma, os altos valores de divergência genética (*p-distance*) observados para esta espécie, mesmo entre populações geograficamente próximas (e.g., C1 e C2), atestam sua habilidade limitada para a dispersão e está em acordo com os resultados mostrados na rede de haplótipos que indicaram forte estruturação. Resultados similares foram reportados por Wang *et al.* (2008) para *Pristimantis ridens* na América Central, onde dados de sequência mitocondrial revelaram divergências muito profundas entre linhagens geograficamente muito próximas e sem a presença de barreiras geográficas óbvias. Outros trabalhos publicados para os anuros do grupo Terrarana, do qual *Pristimantis* sp. faz parte, apontam valores semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde os maiores valores de divergência relatados dentro desse grupo podem chegar a até 10% (Fouquet *et al.* 2007b). Garcia-R *et al.* (2012) sugerem ainda, a partir de um estudo com três espécies simpátricas de *Pristimantis*, utilizando COI e 16S, que muito da diversidade interespecífica nesse grupo pode ter sido resultado da diversidade dentro das espécies

através de sucessivos processos vicariantes ao longo de milhões de anos. Esse argumento parece estar alinhado com os resultados observados para *Pristimantis* sp. no presente estudo, dado o padrão de estruturação genética recuperado por nossas análises. Assim sendo, mesmo populações isoladas e/ou localizadas podem guardar considerável diversidade genética, capaz de assegurar a manutenção de viabilidade populacional ao longo de potenciais eventos vicariantes (Garcia-R *et al.* 2012). Outra alternativa para explicar a estruturação dos dados nessa espécie, poderia ser relacionada à proposta de Taberlet *et al.* (1998) para explicar os padrões filogeográficos exibidos por diferentes táxons europeus, onde eles sugerem que o início da diversificação entre os grupos de cada táxon, se deu tão logo eles chegaram à Europa. Sob essa ótica, tão logo a população ancestral de *Pristimantis* sp. chegou à Floresta Atlântica no sul da Bahia, ela teria dispersado imediatamente para diferentes regiões e, subsequentemente, passaram por alguns períodos em isolamento, por conta de eventos geológicos estocásticos ou de oscilações climáticas associadas, desde sua entrada nessa região no Mioceno até o presente. Nos períodos climáticos favoráveis, essas populações podem ter retomado contato, mas já apresentando elevada divergência entre grupos.

Adicionalmente, a estruturação genética observada para *Pristimantis* sp. parece apresentar um padrão geográfico associado à presença dos rios Paraguaçu, de Contas, Jequitinhonha e Doce, dado que as linhagens recuperadas são geograficamente limitadas por eles. Por outro lado, cenários como este dificultam fazer interpretações precisas sobre os processos envolvidos na formação desses padrões, principalmente para táxons de baixada associados à costa leste brasileira, em específico da região da costa baiana. Conforme Ribeiro (2006) destacou, avaliações geológicas na América do Sul, quando disponíveis, se limitam à evolução dos Andes e as grandes bacias de baixadas, enquanto pouco é relatado sobre a porção leste do escudo brasileiro. No entanto, as origens muito mais antigas dessas drenagens – anterior ao Cenozoico (Ribeiro 2005) – não suportariam suas participações como barreiras geográficas para essa espécie, dada sua origem muito mais recente (~7,25 milhões de anos). Dessa forma, esse padrão poderia ser associado à presença de barreiras crípticas ou relictos de barreiras históricas não mais presentes atualmente (Patton & da Silva 2005, Wang *et al.* 2008).

Redes de Haplótipos

As redes de haplótipos mitocondriais revelaram estruturação para ambas as espécies, contudo, parece haver um isolamento claro entre as populações de *Pristimantis* sp., ao passo que *S. juncae*, apesar de estruturada, apresenta menor distância geral entre os clados. A grande quantidade de haplótipos não amostrados presentes nas redes de ambas as espécies pode ser resultado da extinção de seus representantes durante os sucessivos eventos de glaciação aos quais as mesmas foram submetidas durante o Pleistoceno. Dessa forma, a expansão abrupta no tamanho populacional detectada há ~220 mil anos pela análise BSP para populações de *S. juncae*, pode ter ocorrido a partir de grupos populacionais já geneticamente erodidos, levando aos valores negativos acentuados revelados pela análise estatística D de Tajima. Embora o número de amostras para os clados de *Pristimantis* sp. não permitissem realizar a análise BSP, é possível que um cenário similar tenha ocorrido com algumas de suas populações, dado os resultados críticos de diversidade genética supracitados.

Estimativas do tempo de divergência: Árvore de espécies vs. Árvore de gene

De modo geral, as topologias recuperadas tanto para as árvores de espécies como para árvores de genes foram congruentes quanto às relações entre as linhagens, para ambas as espécies. Diferenças, contudo, foram evidentes para as estimativas do tempo de divergência entre linhagens, seja considerando análises multilocus ou com um único marcador. As datas estimadas de divergência entre as linhagens de *S. juncae* foram mais recentes do que aquelas estimadas para *Pristimantis* sp., com o início da separação entre linhagens ocorrendo entre 3.3 milhões de anos (árvore de espécies multilocus) e 2.94 milhões de anos (árvore de espécies para COI, apenas), portanto, ambas ocorrendo no Plioceno. Apenas a árvore de gene utilizando marcador nuclear (TYR) forneceu uma estimativa de tempo de divergência associada ao Pleistoceno (1.89 milhões de anos). Para *Pristimantis* sp. a estimativa de divergência mais antiga foi observada na árvore de gene considerando apenas o marcador mitocondrial, que datou a primeira separação entre as linhagens há 11.32 milhões de anos. Já a abordagem de árvore de espécies estimou data de divergência inicial há 10.5 milhões de anos para esse mesmo marcador, enquanto a estimativa considerando a análise multilocus apontou para 7.25 milhões de anos. Por todas as propostas, a origem dessas linhagens remete ao Mioceno médio. Por outro lado, quando considerado apenas o gene RAG-1, a árvore de espécie estimou divergência inicial muito mais recente – 1,12 milhão de anos – já no Pleistoceno. Esses indícios sugerem que a maior parte da diversificação em *Pristimantis* sp. largamente pré-datam o Pleistoceno, assim como já observado para outros anfíbios na Floresta Atlântica (Fitzpatrick *et al.* 2009; Brunet *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2010). Portanto, os eventos geológicos que ocorreram no sul da Bahia nessa época explicariam mais adequadamente o perfil evolutivo dessa espécie, do que apenas as oscilações climáticas do Pleistoceno.

Embora discordâncias entre estimativas de tempo de divergência entre linhagens obtidas a partir de árvore de espécies e de genes seja comumente relatado na literatura (McCormack *et al.* 2010), os resultados obtidos para *S. juncae* não se alinham à expectativa de que árvores de genes superestimem as datas dos eventos de separação entre linhagens, dado que os valores obtidos a partir dessa abordagem foram muito menores do que aqueles resultantes das árvores de espécies. De acordo com Edwards & Beerli (2000), a divergência entre genes deveria necessariamente pré-datar os eventos de especiação em si, desde que o fluxo gênico entre as linhagens fosse limitado. Contudo, tais estimativas devem ser examinadas com cautela, dado que os intervalos de confiança associados às mesmas são extensos e amplamente sobrepostos.

Considerações Finais

As diferentes histórias filogeográficas recuperadas por esse estudo podem ser reflexo (1) das diferentes rotas de colonização utilizadas pelos ancestrais de cada espécie durante a ocupação da região estudada, assim como das datas estimadas desses eventos (Wang *et al.* 2008), (2) da influência de eventos vicariantes históricos provavelmente distintos para cada espécie, já que, de acordo com as evidências apontadas nesse estudo, as linhagens de *Scinax juncae* seriam muito mais recentes do que as de *Pristimantis* sp.

e (3) devido às próprias particularidades ecológicas de cada espécie, que potencialmente influenciam de modo distinto suas interações com o ambiente em mudança, podendo ser mais ou menos sensíveis a ela (Duminil *et al.* 2007; Scheffers *et al.* 2014; Rodriguez *et al.* 2015).

Quanto às populações geneticamente erodidas, deve-se destacar que estas são mais susceptíveis à redução da viabilidade populacional a médio e longo prazo, em função da redução do potencial adaptativo – *fitness* – (Reed & Frankham 2003) e, como consequência, tornam-se mais vulneráveis a eventos estocásticos como a deriva genética. Nesse sentido, os resultados do presente estudo reforçam a necessidade de que essas populações, assim como aquelas que detêm conjuntos haplotípicos exclusivos sejam efetivamente protegidas, seja pela manutenção adequada das unidades de conservação em que algumas delas estão inseridas, seja pela atuação mais efetiva dos órgãos responsáveis na defesa do meio ambiente, assegurando a sobrevivência dessas linhagens a curto e longo prazo.

Referências

Alexandrino J, Arntzen JW, Ferrand N (2002) Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the goldenstriped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, **88**, 66–74.

Amaro RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC (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.

Austin JD, Zamudio KR (2008) Incongruence in the pattern and timing of intra-specific diversification in bronze frogs and bullfrogs (Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 1041–053.

Avice JC (2000) Phylogeography. The history and formation of species. pp. 447. Harvard University Press, London.

Avice JC, Walker D, Johns GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of Biological Society of London*, **265**, 1707–1712.

Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM (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, Miyaki CY (2016) Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi: 10.1111/jzs.12118

- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754–3774.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology*, **177**, 19–27.
- Behling H, Pillar VD, Orlóci L, Bauermann SG (2004) Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **203**, 277–297.
- Behling H, Pillar VD, Bauermann SG (2005) Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). *Review of Paleobotany and Palynology*, **133**, 235–248
- Brunes TO, Sequeira F, Haddad CFB, 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 Evolution*, **57**, 1120–1133.
- Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 73–84.
- Cabanne GS, d’Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 760–773.
- Cabanne GS, D’Horta FM, Meyer D, Silva JMC, Miyaki CY (2011) Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 801–820.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**: 785–789.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201.
- Collevatti RG, Telles MP, Nabout JC, Chaves LJ, Soares TN (2013) Demographic history and the low genetic diversity in *Dipteryx alata* (Fabaceae) from Brazilian Neotropical savanas. *Heredity*, **111**: 97–105.
- d’Horta F, Cabanne GS, Meyer D, Miyaki CY (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.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969-1973.

Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG and Petit RJ (2007) Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *American Naturalist*, **169**, 662–672.

Edwards SV, Beerli P (2000) Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, **54**, 1839–1854.

Eizirik E, Kim J, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG Jr, O'Brien SJ, Johnson WE (2011) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, **10**, 65-79.

Excoffier, L. G. Laval, S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47-50.

Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad CFB, Zamudio KR (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, **18**, 2877–2896.

Fouquet A, Vences M, Salducci MD, Meyer A, Marty C, Blanc M, Gilles A (2007) Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43**, 567-582.

Fouquet A, Orrico VD, Ernst R, Blanc M, Martinez Q, Vacher J-P, Rodrigues MT, Ouboter P, Jairam R, Ron S (2016) Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. *Zootaxa*, **4084**, 079–104.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.

Heinick MP, Duellman WE, Hedges SB (2007) Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *PNAS*, **104**, 10092-10097.

Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131–137.

Hao QZ, Wang L, Oldfield F, Peng SZ, Qin L, Song Y, Xu B, Qiao YS, Bloemendal J, Guo ZT (2012) Delayed build-up of Arctic ice sheets during 400,000-year minima in insolation variability. *Nature*, **490**, 392–396.

Hauswaldt JS, Ludewig AK, Vences M, Pröhl H (2011) Widespread co-occurrence of divergent mitochondrial haplotype lineages in a Central American species of poison frog (*Oophaga pumilio*). *Journal of Biogeography*, **38**, 711–726.

Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.

Hoffman, EA, Blouin MS (2004) Evolutionary history of the northern leopard frog: reconstruction of phylogeny, phylogeography, and historical changes in population demography from mitochondrial DNA. *Evolution*, **58**, 145–159.

Galetti-Jr PM, Rodrigues FP, Solé-Cava AM et al. (2008) Genética da Conservação na biodiversidade brasileira. In: Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG. 262 pp.

García-R JC, Crawford AJ, Mendoza AM, Ospina O, Cardenas H, Castro F (2012) Comparative Phylogeography of Direct-Developing Frogs (Anura: Craugastoridae: *Pristimantis*) in the Southern Andes of Colombia. *PLoS ONE*, **7**, e46077.

Gehara M, Crawford AJ, Orrico VGD, Rodríguez A, Lötters S, Fouquet A, Barrientos LS, Brusquetti F, De la Riva I, Ernst R, Urrutia GG, Glaw F, Guayasamin JM, Hölting M, Jansen M, Kok PJR, Kwet A, Lingnau R, Lyra M, Moravec J, Pombal-Jr JP, Rojas-Runjaic FJM, Schulze A, Señaris JC, Solé M, Rodrigues MT, Twomey E, Haddad CFB, Vences M, Köller J (2014) High Levels of Diversity Uncovered in a Widespread Nominal Taxon: Continental Phylogeography of the Neotropical Tree Frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE*, **9**, e111829.

Goebel AM, Donnelly JM, Atz ME (1999) PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11**, 163–199.

Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131–137.

Kaefer I, Tsuji-Nishikido BM, Mota EP, Farias IP, Lima AP (2012) The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism Despite Strong Genetic Structure. *Evolutionary Biology*, **40**, 228–245.

Lapointe FJ, Rissler LJ (2005) Congruence, consensus, and the comparative phylogeography of codistributed species in California. *The American Naturalist*, **166**, 290–299.

Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M, Pardini R (2016) Neotropical forest expansion during last glacial period challenges refuge hypothesis. *PNAS*, **113**, 1008–1013.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 145–1452.

Lisiecki LE, Raymo ME (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic $d^{18}O$ records. *Paleoceanography*, **20**, PA1003, doi:10.1029/2004PA001071.

Macey JR, Schulte JA 2nd, Larson A, Fang Z, Wang Y, Tuniyev BS, Papenfuss TJ (1998) Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: A case of vicariance and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**, 80–87.

McCormack JE, Heled J, Delaney KS, Peterson AT, Knowles LL (2010) Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma jays*. *Evolution*, **65**, 184–202.

Milot E, Gibbs HL, Hobson KA (2000) Phylogeography and genetic structure of northern populations of the yellow warbler (*Dendroica petechia*). *Molecular Ecology*, **9**, 667–681.

Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **31**, 533–563.

Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969–3982.

Maldonado-Coelho M (2012) Climatic oscillations shape the phylogeographical structure of Atlantic forest fire-eye antbirds (Aves: Thamnophilidae). *Biological Journal of Linnean Society*, **105**, 900–924.

Martins FM, Templeton AR, Pavan ACO, Kohlbach BC, Morgante JS (2009) Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 294.

Newman RA, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*, **10**, 1087–1100.

Nylander JAA (2004) MrModeltest v2.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Nunes I, Pombal-Jr JP (2010) A new *Scinax* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest remains of southern State of Bahia, north-eastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, **31**, 347–353.

Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, **17**, 230–237.

Ribas CC, Aleixo A, Nogueira ACR, Miyaki CY, Cracraft J (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society*, **279**, 681–689.

Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2010) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46–57.

Rodríguez A, Börner M, Pabijan M, Gehara M, Haddad CFB, Vences M (2015) Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. *Evolutionary Ecology*, **29**, 765–785.

Ronquist F, Teslenko M, van er Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, **61**, 539–542.

Scheffers BR, Edwards DP, Diesmos A, Williams SE, Evans TA (2014) Microhabitats reduce animal's exposure to climate extremes. *Global Change Biology*, **20**, 495–503.

Sequeira F, Alexandrino J, Weiss S, Ferrand N (2008) Documenting the advantages and limitations of different classes of molecular markers in a well-established phylogeographic context: lessons from the Iberian endemic Golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**, 371–387.

Spinks PQ, Shaffer HB (2009) Conflicting Mitochondrial and Nuclear Phylogenies for the Widely Disjunct Emys (Testudines: Emydidae) Species Complex, and What They Tell Us about Biogeography and Hybridization. *Systematic Biology*, **58**, 1–20.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly PA (2001) New statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, **68**: 978–989.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, **306**, 1783–1786.

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.

Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera FA, Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **55**, 1018–1031.

Tonini JFR, Costa LP, Carnaval AC (2013) Phylogeography structure is Strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistributions models, not always. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **51**, 114–121.

Vallinoto M, Araripe J, Rego PS, Tagliaro CH, Sampaio I, Schneider H (2006) Tocantins river as na effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. *Genetics and Molecular Biology*, **29**, 215–219.

Vanzolini PH, Williams HH (1970) South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, **19**, 1–298.

Vences M, Wake DB (2007) Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian Biology*, v.6, Systematics (ed. by H. H. Heatwole and M. Tyler), pp. 2313–2669. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, NSW.

Vences M, Kosuch J, Glaw F, Böhme W, Veith M (2003) Molecular phylogeny of hyperoliid treefrogs: biogeographic origin of Malagasy and Seychellean taxa and re-analysis of familial paraphyly. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **41**, 205–215.

Wang IJ, Crawford AJ, Bermingham E (2008) Phylogeography of the Pygmy Rain Frog (*Pristimantis ridens*) across the lowland tropical forests of Isthmian Central America. *Molecular Phylogenetic Evolution*, **47**, 992–1004.

Wynn A, Heyer WR (2001) Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the Neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae). *Tropical Zoology*, **14**, 255–285.

Zeisset I, Beebee TJC (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, **101**: 109–119.

Zhang H, Yan J, Zhang G, Zhou K (2008) Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog population (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, e21.

CAPÍTULO II

Este capítulo apresenta o manuscrito intitulado “**Another new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil**” e já foi submetido para publicação no periódico científico internacional **Zootaxa**, classificada como **B1** no sistema Qualis da Capes. Os resultados aqui discorridos, assim como a discussão e conclusões derivadas, decorrem do desenvolvimento da presente tese. Os critérios de redação e formatação seguem as normas deste periódico.

Another new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil

VICTOR G. D. ORRICO^{1*} & EUVALDO MARCIANO JR.²

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil. E-mail: victordill@gmail.com. Corresponding author.

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil.

Abstract

A new species of the genus *Phyllodytes* is described from Una (15° 16.174'S, 39° 4.165'W), State of Bahia, in the Atlantic Rain Forest of Northeastern Brazil. *Phyllodytes* “UNA 1” **sp. nov.** is characterized by its small size for the genus (SVL 20.7-22.7 mm in males); semicircular snout in dorsal view, vertical in lateral view; odontoids moderately developed (in comparison with other species of the genus); vocal sac externally visible; eyes large and prominent; dorsum shagreened, homogenously cream, except for a few scattered spots and blotches; venter areolate with two parallel, paramedial lines of larger tubercles; few tubercles in the ventral surface of thighs being the most medial tubercle slightly larger; tibio-tarsal articulation with a large tubercle; nuptial pad rounded, moderately expanded.

Key words: Amphibia. Hylidae. Southern Bahia. *Phyllodytes* “UNA” sp. nov. Taxonomy.

Introduction

The genus *Phyllodytes* Wagler, 1830 includes 11 species distributed in the Brazilian Atlantic Forest from the state of Espírito Santo extending north up to the state of Paraíba and from the coastline, extending west to the state of Minas Gerais (Bokermann 1966; Cruz *et al.* 2006). However, there are records of *Phyllodytes luteolus* (Wied, 1824) in the city of Rio de Janeiro dating back to the decade of 1920; types of *Lophyohyla piperata* Miranda-Ribeiro, 1923, a junior synonym of *P. luteolus* (and Bokermann 1966; synonymy by Lutz 1954) are from this locality. Both Lutz (1954) and Bokermann (1966) doubted that the city of Rio de Janeiro was part of *P. luteolus* natural range. Izecksohn and Carvalho-e-Silva (2001) and Salles and Silva-Soares (2010)

suggested that *P. luteolus* was in fact an invasive species, introduced in Rio de Janeiro by bromeliads trade.

Amphodus auratus Boulenger, 1917 is endemic of Trinidad and Tobago (Bokermann 1966; Kenny 1969). Although formerly recognized as a member of the genus *Phyllodytes*, recently, this species was found to leave the genus *Phyllodytes* paraphyletic in respect to all other genera of Lophiohylini and a new genus (*Phytotriades* Jower, Downie & Cohen, 2008) was erected to allocate this species (Jowers *et al.* 2008); so far only sequences of *auratus*, *luteolus* and an unnamed species (voucher MRT6144; AY843722) are available in GenBank. Although the recognition of *Phytotriades* has not been universal (e.g., Pyron & Wiens 2011), we follow Frost (2014) recognizing it.

Six of the eleven *Phyllodytes* species are found in Southern Bahia (*P. kaustki*, *P. luteolus*; *P. maculosus*, *P. melanomystax*; *P. tuberculosus*; *P. wuchereri*); if this geographic proximity is a reflection of a phylogenetic history, it is still to be discovered. This region has been called the “Hilea bahiana” due to its singular and rich flora and fauna historically more related to the Amazon than to the remaining Atlantic Forest (Caramaschi *et al.* 2013; Costa 2003; De Sa *et al.* 2012; Fouquet *et al.* 2012; Izecksohn & Peixoto 1981). Our field trips to Una, a locality in the “Hilea bahiana”, recovered specimens of a new species of *Phyllodytes* that is described here.

Material and Methods

Specimens used in the description or examined for comparisons are deposited in the collections of the Museu Nacional, Rio de Janeiro, RJ, Brazil (MNRJ), Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil (MZUESC), Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, SP, Brazil (MZUSP), and Célio F. B. Haddad Collection, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brazil (CFBH). Comparative specimens examined are listed in the Appendix. Specimens collected for this manuscript were collected under IBAMA #12920-1 and ICMBIO #13708-1 permits.

Abbreviations used for measurements of adult specimens are SVL (snout-vent length), HL (head length), HW (head width), IND (internarial distance), END (eye-nostril distance), ED (eye diameter), IOD (interorbital distance), TD (tympanum diameter), THL (thigh length), TBL (tibia length), tarsus length (TAL), FL (foot length), and hand length (HAL). All measurements are in millimeters and were made with digital callipers under a stereo dissecting microscope; measurements followed Duellman (1970) and Napoli (2005) with the exception of IOD that was measured between the anterior corners of the eyes in order to enhance repeatability. Snout profile terminology followed Heyer *et al.* (1990). Webbing formula notation followed the method of Savage & Heyer (1997) although finger notation follow Fabrezi (1992).

We sequenced three mitochondrial genes—12S+TrNA Valine+16S (partial) — using the same primers of Faivovich *et al.* (2005). Resulting sequences were compared with available ones deposited in GenBank (###accession number to be deposited upon

acceptance of the manuscript) and are identical to *Phyllodytes* sp. (AY843722; voucher MRT6144) sequences of Faivovich *et al.* (2005).

Results

Phyllodytes “UNA 1” sp. nov.

(Figs 1 and 2)

Phyllodytes sp. — Faivovich *et al.* (2005); Jowers *et al.* (2008).

Holotype. CFBH 23671, adult male (Fig. 1), collected at Una (15° 16.174'S, 39° 4.165'W), State of Bahia, Northeastern Brazil, on 8 June 2009, by Adriano B. Kury, Amazonas Chagas Jr., Alessandro Giupponi, Denis R. Pedroso, and Victor G. D. Orrico.

Paratypes. MZUESC 11610–11612, adult males, collected at the type locality, on 18 February 2012, by Euvaldo Marciano-Jr, Paulo Henrique Ribeiro and Leandro Oliveira.

Diagnosis. A member of the genus *Phyllodytes*, by possessing fang-like odontoids; molecular data also supports the placement of *P.* “UNA 1” as sister taxon of *P. luteolous* (see Faivovich *et al.* 2005 and Jowers *et al.* 2008). A small-sized species (SVL 22.4 mm in male) characterized by: (1) dorsum of body, arms, and legs cream with scattered dark brown spots; (2) a dark brown stripe extending on the eyes, reaching the tympanum; (3) snout short, semicircular in dorsal view, vertical (or truncated) in profile; (4) vomerine teeth in two dense patches, disposed in a transverse plane, behind the choanae; (5) one anterior, larger, and two-three small odontoids on each side of the mandible; (6) dorsal skin smooth; (7) vocal sac externally visible; (8) venter shagreened with two paramedial rows of developed tubercles; (9) few tubercles in the ventral side of the thighs, the most medial more developed; (10) a tubercle at the tibio-tarsal articulation; (11) unpigmented nuptial pad visible, rounded, moderately expanded, (12) distal subarticular tubercle on finger IV divided.

Comparison with other species. By its small size, *Phyllodytes* “UNA 1” is distinguished from all its congeners, except from *P. punctatus* (SVL 18.2–22.8 mm; Caramaschi & Peixoto, 2004). It differs further by its semicircular snout in dorsal view; except from *P. tuberculosus*. Traits of *P.* “UNA 1” in parenthesis: From *P. acuminatus*, *P. brevirostris*, *P. edelmoi*, *P. kautskyi*, *P. luteolus* and *P. melanomystax* by the immaculate dorsum (spots and blotches on dorsum). It differs also from *P. acuminatus*, *P. brevirostris*, *P. edelmoi*, *P. gyrinaethes*, *P. luteolus*, *P. maculosus*, *P. punctatus*, *P. tuberculosus* and *P. wuchereri* by the presence of well-developed round tubercles at thigh insertion (tubercles absent). From *P. gyrinaethes* by the hidden tympanum

(distinct). From *P. luteolus* it is distinguished by the absence of rows of tarsal tubercles (single tubercle present), the mucronate snout in dorsal view (semicircular) and acute in lateral view (vertical); rows of tubercles in the forearm (absent); various rows of developed tubercles in the venter (only the two paramedial are well-developed); presence of a conspicuous external metatarsal tubercle (inconspicuous). Additionally *Phyllodytes "UNA I"* is promptly distinguished from *P. melanomystax* by the absence of a large dark brown stripe on the snout and canthus rostralis (absent in *P. "UNA I"*).

Description of holotype. Head wider than long (HL 78 % of HW; HW 38.8 % of SVL; HL 30.3 % of SVL); snout semicircular in dorsal and lateral views (Fig. 1; 2); nostrils small, rounded, not protuberant, situated dorsally and directed anteriorly, nearer to the tip of snout than to eye; internarial distance smaller than eye-nostril distance (IND 52.4 % of END), eyes large (ED 50 % of HL; 39 % of HW; 162 % of END), prominent, situated laterally, directed anterolaterally; interorbital space and dorsum of snout flat; canthus rostralis distinct, rounded; loreal region oblique, slightly concave; tympanum evident, relatively large (TD 20.6 % of HL), nearly circular, separated from posterior border of eye by approximately one half of the diameter of tympanum; tympanum diameter larger than internarial distance (TD 127.3 % of IND, eye to nostril distance (TD 41.5 % of END), eye diameter (TD 41.2 % of ED), and interorbital distance (TD 33.1 % of IOD); tympanic annulus evident; supratympanic fold developed, covering dorsal edge of tympanum, nearly straight, slightly curved downwards and extending until the insertion of arm; vocal sac externally poorly developed, subgular, single; vomerine teeth forming straight line behind small, rounded, widely separated choanae; each side of mandible with three, subequal odontoids; pupil horizontal; tongue small, rounded, slightly free and not notched behind.

Forelimbs not hypertrophied, forearms slightly larger (in cross-section) than arms; no tubercle or ornamentation. Hands large (HAL 97 % of HL), outer and inner carpal tubercles developed, elliptical; fingers not webbed, small fringe present between fingers III and IV, and IV and V; fingers in crescent order of size, II < V < III < IV; adhesive discs developed (adhesive discs diameter approximately two times finger width), transversally elliptical; discs on fingers II and III smaller than on fingers IV and V; prepollex indistinct; nuptial pad on the internal base of the finger I, no dark nuptial excrescence although a thin translucent layer can be seen; subarticular tubercles large, rounded, single; no supernumerary tubercles.

Hind limbs long (THL+TBL+TAL+FL equals 162.5 % SVL, not hypertrophied; thigh length smaller than tibia length (THL 88.7 % of TBL; THL 45.5 % of SVL; TBL 51.3 % of SVL); sum of thigh and tibia lengths smaller than SVL (THL+TBL 96.8 % of SVL); a large tubercle on posteroventral internal margin of tarsus, near to the junction with shank. Tarsal length smaller than foot length (TAL 75 % of FL). Foot length smaller than thigh and tibia lengths (FL 82.3 % of THL; FL 73 % of TBL). Plantar surface without supernumerary tubercles; inner metatarsal tubercle large, rounded; outer metatarsal tubercle small, inconspicuous; toes fringed; discs on toe I, smaller than of other toes; plantar formula, I 0⁺ – 2½ II 1 – 2 III 1½ – 2½ IV 3½ – 2 V.

Dorsal surfaces shagreen, specially dorsum; calcar appendage and supra-cloacal crest absent. Venter and ventral surfaces of thighs warty, each thigh with a larger mesal pericloacal tubercle; remaining ventral surfaces smooth.

Measurements of holotype (mm). SVL 22.4; HL 6.8; HW 8.7; IND 1.1; END 2.1; ED 3.4; IOD 4.5; TD 1.4; THL 10.2; TBL 11.5; TAL 6.3; FL 8.4; HAL 6.6.

Color of holotype. In preservative—dorsum uniformly creamy white with minute dark flecks, more densely distributed anteriorly than posteriorly in a gradation, larger (yet small) brown spots behind the head, not forming any pattern also; wide dark brown stripe on snout, canthus rostralis, and dorsolaterally on body; anterior and posterior members with the same minute flecked pattern of dorsum; all ventral surfaces white, with the exception of a few minute dark flecks in the mental region and the undersides of the jaws, palmar, plantar and tarsal surfaces.

Variation. The type specimens are alike in morphological traits. Paratypes have a lateral dark brown stripe extending from the eyes to the flanks. Variation in measurements is presented in Table 1.

Etymology. The specific epithet will make an allusion to the occurrence of the new species in the area of Una municipality in Bahia state. “Una” means “black” in the Tupi-Guarani language and the city, by its turn, is named in allusion to the color of the river that crosses it. Obliquely it also honors the Biological Reserve (REBIO) of Una that protects the incredibly diverse fauna and flora of the region.

Discussion

The known diversity of *Phyllodytes* has been constantly increasing, mostly due to the review of material previously assigned to already known species (e.g., Cruz *et al.* 2006). Interestingly, the bulk of *Phyllodytes* diversity is in Northeastern Brazil, mainly associated with the “Hileia Bahiana”; the lowland forests of northern Espírito Santo state and southern Bahia state (Andrade-Lima 1966; Izecksohn & Peixoto 1981; Nemésio 2012). Species not occurring in this area are usually found in moist forest remnants within the dry Caatinga biome, possibly.

A systematic understanding of the group has not followed this taxonomic uprising. Caramaschi *et al.* (2004) suggested a phenetic group to cluster *auratus* and *wuchereri*. Although only three species of *Phyllodytes sensu lato* have been used in cladistic analyses, the recognition of *Phytotriades* renders this arrangement problematic. Roberto and Ávila (2013) suggested a new infrageneric arrangement based on advertisement call data instead of morphological ones as previously done (see Caramaschi *et al.* 2004). Roberto and Ávila (2013) suggested to group species based on unpulsed or multipulsed advertisement calls. Although proposed outside a phylogenetic

framework, this grouping carries a clear homology proposal (see Robillard *et al.* 2006 characters A1 and M1). Roberto and Ávila (2013) left most species unassigned but subsequent contributions used their proposal as an indicator for taxonomic purposes (Cruz *et al.* 2014; Magalhães *et al.* 2015). Unfortunately, given the unknown historical relationships within *Phyllodytes* and that the advertisement call of *P.* “*UNA 1*” remains unknown, it is not possible to assign it to any group so far.

Acknowledgements

We thank J. Vörös, R. Pacheco, R. Oliveira and C. Oliveira for aiding with images. J. Faivovich for the substantial comments on previous versions of this manuscript. A. Argolo and C. F. B. Haddad for allowing the access to specimens under their care. VGDO thanks FAPESP (#07/57067-9) and Rede Bahiana de Diversidade de Anfíbios for partially funding this project.

References

- Andrade-Lima, D. (1966) Vegetação. In: IBGE (Ed.) *Atlas Nacional do Brasil*. Conselho Nacional de Geografia, Rio de Janeiro, pp.
- Bokermann, W.C.A. (1966) O gênero *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38, 335-344.
- Boulenger, G.A. (1917) On a second species of the batrachian genus *Amphodus*. *Annals and Magazine of Natural History*, ser. 8, 20, 184-185.
- 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.
- Caramaschi, U., Peixoto, O.L. & Rodrigues, M.T. (2004) Revalidation and redescription of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional - Nova Série, Zoologia*, 62, 185-191.
- Costa, L.P. (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, 30, 71-86.
- Cruz, C.A.G., Feio, R.N. & Cardoso, M.C.S. (2006) Description of a new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Amphibia, Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest of the State of Minas Gerais and Bahia. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64, 321-324.
- Cruz, D., Marciano-Jr, E. & Napoli, M.F. (2014) Advertisement and courtship calls of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Anura: Hylidae) *Zootaxa*, 3774, 097–100.
- De Sá, R.O., Streicher, J.W., Sekonyela, R., Forlani, M.C., Loader, S.P., Greenbaum, E., Richards, S.J. & Haddad, C.F.B. (2012) Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. *BMC Evolutionary Biology*, 12,
- Duellman, W.E. (1970) Hylid frogs of Middle America. *Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas*, 1-2, 1-753.
- Fabrezi, M. (1992) El carpo de los anuros. *Alytes*, 10, 1-29.

- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1-240.
- 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.
- Frost, D. (2014) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Vol. 2014. American Museum of Natural History, New York
- 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.
- Izecksohn, E. & Carvalho-e-Silva, S.P.d. (2001) *Anfibios do Município do Rio de Janeiro*. Editora UFRJ, Rio de Janeiro, pp.
- Izecksohn, E. & Peixoto, O.L. (1981) Nova espécie de *Proceratophrys*, da Hiléia Bahiana, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 41, 19-24.
- Jowers, M.J., Downie, J.R. & Cohen, B.L. (2008) The Golden Tree Frog of Trinidad, *Phyllodytes auratus* (Anura: Hylidae): systematic and conservation status. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 43, 181–188.
- Kenny, J.S. (1969) The Amphibia of Trinidad. *Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands XXIX*, 29, 1-78.
- Lutz, B. (1954) Anfíbios anuros do distrito Federal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 52, 155-238.
- Magalhães, F.d.M., Juncá, F.A. & Garda, A.A. (2015) Tadpole and vocalisations of *Phyllodytes wuchereri* (Anura: Hylidae) from Bahia, Brazil. *Salamandra*, 51, 83–90.
- Miranda Ribeiro, A.d. (1923) As *Phyllomedusas* do Museu Paulista. *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 1, 3-6.
- Napoli, M.F. (2005) A new species allied to *Hyla circumdata* (Anura: Hylidae) from Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. *Herpetologica*, 61, 63-69.
- Nemésio, A. (2012) The western limits of the “Hileia Baiana” for orchid bees, including seven new records for the state of Minas Gerais, eastern Brazil. *Spixiana*, 35, 109-116.
- Pyron, R.A. & Wiens, J.J. (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 543-583.
- Roberto, I.J. & Ávila, R.W. (2013) The advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Peixoto, Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae). *Zootaxa*, 3669, 193–196.
- Robillard, T., Höbel, G. & Gerhardt, H.C. (2006) Evolution of advertisement signals in North American hylid frogs: vocalizations as end-products of calling behavior. *Cladistics*, 22, 533–545.
- Salles, R.d.O.L. & Silva-Soares, T. (2010) *Phyllodytes luteolus* (Anura, Hylidae) as an Alien Species in the Rio de Janeiro municipality, State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Herpetology Notes*, 3, 257-258.
- Savage, J.M. & Heyer, W.R. (1997) Digital webbing formulae for amphibians: a refinement. *Herpetological Review*, 28, 131.

- Wagler, J. (1830) *Natürliches System der Amphibien : mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vögel: ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie*. Cotta'schen, München, vi + 352 pp.
- Wied-Neuwied, M.z. (1824) *Abbildungen zur Naturgeschichte Brasiliens*. Landes-Industrie-Comptoir, Weimar, pp.

Appendix

Additional specimens examined (all from Brazil; names in bold are second-level geographic units.). For acronyms, see text.

Phyllodytes edelmoi: **Alagoas**, Maceió (CFBH 22583–22586, 38358, 39199).

Phyllodytes kautskyi: **Espírito Santo**, Linhares (CFBH 38358; 39199).

Phyllodytes luteolus: **Bahia**, Caravelas (MZUESC 9888; 9891–9893); Ilhéus (CZGB 735–737; 741); Itaúnas (MZUESC 9782–9783); **Espírito Santo**, Conceição da Barra (CFBH 4163–4164); Guarapari (CFBH 583; 890; 891–896; 22462–25065; 33354; 35254–35259; 37236); Linhares (CFBH 19442; 38303; 38307–38315; 38319); Marataízes (CFBH 19489); Sooretama (CFBH 14924; 14930; 14954–14956); Vila Velha (CFBH 35531); Vitória (5386; 32215).

Phyllodytes maculosus: **Bahia**, Uruçuca (CFBH 38974).

Phyllodytes melanomystax: **Bahia**, Aurelino Leal (CFBH 18739; 18770); Ilhéus (CFBH 34084; 35707; 35725; 38968; MZUESC 598; 7300; 7502; 11669; 14245–14247); Itacaré (CFBH 28003); Uruçuca (CFBH 13263–13264; 32398; 34018; MZUESC 7560).

Phyllodytes tuberculatus: **Bahia**, Itamarajú (MZUESC 10522–10532); Maracás (CFBH 19341).

Phyllodytes wuchereri: **Bahia**, Camacan (CFBH 32098–32100; MZUESC 8134; 8319; 9052; 11674).

Table 1. Range, mean, and standard deviation (SD) of the measurements (mm) of the type specimens of *Phyllodytes* “*UNA 1*” sp. nov. (n = 04 adult males).

Characters	Range	Mean	SD
SVL	20.7-22.7	22.0	0.89
HL	6.7-7.3	6.9	0.28
HW	8.1-8.8	8.5	0.30
IND	1.1-1.2	1.2	0.05
END	1.4-2.1	1.6	0.34
ED	2.4-3.4	2.8	0.43
IOD	4.5-6.6	5.9	0.96
TD	1.3-1.4	1.3	0.07
THL	8.7-11.2	10.2	1.05
TBL	10.8-11.6	11.4	0.38
TAL	5.8-6.5	6.2	0.29
FL	7.7-8.6	8.3	0.39
HAL	5.8-6.6	6.2	0.33

CAPTIONS FOR FIGURES

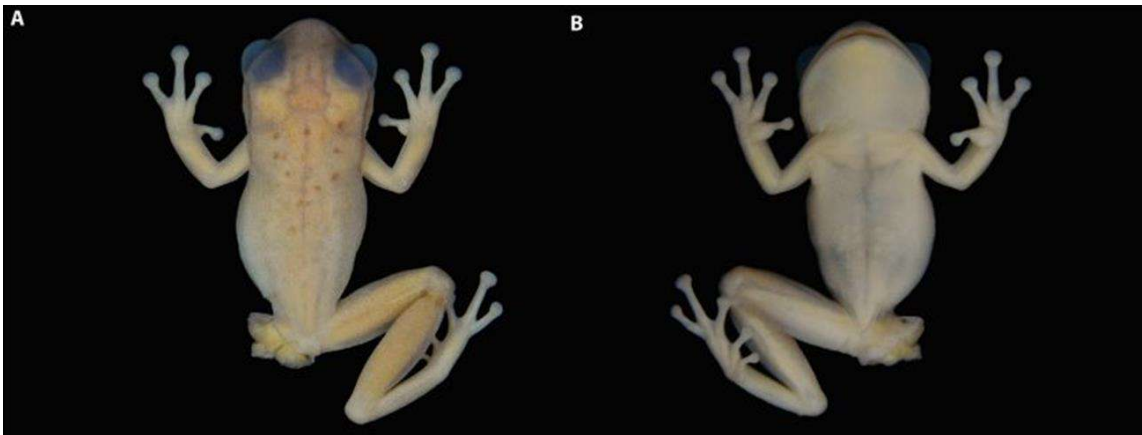


Figure 1. *Phyllodytes "UNA 1"* sp. nov., holotype (CFBH 75468; SVL 20.6 mm), dorsal and ventral views.

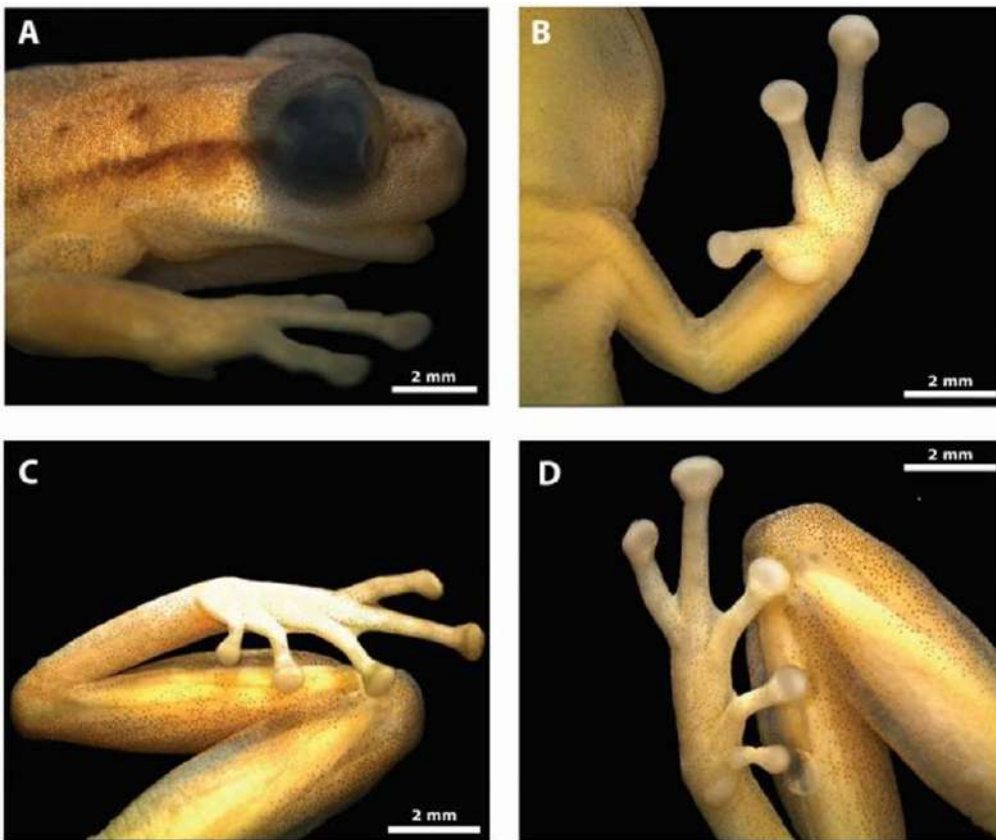


Figure 2. *Phyllodytes "UNA 1"* sp. nov., holotype (CFBH 75468; SVL 20.6 mm). A) Lateral view of the head (Right side); B) Plantar view of the left hand; C) Right hindlimb (notice the tubercle near the heel); D) Plantar view of the right foot.

MANUSCRITO PARA APRECIACÃO

CAPÍTULO III

Este capítulo apresenta o manuscrito intitulado “**A new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest of southern Bahia, Brazil.**” que será submetido para publicação no periódico científico internacional **Zootaxa**, classificado como **B1** no sistema Qualis da Capes. Os resultados aqui discutidos, assim como a discussão e conclusões derivadas, decorrem do desenvolvimento da presente tese. Os critérios de redação e formatação seguem as normas deste periódico.

A new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest of southern Bahia, Brazil.

EUVALDO MARCIANO-JR^{1,4}, AMANDA SANTIAGO F. LANTYER-SILVA² & MIRCO SOLÉ³

¹*Graduate Program in Ecology and Biodiversity Conservation, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil. E-mail: euvaldo.marciano@gmail.com*

²*Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Avenida 24 A, 1515, ZIPCODE: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.*

³*Department of Biological Science, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil.*

⁴**Corresponding author:** euvaldo.marciano@gmail.com

Abstract

We describe a new species of *Phyllodytes* from Ilhéus (15°04'S, 39°03'W; 95 m above sea level) southern Bahia, in the Atlantic Rain Forest of Northeastern Brazil. *Phyllodytes* “Acuípe” sp. nov. is diagnosable by the combination of characters as follows: (1) dorsum of body, arms, and legs uniformly light brown; (2) flanks yellow; (3) snout pointed in dorsal view, protruding in profile; (4) tympanum large with remarkable tympanic annulus; (5) two anterior distinct, larger, and a series of indistinct each other, smaller odontoids on each side of the mandible; (6) well-developed tubercle near tibio-tarsal articulation; (7) advertisement call composed by a series of 12 to 19 unpulsed notes with harmonic structure and (8) mean dominant frequency 3.685 kHz.

Introduction

Phyllodytes is a genus of anuran amphibians characterized by the presence of odontoids on the mandible and on the cultriform process of the parasphenoid (Peters “1872” [1873]). Currently the genus comprises eleven species distributed in the Atlantic Forest morphoclimatic domain of easternmost Brazil (Frost 2016), mainly in the State of Bahia, where it also occurs in xeric environments (Bokermann 1966). All known *Phyllodytes* have an intimate relation with bromeliads and they spend all or most of

their life inside this phytothelms, including their larval phase. Due to this peculiar life history they are often undersampled during rapid amphibian assessments as researcher mostly focus on ponds and rivers, where most amphibian species gather during the breeding season to mate. The scarcity of studies focusing on phytothelm breeders has led to a poor knowledge of the species of the genus *Phyllodytes* regarding taxonomical, ecological and phylogenetic data.

As an attempt to solve part of these knowledge gaps in the genus *Phyllodytes*, Peixoto *et al.* (2003), followed by Caramaschi *et al.* (2004) proposed its organization in three phenetic groups based on color patterns. Faivovich *et al.* (2005) followed this classification, though these authors stated they were not aware of any possible synapomorphy for these species groups. Further, considering the relevance of acoustic features for anuran taxonomy and phylogeny (Blair 1958, Goicoechea *et al.* 2010), Roberto & Ávila (2013) proposed a rearrangement of the previously established groups (Peixoto *et al.* 2013, Caramaschi *et al.* 2004, Faivovich *et al.* 2005). They established just two groups that included the five species whose advertisement calls descriptions were available by that time: *Phyllodytes kautskyi* and *P. melanomystax* in the group of *P. kautskyi*, and *P. edelmoi*, *P. gyrinaethes* and *P. luteolus* in the group of *P. luteolus*. The other species remain ungrouped.

Herein, we describe a new species of *Phyllodytes* from southern Bahia, its advertisement call and present notes on its habitats and habits.

Material and Methods

Morphometrics. Specimens used in the description or examined for comparisons are deposited in the collections of the Museu de Zoologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil (MZUESC), and the Museu de Zoologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil (MZUFBA). Abbreviations used in the account are: SVL (snout-vent length), HL (head length), HW (head width), END (eye-nostril distance), ED (eye diameter), UEW (upper eyelid width), TD (tympanum diameter), THL (thigh length), TL (tibia length), and FL (foot length). All measurements are in millimeters and follow Duellman (1970) and Heyer *et al.* (1990). Webbing formula notation follows Savage & Heyer (1967) modified by Myers & Duellman (1982).

Bioacoustics. Advertisement calls from a male (MZUFBA 14088, SVL 21.30mm) inside an epiphytic bromeliad (~3 meters above ground) were recorded on July 18th 2013 (air temperature 22.6° C, air humidity 87%) with a Sennheiser ME45 unidirectional microphone attached to a Marantz PMD 660 digital recorder. The microphone was placed at a distance of ca. 20 cm from the recorded specimen. Calls were analyzed with a sampling frequency of 48 kHz and sample size of 16 bits. Temporal and spectral parameters of calls were analyzed using the Raven Pro 1.4 software. Spectrograms were obtained with a FFT (Fast Fourier Transformation) length of 256 points, 75% overlap, window Hamming. Our terminology for call descriptions follows Duellman & Trueb (1994).

Results

Phyllodytes “*Acuipe 1*” sp. nov.

Holotype: MZUFBA 14088, adult male collected in an epiphytic bromeliad in a Restinga area of the Boa União Reserve (15°04’S, 39°03’W; 95 m above sea level), municipality of Ilhéus, State of Bahia, August 8th 2013 by E. Marciano-Jr, M. Solé, and H.R. Silva.

Paratopotypes: MZUESC (n° ainda indisponíveis) adult males, collected on August 18th 2013, by E. Marciano-Jr, M. Solé and A.S.F. Lantyer-Silva.

Diagnosis. A small sized species (SVL 21.3 – 23.7 mm in male) characterized by: (1) dorsum of body, arms, and legs uniformly light brown; (2) a dark brown stripe extending from the posterior corner of the eyes, upper contour of the tympanum, and reaching the inguinal region; (3) flanks yellow; (4) snout pointed in dorsal view, protruding in profile; (5) tympanum large with remarkable tympanic annulus; (6) supratympanic fold well marked extending to shoulder; (7) vomerine teeth in two dense patches almost unified, horizontally disposed, behind the choanae; (8) two anterior distinct, larger, and a series of indistinct each other, smaller odontoids on each side of the mandible; (9) dorsal skin slightly rough; (10) Venter cream with two paramedial rows of developed tubercles paralleled with rows of indistinct ones; (11) well-developed tubercle near tibio-tarsal articulation.

Comparisons with other species. The dorsal color pattern (immaculate brown) distinguishes *Phyllodytes* “*Acuipe 1*” sp.nov. from *P. gyrinaethes*, *P. melanomystax*, *P. punctatus*, *P. tuberculosus*, *P. wuchereri* and *P. maculosus* (all have some kind of dorsal pattern). The absence of distinct lateral stripes distinguishes *P. “Acuipe 1”* sp. nov. from *P.kautskyi* and *P. luteolus*. The yellow groin distinguishes *P. “Acuipe 1”* sp.nov. from all species of *Phyllodytes* (red groin in *P. gyrinaethes* and with no color in all remaining species). The small size (< 24 mm in males) separates *P. “Acuipe 1”* sp. nov. from *P. kautskyi* (> 39 mm) and *P. maculosus* (> 39 mm in males). Two large anterior odontoids on each side of the mandible distinguishes *P. “Acuipe 1”* sp. nov. from *P. edelmoi*, *P. kautskyi*, and *P. punctatus* which possess only one large odontoid, and from *P. brevirostris* and *P. melanomystax* that have no large odontoid.

Description of holotype. Body robust. Head wider than long, its width overtakes the body width; snout pointed in dorsal view, protruding in profile. Nostril small, elliptical, slightly directed posterodorsally; canthus rostralis distinct, mainly near the eyes; loreal region oblique, not concave; eyes large, directed anterolaterally. Eye diameter 30.7% (29.1–32.7%) of head length; interorbital space and dorsum of snout flat; tympanum large, distinct and round; its diameter is 18.7% of head length and 61.1% of eye diameter; supratympanic fold distinct, covering upper quarter of tympanum. Vocal sac subgular, poorly developed; vocal slits near angle of jaws, at posterior border of tongue; tongue large, almost cordiform, fixed behind; two groups of vomerine teeth, almost uninterrupted in straight line behind and between choanae; each

side of mandible with two large odontoids, remaining odontoids small, discrete; horizontal pupil divides the iris in two parts, dorsal and ventral ones.

Forearms slightly more robust than upper arms; fingers slender, relative lengths I < II = IV < III; subarticular tubercles discrete, round; supernumerary tubercles few, small, low; palmar and thenar tubercles well developed, the first one spatulate, projecting laterally, triangulated; the later elongate, elliptical; discs of fingers well developed, diameter of third finger disc 44.4% (44.4–46%) of eye diameter; webbing absent between fingers I and II, very reduced between fingers II–III–IV.

Legs slender; tibia longer than thigh; sum of thigh and tibia lengths 98,6% (98,5–105,4%) of SVL. Foot with distinct, round subarticular tubercles; supernumerary tubercles few, round, low; inner metatarsal tubercle ovoid, spatulate, projecting laterally; outer metatarsal tubercle round; a row of distinct tubercles on the outer margins of tarsus; toes slender, relative lengths I < V < II < III < IV; discs on toes almost equal in size to discs of fingers; webbing absent between toes I–II; webbing formula I – II 2⁺ – 3⁻ III 2⁺ – 3⁺ IV 3 – 2⁺ V.

Dorsal surfaces of body shagreen, less so on limbs, venter, throat, and ventral surface of thighs; two medial indistinct series of round tubercles, accompanied by a few others, dispersed over venter; two distinct round tubercles at insertion of thigh. Ventral surface of forelimbs smooth.

Color in preservative. Dorsum, dorsal surface of limbs brown. A brown stripe behind the eyes, passing over the supratympanic fold and reaching the flanks. The color fades until it reach the flanks. Ventral body and limbs surfaces cream.

Color in life. Dorsum of body uniformly brown; laterally, a dark brown stripe crossing the eye, tympanum, and reaching the inguinal region; venter white; upper half of the iris yellow or reddish and lower one yellow. Inguinal region yellow.

Variation. The type specimens present little variation in morphological aspects and color pattern.

Etymology. The specific name will be presented when of the submission for publication.

Natural History. We found *P. "Acuipe 1"* in syntopy with other *Phyllodytes* spp (*P. maculosus*, *P. melanomystax*, and other two undescribed species) at the type locality. Yet, the former can be heard calling from bromeliads at heights of two to more than 20 meters, while the remaining species (except *P. maculosus*) call from bromeliads at ground or in lower heights.

Advertisement call. The advertisement call of *Phyllodytes "Acuipe 1"* sp. nov. is composed by a series of 12 to 19 unpulsed notes (n=11 calls analyzed) with harmonic structure. First notes were shorter than the following ones that are more intense. The mean duration of each call is 4.049 ± 1.359s (3.201–8.106s; n=11 calls) emitted in intervals of 36.599 ± 7.692s (26.221–47.578s; n= 8 intervals). The notes present mean duration of 0.018 ± 0.003s (0.010–0.040s; n=132 notes) and are emitted at intervals of 0.349 ± 0.097s (0.130–0.618; n= 121 intervals). The mean dominant frequency is 3.685 ± 0.750 kHz (1.875–4.313 kHz; n=132 notes analyzed).

Comparisons with other species. *Phyllodytes* “*Acuipe 1*”, as the majority of the species within the genus *Phyllodytes*, presents calls with more than one note. Out of the nine species whose advertisement call is available only *P. acuminatus* and *P. melanomystax* present calls with one note. By its unpulsed structure the call of *P. “Acuipe 1”* sp. nov. is promptly distinguished from the pulsed calls of *P. luteolus*, *P. edelmoi*, *P. tuberculosus*, *P. gyrinaethes* and *P. wuchereri*. Among the other species of *Phyllodytes* with unpulsed structure *P. “Acuipe 1”* sp. nov. can be distinguished from *P. kautskyi* by the higher dominant frequency [3.68 kHz (1.87 – 4.31) vs. 1.37 kHz (0.87 – 1.81) in *P. kautskyi* from first description]. After the original description of the advertisement call from *P. kautskyi* by Simon & Gasparini (2003), Simon & Peres (2012) presented additional bioacoustic details for populations of *P. kautskyi* from southern Bahia. However, there are evidences that lead us to conclude that the studied populations could be actually assigned to *P. maculosus* (Marciano-Jr *et al.* in prep). Thus, the differences assigned to polymorphisms in the Bahian population of *P. kautskyi* would represent diagnostic features of *P. maculosus*.

The lower number of note per call in *P. “Acuipe 1”* sp. nov. (10–19) distinguishes it from *P. kautskyi* (21–22; Simon & Gasparini 2003; Simon & Peres 2012), *P. tuberculosus* (14–23; Juncá *et al.* 2012) and *P. edelmoi* (22–29; Lima *et al.* 2008). By the higher number, *P. “Acuipe 1”* sp. nov. can be distinguished from *P. gyrinaethes* (4–6; Roberto & Ávila 2013) and *P. luteolus* (8–15; Weygoldt 1981). The higher call duration in *P. “Acuipe 1”* sp. nov. 4.06 ± 1.36 (3.20–8.11) distinguishes it from *P. acuminatus* (0.03–0.17; Campos *et al.* 2014), *P. melanomystax* (0.07 ± 0.04 ; Nunes *et al.* 2007), *P. kautskyi* (3.55 ± 0.19 ; Simon & Gasparini 2003; 3.48–3.90 in Simon & Peres 2012), *P. gyrinaethes* (1.7 ± 0.3 ; Roberto & Ávila 2013) and *P. edelmoi* (5.2 ± 0.44 ; Lima *et al.* 2008). Following Roberto & Ávila (2013) *Phyllodytes “Acuipe 1”* sp. nov. could, on one hand, be grouped with *P. kautskyi*, *P. melanomystax* and *P. acuminatus* based on calls composed of harmonic notes. In comparison with these species, *P. “Acuipe 1”* sp. nov. has an intermediate number of notes, higher call duration and lower note duration (Table 1). On the other hand, following Caramaschi *et al.* (2004), *P. “Acuipe 1”* sp. nov. could be assigned to the *P. luteolus* group based on plain dorsal color pattern. Additionally, we could assign it to the *P. gyrinaethes* group based on the presence of bright color in concealed parts (flanks and anterior part of the thigh yellow in *P. “Acuipe 1”* sp. nov. and red in *P. gyrinaethes*). However, none of the criteria to formation of species groups was formally tested.

Calls from *P. maculosus*, *P. brevirostris* and *P. punctatus* remain undescribed.

Acknowledgements

We thank L. Menezes and P.F. Mendes for aiding with images. R. Oliveira and K. Tuñón for the valuable comments on previous versions of this manuscript. To Argolo for allowing the access to specimens under their care. The fieldworks were conducted during the project “Diversidade e estrutura genética dos anfíbios do Corredor Central da Mata Atlântica do Sul da Bahia - 0991_20132” supported by the Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. EMJ thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior - CAPES (# xxx) and Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia - FAPESB (#8952/2014) for the doctoral grant, and Rede Bahiana de Diversidade de Anfíbios for partially funding this project. The Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) permitted collection of specimens (License numbers 13708-1 and 33132-4).

References

- Blair, W.F. (1958) Mating call in the speciation of anuran amphibians. *The American Naturalist*, 92, 27–51.
- Bokermann, W.C.A. (1966) O gênero *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Anura, Hylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38, 335-344.
- Caramaschi, U., Silva, H. R. & Britto-Pereira, M. C. (1992) A new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from Southern Bahia, Brasil. *Copeia*, 1992, 1, 187-191.
- Caramaschi, U., Peixoto, O.L. & Rodrigues, M.T. (2004) Revalidation and redescription of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional - Nova Série, Zoologia*, 62, 185-191.
- Caramaschi, U. & Peixoto, O.L. (2004) A new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the State of Sergipe, Northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 25, 1-7.
- Costa, L.P. (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, 30, 71-86.
- Cruz, C.A.G., Feio, R.N. & Cardoso, M.C.S. (2006) Description of a new species of *Phyllodytes* Wagler, 1830 (Amphibia, Anura, Hylidae) from the Atlantic Rain Forest of the State of Minas Gerais and Bahia. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, 64, 321-324.
- Cruz, D., Marciano-Jr, E. & Napoli, M.F. (2014) Advertisement and courtship calls of *Phyllodytes wuchereri* (Peters, 1873) (Anura: Hylidae) *Zootaxa*, 3774, 097–100.
- De Sá, R.O., Streicher, J.W., Sekonyela, R., Forlani, M.C., Loader, S.P., Greenbaum, E., Richards, S.J. & Haddad, C.F.B. (2012) Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 1-21.
- Duellman, W.E. (1970) Hylid frogs of Middle America. *Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas*, 1-2, 1-753.
- Fabrezi, M. (1992) El carpo de los anuros. *Alytes*, 10, 1-29.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1-240.
- 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.
- Frost, D. (2014) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Vol. 2014. American Museum of Natural History, New York

- Goicoechea, N., De La Riva, I. & Padial, J.M. (2010) Recovering phylogenetic signal from frog mating calls. *Zoologica Scripta*, 39, 141–154.
- 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.
- Izecksohn, E. & Carvalho-e-Silva, S.P.D. (2001) *Anfíbios do Município do Rio de Janeiro*. Editora UFRJ, Rio de Janeiro, 148 pp.
- Izecksohn, E. & Peixoto, O.L. (1981) Nova espécie de *Proceratophrys*, da Hiléia Bahiana, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 41, 19-24.
- Lima, M.G., Lingnau, R. & Skuk, G. (2008) The advertisement call of *Phyllodytes edelmoi* (Anura, Hylidae). *American Journal of Herpetology*, 3, 2, 118-121.
- Nunes, I., Santiago, R.S. & Juncá, F.A. (2007) Advertisement calls of four hylid frogs from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology*, 2, 2, 89-96.
- 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, 2, 265-272.
- Peixoto, O.L., Caramaschi, U. & Freire, E.M.X. (2003) Two new species of *Phyllodytes* (Anura: Hylidae) from the state of Alagoas, Northeastern Brazil. *Herpetologica*, 59, 2, 235-246.
- Roberto, I.J. & Ávila, R.W. (2013) The advertisement call of *Phyllodytes gyrinaethes* Peixoto, Caramaschi & Freire, 2003 (Anura, Hylidae). *Zootaxa*, 3669, 193–196.
- Savage, J.M. & Heyer, W.R. (1997) Digital webbing formulae for amphibians: a refinement. *Herpetological Review*, 28, 131.
- Simon, J.E. & Gasparini, J. L. (2003) Descrição da vocalização de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto e Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão. Nova Série*, 16, 47-54.
- Simon, J.E. & Peres, J. (2012) Revisão da distribuição geográfica de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto & Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão. Nova Série*, 29, 17-30.
- Wagler, J. (1830) *Natürliches System der Amphibien : mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vögel: ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie*. Cotta'schen, München, vi + 352 pp.
- Wied-Neuwied, M.Z. (1824) *Abbildungen zur Naturgeschichte Brasiliens*. Landes-Industrie-Comptoir, Weimar, pp.

TABLE 1. Acoustic parameters of the advertisement call of *Phyllodytes* species published on literature. According to viability, we present the data as follows: Mean \pm Standard Deviation plus (range). Missing data are marked with “–” symbol.

FIGURE 1. *Phyllodytes “Acuipe 1”* sp. nov., holotype (MZUFBA 14088; SVL 21.30 mm), (A) dorsal and (B) ventral views, (C) hand, (D) foot and, (E) lateral view of head. White bars equal 1 mm.

FIGURE 2. Advertisement call of *Phyllodytes “Acuipe 1”* sp. nov. type locality. (A) waveform of the call, (B) audiospectrogram of the call, (C) power spectrum of the call, (D) waveform of the note and (E) audiospectrogram of the note.

TABLE 1.

Literature	Species	Males recorded	Call structure	Dominant Frequency (kHz)	Notes / call	Call duration (s)	Intercall interval (s)	Note duration (s)	Internote intervals (s)	Pulses / note
Weygoldt 1981	<i>P. luteolus</i>	-	Pulsed	2-6	8 - 15	5.0	-	0.125	-	-
Lima <i>et al.</i> 2008	<i>P. edelmoi</i>	4	Pulsed	2.84 ± 0.16 1.49 - 3.32	26.46 ± 2.3 22 - 29	5.2 ± 0.44 4.28 - 5.73	48.27 ± 8.33 38.11 - 61.03	0.1 ± 0.003 0.04 - 0.16	-	20.26 ± 2.85 6 - 32
Juncá <i>et al.</i> 2012	<i>P. tuberculosus</i>	1	Pulsed	2.46 ± 0.45 1.68 - 3.27	18.60 ± 3.36 14 - 23	6.72 ± 1.73 4.65 - 9.35	-	0.17 ± 0.047 0.07 - 0.25	0.214 ± 0.048 ms 0.07 - 0.36 ms	24.55 ± 4.36 13 - 34
Roberto & Ávila 2013	<i>P. gyrinaethes</i>	2	Pulsed	2.75 ± 0.16 2.53-3.09	4.9 ± 0.6 4-6	1.7 ± 0.3 1.3 - 2.3	52.4 ± 25.7 21.2 - 88.7	0.04 ± 0.01 0.02 - 0.07	0.4 ± 0.03 0.3 - 0.5	-
Cruz <i>et al.</i> 2014	<i>P. wucheri</i>	2	Pulsed	1.29 - 3.52	16.18 ± 3.25 10 - 21	4.70 ± 1.23 2.75 - 6.75	Irregular	0.19 ± 0.04 0.11 - 0.32	0.12 ± 0.02 0.09 - 0.21	27-44 pulses/group 3-9 pulse groups
Magalhães <i>et al.</i> 2015	<i>P. wucheri</i>	4	Pulsed	3.25 ± 0.08 3.19 - 3.45	18 ± 2 16 - 20	4.3 ± 0.3 3.9 - 4.7	134 ± 10 120 - 143	0.12 ± 0.013	0.12 ± 0.019 0.087 - 0.195	-
Simon & Gasparini 2003	<i>P. kautskyi</i>	1	Unpulsed, with harmonics	1.37 0.87 - 1.81	21	3.55 ± 0.19	46.66 ± 11.45	0.08 ± 0.012	0.06 - 0.12	-
Simon & Peres 2012	<i>P. kautskyi</i>	1	Unpulsed, with harmonics	1.16 0.88 - 1.62	21 - 22	3.48 - 3.90	53.55-66.08	0.074 ± 0.014	0.084 - 0.140	-
Nunes <i>et al.</i> 2007	<i>P. melano mystax</i>	3	Unpulsed, with harmonics	1.39 - 3.36	1	0.07 ± 0.04	28.81 ± 12.48 11.18 - 54.29	0.07 ± 0.04	-	-
Campos <i>et al.</i> 2014	<i>P. acuminatus</i>	2	Unpulsed, with harmonics	2.07 - 4.57	1	0.03 - 0.17	0.35 ± 0.05 (n= 66) 0.27 - 0.47	-	-	-
This study	<i>P. megatympanum</i>	1	Unpulsed, with harmonics	3.68 ± 0.75 1.87 - 4.31	12 ± 2.45 10 - 19	4.06 ± 1.36 3.20 - 8.11	36.60 ± 7.69 26.22 - 47.58	0.018 ± 0.003 0.010 - 0.040	0.35 ± 0.10 0.130 - 0.618	-

FIGURE 1.

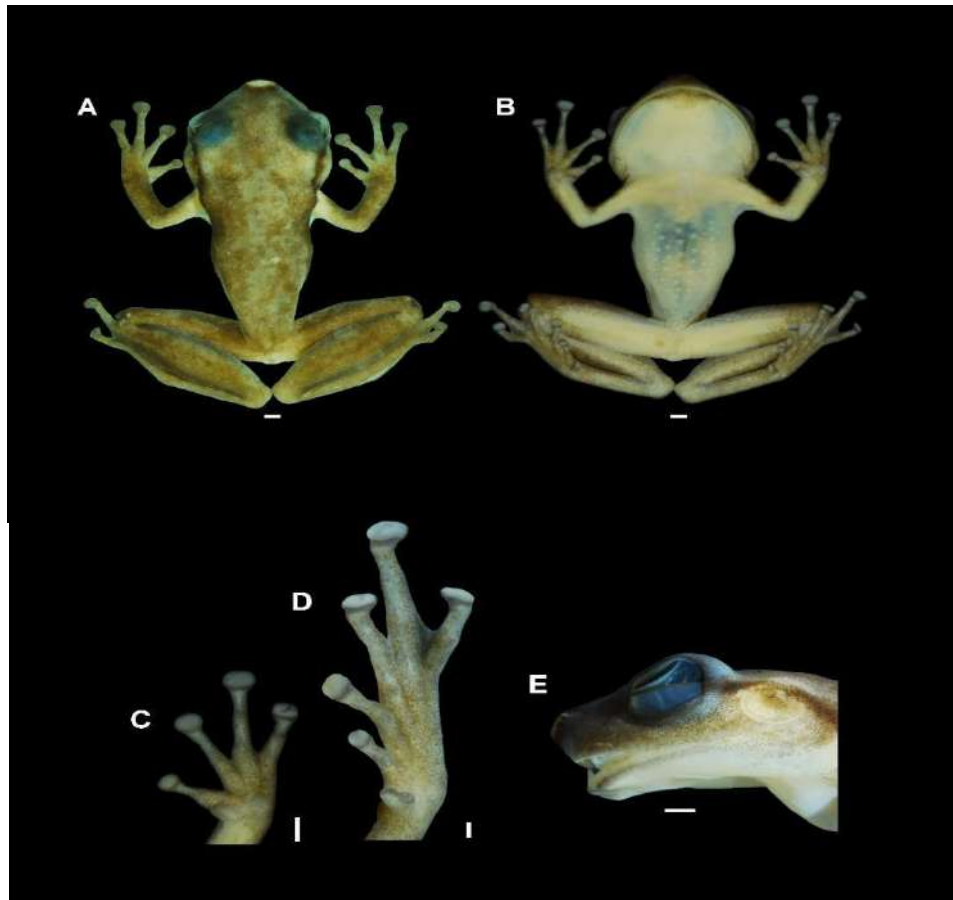
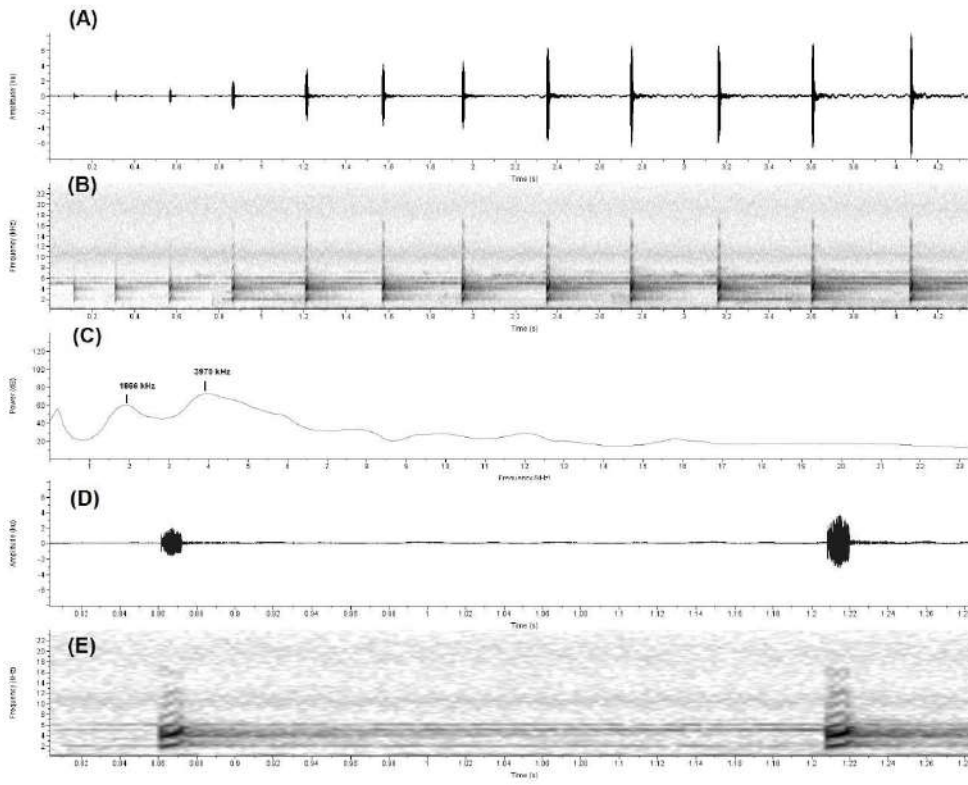


FIGURE 2.



MANUSCRITO PARA APRECIACÃO

CAPÍTULO IV

Este capítulo apresenta o manuscrito intitulado “**Nova espécie críptica de *Pristimantis* é revelada no sul da Bahia**” que será submetido para publicação no periódico científico internacional **Zootaxa**, classificado como **B1** pelo Sistema Qualis da Capes. Os resultados aqui discorridos, assim como a discussão e conclusões derivadas, decorrem do desenvolvimento da presente tese. Os critérios de redação e formatação seguem as normas deste periódico.

Nova espécie críptica de *Pristimantis* (Anura, Craugastoridae) é revelada no sul da Bahia.

EUVALDO MARCIANO JR^{1*}, PATRÍCIA FONSECA MENDES² & MIRCO SOLÉ³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil. E-mail: euvaldo.marciano@gmail.com *Corresponding author.

² Ciências Biológicas, Universidade Federal da Bahia.

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus, BA, Brasil.

Resumo

Nós descrevemos uma nova espécie críptica de *Pristimantis* do grupo de espécies de *P. conspicillatus* de Ibicarai (39° 37' 12" W, 14° 47' 24" S), sul da Bahia, na Floresta Atlântica do nordeste do Brasil. Essa é a primeira espécie do gênero descrita para a Floresta Atlântica desde que a distribuição do gênero foi estendida para esse bioma em 2012. *Pristimantis* "Ibicarai" sp. nov. é diagnosticável pela combinação dos seguintes caracteres: (1) uma faixa supratimpânica preta mais espessa na margem direita; (2) prega supratimpânica evidente; (3) canthus rostralis reto; (4) ânulo timpânico circular com uma reentrância em forma de gota na margem superior; (5) primeiro dedo da mão mais curto que o segundo.

Introdução

Brachycephaloidea é uma superfamília de anuros que comporta três grandes famílias de rãs conhecidas como Terraranas, são elas Brachycephalidae, Craugastoridae e Eleutherodactylidae (Padial *et al.* 2014). Todas derivam de linhagens de anuros do novo mundo cuja reprodução acontece por desenvolvimento direto, portanto, sem estágio larval (Hedges *et al.* 2008).

Pristimantis é um dos gêneros mais numerosos de Craugastoridae, com 488 espécies descritas (Frost 2016) e até recentemente era associado apenas às formações florestais amazônicas. No entanto, Canedo & Haddad (2012) propuseram uma divisão no gênero *Ischnocnema* endêmico da Floresta Atlântica, transferindo todos os táxons associados a este nome presentes no Nordeste do Brasil para o gênero *Pristimantis*. Dessa forma, o último passou a apresentar distribuição disjunta na Floresta Atlântica com as seguintes espécies: *Pristimantis paulodutraei*, *P. ramagii* e *P. vinhai*, todas compondo o clado *P.*

ramagii (sensu Napoli & Brandão 2003) e, a partir de então, alocadas no grupo de espécies de *P. conspicillatus* (Lynch & Duellman 1997).

De forma geral, as espécies desse gênero apresentam morfologia externa bastante conservada, o que dificulta suas diagnoses (Padial *et al.* 2009). O grupo de espécies de *P. ramagii*, por exemplo, foi recorrentemente objeto de investigações que tentavam esclarecer seus aspectos morfológicos e filogenéticos (Lynch & Duellman 1997, Heyer & Carvalho 2000, Napoli & Brandão 2003, Carnaval & Bates 2007, Siqueira *et al.* 2008), levantando muitas questões que permanecem em aberto (Carnaval & Bates 2007, Napoli *et al.* 2009).

No entanto, o desenvolvimento de uma nova abordagem para delimitação de espécies – taxonomia integrativa – tem se mostrado como meio mais eficaz de se identificar novas espécies (Dayrat 2005, Will *et al.* 2005), principalmente em grupos morfológicamente crípticos (Channing *et al.* 2012). A proposta da taxonomia integrativa é reunir diferentes linhas de evidência capazes de validar a separação entre linhagens e sua utilização reduz vieses relacionados ao uso de apenas um critério de discriminação, o que pode facilitar o reconhecimento de complexos de espécies composto por espécies crípticas (Padial *et al.* 2008; Padial & De La Riva 2009). Nesse sentido, a bioacústica representa importante contribuição para o reconhecimento de espécies, dado que as vocalizações de anúncio são caracteres de reconhecimento intraespecífico bastantes eficazes para manutenção de barreiras pré-zigóticas entre linhagens monofiléticas (Wells 1977).

Adicionalmente, a análise da variação em sequências de DNA expandiu os horizontes da pesquisa taxonômica, fornecendo evidências robustas das relações de parentesco entre linhagens (Fouquet *et al.* 2007, Padial & De-La-Riva 2009).

No presente estudo, nós utilizamos o contexto integrativo para descrever uma nova espécie críptica de *Pristimantis* do clado *P. ramagii* e associada ao grupo de espécies de *P. conspicillatus*, a partir de evidências morfométricas, bioacústicas e moleculares.

Material e Métodos

Morfometria. Espécimes usados na descrição ou examinados para comparações estão depositados nas coleções do Museu de Zoologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil (MZUESC) e Museu de Zoologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil (MZUFBA). As abreviações usadas ao longo do texto são as seguintes: CRC (comprimento rostro-cloacal), CC (comprimento da cabeça), LC (largura da cabeça), DON (distância olho-narina), DO (diâmetro do olho), LPS (largura da pálpebra superior), DIO (distância interorbital), DT (diâmetro do tímpano), DIN (distância inter-narina), DNF (distância narina-ponta foncinho), RC (comprimento do radio-cúbito), MÃO (comprimento da mão), CCX (comprimento da coxa), CTB (comprimento da tíbia), CP (comprimento do pé), DD2D (diâmetro do disco do 2º dedo), DD3A (diâmetro do disco do 3º artelho), CD1 (comprimento do dedo 1), CD2 (comprimento do dedo 2), CA3 (comprimento do artelho 3) e CA5 (comprimento do artelho 5). Todas as medidas estão em milímetros e seguem Napoli (2000 2005).

Bioacústica. Cantos de anúncio de um macho (MZUFBA, CRC 22,9 mm) foram registrados em 05 de março de 2015 (temperatura do ar 27° C, umidade do ar 70%) com um microfone unidirecional Sennheiser ME45 anexado a um gravador digital Marantz PMD 660. O microfone foi colocado a uma distância de ca. 30 cm do espécime registrado. Os cantos foram analisados com frequência de 44 kHz e tamanho da amostra de 16 bits. Os parâmetros temporais e espectrais dos cantos foram analisados usando os programas Avosoft SASlab lite v. 5.2 e Sound Ruler v. 0.9., respectivamente. Espectrogramas foram obtidos com um comprimento de FFT (Fast Fourier Transformation) de 256 pontos, 75% de sobreposição, janela Hamming. A terminologia para descrição dos cantos segue Duellman & Trueb (1994).

Procedimentos Moleculares. Nós extraímos DNA genômico total do tecido muscular da coxa, usando um protocolo de extração de sal padrão (Bruford *et al.* 1992). Nós amostramos nove indivíduos de *Pristimantis* “Ibicarai” sp. nov. nos municípios de Ibicarai e Igrapiuna, quatro amostras de *Pristimantis paulodutraei* de Ilhéus e três amostras de *Pristimantis vinhai* de Ibicarai, Ilhéus e Igrapiúna. Todas localizadas no Sul da Bahia.

Sequência parcial do gene mitocondrial 16S foi amplificada usando o conjunto de primers publicados AC_16S_AR (F) CGCCTGTTTATCAAAAACAT e 16SBH (R) CCGGTCTGAACTCAGATCACGT (Palumbi *et al.* 2002). Reações de PCR foram realizadas em um volume final de 11.5 µl usando as seguintes concentrações: 0,25 µl de dNTP, 2,5 µl de tampão de PCR, 0,3 µl de cada primer, 0,1 µl de GoTaq DNA polymerase e 1 µl de DNA. As condições de amplificação consistiram de uma etapa de pre-desnaturação de 3 min à 92 °C, seguida por 38-40 ciclos de desnaturação de 3 min à 92°C, etapa de anelamento à 48 °C por 50 seg e extensão à 72 °C por 3min e armazenamento à 8 °C. Os produtos do PCR foram purificados com processo enzimático: 0,15 unidades de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) e 1 unidade de Exonuclease I, incubada por 15 min à 37°C, seguido por 15 min à 80°C. Produtos de PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador de DNA automatizado (Applied Biosystems ABI 3130XL). Sequências foram checadas e editadas usando o programa CodonCode Aligner 3.7.1(CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA).

O alinhamento das sequencias foi realizado usando o algoritmo ClustalW implementado no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). As sequencias foram submetidas ao Genbank (serão adicionadas ao manuscrito após aceitação). Uma árvore de Máxima Verossimilhança foi gerada no MEGA 6.06 com base nos fragmentos de 16S usando sequências de *Pristimantis* “Ibicarai” sp. nov., *Pristimantis paulodutraei*, *Pristimantis vinhai* e sequências de espécies relacionadas disponíveis no Genbank (JX267365.1; JX267380.1; JX267319.1; JX267360.1; JX267297.1; EF493703.1 and EF493259.1). Como grupo externo nós usamos sequência de *Haddadus binotatus* (Genbank KF740846.1).

Resultados

Pristimantis “Ibicarai” sp. nov.

Figuras 1 e 2.

Holótipo. MZUFBA (nº ainda indisponível), macho adulto da RPPN Estância Manacá, Município de Ibicarai (39° 37' 12" W, 14° 47' 24" S), Estado da Bahia, Brasil, 600 m de altitude. Coletado em 05 de março de 2016, por EMJ.

Parátipos. 15 machos: UFBA (nº indisponíveis), coletados com o holótipo.

Diagnose A espécie pertence ao gênero *Pristimantis* com base em árvore filogenética de Máxima Verossimilhança recuperada a partir de sequências do gene mitocondrial 16S, para o qual apresentou monofilia recíproca. A nova espécie é associada ao grupo de espécies de *Pristimantis ramagii* pela seguinte combinação de caracteres: comprimento da tibia < 60% do comprimento rostro-cloacal; disco adesivo dos dedos bem desenvolvidos (D2D 0,5–0,8 mm; D3D 0,9–1,3 mm), focinho subacuminado em vista dorsal, ventre granuloso, ausência de almofadas nupciais; em vida, íris de cor dourada na parte superior e cobre na porção inferior. *Pristimantis* “Ibicarai” sp. nov. é diagnosticado das demais espécies de seu grupo pela seguinte combinação de caracteres: (1) mancha supratimpânica de cor preta, espessa no bordo direito do tímpano; (2) canthus rostralis reto; (3) prega supratimpânica evidente; (4) ânulo timpânico circular com reentrância em formato de gota, afinada no bordo superior; (5) primeiro dedo menor que o segundo; (6) canto de anúncio com uma nota multipulsada (média de 15 grupos de pulsos/nota), duração média do canto 0,0060 s (0,0057–0,0064) e frequência dominante média 2,49 kHz (2,34–2,53).

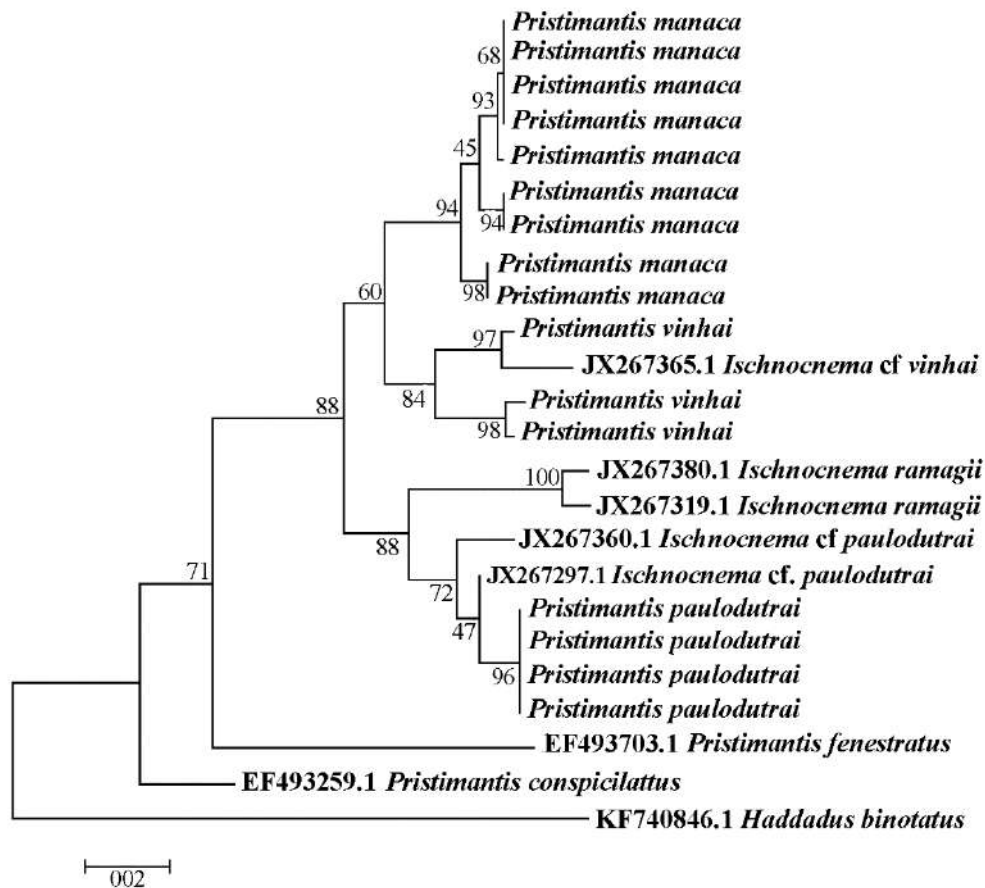


Figura 1. Árvore filogenética estimada pelo método de Máxima Verossimilhança com o gene 16S mostrando as relações interespecíficas entre *P. "Ibicarai"* sp. nov. e as demais espécies do clado de *P. ramagii*. A árvore foi enraizada com os grupos externos *P. conspicillatus*, *P. fenestratus* e *Haddadus binotatus*.

Comparação com outras espécies. *Pristimantis "Ibicarai"* sp. nov. é diagnosticado de *P. vinhai* pelo maior tamanho, pela presença de mancha supratimpânica de cor preta e espessa no bordo direito do tímpano, espessa apenas no bordo superior em *P. vinhai*; pela ausência de tubérculo palpebral em *P. "Ibicarai"* sp. nov., presente em parte dos espécimes de *P. vinhai*; pelo canthus rostralis reto em *P. "Ibicarai"* sp. nov., curvo em *P. vinhai*. *P. "Ibicarai"* sp. nov. pode ser diferenciado de *P. paulodutrae* pela proporção entre os dedos I e II, sendo o dedo I menor que o dedo II em *P. "Ibicarai"* sp. nov., enquanto o inverso ocorre em *P. paulodutrae*; pelas reentrâncias epidérmicas observadas na superfície ventral das coxas, formando um padrão de favos em *P. "Ibicarai"* sp. nov., enquanto o formato em *P. paulodutrae* é irregular. O canto de anúncio distingue *P. "Ibicarai"* sp. nov. das demais espécies do clado de *P. ramagii*, por possuir apenas uma nota multipulsada (2-3 notas em *P. paulodutrae*), pela menor duração (0,032s em *P. ramagii*) e pela menor frequência

dominante (2,33kHz a máxima observada em *P. ramagii* e cerca de 4,0kHz, estimado para a imagem no artigo original de descrição de *P. paulodutraii*). O canto de *P. vinhai* permanece não descrito. Dados de sequência de mtDNA (16S) recuperou a monofilia de *P. "Ibicarai"* sp. nov. com relação às demais espécies do clado de *P. ramagii*, bem como com relação à *P. conspicillatus* e *P. fenestratus*.

Descrição do Holótipo. Espécie de corpo moderadamente robusto, tamanho pequeno (CRC 22,90 mm); cabeça um pouco mais longa que larga (CC/LC 1,26 mm); focinho subacuminado em vista dorsal, acuminado em vista lateral; narinas salientes, orientadas para frente, próximas da ponta do focinho; olhos proeminentes, dirigidos lateralmente, diâmetro do olho igual ou ligeiramente maior que a distância olho-narina (DO/DON 1,02 mm); *canthus rostralis* reto; região loreal levemente côncava; tímpano evidente, seu diâmetro menor que diâmetro do olho (DT/DO 0,44 mm); prega supratimpânica bem evidente; dentes vomerianos em duas séries dispostas obliquamente entre e atrás das coanas; língua grande cordiforme; fendas vocais presentes dispostas lateralmente na porção posterior; saco vocal único e subgular bem desenvolvido; dedos com calos subarticulares pequenos, proeminentes e cônicos; tubérculos supranumerários presentes, pequenos e cônicos; tubérculo carpal grande e bífido, tubérculo metacarpal externo, grande e elíptico; discos adesivos bem desenvolvidos nos dedos III e IV e pouco desenvolvidos nos dedos I e II ($I \approx II < III \approx IV$), ausência de almofadas nupciais, primeiro dedo levemente menor que o segundo (CD1/CD2 0,86 mm); superfície dorsal lisa a granulosa; superfície ventral granulosa; região perianal e parte posterior da coxa granulosa; soma dos comprimentos da tíbia e coxa igual ou ligeiramente maior que o comprimento rostro-cloacal (CCX+CTB/CRC 0,99 mm); artelhos finos, moderadamente longos; comprimento relativo dos artelhos ($I < II < III < V < IV$); comprimento do quinto artelho maior que terceiro (CA5/CA3 1,11), porém não alcançando o tubérculo distal do quarto artelho; discos adesivos dos artelhos III, IV e V bem desenvolvidos; calos subarticulares pequenos, proeminentes e redondos; tubérculos supranumerários presentes. Estatística descritiva na Tabela 1.

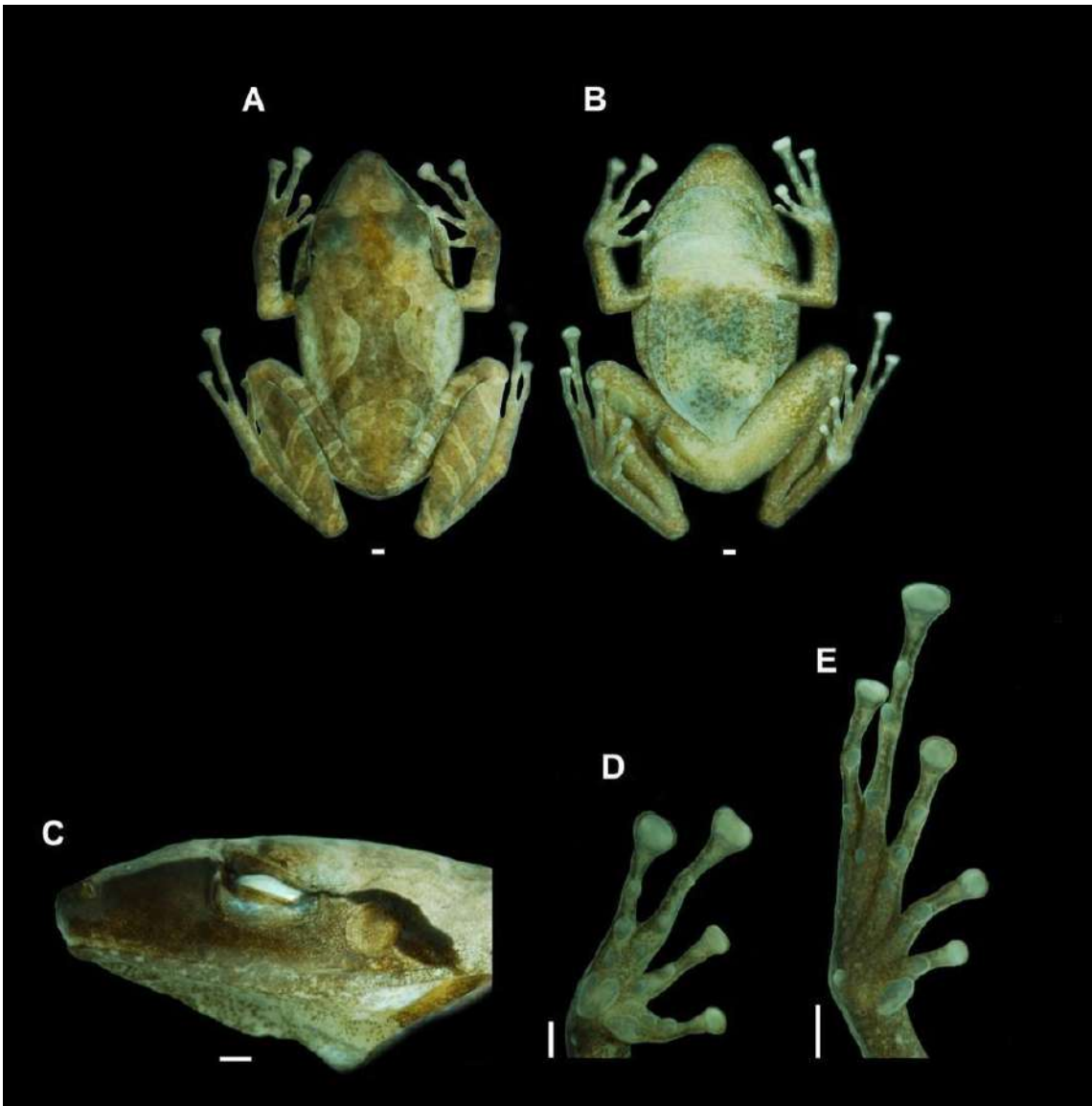


Figura 2. Vistas (A) dorsal, (B) ventral, (C) lateral e superfícies ventrais (D) da mão e (E) do pé do holótipo de *Pristimantis* “Ibicarai” sp. nov. As barras brancas correspondem à 1mm.

Coloração em vida do holótipo. O indivíduo apresentava coloração castanha escura em toda a superfície dorsal, uma máscara de cor negra bem marcada em toda a região loreal delimitando nitidamente o *canthus rostralis*, faixa supratimpânica de cor negra e marginada por uma fina linha branca, Chevron marrom com ápice em forma de abobada sobre o dorso, barras marrons nas superfícies dorsais da coxa e tíbia, ventre e região gular irregularmente manchados.

Dimorfismo sexual. Fêmeas de *Pristimantis* “Ibicarai” sp. nov. são maiores que machos (CRC fêmeas 28,5–31,3 mm; machos 19,1–24,7 mm).

História natural e Distribuição geográfica. *Pristimantis* “Ibicarai” sp nova coexiste em simpatria com os congêneres *P. vinhai* e *P. paulodutrai* ao longo da Floresta Atlântica do Sul da Bahia, estando seus limites geográficos conhecidos, até o momento, entre os municípios de Jucuruçu, no extremo sul do estado e Elísio Medrado (Serra da Jiboia), na região do vale do Jiquiriça ao norte. A espécie nova é morfologicamente críptica em relação a *P. paulodutrai*, porém é nitidamente associada a ambientes florestados, enquanto *P. paulodutrai* é frequentemente observado em áreas abertas e bordas de mata. Indivíduos de ambas as espécies já foram encontrados em sintopia em algumas localidades, mas em sítios próximos à borda da mata. À medida que nos distanciamos da borda em direção ao interior da mata, apenas *P. “Ibicarai”* é visto e/ou ouvido.

Pristimantis “Ibicarai” apresenta maior atividade vocal no período crepuscular, iniciando as vocalizações por volta das 17h, com picos de atividade até 18h. Após esse intervalo, ainda se pode ouvir machos vocalmente ativos ao longo da noite, mas emitindo cantos em frequência de tempos maiores. Os machos cantam empoleirados sobre a vegetação arbustiva ou troncos de árvores com superfície irregular que os permitam ficar apoiados, podendo chegar a alturas de até 1,5 acima do solo. A orientação do corpo durante a vocalização pode variar de acordo com o sítio escolhido, podendo ser verticalmente orientado com focinho voltado para cima ou horizontalmente orientado. A detecção de amplexos não é frequente e nos casos em que foram detectados normalmente a observação foi feita em horários mais avançados da noite (>21h).

Coloração em preservativo – Em preservativo de poucos dias a coloração varia de marrom pardo a acinzentado escuro, mas ao longo do tempo o aspecto geral da coloração varia de marrom claro a marrom escuro.

Tabela 1. Estatística descritiva das mensurações do holótipo e dos parátipos 16 machos de *Pristimantis* sp. nov.

Medida	Amplitude (mm)	Média (mm)	Desvio padrão (mm)
CRC	18.10-24.70	21.69	1.53
CC	8.30-10.60	9.40	0.74
LC	6.40-7.90	7.32	0.53
DO	0.21-0.30	0.26	0.02
DON	0.22-0.28	0.25	0.01
DT	0.09-0.13	0.11	0.01
LPS	0.14-0.24	0.21	0.03
DIO	0.21-0.27	0.24	0.02
DIN	0.15-0.21	0.18	0.02
DNF	0.06-0.12	0.09	0.01
RC	4.20-5.75	5.24	0.49
MAO	5.40-7.00	6.23	0.79
CCX	9.20-12.05	10.74	0.51
CTB	10.80-12.60	11.75	0.80
CP	9.00-11.30	10.22	0.01
DD2D	0.05-0.08	0.07	0.01
DD3A	0.09-0.13	0.11	0.25
CD1	2.75-3.70	3.16	0.27
CD2	3.40-4.40	3.72	0.50
CA3	5.60-6.90	6.38	0.50
CA5	6.60-8.20	7.43	0.65

Discussão

Desde a atribuição dos Terrarana do Nordeste do Brasil ao gênero *Pristimantis* por Canedo & Haddad (2012), nenhuma nova espécie desse gênero foi descrita para a região. A descoberta de *Pristimantis* “Ibicarai” aumenta para 4 a diversidade do grupo na Floresta Atlântica (*P. paulodutraei*, *P. ramagii*, *P. vinhai* e *P. “Ibicarai”*) e chama atenção para a possibilidade de diversidade críptica elevada desse gênero no bioma. De acordo com Fouquet *et al.* 2007 a região neotropical possivelmente abriga uma diversidade subestimada de espécies crípticas. Para o gênero *Pristimantis* isso também foi destacado por Padial & De La Riva (2009).

De modo geral, essa linhagem de anuros do novo mundo apresenta forte conservantismo morfológico a despeito da grande variedade de espécies e habitats que ocupam, motivo pelo qual estabelecer suas características diagnósticas somente a partir de dados de morfologia externa é fortemente não recomendado (De Queiroz 2005, Padial *et al.* 2009). No entanto, desde que o uso de sequências de DNA se tornou uma ferramenta valiosa para auxiliar na determinação de espécies (Wheeler 2005, 2007), a identificação de linhagens monofiléticas dentro desse gênero tornou-se uma atividade promissora.

No presente estudo, nós empregamos os princípios da taxonomia integrativa (Dayrat 2005, Will *et al.* 2005) para assegurar a validade da espécie nova, dado que, apenas a morfologia externa não seria capaz de diagnosticá-la. Nesse sentido, dados de DNA mitocondrial (16S), amplamente utilizados na determinação genética de linhagens reciprocamente monofiléticas, foram utilizados juntamente com dados de morfometria padrão e de vocalizações de anúncio. Adicionalmente, características relacionadas ao tipo de macro-habitat (Florestal vs. área aberta) foram empregadas como meio de diferenciação do seu similar críptico *P. paulodutraei*, de modo que não resta dúvida de que essa abordagem é fortemente recomendada para detecção de espécies crípticas nesse grupo.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela permissão de coleta dos espécimes (Licenças de número 13708-1 e 33132-4). Aos Sr. Enoc Reis, proprietário da RPPN Estância Manacá por sempre nos acolher bem em sua propriedade. Os trabalhos de campo foram conduzidos durante as expedições do projeto intitulado “Diversidade e estrutura genética dos anfíbios do Corredor Central da Mata Atlântica do Sul da Bahia - 0991_20132” financiado pela Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. EMJ é grato à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (# xxx) e Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia - FAPESB (#8952/2014) pelas bolsas de doutorado concedidas. EMJ e MS são gratos à Rede Bahiana de Diversidade de Anfíbios por financiar parte dos custos desse projeto.

Referências

- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. & Burke, T. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 225–270.
- Carnaval, A.C. & Bates, J.M. (2007) Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. *Evolution*, 61 (12), p.2942.
- Dayrat, B. (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407–415.
- 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*, 31, 231–410.

- Heyer, W.R. & Carvalho, C.M. (2000) The enigmatic advertisement call of *Eleutherodactylus ramagii* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*, 21, 117–121.
- Lynch, J.D. & Duellman W.E. (1997) Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in Western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. Univ. Kansas Nat. Hist. Mus. Spec. Publ. 23: 1-236.
- Padial, J.M., Chaparro, J.C & De La Riva, I. (2008) Systematics of *Oreobates* and the *Eleutherodactylus discoidalis* species Group (Amphibia, Anura) based on two mtDNA genes and external morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 152, 353–365.
- Padial, J.M & De La Riva, I. (2009) Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 97–122.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. & Grabawski, G. (1991) *The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0*. Privately published, compiled by S. Palumbi, University of Hawaii, Honolulu.
- Siqueira, S., Evidências sobre os relacionamentos Intere -Intragenéricos de *Pristimantis crepitans* e *Ischnochnema paulodutra* e sobre a existência de novas espécies de *Barycholos* e *Pristimantis* (Anura, Terrarana), inferidas por dados citogenéticos. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética; ISBN 978-85-89109-06-2; 2008.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6.06: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D. (2005) The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 844–851.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avice JC (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447p.

Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **18**, 489–522.

Brown KS (1991) Conservation of neotropical environments: insects as indicators, p. 250-404. In: Collins NM & Thomas JA (eds). *Conservation of insects and their natural environments*. R.E.S. Symposium 15, Academic Press, London. 450p.

Caramaschi U, Orrico VGD, Faivovich J, Dias IR, Solé M (2013) A new species of *Allophryne* (Anura: Allophrynidae) from the Atlantic Rain Forest Biome of eastern Brazil. *Herpetologica*, **69**, 480–491.

Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**, 785– 789.

Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201.

Coimbra-Filho AF, Câmara IG (1996) Os limites originais do Bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Brasileira para Conservação da Natureza (FBCN), Rio de Janeiro, Brasil.

Crottini A, Andreone F, Kosuch J, Borkin LJ, Litvinchuk SN, Eggert C, Veith M (2007) Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. *Molecular Ecology*, **16**, 1–21.

Faria D, Soares-Santos B, Sampaio E (2006) Bats from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Biota Neotropica*, **6**, 1–13.

Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M, Gemmell NJ (2007) Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS ONE*, **2**, e1109.

Fouquet A, Martinez Q, Zeidler L, Courtois EA, Gaucher P, Blanc M, Lima JD, Souza SM, Rodrigues MT, Kok PJR (2016) Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. *Zootaxa*, **4084**, 79–104.

Gehara M, Crawford AJ, Orrico VGD, Rodriguez A, Lotters S, Fouquet A, Barrientos LS, Brusquetti F, De la Riva I, Ernst R, Urrutia GG, Glaw F, Guayasamin JM, Holting M, Jansen M, Kok PJR, Kwet A, Lingnau R, Lyra M, Moravec J, Pombal JP, Rojas-

Runjaic FJM, Schulze A, Senaris JC, Sole M, Rodrigues MT, Twomey E, Haddad CFB, Vences M, Kohler J (2014) High Levels of Diversity Uncovered in a Widespread Nominal Taxon: Continental Phylogeography of the Neotropical Tree Frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE*, **9**, e103958. doi:10.1371/journal.pone.0103958.

Haffer J (1974) Avian speciation in the tropical South America. Nuttall Ornithological Club, Harvard University, Cambridge.

Hauswaldt JS, Ludewig AK, Vences M, Pröhl H (2011) Widespread co-occurrence of divergent mitochondrial haplotype lineages in a Central American species of poison frog (*Oophaga pumilio*). *Journal of Biogeography*, **38**, 711–726.

IUCN (2016) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 17 de fevereiro de 2016.

Jackson JF (1978) Differentiation in the genera *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): Implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil. *Arquivos de Zoologia*, **30**, 1–79.

Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim J, Brooks J, Mittermeier CG, Lamourux J, Fonseca GAB. (eds.) (2004) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cemex, Mexico City. 396p.

MMA - MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE (2007) Áreas prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira: Atualização Portaria MMA n° 9, de 23 de janeiro de 2007. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília: MMA.

Mori SA, Boom BB, Prance GT (1981) Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia*, **33**, 233–245.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.

Napoli MF, Caramaschi U, Cruz CAG, Dias IR (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.

Pontes R, Caramaschi U, Pombal-Jr JP (2014) A Remarkable New Glass Frog (Centrolenidae) from the Northeast Atlantic Forest, Brazil. *Herpetologica*, **70**, 298–308.

Silva JMC, Castelletti CHM (2003) Status of biodiversity of the Atlantic Forest of the Brazil. pp. 43-59. In: C. GALINDO-LEAL & I. G. CÂMERA (eds.). The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C.

Stuart S, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fishman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, **306**, 1783–1786.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota MM., Bedê LC (2005) Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, **1**, 132–138.

Teixeira Jr M, Dal Vechio F, Recoder RS, Carnaval AC, Strangas S, Damasceno RP, Sena MA, Rodrigues MT (2012) Two new species of marsupial tree-frogs genus *Gastrotheca* Fitzinger, 1843 (Anura, Hemiphractidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa*, **3437**, 1–23.

Thomas WW, Carvalho AM, Amorim AMA, Garrison J, Arbelaez AL (1998) Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brasil. *Biodiversity and Conservation*, **7**, 311–322.

Thomas WW, Carvalho AM (1997) Atlantic moist forest of southern Bahia. In: Centres of plants diversity: a guide and strategy for their conservation. Davis SD, Heywood VH, MacBryde OH, Hamilton AC (eds). v3, London, IUCN-WWF.

Vences M, Wake DB (2007) Speciation, species boundaries and phylogeography of amphibians. *Amphibian Biology*, v.6, Systematics (ed. by H. H. Heatwole and M. Tyler), pp. 2313–2669. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, NSW.

Wynn A, Heyer WR (2001) Do geographically widespread species of tropical amphibians exist? An estimate of genetic relatedness within the Neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider 1799) (Anura Leptodactylidae). *Tropical Zoology*, **14**, 255–285.

Zeisset I, Beebee TJC (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, **101**: 109–119.

Zhang H, Yan J, Zhang G, Zhou K (2008) Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog population (*Pelophylax nigromaculata*): evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, e21.