



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

MARINY OLIVEIRA ARRUDA

PRIMEIRA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DAS ESPÉCIES
***Adelophryne maranguapensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) E**
***Adelophryne baturitensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) NOS BREJOS**
DE ALTITUDE DO CEARÁ.

FORTALEZA

2024

MARINY OLIVEIRA ARRUDA

PRIMEIRA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DAS ESPÉCIES *Adelophryne maranguapensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) E *Adelophryne baturitensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) NOS BREJOS DE ALTITUDE DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Linha de Pesquisa: Ecologia e História Natural de anfíbios/Squamata terrestres e semiterrestres.

Orientador: Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Araripe.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A819p Arruda, Mariny Oliveira.
Primeira avaliação genética de populações das espécies *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) e *Adelophryne baturitensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) nos Brejos de altitude do Ceará. / Mariny Oliveira Arruda. – 2024.
50 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila.
Coorientação: Prof. Dr. Juliana Araripe.
1. Estrutura populacional. 2. Diversidade genética. 3. Genética da conservação. 4. Anfíbios. I. Título.
CDD 577
-

MARINY OLIVEIRA ARRUDA

PRIMEIRA AVALIAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DAS RÃZINHAS *Adelophryne maranguapensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) E *Adelophryne baturitensis* HOOGMOED, BORGES & CASCON (1994) NOS BREJOS DE ALTITUDE DO CEARÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Linha de Pesquisa: Ecologia e História Natural de anfíbios/Squamata terrestres e semiterrestres.

Aprovada em: 28/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Déborah Praciano de Castro
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Prof. Dr. Péricles Sena do Rego
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Em memória à minha querida Avó Telina e ao
meu querido padrinho Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata à todas as pessoas que me ajudaram a desenvolver esse trabalho e que participaram de cada etapa da minha trajetória durante o mestrado, dentre elas, agradeço:

À minha mãe Regina Helena de Oliveira, às minhas irmãs Natália de Oliveira, Mariany Oliveira, aos meus irmãos Júnior Oliveira, Dardiê Martins, às minhas sobrinhas Alissa de Oliveira e Hadassa Martins, ao meu cunhado-irmão Pedro Pinheiro e ao meu noivo Bruno Celio, por me incentivarem e por me acompanharem durante todas as fases da minha vida, com o apoio de vocês tudo se torna possível. Agradeço à minha madrinha Lourdes, às minhas tias, primas e aos meus tios e primos pelo apoio. Amo muito vocês!

Agradeço ao meu orientador Robson Waldemar Ávila por confiar em mim para desenvolver esse trabalho e por ter aberto portas importantes para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigada por escutar as minhas ideias, as minhas aflições, por conversar sobre o projeto durante as minhas inquietações e por me incentivar na pesquisa. Obrigada também por ter me proporcionado conhecer e fazer coletas na Amazônia, foi incrível aprender com você sobre as espécies que eu só conhecia através dos guias herpetológicos. Sem dúvidas, te ver reconhecendo praticamente todos os sapos através da vocalização foi inspirador. Muito obrigada por tudo, pela parceria e pelo cuidado comigo!

Agradeço à minha querida coorientadora Juliana Araripe por todo o acompanhamento e o carinho durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por estar sempre presente, por responder minhas dúvidas e por participar intensamente do projeto. Obrigada por ter me acolhido durante a minha estadia em Bragança, por ter aberto às portas da sua casa e do seu laboratório para mim. Foi crucial ter ido finalizar o trabalho no seu laboratório, a compreensão se tornou mais prática, eu realmente aprendi demais. Obrigada também ao Péricles Sena pelas conversas científicas, pelo aprendizado e por todo o carinho comigo. Vocês três são muito especiais e nunca esquecerei o que fizeram por mim!

Agradeço à Renata Perez por destinar um tempo para me ensinar a extrair os tecidos e fazer os PCRs, sua ajuda foi primordial para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada! Agradeço também ao Igor Joventino pelo interesse no trabalho, por fazer a ponte com o laboratório da professora Denise e por me deixar animada quando conversávamos sobre os *Adelophrynes*.

Agradeço ao meu querido amigo e parceiro geneticista (haha), Rafael Ramos, por

ter feito toda a parte de bancada comigo no NUROF, foi tão bom aprender junto com você. Rafa, obrigada por ter dedicado o seu tempo para realizar as extrações e os PCRs comigo e por ter me proporcionado confiança e segurança. Sou muito feliz com a nossa parceria!

Agradeço à querida equipe do Nurof por ter me recebido muito bem desde o início, em especial às técnicas Roberta Braga e a Castiele Holanda, e ao colaborador Sr. Carlos, por todo o apoio e incentivo. Agradeço também aos queridos amigos que o NUROF me deu, que me ajudam tanto todos os dias, e principalmente por me acompanharem nas atividades de campo: Átilas Rodrigues, Tatiana Feitosa, Matheus Calixto, Inessa Maia, Rafael Ramos, Elvis Franklin, Dalilange Batista, Cristiana Silva e Bruno Guilhon. Obrigada também aos estagiários queridos que passaram e aos que estão atualmente no laboratório!

Agradeço às professoras Vânia Maria Maciel Melo e Denise Cavalcante Hissa por abrirem as portas dos seus laboratórios, à mestranda Vanessa Ariane e à técnica Mirella por toda a ajuda durante a execução desse trabalho. Agradeço também aos queridos doutorandos Gabryele Malcher e Paulo Ferreira por todo o suporte durante e depois da minha passagem pelo Laboratório de Genética e Conservação na UFPA de Bragança, e ao estudante de iniciação científica Frentzen por ter contribuído durante os procedimentos de bancada.

Agradeço a todos que me ajudaram durante as coletas na Serra de Maranguape e na Serra de Baturité, sem vocês este trabalho não seria possível. Em especial ao meu irmão Junior, a minha cunhada Rayane, a minha avó Lúcia e a tia Neuma por abrirem as portas das suas casas em Mulungu. Agradeço aos funcionários do Hotel Remanso em Guaramiranga, por permitirem a nossa entrada para a realização das coletas. Agradeço também ao querido Kássio e a sua família pela estadia na Parnaíba.

Agradeço aos meus colegas do PPGERN pela troca durante as disciplinas, especialmente aos queridos Átilas e Cíntia, vocês são muito especiais para mim! Às minhas amigas herpetólogas Luana Sousa e Thabata Cavalcante e a todos os meus amigos que acompanham minha jornada, obrigada por me incentivarem e me apoiarem sempre.

Agradeço à Profa. Dra. Deborah Praciano de Castro, ao Prof. Dr. Péricles Sena do Rego e ao Prof. Dr. Igor Joventino Roberto por participarem da banca e da finalização desse ciclo tão importante em minha jornada acadêmica.

Por fim, agradeço à querida Universidade Federal do Ceará, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela oportunidade de poder realizar o meu sonho de estudar nessa instituição e pela oportunidade de conhecer lugares e pessoas, e de trabalhar com os queridos Adelos.

“Happiness can be found even in the darkest of times if one only remembers to turn on the light.” (J.K. Rowling).

RESUMO

O mundo enfrenta uma crise de extinção sem precedentes, em que as taxas atuais de perda de espécies excedem os padrões históricos. Com o advento das técnicas moleculares, a genética da conservação destaca-se como uma ferramenta capaz de analisar aspectos relevantes sobre a bioecologia das espécies, especialmente para espécies ameaçadas, como os anfíbios. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi realizar o primeiro estudo genético populacional das espécies *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis*, além de fornecer informações sobre a distribuição de *A. baturitensis* na Serra de Maranguape. Para o desenvolvimento do estudo, duas hipóteses foram testadas: a primeira afirmava que *A. baturitensis* apresentava maiores índices de diversidade genética do que *A. maranguapensis*, por ocorrer em quatro brejos de altitude do Ceará; a segunda abordava que *A. baturitensis* apresentava diferentes padrões de estruturação populacional e possuía diferentes estoques populacionais, associados com suas áreas de ocorrências. Foram realizados procedimentos moleculares a partir das sequências de DNA geradas dos 56 tecidos que estavam depositados no Núcleo Regional de Ofiologia da UFC (NUROF) e das 24 sequências presentes no Genbank. Essas sequências pertenciam aos indivíduos coletados na Serra de Maranguape, Serra da Aratanha, Maciço de Baturité e Planalto da Ibiapaba e o marcador mitocondrial utilizado para a realização das análises foi o 16S rRNA. Diante disso, os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram avaliados, as redes de haplótipos foram construídas para verificarmos presença de fluxo gênico e a Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para observarmos a variabilidade genética dentro e entre as populações. Através dos resultados, concluímos que as hipóteses foram refutadas, pois observamos que, apesar da espécie *A. maranguapensis* ser criticamente ameaçada de extinção, apresentou índices de diversidade mais elevados em comparação com *A. baturitensis*. Foi evidenciada ausência de estrutura populacional em *A. baturitensis*, e as quatro populações conhecidas para a espécie parecem consistir em um único estoque populacional. Ademais, os resultados acerca da variabilidade genética nas populações mostraram que *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis* são espécies que não compartilham fluxo gênico. Além desta avaliação, nosso estudo contribuiu para novas informações sobre a ocorrência e identificação de *A. baturitensis* na Serra de Maranguape. Constatamos que essa espécie ocorre em sintopia com *A. maranguapensis*, ocorrendo em altitudes superiores a 600 metros e utilizando o micro-habitat das bromélias.

Palavras-chave: genética da conservação; diversidade genética; estrutura populacional; anfíbios.

ABSTRACT

The world is facing an unprecedented extinction crisis, where current rates of species loss exceed historical standards. With the advent of molecular techniques, conservation genetics emerges as a tool capable of analyzing relevant aspects of species bioecology, especially for threatened species such as amphibians. Therefore, the overall objective of this study was to conduct the first population genetic study of the species *Adelophryne maranguapensis* and *Adelophryne baturitensis*, as well as to provide information on the distribution of *A. baturitensis* in the Serra de Maranguape. For the development of the study, two hypotheses were tested: the first stated that *A. baturitensis* exhibited higher levels of genetic diversity than *A. maranguapensis*, as it occurs in four high-altitude bogs in Ceará; the second addressed that *A. baturitensis* showed different patterns of population structuring and had different population stocks associated with its occurrence areas. Molecular procedures were carried out using DNA sequences generated from 56 tissues deposited at the Regional Nucleus of Ophiology of UFC (NUROF) and 24 sequences available on GenBank. These sequences belonged to individuals collected in the Serra de Maranguape, Serra da Aratanha, Maciço de Baturité, and Planalto da Ibiapaba, and the mitochondrial marker used for the analyses was 16S rRNA. Accordingly, haplotype and nucleotide diversity indices were evaluated, haplotype networks were constructed to examine gene flow, and Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed to observe genetic variability within and between populations. Based on the results, we concluded that the hypotheses were refuted, as we observed that, despite the species *A. maranguapensis* being critically endangered, it exhibited higher diversity indices compared to *A. baturitensis*. The absence of population structure in *A. baturitensis* was evidenced, and the four populations known for the species appear to consist of a single population stock. Furthermore, the results regarding genetic variability in populations showed that *Adelophryne maranguapensis* and *Adelophryne baturitensis* are species that do not share gene flow. In addition to this assessment, our study contributed new information on the occurrence and identification of *A. baturitensis* in the Serra de Maranguape. We found that this species occurs in syntopy with *A. maranguapensis*, occurring at altitudes above 600 meters and utilizing bromeliad microhabitats.

Keywords: conservation biology; genetic diversity; population structure; amphibians.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Espécies do gênero *Adelophryne* inseridas aos clados Norte e Sul da Mata Atlântica e ao clado Norte da Amazônia..... 28
- Figura 2 – Distribuição de *Adelophryne baturitensis* e *Adelophryne maranguapensis* e a rede de haplótipos para o marcador mitocondrial 16S rRna. As cores usadas no mapa para representar cada localidade correspondem às cores usadas na rede de haplótipos. Os pontos e os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Índices de diversidade genética encontradas para as espécies <i>Adelophryne baturitensis</i> e <i>Adelophryne maranguapensis</i> . N - número dos indivíduos analisados; S - número de sítios polimórficos; H - o número de haplótipos; h - diversidade haplotípica; π - diversidade nucleotídica.....	30
Tabela 2	– Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as espécies <i>Adelophryne maranguapensis</i> e <i>Adelophryne baturitensis</i> usando o marcador mitocondrial 16S rRNA. Avaliado quanto à diversidade genética dentro e entre populações.....	32
Tabela 3	- Análise do F_{st} par a par para as populações das espécies <i>Adelophryne maranguapensis</i> e <i>Adelophryne baturitensis</i>	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Marcadores moleculares utilizados nos estudos genéticos em anfíbios	17
3.2	Ferramentas genéticas para a conservação das espécies	19
3.3	Pesquisas de estruturação e diversidade genética em anuros neotropicais	21
3.4	As rãzinhas <i>Adelophryne maranguapensis</i> e <i>Adelophryne baturitensis</i>	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que três espécies passam pelo processo de extinção a cada hora, evento nunca visto quando comparado às mudanças ambientais que já ocorreram no planeta e foram responsáveis por reduzir a taxa de espécies (Desalle; Amato, 2017). A sexta extinção em massa é evidente com números que excedem o surgimento de novas espécies, distinguindo-se dos outros eventos de extinção pois o homem é o principal fator responsável (Frankham *et al.*, 2003). A Plataforma de Política Científica sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos divulgou que cerca de 50% dos ecossistemas da Terra haviam diminuído, e estes apresentam 25% das espécies em risco de extinção (Kardos, 2021).

Com a redução da biodiversidade há o comprometimento da diversidade genética dos ecossistemas, das comunidades e das populações, devido às alterações ambientais, às espécies exóticas, à poluição e à exploração dos habitats (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008; Kardos, 2021). Ademais, as doenças como a quitridiomicose e a ranavirose, que se espalham rapidamente, causam declínios significativos em populações de anfíbios (Gray; Chinchar, 2015; Moura-Campos *et al.*, 2021; Rebouças *et al.*, 2021). Diante disso, muitas catástrofes ambientais que ocorrem há muitos anos, em diversas áreas, são, na maioria das vezes, causadas pelo homem e atuam na redução do tamanho das populações. Isso altera a estrutura genética das populações, as quais podem apresentar endocruzamentos entre os indivíduos, influenciando na redução da adaptação ao meio modificado e facilitando um possível processo de extinção (Awise, 1995; Frankham; Ballou; Briscoe, 2008).

A Biologia da Conservação surgiu com o propósito de contribuir para a redução da extinção das espécies por meio de estudos envolvendo diferentes áreas, como ecologia, genética, biogeografia, demografia, filogeografia, sistemática, fisiologia, incluindo a própria biologia dos seres ameaçados (Hauffe; Sbordoni, 2010; Soulé, 1985). Em meados de 1978, foi proposta a Primeira Conferência Internacional de Biologia da Conservação e, em 1985, uma sociedade foi criada para discutir e consolidar propostas em prol da manutenção de estudos ecológicos e evolutivos das espécies que precisam ser conservadas (Soulé; Wilcox, 1980; Soulé, 1985). A implementação de estudos de Biologia da Conservação foi inspirada no interesse dos jovens cientistas da época em proteger a biodiversidade (Soulé; Simberloff, 1986).

Os biólogos conservacionistas procuraram meios de consolidar suas propostas ambientais através do uso da genética que propicia respostas aceleradas, coerentes e eficazes para a conservação das espécies, além de se aprofundar na compreensão dos aspectos

comportamentais, evolutivos e ecológicos dos seres vivos (Hauffe; Sbordoni, 2010; Holsinger, 1996). A união entre a genética e a conservação tornou-se crucial para o aprimoramento das pesquisas ambientais, proporcionando trabalhos, principalmente, de genética das populações (Hauffe; Sbordoni, 2010).

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, a Genética da Conservação, uma vertente da Biologia da Conservação, emerge com estudos específicos que analisam a estruturação e a diversidade genética desde os ecossistemas até os indivíduos (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008; Hedrick, 2001). Assim, atua como uma ferramenta valiosa para analisar as espécies em declínio, o impacto de fatores ambientais e genéticos na sobrevivência delas, bem como guiar estratégias de conservação (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008; Soulé, 1985). O advento das novas tecnologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação do DNA, propiciou o desenvolvimento dessa nova vertente (Ouborg et al., 2010). Ademais, essas novas tecnologias possibilitam o sequenciamento completo dos genomas em busca de compreender como as espécies estão estruturadas geneticamente, podendo propor medidas que ajudem no enfrentamento das variações do ambiente (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008; Hedrick, 2001).

Nessa perspectiva, a Genética da Conservação contribui como uma ferramenta que auxilia na manutenção dos ecossistemas, uma vez que os manejos e as realocações de espécies ameaçadas dependem do entendimento dos aspectos genéticos das espécies (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008). Ademais, pode elucidar questionamentos que antes eram limitados pela falta de tecnologias moleculares apropriadas para estudar o genoma e como o ambiente interagia com o mesmo (Ouborg et al., 2010). As técnicas moleculares ajudam na compreensão da estruturação e da diversidade genética das espécies, na detecção da caça e na exploração dos animais silvestres, auxiliando nas condutas necessárias para a proteção (Frankham; Ballou; Briscoe, 2008). A proteção dos ecossistemas devem ser priorizadas pelas práticas conservacionistas, garantindo uma maior variabilidade genética e possibilitando estratégias para a conservação das espécies ameaçadas (Dewoody *et al.*, 2021).

Os estudos de Genética da Conservação podem ajudar os anfíbios contra a ameaça de extinção, visto que fazem parte do grupo de vertebrado mais prejudicado pelas mudanças climáticas em conjunto com as alterações do habitat, a poluição, as espécies exóticas e as doenças, com cerca de 41% de espécies ameaçadas no mundo (Luedtke *et al.*, 2023; Toledo et al., 2023). Com 1.188 espécies descritas, o Brasil é o país com a maior diversidade de espécies da Ordem Anura (Loebmann; Haddad, 2010; Oliveira *et al.*, 2019; Segalla *et al.*, 2021). No entanto, é preocupante notar que essa riqueza biológica está em declínio, uma vez que 58

espécies de anfíbios encontram-se atualmente em algum grau de ameaça no país, e duas já são consideradas extintas: *Boana cymbalum* (Bokermann, 1963) e *Phrynomedusa fimbriata* Miranda-Ribeiro, 1923, de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2022). Assim, é crucial o desenvolvimento de estudos que analisem a estruturação populacional e a diversidade genética das espécies, principalmente das ameaçadas, como é o caso de *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994, *Rhinella casconi* Roberto, Brito & Thomé, 2014, *Proceratophrys ararype* Mângia, Koroiva, Nunes, Roberto, Ávila, Sant'Anna, Santana & Garda, 2018, para o estado do Ceará, pois essas pesquisas podem auxiliar nas estratégias de conservação.

No brejos-de-altitude do Ceará no Brasil, as únicas espécies existentes do gênero *Adelophryne* pertencentes ao clado Norte da Mata Atlântica são: *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) e *Adelophryne baturitensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994). Ambas as espécies estão inseridas dentro da família Eleutherodactylidae e da subfamília Phyzelaphryninae, apresentando tamanho diminuto (Hoogmoed; Borges; Cascon, 1994), e até o desenvolvimento desse estudo não apresentavam informações acerca da genética populacional.

Adelophryne maranguapensis é uma espécie endêmica da Serra de Maranguape, no Estado do Ceará, com uma área de distribuição restrita de aproximadamente 13 km². Esta espécie passa por desenvolvimento direto e pode ser encontrada tanto durante o dia quanto à noite, em ambientes de serrapilheira e arbóreos, especialmente em bromélias, onde deposita seus ovos a altitudes acima de 600m (Cassiano-lima, 2011; Cassiano-lima et al., 2020). Embora existam estudos sobre a descrição, micro-habitat, reprodução, dieta e parasitismo desta espécie (Cassiano-lima, 2011; Cassiano-lima et al., 2020; Araújo et al., 2023; De Oliveira et al., 2022), informações sobre genética de conservação ainda são escassas. *Adelophryne maranguapensis* está altamente afetada por atividades humanas e mudanças climáticas (Corlett, 2012), sendo classificada como criticamente ameaçada de extinção (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023).

Adelophryne baturitensis Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) é encontrada no Maciço de Baturité, Serra de Maranguape, Serra da Aratanha e Planalto da Ibiapaba, no Estado do Ceará, Brasil. Esta espécie é uma das mais amplamente distribuídas no Ceará e, portanto, é classificada no status de menor preocupação (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023). *Adelophryne baturitensis* é uma espécie diurna que pode ser encontrada na serrapilheira ou em bromélias (Hoogmoed; Borges; Cascon, 1984). No entanto, informações detalhadas sobre seu micro-habitat, bioacústica, aspectos reprodutivos e genética populacional ainda são escassas.

Portanto, as perguntas que serviram de embasamento para o desenvolvimento desse trabalho foram: 1. Como estão os índices de diversidade genética para as espécies *A. maranguapensis* e *A. baturitensis*, será que a espécie com menor diversidade genética apresenta distribuição mais restrita? 2. Como estão estruturadas as populações de *Adelophryne baturitensis*, cada brejo corresponde a um estoque populacional? Diante disso, a primeira hipótese testada indicava que *A. baturitensis* apresentava maiores índices de diversidade genética do que *Adelophryne maranguapensis*, por ocorrer em quatro brejos de altitude do Ceará. Além desta, a segunda hipótese testava que *A. baturitensis* apresentava estruturação populacional e diferentes estoques populacionais para suas populações. A partir disso, apresentamos o primeiro recorte acerca da genética populacional das espécies *A. maranguapensis* e *A. baturitensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a primeira avaliação da genética das populações das espécies *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis*, além de fornecer informações sobre a distribuição de *A. baturitensis* na Serra de Maranguape.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar os níveis de diversidade genética entre estas espécies;
- Analisar a estruturação genética das populações;
- Apresentar novas perspectivas para a distribuição de *Adelophryne baturitensis* na Serra de Maranguape.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Marcadores moleculares utilizados nos estudos genéticos em anfíbios

A introdução das técnicas moleculares permitiu o desenvolvimento de trabalhos acerca da organização das populações e do tamanho das mesmas, utilizando os marcadores moleculares (Wagner *et al.*, 2005; Zeisset; Beebee, 2008). Por meio dessa ferramenta, é possível caracterizar as diferenças, especificamente, os polimorfismos que existem nas sequências do DNA. Os marcadores moleculares são uma sequência específica de DNA que diferencia as espécies quando os seus genomas são comparados (Agarwal *et al.*, 2008). São obtidos pela extração do DNA através do tecido do ser vivo que foi coletado, ou seja, os marcadores são herdados e não sofrem interferência ambiental, destacando diversas informações sobre os caracteres dos organismos (Avisé, 1993; Agarwal *et al.*, 2008; Faucher; Godé; Arnaud, 2016).

Os marcadores utilizados frequentemente são aqueles que têm um custo benefício satisfatório e que detectam graus de polimorfismos. Eles são amplamente distribuídos no genoma, apresentam multialelismo, herança codominante e são reproduzidos de forma consistente (Adhikari *et al.*, 2017; Zolet *et al.*, 2017). As técnicas mais utilizadas são aquelas que permitem observar os polimorfismos no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP); os polimorfismos de sítio único (SNP); os polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP); os marcadores de sequências expressas (EST) e microssatélites (Agostini *et al.*, 2022; Carvalho *et al.*, 2020; Faucher; Godé; Arnaud, 2016; Hilsdorf; Hallerman, 2017; Luna *et al.*, 2017; Rowan; Arbogast; Kamel, 2022).

Os marcadores moleculares que utilizam o DNA são definidos de acordo com a herança alélica, podendo ser codominantes, quando são capazes de diferenciar indivíduos homocigotos ou heterocigotos, ou dominantes, quando reconhecem a presença ou ausência de um determinado caractere. Esses marcadores ainda podem ser caracterizados em mitocondriais ou nucleares, muitas vezes utilizados juntos para um estudo mais preciso da história evolutiva das espécies (Faivovich *et al.*, 2010). Os nucleares apresentam herança de ambos os progenitores, já os mitocondriais são herdados da linhagem materna. Os índices de mutações nos marcadores mitocondriais são mais altos quando comparados à maioria dos nucleares, além de não passarem por recombinação e serem boas ferramentas para o estudo da história demográfica (Zolet *et al.*, 2013). É importante salientar que a escolha do marcador molecular depende do objetivo de cada estudo (Adhikari *et al.*, 2017; Zolet *et al.*, 2017).

Os marcadores nucleares mais utilizados atualmente são os microsatélites, pois permitem um estudo mais detalhado e estimam a presença de heteroziguidade dentro das populações. São ferramentas que apresentam diferentes alelos que correspondem a quantidades diferentes de unidades de repetição e disponibilizam resultados que ajudam na criação de estratégias de conservação (Faucher; Godé; Arnaud, 2016; Nali *et al.*, 2014). Os microsatélites servem como referência em diversos estudos e podem ser utilizados para analisar o tamanho das populações e a diversidade genética (Ouborg *et al.*, 2010).

Os marcadores moleculares mitocondriais avaliam as diferentes gerações maternas do indivíduo. São usados para realizar genotipagens que auxiliam nas pesquisas de filogeografia, de fluxo gênico, e de endogamia (Beebe; Rowe, 2004; Faucher; Godé; Arnaud, 2016;). Além disso, possibilitam o desenvolvimento de estudos mais específicos para compreender as diferenças filogenéticas e a estrutura genética, assim como avaliam a diversidade genética presente entre os indivíduos da mesma espécie e as barreiras geográficas que influenciam o fluxo gênico nas populações (Funk *et al.*, 2007; Loughheed *et al.*, 2006; Mota, 2010; Lourenço-de-Moraes *et al.*, 2018; Vences *et al.*, 2005). As sequências dos genes mitocondriais como citocromo b (CytB), citocromo oxidase I (COI), 12S rRNA, 16S rRNA, e a alça D da região controle (D-loop) são encontradas no Genbank, maior plataforma de dados de sequências de DNA das espécies em geral. Dentre esses marcadores moleculares, o D-loop e o 12S são os que apresentam menor número de sequências de DNA na plataforma com 310.283 e 493.006, respectivamente (NCBI, 2023).

O 16S rRNA codifica a subunidade maior do ribossomo sendo muito utilizado na identificação das diferentes espécies de anfíbios por estar em uma região conservada. Diante disso, pode ser considerado o DNA barcoding dos anfíbios, facilitando os estudos moleculares e genéticos, além de ser facilmente amplificado. Embora seja um marcador conservado, ainda apresenta algumas taxas de mutação nas regiões variáveis (Vences, *et al.*, 2005; Wilson; Maxson; Sarich, 1974). O 12S rRNA codifica a subunidade menor do ribossomo e apresenta características semelhantes ao 16S rRNA. Diversas pesquisas utilizam estes dois marcadores associados para facilitar as pesquisas de filogeografia e filogenia (Austin *et al.*, 2002; Ron *et al.*, 2006; Fouquet *et al.*, 2012). O 12S rRNA também é utilizado em pesquisas acerca de outros grupos como moluscos (Guzmán; Vogler; Beltramino *et al.*, 2021) peixes (Kumari *et al.*, 2019), aves (Li; Da; Bao, 2023) e répteis (Ferreira; Vasconcelos; Harris, 2023).

O marcador mitocondrial COI apresenta uma maior variabilidade quando comparado ao 16S rRNA, por isso, pode dificultar o processo de identificação dos anfíbios. Além disso, a amplificação do COI é mais complexa que a do 16S rRNA (Hebert *et al.*, 2003;

Vences, *et al.*, 2005). O gene COI evolui a uma taxa molecular aproximadamente três vezes mais rápida do que o 12S e 16S rRNA, devido em grande parte à alta incidência de substituições de bases no terceiro nucleotídeo da sua posição. Essa característica leva a uma evolução mais acelerada (Knowlton; Weigt, 1998; Cox; Hebert, 2001; Wares; Cunningham, 2001). O COI é particularmente valioso para estudos filogenéticos mais aprofundados em comparação com alternativas como o Citocromo b (Cytb), devido à tendência de apresentar mudanças mais lentas em sua sequência de aminoácidos (Simmons; Weller, 2001; Lynch; Jarrell, 1993).

Além desses marcadores mitocondriais, a alça D da região controle do DNA, conhecida como D-loop, é proveniente da mitocôndria, sendo utilizado nos estudos de estruturação e de diversidade genética nas populações, pois apresenta alta taxa de mutação (Kuhn, 2014). É uma área que não é transcrita no DNA mitocondrial, porém, marca o início do processo de replicação e contém os promotores essenciais para a transcrição do DNA mitocondrial. Durante a replicação é originada uma alça em D, a qual representa o nome do gene, que se desloca juntamente com a cadeia formada (Takamatsu, 2002). O D-loop é mais mutável que os outros genes mitocondriais, dessa forma, é perceptível avaliar a formação dos polimorfismos e as permutas que ocorrem entre os nucleotídios. É utilizado como marcador em estudos de diversidade genética e de filogeografia (Miyazono *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021).

Portanto, os marcadores mitocondriais se consolidaram como uma ferramenta para investigações sobre a estrutura genética das populações, análises filogenéticas e estudos de relações evolutivas. Em resumo, ao fazer uso do marcador mitocondrial apropriado é possível obter conclusões confiáveis sobre parentesco, distância genética, variabilidade genética, bem como caracterizar a estrutura e o tamanho efetivo das populações (Bignotto, 2010; Faucher; Godé; Arnaud, 2016).

3.2. Ferramentas genéticas para a conservação das espécies

Por meio do estudo da estrutura populacional das populações é possível analisar os impactos da seleção natural, da deriva genética, da migração e da mutação na troca do fluxo gênico que ocorre entre os indivíduos da mesma espécie. Essas análises são fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas nas áreas da epidemiologia, da ecologia, da genética e da conservação (Hamrick, 1982; Balloux; Lugon-Moulin, 2002). As pesquisas genéticas investigam a história demográfica desde o passado até o presente, avaliando as populações que apresentavam heterogeneidade e um tamanho ideal, porém, tornaram-se pequenas com

significativos endocruzamentos (Chavez *et al.*, 2011; Frankham; Ballou; Briscoe, 2008; Ouborg *et al.*, 2010).

É relevante estudar as alterações populacionais responsáveis por modificar a estruturação genética e influenciar no desenvolvimento das mesmas. A perda da diversidade genética e a ocorrência de endogamia contribuem para o aumento da probabilidade da população ser extinta, porque não consegue enfrentar as adversidades ambientais que surgem em um ambiente modificado. Por isso, as evidências apresentadas não podem ser ignoradas, já que o manejo correto das espécies pode ajudar na conservação (Frankham, 2003; Chavez *et al.*, 2011; Ouborg *et al.*, 2010).

Espécies ameaçadas são beneficiadas pelos trabalhos que analisam a estruturação e a diversidade genética, pois proporcionam o desenvolvimento de práticas que ajudam na recuperação no habitat natural (Frankham, 2005). No mundo, são recorrentes as pesquisas que analisam como a estruturação e as taxas de diversidade genética das populações de anfíbios estão organizadas. Nesses estudos são observados os eventos filogeográficos que atuaram na história de vida e na demografia das espécies, como o realizado por Wei *et al.* (2020), na China. Por meio da técnica de sequenciamento de nova geração (SLAF) que possibilitou a descoberta dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) obtiveram resultados importantes como: a presença de diferentes linhagens entre as populações de *Hyla annectans* Jerdon (1870). Além de conseguirem avaliar que as mudanças climáticas, a seleção natural e a geografia, são fatores que modificam a diversidade genética e fenotípica em *Hyla annectans*.

No Japão, estudos de filogeografia similares aos citados anteriormente também foram desenvolvidos, como o de Fukutani *et al.* (2022) que visava compreender a história evolutiva das linhagens dos sapos japoneses. Episódios de movimentação das placas tectônicas que formaram o arquipélago do Japão e os eventos glaciais podem ter contribuído na distribuição atual das espécies.

Analisar como estão organizados os padrões genéticos das populações contribui não apenas para os estudos de filogeografia, mas são essenciais para que propostas eficazes de conservação sejam elaboradas. Na América do Norte, mais precisamente no leste da Virgínia, trabalhos de genética da conservação foram realizados com duas espécies de salamandras: uma mais restrita, *Plethodon nettingi* Green (1938), e outra bem mais distribuída, *Plethodon cinereus* Green (1818). A finalidade era estudar a variabilidade genética, os fatores da geografia e da história de vida que podem ter interferido no fluxo gênico entre os indivíduos. Foram comparadas as populações das duas espécies para que propostas de conservação fossem elaboradas para a espécie *P. nettingi*, que vive em uma área de montanha e é ameaçada de

extinção. Como medidas foram propostas construções de corredores ecológicos para permitir a conexão entre as diferentes populações da espécie mencionada. Desse modo, possibilitando o cruzamento entre os indivíduos e reduzindo as taxas de endogamia dentro da população (Rowan; Arbogast; Kamel, 2022).

A América Latina é crucial para o desenvolvimento de pesquisas de Genética da Conservação pelos altos índices de biodiversidade e de áreas suscetíveis à proteção pela quantidade significativa de espécies silvestres (Mittermeier *et al.*, 1998). No Brasil são desenvolvidos estudos na área, como o realizado com a população de *Saguinus bicolor* Spix (1823), que avaliou a estrutura populacional e a diversidade genética utilizando nove loci de microssatélites das amostras de cabelo dos animais. O trabalho foi realizado nos fragmentos de florestas onde essa espécie é encontrada em Manaus. Encontraram como principal resultado a redução da diversidade genética, explicado pela expansão urbana que dividiu o habitat original da espécie, gerando os gargalos genéticos, as mudanças de estruturação populacional e a erosão genética nos grupos que vivem nos fragmentos urbanos. Diante disso, conseguiram recomendar medidas que ajudassem novamente na integração das populações naturais, como a criação dos corredores ecológicos e a proteção ambiental dos fragmentos (Rodríguez-Clark *et al.*, 2015; Farias *et al.*, 2015).

Outro exemplo são as pesquisas relacionadas ao Soldadinho do Araripe (*Antilophia bokermanni*), endêmico da Chapada do Araripe no Estado do Ceará. É uma espécie criticamente ameaçada devido à destruição do seu habitat para a ampliação das terras agrícolas (Silva *et al.*, 2011). Por meio de estudos de diversidade genética, utilizando os microssatélites, percebeu-se que os índices de heterozigosidade e de variedade alélica estão reduzidos na população. Dessa forma, com os resultados desse estudo, os cientistas conseguem promover ações de conservação para evitar que as atividades antrópicas contribuam para a extinção da espécie no ecossistema (Souza *et al.*, 2019).

3.3 Pesquisas de estruturação e diversidade genética em anuros neotropicais

As pesquisas de Genética da Conservação explorando os anfíbios neotropicais são cruciais, visto que fazem parte do grupo de vertebrado mais ameaçado do mundo em virtude da contaminação por doenças, da inserção de espécies exóticas no habitat, da poluição, da agropecuária e do crescimento urbano e das mudanças climáticas (Stuart *et al.*, 2004; Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade, 2018; Luedtke *et al.*, 2023). Aproximadamente 41% das espécies se encontram ameaçadas ou na iminência da extinção

(Beebee, 2005; Hoffmann *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2023; MMA, 2022; SEMA, 2022), principalmente pelos efeitos das alterações no clima (Luedtke *et al.*, 2023). As mudanças climáticas e o surgimento de doenças têm comprometido ainda mais o crescimento, a alimentação e a reprodução dos anfíbios, contribuindo significativamente para o declínio das populações (Li *et al.*, 2013; Canestrelli *et al.*, 2017; Toledo *et al.*, 2023; Luedtke *et al.*, 2023).

No Brasil, a Ordem Anura tem ampla distribuição e apresenta a maior diversidade desses animais, com 1.144 espécies descritas (Segalla *et al.*, 2021), quando comparada aos outros países (Loebmann; Haddad, 2010; Oliveira *et al.*, 2015), número que está abaixo do real, pois ao longo dos anos outras espécies de anuros foram descritas. Além dos fatores mencionados acima, as populações dos anfíbios também sofrem com a contaminação causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999) (Toledo *et al.*, 2023). Esses surtos de quitridiomiose e, conseqüentemente, o declínio dos anuros, são intensificados pelas alterações no clima devido às mudanças na pluviosidade e na temperatura (Moura-Campos *et al.*, 2021; Rebouças *et al.*, 2021).

Por isso, avaliações da estruturação populacional e da diversidade genética em anuros têm avançado muito entre as pesquisas. Ramos *et al.* (2018), fazendo uso da genética, avaliaram a estruturação populacional e a diversidade genética da espécie *Pithecopus megacephalus* Miranda-Ribeiro (1926) que ocorre em um conjunto de montanhas, considerada centro de endemismo, na região Sudeste. Por meio da utilização dos marcadores nucleares e mitocondriais descobriram que existem três populações distintas e bem estruturadas localizadas no centro, no norte e no sul da Serra do Espinhaço. Ademais, ao analisarem a área onde vivem atualmente perceberam ter sido o local da maior interação entre as populações ancestrais. Diante disso, os resultados desse estudo proporcionam conhecimento acerca da espécie que podem ser utilizados para definir um melhor status de conservação, pois está classificada na lista de espécies ameaçadas da IUCN como espécie com dados deficientes (IUCN, 2008).

Resultados importantes acerca do complexo da espécie *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815), que se distribui na América do Sul, incluindo o Brasil, foram encontrados com o apoio dos marcadores mitocondriais e nucleares. A partir disso, percebeu-se que existem duas populações (Norte e Sul) bem estruturadas da espécie, provavelmente divergiram pela destruição do habitat causada pelas mudanças que ocorreram no clima durante o Pleistoceno. Essas alterações climáticas influenciaram a diversidade genética encontrada dentro do grupo. Com exceção da linhagem que ocorre na Chapada Diamantina, as populações apresentaram um aumento significativo do seu tamanho em um período de 300.000 anos. Em relação ao nicho ecológico, as quatro espécies dentro do complexo de *L. latrans* apresentaram divergência em

seus nichos, não havendo sobreposição, inclusive entre as populações do Norte e do Sul de *L. latrans* (Magalhães *et al.*, 2022).

A estrutura da população da espécie *Physalaemus cuvieri* Fitzinger (1826) foi analisada no Cerrado para estimar se a fragmentação do habitat causada pelas ações antrópicas alteram os fluxos gênicos e a diversidade genética entre as populações. Diante dessa pesquisa, foi observado a interrupção do fluxo gênico e a diminuição da diversidade da espécie. Com esses resultados, é perceptível que a perda do habitat pode impactar na estruturação da população mesmo que a espécie seja bem distribuída (Campos-Telles *et al.*, 2007). Na Serra da Canastra, área de Cerrado, estudo semelhante foi realizado com a espécie *Bokermannohyla ibitiguara* Cardoso (1983). Através dos marcadores microssatélites pode-se notar uma limitação do fluxo gênico entre as quatro populações que ocorrem fora e dentro da área, bem como a presença de populações bem estruturadas. Observou-se principalmente que a topografia do Cerrado influencia a estruturação genética da espécie. Por isso, é crucial considerar os efeitos da complexidade topográfica do Cerrado ao analisar propostas de conservação para área, pois é um fator decisivo para a manutenção das espécies que se distribuem no bioma (Nali *et al.*, 2020).

Na Amazônia, investigações de estruturação populacional de anuros, utilizando o marcador mitocondrial 16S rRna, foram executadas com o objetivo de compreender os eventos que influenciaram a diversificação das populações (Fouquet *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2018; Moraes *et al.*, 2022). A hipótese de que os rios atuavam como barreiras geográficas foi aceita no estudo de Fouquet *et al.* (2015) e Ortiz *et al.* (2018), sendo responsáveis por modificar a estruturação e a diversidade genética dos anuros. A história de vida das espécies, como o habitat, o crescimento, a reprodução e os fenômenos de migração foram alterados por essas barreiras (Fouquet *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2018). Ademais, com o mesmo marcador citado acima, Moraes *et al.* (2022) conseguiram restabelecer a história evolutiva do gênero *Amazophrynella* que se diversificou durante o Neogeno e passou por especiação no Pleistoceno. No mesmo estudo, descobriram 21 novas espécies para o gênero e diferentes linhagens que podem estar associadas às mudanças que ocorreram na Floresta Amazônica ao longo do tempo, envolvendo a distribuição das chuvas e as modificações no habitat.

Na Caatinga, Mângia *et al.* (2020) revisaram os dados taxonômicos de três espécies do gênero *Proceratophrys*, utilizando a taxonomia integrativa, como os aspectos da biocústica, da morfologia, da morfometria e da genética. O objetivo do trabalho foi desenvolver um estudo taxonômico mais consistente para verificar as descrições das espécies: *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883), *Proceratophrys caramaschii* e *Proceratophrys aridus*. Os

pesquisadores notaram que os indivíduos analisados para a elaboração da diagnose de *P. caramaschii* e *P. aridus* se tratavam de variações da espécie *P. cristiceps*. As vocalizações das espécies não diferiram e o marcador 16S rRna mostrou que as distâncias genéticas entre *P. caramaschii* e *P. cristiceps* eram muito baixas, bem como entre *P. aridus* e *P. cristiceps*. Assim, as duas espécies foram sinonimizadas a *P. cristiceps*.

Estudos utilizando as técnicas moleculares e genéticas são fundamentais para descrever a diversidade biológica, principalmente, as espécies que podem estar em um estado grave de ameaça (Carnaval; Bates, 2007; Souza *et al.*, 2019; Kardos, 2021). Através das ferramentas genéticas foi possível analisar a diversificação do gênero *Pristimantis* nas florestas úmidas encontradas na Caatinga. Essas mudanças ocorreram durante o Pleistoceno ocasionadas pelo crescimento das populações do gênero ou de movimentos das placas tectônicas que alteraram o ambiente. O trabalho retrata a relevância de se estudar esses enclaves florestais na Caatinga por apresentarem diversidade críptica e espécies endêmicas (Trevisan *et al.*, 2020).

3.4 As rãzinhas *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis*

O gênero *Adelophryne* apresenta 12 espécies pertencentes ao clado Terrarana e inseridas na família Eleutherodactylidae e na subfamília Phyzelaphryninae. As espécies têm um tamanho pequeno e são visualizadas durante todo o ano ou com mais frequência no período chuvoso. Ocorrem nas florestas úmidas e são encontradas nas serrapilheiras ou nas bromélias (Hoogmoed; Lescure, 1984; Hoogmoed; Borges; Cascon, 1994; Macculloch *et al.*, 2008; Cassiano-Lima *et al.*, 2011; Fouquet *et al.*, 2012; Lourenço-de-moraes *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012; Lourenço-de-Moraes *et al.*, 2014; Lourenço-de-Moraes *et al.*, 2018; Taucce *et al.*, 2020; Lourenço-de-Moraes *et al.*, 2021). Apresenta uma distribuição descontínua no Leste, Norte e Nordeste do Brasil, podendo ser encontrado na área superior da Bacia Amazônica, na Guiana e na Venezuela (Fouquet *et al.*, 2012).

Embora haja o conhecimento do posicionamento filogenético das espécies, os estudos de genética da população são escassos (Fouquet *et al.*, 2012). Fouquet *et al.* (2012) foram os pioneiros ao verificarem o monofilismo do grupo e a relação de parentesco com o gênero *Phyzelaphryne* utilizando os marcadores mitocondriais: COI, CytB, 12S e 16S rRNA e os loci nucleares RAG1, POMC e TYR. Como resultados obtiveram que *Adelophryne* é um grupo monofilético e grupo irmão de *Phyzelaphryne*, ademais, apresentam três clados distintos: Norte da Floresta Amazônica, Norte da Mata Atlântica e Sul da Mata Atlântica, que se dispersaram em épocas diferentes (Figura 1).

O grupo Norte da Floresta Amazônica surgiu durante o Mioceno e iniciou sua diversificação há cerca de 13 milhões de anos, muito antes dos grupos Norte e Sul da Mata Atlântica começarem a se diversificar por volta de sete milhões de anos. Os grupos Norte e Sul da Mata Atlântica se dispersaram através do Norte da Floresta Amazônica entre 23 e 16 milhões de anos. Essas informações de Biogeografia foram detectadas com o uso e a disponibilidade dos marcadores moleculares para as espécies do gênero. Esses marcadores proporcionaram a realização de uma estimativa de que existiam mais espécies para o gênero, com destaque para os grupos da Mata Atlântica. Isso acontece devido à diversificação genética, restringindo o fluxo gênico entre as populações e desencadeando uma diferenciação genética cada vez mais acelerada, promovendo o surgimento de novas espécies (Fouquet *et al.*, 2012).

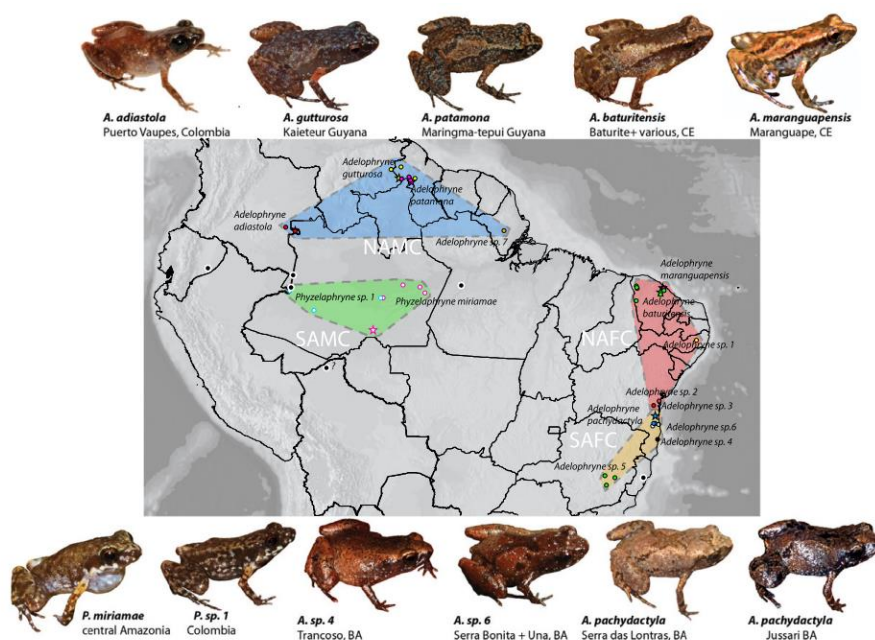
A subfamília *Phyzelaphryninae* é extremamente sensível às mudanças ambientais e climáticas e pode apresentar uma redução populacional significativa, além de estarem suscetíveis à contaminação pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Mesquita *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, é relevante que estudos de genética da conservação sejam desenvolvidos, visto que, algumas espécies do gênero se encontram na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas. *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) está classificada como criticamente ameaçada de acordo com a atualização das Listas do Brasil, do Ceará e da IUCN (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023). *A. baturitensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) é uma das espécies mais bem distribuídas do Ceará, por isso, está classificada como menos preocupante (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023). *A. adiaistola* Hoogmoed & Lescure (1984) e *A. gutturosa* Hoogmoed & Lescure, 1984 estão classificadas como menos preocupantes, aparecendo somente na Lista da IUCN (IUCN, 2004), assim como, *A. pachydactyla* Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994 e *A. patamona* MacCulloch, Lathrop, Kok, Minter, Khan & Barrio-Amoros, 2008 que estão classificadas como dados deficientes (IUCN, 2004; IUCN, 2017).

No Ceará, as espécies *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) e *Adelophryne baturitensis* Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) se distribuem nos brejos-de-altitude e fazem parte do clado Norte da Mata Atlântica. São enclaves florestais úmidos com altitude entre 500 a 1100 m que estão inseridos no semiárido nordestino, rodeado por vegetação que compõem o domínio da caatinga (Tabarelli; Santos, 2004). O impacto das chuvas orográficas no microclima influencia a fauna relictual presentes nessas “áreas de exceção” que estão relacionadas com a fauna e a flora das florestas neotropicais (Borges-nojosa; Caramaschi, 2003; Borges-nojosa, 2007; Castro *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2020a; Silveira *et al.*, 2020b; Freitas *et al.*, 2023).

Adelophryne maranguapensis Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) é endêmica da Serra de Maranguape, no Estado do Ceará, cuja área de vida é restrita a uma extensão de aproximadamente 13 km². Apresenta desenvolvimento direto sendo encontrada nos períodos diurnos e noturnos, na serrapilheira e em ambientes arbóreos, como as bromélias, sítio de desova do animal em altitudes acima dos 600m (Cassiano-lima, 2011; Cassiano-lima *et al.*, 2020). Pesquisas com foco na genética da conservação desse anuro são inexistentes, apresentando na literatura aspectos da descrição, do micro-hábitat e da reprodução (Cassiano-lima, 2011; Cassiano-lima *et al.*, 2020), da dieta (Araújo *et al.*, 2023) e do parasitismo (De Oliveira *et al.*, 2022). É a espécie mais afetada pelas ações antrópicas e mudanças climáticas (Corlett, 2012). *A. maranguapensis* está classificada como criticamente ameaçada (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023).

Adelophryne baturitensis Hoogmoed, Borges & Cascon (1994) é encontrada no Maciço de Baturité, Serra de Maranguape, Serra da Aratanha e Planalto da Ibiapaba. É uma das espécies mais bem distribuídas do Ceará, por isso, está classificada como menos preocupante (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023). Tem hábitos diurnos, é encontrado na serrapilheira ou em bromélias (Hoogmoed; Borges; Cascon, 1984). Informações acerca do microhabitat, da bioacústica, dos aspectos reprodutivos e da genética populacional são inexistentes.

Figura 1 – Espécies do gênero *Adelophryne* inseridas aos clados Norte e Sul da Mata Atlântica e ao clado Norte da Amazônia



Fonte: Fouquet *et al.*, 2012

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A espécie *Adelophryne baturitensis* ocorre no Maciço de Baturité, Serra de Maranguape, Serra da Aratanha e Planalto da Ibiapaba, e *Adelophryne maranguapensis* é endêmica da Serra de Maranguape, todas localizadas no estado do Ceará, Brasil. As Serras cristalinas de Baturité, Maranguape e Aratanha são caracterizadas como maciços residuais que apresentam a mata úmida do cristalino. Por estarem localizadas em uma área de barlavento, recebem maior quantidade de chuvas quando comparadas às outras áreas da Caatinga (sotavento). Esses brejos apresentam uma diversidade de vegetação, como árvores de porte alto e predominância de briófitas, pteridófitas e epífitas (Moro *et al.*, 2015). Acredita-se que esses maciços residuais tiveram maior interferência da Mata Atlântica por compartilharem espécies de fauna e de flora semelhantes (Moro *et al.*, 2015).

Por outro lado, as matas úmidas e subúmidas também estão localizadas na Serra da Ibiapaba que é caracterizada como relevo sedimentar. É a Serra que está mais ao oeste do estado do Ceará e abriga uma mata úmida sedimentar que apresenta influência da Floresta Amazônica (Figueiredo *et al.*, 1997; Moro *et al.*, 2015; Veloso *et al.*, 1991).

4.2 Coleta das Amostras

As amostras de tecido utilizadas estavam armazenadas na Coleção de Tecidos do NUROF no Campus de Fortaleza da Universidade Federal do Ceará (UFC) e são provenientes de excursões que ocorreram ao longo dos anos pelo Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) para o Maciço de Baturité, Serra de Maranguape e Planalto da Ibiapaba. Além destas, foram coletados 13 exemplares de *A. baturitensis* no hotel Remanso (-4,2409S -39,9287 W) localizado no Maciço de Baturité para completar a amostragem da localidade. Os animais foram levados ao laboratório, onde foram eutanasiados com lidocaína 2%, após isso, os indivíduos foram pesados e medidos (Chatigny *et al.*, 2017). A musculatura da perna foi removida e colocada em um epperdorf com álcool PA para ser utilizado na análise genética. Os indivíduos foram fixados com formalina a 10% e tombado na coleção Herpetológica do NUROF. Também foram utilizadas no presente estudo amostras obtidas a partir de swab com esfregaço de pele de *A. maranguapensis*, uma vez que esta é uma espécie criticamente ameaçada e a captura da mesma é mais restritiva. O swab foi passado três vezes na região dorsal e ventral dos anfíbios, seguindo

o protocolo de Kriger *et al.* (2006).

4.3 Extração, amplificação, e sequenciamento do DNA

O DNA foi extraído com o kit Wizard® DNA Purification (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, em seguida as amostras foram quantificadas no Nanodrop. Parte do gene mitocondrial 16S rRNA foi amplificado usando o par dos primers 16S-a 5'CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCT3' e 16S-b 5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3' (Palumbi *et al.*, 1991). O volume final da reação foi de 25 µl, composto por: 4.0 µl de dNTP (1.25 mM), 2,5 de 10×PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 1.0 µl de MgCl₂ (50 mM), 1.0 µl de cada primer (50 ng/µl), 0.25 µl de Taq polimerase (5 U/µl, Invitrogen), 1 µl de DNA (aproximadamente 100 ng/ul), and 14,25 de água purificada para completar o volume final. O protocolo de amplificação seguiu os seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 45s, 56°C por 45s, 72°C por 2 min, e a extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR passaram por eletroforese em gel de agarose e foram visualizados no transluminador para confirmar o sucesso da amplificação.

As amostras positivas foram purificadas com 20% de PEG 8000, seguindo o protocolo de Paithankar e Prasad (1991). A reação de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Genética e Conservação (LGC/IECOS) da UFPA, utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystems) e injetados no sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems).

4.4 Análise de dados

As sequências foram inspecionadas e corrigidas no BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999), e no mesmo programa foram alinhadas automaticamente no Clustal W (Thompson *et al.*, 1997). Foram incorporados a este banco sequências depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para o mesmo marcador, as quais foram separadas por localidades de acordo com as informações disponíveis nestes acessos (*Adelophryne maranguapensis*:

JX298285.1; JX298286.1; KU495097.1; KU495098.1; KU495099.1; KU495100.1; KU495102.1; KU495103.1; KU495104.1; KU495105.1 ; KU495106.1; KU495101.1; *Adelophryne baturitensis*:

JX298281.1;JX298280.1;JX298277.1;JX298278.1;JX298279.1;JX298282.1;KU495092.1;KU495093.1;KU495090.1;KU495091.1;KU495094.1;KU495095; KU495096.1) .

O número de sítios polimórficos foram contabilizados no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Através do DnaSP v.5.1, os índices de diversidade genética, como a diversidade haplotípica (h) e a diversidade nucleotídica (π) foram analisados dentro das populações (brejos) e dentro de cada espécie (Librado; Rozas, 2010). A estruturação e as associações entre os haplótipos foram construídas a partir da rede de haplótipos elaborada no programa Haploviewer v.4.2 (Barrett *et al.*, 2005), considerando todos os haplótipos reconhecidos para as espécies. No programa Arlequin v3.5.12 foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dimensionar como a variabilidade genética está distribuída dentro e entre as espécies. Os níveis de diferenciação genética entre as localidades de cada táxon foram determinados a partir dos valores de F_{st} par a par (Weir; Hill, 2002; Excoffier; Lischer, 2010).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 80 sequências com 345 pares de base das sequências da região 16S rRNA da mitocôndria para as duas espécies. Dentre estas, 46 sequências de *A. baturitensis* dos brejos de altitude do Ceará, sendo 34 de espécimes coletados no Maciço de Baturité (n=17), no Planalto da Ibiapaba (n=9), na Serra de Maranguape (Mar =8), que estavam depositados na coleção de tecidos do NUROF. Para complementar a amostragem, 12 sequências presentes no Genbank foram utilizadas, pertencendo as Serras da Aratanha (n= 1), Maciço de Baturité (n= 2), Planalto da Ibiapaba (n= 7) e Serra de Maranguape (n= 2). Para a espécie *A. maranguapensis* foram utilizadas 34 sequências, destas, nove foram geradas a partir da extração do DNA de músculo dos indivíduos e 13 a partir de esfregaço dérmico. As sequências depositadas no Genbank para a espécie (n=12) complementaram a amostragem.

Os parâmetros de diversidade analisados revelaram valores maiores para *A. maranguapensis* do que para as quatro populações de *A. baturitensis* de diferentes localidades. *A. maranguapensis* apresenta diversidade haplotípica ($h = 0,171$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00085$), com cinco sítios polimórficos, correspondendo aos quatro haplótipos encontrados em sua população (Tabela 1). Já para *A. baturitensis* foi reconhecido um único haplótipo para a região gênica analisada compartilhada entre as diferentes populações que ocorrem nos brejos de altitude de Baturité, Maranguape, Aratanha e Ibiapaba.

Tabela 1 - Índices de diversidade genética para as espécies *Adelophryne baturitensis* e *Adelophryne maranguapensis*. N - número dos indivíduos analisados; S - número de sítios polimórficos; H - o número de haplótipos; h - diversidade haplotípica; π - diversidade nucleotídica

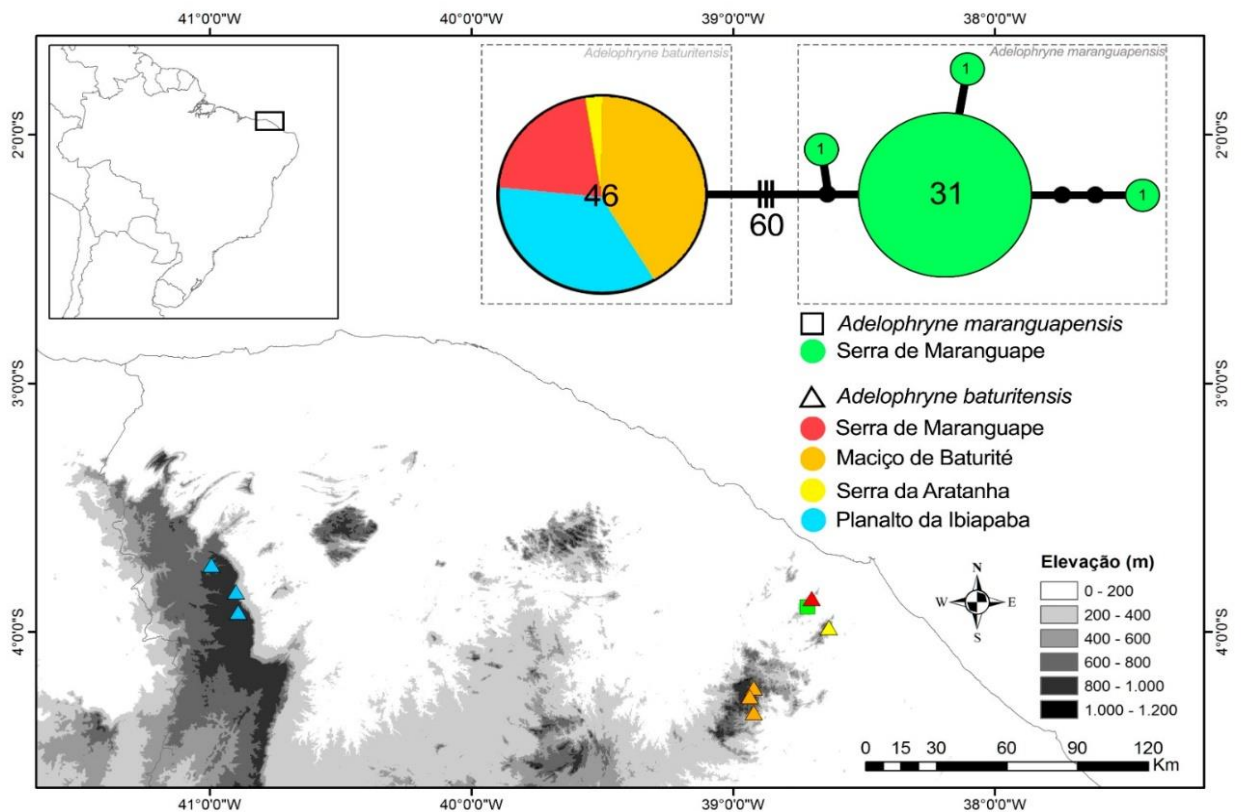
Espécies	Localidade	N	S	H	h	π
<i>Adelophryne baturitensis</i>	Baturité	19	0	1	0	0
	Maranguape	10	0	1	0	0
	Ibiapaba	16	0	1	0	0
	Aratanha	1	0	1	0	0
	Total	46	0	1	0	0
<i>Adelophryne maranguapensis</i>	Maranguape	34	5	4	0,171	0,00085

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para a construção da rede de haplótipos no Haplotype Viewer (Figura 2) foram utilizadas as 80 sequências mencionadas anteriormente, obtendo como resultado dois grupos de

espécies separadas por 60 eventos mutacionais. As espécies apresentaram ausência de estruturação populacional e de compartilhamento de haplótipos. *A. maranguapensis* apresentou uma única população, como o esperado, e quatro haplótipos, e *A. baturitensis* apenas um único haplótipo frequente entre as populações que ocorrem no Maciço de Baturité, Planalto da Ibiapaba, Serra de Maranguape e Serra da Aratanha.

Figura 2 – Distribuição de *Adelophryne baturitensis* e *Adelophryne maranguapensis* e a rede de haplótipos para o marcador mitocondrial 16S rRna. As cores usadas no mapa para representar cada localidade correspondem às cores usadas na rede de haplótipos. Os pontos e os traços representam os passos mutacionais entre os haplótipos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Tabela 2) considerou 34 sequências de *A. baturitensis* dos brejos de altitude do Ceará, geradas a partir dos tecidos dos espécimes coletados no Maciço de Baturité (n=17), Planalto da Ibiapaba (n=9), Serra de Maranguape (Mar =8), e as 22 sequências de *A. maranguapensis* da Serra de Maranguape, todas com 499 pares de base. Nesse sentido, mostrou que a maior variabilidade genética para o gene 16S rRna ocorre entre os grupos ($F_{ct} = 99.46\%$). A diferenciação genética entre as populações de *A. baturitensis* ($F_{sc} = 0.05$), é baixa e sem significância ($p = 0.08871$).

Por outro lado, para a investigação do *Fst* par a par foram incorporadas à análise as sequências depositadas no Genbank, no total 80 sequências exploradas com 345 pares de base. A partir do *Fst* par a par pode-se observar que as populações de *A. baturitensis* e de *A. maranguapensis* apresentam diferenças significativas. Ademais, as populações de *A. baturitensis* dos diferentes brejos de altitude apresentam um único estoque populacional, embora seja uma espécie com ampla distribuição geográfica no Ceará. Assim, a diferença genética entre essas populações é muito pequena (Tabela 3).

Tabela 2 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as espécies *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis* usando o marcador mitocondrial 16S rRna. Avaliado quanto à diversidade genética dentro e entre populações.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem de Variação
Entre grupos	1	947.486	35.44840 Va	99.46
Entre populações dentro dos grupos	2	0.733	0.01819 Vb	0.05
Dentro das populações	52	9.013	0.17333 Vc	0.49*
Total	55	957.232	35.63992	

P-value significativo Vc (p= 0.00)

Índices de fixação

FCT: 0.99463; FSC: 0.09496; FST: 0.99514;

Tabela 3 - Análise do *Fst* par a par para as populações das espécies *Adelophryne maranguapensis* e *Adelophryne baturitensis*

Localidades	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1) <i>A. maranguapensis</i> (Maranguape)	-				
(2) <i>A. baturitensis</i> (Baturité)	0.99729*	-			
(3) <i>A. baturitensis</i> (Ibiapaba)	0.99712*	-	-		
(4) <i>A. baturitensis</i> (Maranguape)	0.99678*	-	-	-	
(5) <i>A. baturitensis</i> (Aratanha)	0.99580	-	-	-	-

* P-valor significativo (p= 0.05)

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que investiga aspectos populacionais usando ferramentas moleculares para os anfíbios do gênero *Adelophryne* que ocorrem no estado do Ceará. Ademais, a pesquisa proporciona novas perspectivas acerca dos aspectos ecológicos de *Adelophryne baturitensis*.

6.1 Diversidade Genética e Estruturação populacional

A espécie *A. maranguapensis* apresenta estoque populacional único com índices de diversidade genética e presença de haplótipos que sugerem uma possível expansão populacional, podendo estar associada aos eventos de demografia recente (Nyakaana *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009). Os exemplares de *A. baturitensis* dos diferentes brejos de altitude são geneticamente idênticos, apresentando um único estoque populacional, o que indica que a separação entre as populações não foi muito antiga e pode estar associada à formação dos brejos de altitude do Nordeste do Brasil, que remete à expansão recente das florestas nos períodos úmidos do Pleistoceno e Holoceno (Prado; Gibbs, 1993). Diante disso, a formação recente dos enclaves florestais pode não ter afetado a diversidade e a estrutura genética do marcador mitocondrial 16S rRna (Vences *et al.*, 2005).

Nesse sentido, os índices de diversidade surpreendentemente menores em *A. baturitensis* do que os encontrados para *A. maranguapensis*, mesmo esta última apresentando uma população menor e estar criticamente ameaçada de extinção, pode ter sido afetado pela redução do tamanho populacional causado pelas fragmentações naturais ou antrópicas, bem como a alta probabilidade de endogamia entre os indivíduos de populações isoladas e pequenas (Arioli; Jakob; Reyer, 2010). Este último caso é preocupante, pois a alta variabilidade genética dentro das populações mantém altos índices de diversidade, sendo necessária para a adaptação às possíveis mudanças ambientais do meio (Salducci *et al.*, 2005; Funk *et al.*, 2007; Mota, 2010).

Na literatura existem trabalhos que documentam a estruturação genética em anfíbios (Zeisset; Beebe, 2008; Kaefer *et al.*, 2012; Santana-Cornélio *et al.*, 2020), indicando que é frequente o isolamento da distribuição das populações, resultando em baixa migração e estimativas praticamente nulas de fluxo gênico entre elas (Shaffer *et al.*, 2000; Lampert *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2018; Magalhães *et al.*, 2022). Os anfíbios com desenvolvimento direto, como *Pristimantis lato* (Santana-Cornélio *et al.*, 2020) e *Allobates* (Kaefer *et al.*, 2012)

apresentam forte estruturação genética devido às estratégias de vida, como baixas taxa de migração (Fouquet *et al.*, 2014, 2015), territorialidade e filopatria (Wells, 2007; Bogart, 1991). Apesar disso, os resultados encontrados no presente estudo mostraram um perfil diferente do que era esperado para *A. baturitensis*, e isso pode estar relacionado ao uso do marcador genético 16S rRna, por ser mais conservado (Thomé *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2005).

6.2 Aspectos ecológicos

As espécies *A. maranguapensis* e *A. baturitensis* fazem parte do clado Norte da Mata Atlântica e são as únicas do gênero *Adelophryne* registradas para os brejos de altitude do Ceará (Hoogmoed; Borges; Cascon, 1984; Fouquet *et al.*, 2012). *A. maranguapensis* tem os aspectos de história natural e de ecologia bem estudados na literatura, como a biologia reprodutiva (Cassiano-Lima *et al.*, 2020), descrição do canto de anúncio (Cassiano-Lima *et al.*, 2014), a dieta (Araújo *et al.*, 2023) e o parasitismo (De Oliveira *et al.*, 2022). Contudo, para *A. baturitensis* existe uma escassez de informações detalhadas sobre a história natural, apresentando praticamente informações da descrição da espécie (Hoogmoed; Borges; Cascon, 1984), do microhabitat (Borges-Nojosa, 2007) e da dieta (Araújo *et al.*, 2023).

Como novidades para os aspectos ecológicos das espécies é importante mencionar que os nossos dados revelaram que nove indivíduos coletados na Serra de Maranguape em altitudes de 800m e identificados previamente como *A. maranguapensis*, quando sequenciados apresentaram sequências de DNA de *A. baturitensis*. Outrossim, durante as coletas de DNA de *A. maranguapensis*, realizadas por meio da técnica do swab, em altitudes acima dos 900m no microhabitat das bromélias, obtivemos uma sequência de *A. baturitensis*. Essa sequência pertencia ao indivíduo ABA 122, representante de um haplótipo distinto do encontrado para *A. baturitensis*. Contudo, essa sequência apresentou alguns picos de baixa qualidade e não foi inserida no banco de dados das análises, sendo relevante a repetição das coletas e dos procedimentos moleculares. Diante disso, essas informações são novidades relevantes para a literatura, visto que acreditava-se que as duas espécies não ocorriam em sintopia.

Nessa perspectiva, nosso estudo contribui para a complementação de informações acerca da distribuição de *A. baturitensis* na Serra de Maranguape, visto que, acreditava-se que a sua distribuição ocorria abaixo dos 600 m de altitude (I. J. Roberto - Informação pessoal). Esse parâmetro contribuía para a identificação das espécies em Maranguape por apresentarem características morfológicas semelhantes, sendo difícil identificar as espécies pelas informações morfológicas encontradas no artigo de descrição. Contudo, é necessário ter cautela quanto a

identificação das duas espécies considerando a altitude onde são coletadas, sendo fundamental o apoio das ferramentas genéticas e moleculares no processo de identificação, como o PCR multiplex (Silva, 2008; Ermakov *et al.*, 2019; Chernigova *et al.*, 2023). O PCR multiplex é uma ferramenta eficaz, barata e rápida na identificação de espécies que apresentam morfologia semelhantes (Phuektes *et al.*, 2001; Silva, 2008). É uma técnica amplamente utilizada para a detecção de microrganismos (Silva, 2008) e recentemente foi aplicada para identificar os sapos verdes europeus e os seus híbridos (Ermakov *et al.*, 2019) e as rãs marrons da Sibéria (Chernigova *et al.*, 2023). Principalmente para o gênero *Adelophryne* essa ferramenta seria relevante, pois a morfologia semelhante torna difícil o processo de identificação das espécies (Loebmann; Orrico; Haddad, 2011).

6.3 Implicações para a conservação

A. maranguapensis está criticamente ameaçada de extinção e *A. baturitensis* está classificada como menos preocupante (MMA, 2022; SEMA, 2022; IUCN, 2023). Nessa perspectiva, os resultados apresentados mostraram informações que não esperávamos encontrar para *A. baturitensis*, pois embora já soubessemos sobre o nível de ameaça de *A. maranguapensis*, não esperávamos uma diversidade mais baixa para *A. baturitensis*, visto que apresenta maior distribuição e maior tamanho populacional. Desse modo, as informações reveladas destaca a necessidade de uma investigação mais detalhada, através da utilização de marcadores mais variáveis, como os microssatélites e o D-loop, para fornecer respostas mais precisas acerca da diversidade e da estruturação genética das espécies (Ouborg *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2021). Além disso, é extremamente necessário um estudo mais abrangente sobre a história natural da espécie e sobre os aspectos populacionais da mesma, em cada um dos brejos. Assim, os resultados aqui descritos podem integrar esses dados no Plano Nacional de Conservação dos anfíbios, pois associados a outras estratégias de conservação, poderão ser cruciais para a manutenção dessas populações a longo prazo.

7 CONCLUSÃO

Ao final desta dissertação de mestrado podemos concluir que *Adelophryne maranguapensis* apresentou maiores índices de diversidade haplotípica e nucleotídica do que *Adelophryne baturitensis*. Além disso, não encontramos sinais de estruturação populacional para *A. baturitensis* e observamos que suas populações são compostas por apenas um único estoque populacional.

O nosso estudo proporcionou novas contribuições para a ocorrência e para a identificação de *A. baturitensis* na Serra de Maranguape. Com os nossos resultados conseguimos visualizar que a espécie está ocorrendo em sintopia com *A. maranguapensis*, em altitudes acima de 600m, usando o micro-habitat das bromélias. Essa nova informação é crucial para o cuidado na identificação das espécies na Serra, visto que a altitude era utilizada como um critério relevante para diferenciá-las pela semelhança dos caracteres morfológicos.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BISWAS, A.; RANA, T. S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 283-297, 2017.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant cell reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.
- AGOSTINI, M. A. P.; DE SOUSA ROCHA, B. B.; BALESTRA, R. A. M.; PAIVA, S. R. Marcador de DNA Mitocondrial para Estudos Genético-Populacionais de Tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, v.12, n.1, p. 328-341, 2022.
- ARAÚJO, K. C.; CASSIANO-LIMA, D.; BRASILEIRO, A. C.; BEZERRA, C. H.; ÁVILA, R. W. What the minute shield frogs *Adelophryne* eat at a humid forest relict in Ceará state, northeastern Brazil. **NORTH-WESTERN JOURNAL OF ZOOLOGY**, v. 19, n. 1, p. 000-000, 2023.
- ARIOLI, M.; JAKOB, C.; REYER, H.-U. Genetic diversity in water frog hybrids (*Pelophylax esculentus*) varies with population structure and geographic location. *Molecular Ecology*, v.19, n.9, p. 1814–1828, 2010. DOI:10.1111/j.1365-294x.2010.04603.x
- AUSTIN, J. D.; LOUGHEED, S. C.; TANNER, K.; CHEK, A. A.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic Neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. **Zoological Journal of the Linnaean Society**, v.134, p. 335:346, 2002.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1993.
- AVISE, J.C. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. **Con Biol**, v. 9, p. 686–690, 1995. DOI: <http://www.jstor.org/stable/2386624>
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, n.2, p. 155-165, 2002.
- BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BEEBEE, T.T., ROWE, G. **An Introduction to Molecular Ecology**. Oxford University Press, 2004.
- BEEBEE, T.J.C. Conservation genetics of amphibians. **Heredity**, v. 95, p. 423–4277, 2005 <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800736>
- BIGNOTTO, T. S. **Comparação molecular de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalminidae) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco**. Maringá: UEM, 2010. 172 p. Tese

(Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

BOGART, J. P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. *In: Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, 1991. p. 233-258.

BORGES-NOJOSA, D. M. Diversidade de anfíbios e répteis da serra de Baturité, Ceará. *In: T. S. Oliveira e F. S. Araújo (eds.) Biodiversidade e conservação da biota na serra de Baturité, Ceará*. Fortaleza, Edições UFC, Coelce, 2007.

BORGES-NOJOSA, D. M.; CARAMASCHI, U. Composição e análise comparativa da diversidade e das afinidades biogeográficas dos lagartos e anfisbenídeos (Squamata) dos brejos-nordestinos, p. 463-512. *In: I. R. Leal, M. Tabarelli e J. M. C. Silva (eds.) Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003.

CAMPOS-TELLES, M.P.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; BASTOS, R.P.; SOARES, T.N.; GUIMARÃES, L.D.A.; LIMA, L.P. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. **Biological Conservation**, v. 139, p. 37-46, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.06.003>

CANESTRELLI, D.; BISCONTI, R.; CHIOCCHIO, A.; MAIORANO, L.; ZAMPIGLIA, M.; NASCETTI, G. Climate change promotes hybridisation between deeply divergent species. **PeerJ**, v. 5, n. 3072, e3072, 2017. DOI:10.7717/peerj.3072.

CARNAVAL, A.C.; BATES, J.M. Amphibian DNA shows marked genetic structure and tracks Pleistocene climate change in northeastern Brazil. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 61, p. 2942-2957, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00241.x>

CARVALHO, J. A.; HAGEN, F.; FISHER, M. C.; DE CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M. Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v.14, n.7, e0008330, 2020.

CASSIANO-LIMA, D.C.; BORGES-NOJOSA, D.M.; CASCON, P.; CECHIN, S. Z. The reproductive mode of *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994 (Anura, Eleutherodactylidae) an endemic and threatened species from Atlantic Forest remnants in northern Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 7, n.1, p. 92-97, 2011.

CASSIANO-LIMA, D.; LIMA, A. V. P.; FORTUNATO, M. E. M.; SOUSA, T. A.; CASTRO, D. P.; BORGES-NOJOSA, D.M.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of direct developing and threatened frog *Adelophryne maranguapensis* (Anura, Eleutherodactylidae) reveals a cryptic reproductive mode for anurans and the first record of parental care for the genus. **Journal of Natural History**, v. 54, n.27-28, p. 1721-1733, 2020.

CASTRO, D. P.; MÂNGIA, S.; DE MEDEIROS MAGALHÃES, F.; RÖHR, D. L.; CAMURUGI, F.; DA SILVEIRA FILHO, R. R.; BORGES-NOJOSA, D. M. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga VI: the Ubajara National Park, Ceará, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 727-742, 2019.

CHATIGNY, F.; KAMUNDE, C.; CREIGHTON, C. M.; STEVENS, E. D. Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 56, n. 3, p. 244-253, 2017.

CHERNIGOVA, P.; ERMAKOV, O.; LISACHEV, A.; SVININ, A.; SIMONOV, E. Multiplex PCR assay to distinguish among three widespread brown frog species. **Conservation Genetics Resources**, p. 1-3, 2023.

CHAVEZ, P.B.; ALVARENGA, C.S.; POSSAMAI, C.B.; DIAS, L.G.; BOUBLI, J.P.; STRIER, K.B.; MENDES, S.L.; FAGUNDES, V. Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the Northern Muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*). **PLOS ONE**, v.6, e20722, 2011.

CORLETT, R.T. Climate change in the tropics: the end of the world as we know it? **Biol. Conserv**, v. 151, 22–25, 2012.

COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Mol. Ecol.** v.10, p. 371–386, 2001.

DE OLIVEIRA, C. R.; LIMA, D. C.; ÁVILA, R. W.; BORGES-NOJOSA, D. M. Endoparasites of *Adelophryne maranguapensis* Hoogmoed, Borges & Cascon, 1994 (Anura, Eleutherodactylidae), an endemic and threatened species from an altitude swamp in northeastern Brazil. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 1053-1057, 2022.

DESALLE, R.; AMATO, G. Conservation genetics, precision conservation, and de-extinction. **Hastings Center Report**, v. 47, p. 18-23, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/hast.747>

DEWOODY, J.A.; HARDER, A.M.; MATHUR, S.; WILLOUGHBY, J.R. The long-standing significance of genetic diversity in conservation. **Molecular Ecology**, v. 30, p. 4147–4154, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.16051>

ERMAKOV, O.; IVANOV, A.; TITOV, S.; SVININ, A.; LITVINCHUK, S. New multiplex PCR method for identification of East European green frog species and their hybrids. **Russian Journal of Herpetology**, v. 26, n. 6, p. 367-370, 2019.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; BAËTA, D.; JUNGFER, K.H.; ÁLVARES, G.F.R.A.; BRANDÃO, R.A.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, L.; BARRIO-AMÓS, C.L; CRUZ, C.A.G.; WHEELER, W.C. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics**, v. 25, p. 1-35, 2010.

FARIAS, I. P.; SANTOS, W. G.; GORDO, M.; HRBEK, T. Effects of Forest Fragmentation on Genetic Diversity of the Critically Endangered Primate, the Pied Tamarin (*Saguinus bicolor*): Implications for Conservation. **Journal of Heredity**, v.106, n.1, p. 512–521, 2015. DOI:10.1093/jhered/esv048

FAUCHER, L.; GODÉ, C.; ARNAUD, J.F. Development of nuclear microsatellite loci and

mitochondrial single nucleotide polymorphisms for the natterjack toad, *Bufo* (Epidalea) calamita (Bufonidae), using next generation sequencing and competitive allele specific PCR (KASPar), **Journal of heredity**, v. 107, n. 7p. 660-665, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/esw068>

FERREIRA, A. I.; VASCONCELOS, D. S.; HARRIS, D. J. Origins of an introduced *Teira dugesii* (Squamata: Lacertidae) population in Porto, Portugal. **Herpetology Notes**, v.16, p. 9-11, 2023.

FIGUEIREDO, M. A. Unidades Fitoecológicas. *In: Atlas do Ceará*. Fortaleza: IPLANCE, 1997. p. 28.

FOUQUET, A.; LOEBMANN, D.; CASTROVIEJO-FISHER, S.; PADIAL, J.M.; ORRICO, V.G.; LYRA, M.L.; RODRIGUES, M.T. 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**, v.65, n. 547-561, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.07.012>

FOUQUET, A.; SANTANA, C. C.; HADDAD, F. B. C.; PECH, N.; RODRIGUES, T. M. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Biogeography**, v. 41, p. 855-870, 2014. DOI: 10.1111/jbi.12250.

FOUQUET, A.; COURTOIS, E.A.; BAUDAIN, D.; LIMA, J.D.; SOUZA, S.M.; NOONAN, B.P.; RODRIGUES, M.T. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, v. 31, p. 61–373, 2015. DOI: 10.1017/s0266467415000206

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biology**, v, 326, p. 22-29, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00023-4)

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biol Cons**, v. 126, p. 131–140, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.

FREITAS, M. A.; DUBEUX, M. J.; CHAVES, M. F.; FIORILLO, B. F.; GENTIL FILHO, A. P.; VIEIRA, W. L.; DE MOURA, G. J. Herpetofauna in three highland Atlantic Forest remnants in northeastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 16, p. 377-390, 2023.

FUKUTANI, K.; MATSUI, M.; VAN TRAN, D.; NISHIKAWA, K. Genetic diversity and demography of *Bufo japonicus* and *B. torrenticola* (Amphibia: Anura: Bufonidae) influenced by the Quaternary climate. **PeerJ**, v. 10, p. e13452, 2022.

FUNK, W. C.; CALDWELL, J. P.; PEDEN, C. E.; PADIAL, J. M.; DE LA RIVA, I.; CANNATELLA, D. C. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian Forest frog, *Physalaemus petersi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, n.2, p. 825-837, 2007.

GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. Introduction: History and Future of Ranaviruses. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. (Eds.). **Ranaviruses, lethal pathogens to ectothermic vertebrates**. Springer International Publishing, New York, USA, 2015. p. 1-7.

GONÇALVES, G. L.; MARINHO, J. R.; FREITAS, T. R. O. Genetic structure of sigmodontine rodents (Cricetidae) along an altitudinal gradient of the Atlantic Forest in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 882 – 885, 2009.

GUZMÁN, L. B.; VOGLER, R. E.; BELTRAMINO, A. A. The mitochondrial genome of the semi-slug *Omalonyx unguis* (Gastropoda: Succineidae) and the phylogenetic relationships within Stylommatophora. **PLOS ONE**, v. 16, n. 6, p. e0253724, 2021.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HAUFFE, H.C.; SBORDONI, V. Introduction. In: BERTORELLE, G., BRUFORD, M.W.; HAUFFE, H.C.; RIZZOLI, A.; VERNESI C (ed). **Population genetics for animal conservation**, 1st edn. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 2010. p. 1–10.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n.1512, p. 313–321, 2003. DOI:10.1098/rspb.2002.2218.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, p. 629-636, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02282-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02282-0)

HILSDORF, A.W.; HALLERMAN, E.M. **Genetic resources of neotropical fishes**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

HOFFMANN, M.; HILTON-TAYLOR, C.; ÂNGULO, A.; BOHM, M.; BROOKS, T.M.; BUTCHART, S.H.M.; COX, N.A. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. **Science**, v. 330, p. 1503–1509, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1194442>

HOLSINGER, K.E. The scope and the limits of conservation genetics. **Evolution**, v.50, p. 2558-2561, 1996. DOI: <https://doi.org/10.2307/2410726>

HOOGMOED, M. S.; LESCURE, J. A new genus and two new species of minute leptodactylid frogs from northern South America, with comments upon *Phyzelaphryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Zoologische Mededelingen**, v.58, n.6, p. 85-115, 1984.

HOOGMOED, M. S.; BORGES, D. M.; CASCON, P. Three new species of the genus *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from northeastern Brazil, with remarks on the other species of the genus. **Zoologische Mededelingen**, v. 68, n. 24, p. 271-300, 1994.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2004**. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 24 jan.2023.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2008**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 24 jan.2023.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2017**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 24 jan.2023.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2021**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 24 jan.2023.

IUCN SSC. Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Adelophryne maranguapensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2023**: e.T56302A180648528. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20231.RLTS.T56302A180648528.en>. Acesso em: 27 fev. 2024.

IUCN SSC. Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Adelophryne baturitensis*. **The IUCN Red List of Threatened Species, 2023**: e.T56300A180648391. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T56300A180648391.en>. Acesso em: 27 fev. 2024.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio, 2018.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n.4, p. 25, 2001.

KAEFER, I. L.; KAEFER, I. L.; TSUJI-NISHIKIDO, B. M.; LIMA, A. P. Beyond the river: Underlying determinants of population acoustic signal variability in Amazonian direct-developing *Allobates* (Anura: Dendrobatoidea). **Acta Ethologica**, v. 15, p. 187-194, 2012. DOI: 10.1007/s10211-012-0126-0.

KARDOS, M. Conservation genetics. **Current Biology**, v. 31, p. 1185-1190, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.047>

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proc. R. Soc. Lond. B**, n. 265, p. 2257–2263, 1998. DOI: 10.1098/rspb.1998.0568.

KRIGER, K. M.; HINES, H. B.; HYATT, A. D.; BOYLE, D. G.; HERO, J. M. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, p. 141-148, 2006.

KUHN, D. B. **Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, 2014.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular

evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol Biol Evol**, v. 35, p. 1547–1549, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

KUMARI, P.; DONG, K.; EO, K. Y.; LEE, W. S.; KIMURA, J.; YAMAMOTO, N. DNA metabarcoding-based diet survey for the Eurasian otter (*Lutra lutra*): Development of a Eurasian otter-specific blocking oligonucleotide for 12S rRNA gene sequencing for vertebrates. **PLOS One**, v.14, n.12, p. e0226253, 2019.

LAMPERT, K.P.; RAND, A.S.; MUELLER, U.G; RYAN, M.J. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. **Molecular Ecology**, v.12, p. 3325–3334, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.02016.x.

LI, Y.; COHEN, J. M.; ROHR, J. R. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. **Integrative Zoology**, v. 8, n. 2, p. 145–161, 2013.

LI, J.; DA, L.; BAO, X. High-throughput sequencing yields a complete mitochondrial genome of *Emberiza godlewskii* (aves, emberidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 8, n. 8, p. 882–885, 2023.

LIBRADO, P.; S. J. ROZA. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p.11, p. 1451–1452, 2010.

LOEBMANN, D.; HADDAD, C.F.B. Amphibians and reptiles from a highly diverse area of the Caatinga domain: composition and conservation implications. **Biota Neotropica**, n. 10, p. 227-256, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300026>

LOEBMANN, D.; ORRICO, D.V.G.; HADDAD, C.F.B. First record of *Adelophryne baturitensis* hoogmoed, borges & Cascon, 1994 for the state of Pernambuco, northeastern Brazil (Anura, Eleutherodactylidae, Phyzelaphryninae). **Herpetology Notes**, p. 75-77, 2011.

LOUGHEED, S. C.; AUSTIN, J. D.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T.; CHEK, A. A. Multicharacter perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a Neotropical hylid frog. **Evolutionary Biology**. v. 6, n. 23, p. 1-16, 2006.

LOURENÇO-DE-MORAES, R.; SOLE, M.; TOLEDO, L. F. A new species of *Adelophryne* Hoogmoed and Lescure 1984 (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3441, n.1, p. 59-68, 2012.

LOURENÇO-DE-MORAES, R.R.B.; FERREIRA, A.; FOUQUET, A.; R.P. BASTOS. A new diminutive frog species of *Adelophryne* (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3846, n.3, p. 348–360, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3846.3.2>.

LOURENÇO-DE-MORAES, R.; DIAS, I. R.; MIRA-MENDES, C. V.; OLIVEIRA, R. M. D.; BARTH, A.; RUAS, D. S.; BASTOS, R. P. Diversity of miniaturized frogs of the genus *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae): A new species from the Atlantic Forest of northeast Brazil. **PLOS One**, v. 13, n. 9, p. e0201781, 2018.

LOURENÇO-DE-MORAES, R.; LISBOA, B. S.; DE OLIVEIRA DRUMMOND, L.; DE MELO MOURA, C. C.; DE MOURA, G. J. B.; LYRA, M. L.; SANTANA, D. J. A New

Species of the Genus *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae: Physelaphryninae) from the Atlantic Forest of Northeastern Brazil. **Herpetologica**, v.77, n.2, p. 164-175, 2021.

LUEDTKE, J. A.; CHANSON, J.; NEAM, K.; HOBIN, L.; MACIEL, A. O.; CATENAZZI, A.; STUART, S. N. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, p.1-7, 2023.

LUNA, L.W.; SOUZA, T.O.; DE SILVA, W.A.G. et al. Genetic variation of the endangered Araripe Manakin (*Antilophia bokermanni*) indicates a history of demographic decline. **Rev. Bras. Ornitol**, v. 25, p. 60–66, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03544378>

LYNCH, M.; JARRELL, P. E. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 135, p. 1197–1208, 1993.

MACCULLOCH, R. D.; LATHROP, A.; KOK, P. J.; MINTER, L. R.; KHAN, S. Z.; BARRIO-AMOROS, C. L. A new species of *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae) from Guyana, with additional data on *A. gutturosa*. **Zootaxa**, v. 1884, n.1, p. 36-50, 2008.

MAGALHÃES, F. D. M.; CAMURUGI, F.; LYRA, M. L.; BALDO, D.; EHARA, M.; HADDAD, C. F.; GARDA, A. A. Ecological divergence and synchronous Pleistocene diversification in the widespread South American butter frog complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 169, p. 107398, 2022.

MÂNGIA, S.; OLIVEIRA, E. F.; SANTANA, D. J.; KOROIVA, R.; PAIVA, F.; GARDA, A. A. Revising the taxonomy of *Proceratophrys Miranda-Ribeiro, 1920* (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v, 58, n. 4, p. 1151–1172, 2020.

MESQUITA, A.F.C.; LAMBERTINI, C.; LYRA, M. L.R.; Malagoli, T.Y.; James, L.F.; Toledo, C.F.B.; Becker, C.G. Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. **Sci rep** 7, 16605, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16425-y>

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; AND SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In: 2010 gateway computing environments workshop* (GCE). Ieee, 2010. p. 1-8.

MIYAZONO, F.; SCHNEIDER, P. M.; METZGER, R.; WARNECKE-EBERZ, U.; BALDUS, S. E., DIENES, H. P.; AIKOU, T.; HOELSCHER, A. H. Mutations in the mitochondrial DNA *D-Loop* region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **Oncogene**. v. 21, n. 23, p. 3780-3783, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Portaria** MMA nº 148, de 7 de junho de 2022 Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 8 de jun. de 2022.

MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; THOMSEN, J.B.; DA FONSECA, G.A.B.; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting

conservation priorities. **Conservation Biology**, v. 12, p. 516–520, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.012003516.x>

MOURA-CAMPOS, D.; GREENSPAN, S.E.; DIRENZO, G.V.; NEELY, W.J.; TOLEDO, L.F.; BECKER, C.G. Fungal disease cluster in tropical terrestrial frogs predicted by low rainfall. **Biological Conservation**, v. 261, p. 109246, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109246>.

MORAES, L. J.; WERNECK, F. P.; RÉJAUD, A.; RODRIGUES, M. T.; PRATES, I.; GLAW, F.; FOUQUET, A. Diversification of tiny toads (Bufonidae: Amazophrynella) sheds light on ancient landscape dynamism in Amazonia. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 1, p. 75-91, 2022.

MORO, M. F.; MACEDO, M. B.; MOURA-FÉ, M. M. D.; CASTRO, A. S. F.; COSTA, R. C. D. (2015). Vegetação, unidades fitoecológicas e diversidade paisagística do estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 66, p. 717-743, 2015.

MOTA, E. P. **Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura; Hylidae) na Amazônia brasileira**. Manaus: INPA\UFAM, 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

NALI, R.C.; PRADO, C.P.A.; ZAMUDIO, K.R. Microsatellite markers for Bokermannohyla species (Anura, Hylidae) from the Brazilian Cerrado and Atlantic Forest domains. **Amphibia-Reptilia**, v. 35, p. 355–360, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685381-00002950>

NALI, R.C.; BECKER, C.G.; ZAMUDIO, K.R.; PRADO, C.P. Topography, more than land cover, explains genetic diversity in a Neotropical savanna tree frog. **Diversity and Distributions**, v. 26, p. 1798-1812, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.13154>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 09 fev. 2023.

NYAKAANA, S.; TUMUSIIME, C.; OGUGE, N.; SIEGISMUND, H.R.; ARCTANDER, P.; MUWANIKI, V. Mitochondrial diversity and population structure of a forest dependent rodent, *Praomys taitae* (Rodentia: Muridae) Heller 1911, in the fragmented forest patches of Taita Hills, Kenya. **South African Journal of Science**, v. 104, n. 11, p. 499-504, 2008.

OLIVEIRA, S.L.; DE MELO D.; BASTOS, R.P.; DE MORAIS, A.R. Anfíbios anuros nos covais do município de Jataí, estado de Goiás. **Geoambiente online**, v. 24, p. 49-60, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5216/revgeoamb.v0i24.34139>

OLIVEIRA, U.; SOARES-FILHO, B.S.; SANTOS, A.J.; PAGLIA, A.P.; BRESCOVIT, A.D.; CARVALHO, C. J.B.; FERRO, V.G.. Modelling Highly Biodiverse Areas in Brazil. **Scientific Reports**, v.9, p. 6355, 2019. DOI:10.1038/s41598-019- 42881-9.

OUBORG, N.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.K.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in genetics**, v. 26, p. 177-187, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.001>

ORTIZ, D.A.; LIMA, A.P.; WERNECK, F.P. Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. **Evolutionary Ecology**, v. 32, p. 359-378, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10682-018-9939-2>

PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n.6, p. 1346, 1991.

PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLIAN, W. O.; STICE, L. P. S.; GRABOWSKI, G. **The Simple Fool's Guide to PCR**. Honolulu: University of Hawaii Press, 1991.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 5, p. 1140-1148, 2001.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest of South America. **Ann. Mo. Bot. Gard**, v.80, p. 902–927, 1993.

RAMBAUT, A. FigTree. **Tree Figure Drawing Tool**, v1. 4.3, p. 2006–2016, 2016.

RAMOS, E.K.S.; DE MAGALHÃES, R.F.; SARI, E.H.R.; ROSA, A.H.B.; GARCIA, P.C.A.; SANTOS, F.R. Population genetics and distribution data reveal conservation concerns to the sky island endemic *Pithecopus megacephalus* (Anura, Phyllomedusidae). **Conservation Genetics**, v.19, p. 99-110, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1013-z>

REBOUÇAS, R.; DOS SANTOS, M.M.; DA SILVA MARTINS, A.G.; DOMINGOS, A.H.R.; SANTOS, I.; TOLEDO, L.F. Warming drives cryptic declines of amphibians in eastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 256, p.109035, 2021.

RODRÍGUEZ-CLARK, K.M.; OLIVEIRA-MIRANDA, M.A.; AGUILERA MENESES, M.; MARTINO, Á.; MÉNDEZ, M.A.; MIYAKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. Finding the “Conservation” in Conservation Genetics—Progress in Latin America. **Journal of Heredity**, v. 106, p. 423-427, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/esv052>

RON, S. R.; SANTOS, J. C.; CANNATELLA, D. C. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, p. 392-403, 2006.

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

ROWAN, L.; ARBOGAST, B.; KAMEL, S.J. Assessing the genetic consequences of habitat fragmentation on the federally threatened cheat mountain salamander (*Plethodon nettingi*): a comparative, multi-locus approach. **Conservation Genetics**, v. 23, p. 699–711, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-022-01449-3>

SALDUCCI, M. D.; MARTY, C.; FOUQUET, A.; GILLES, A. Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana. **Comptes Rendus**

Biologies, v. 328, p. 1009-1024, 2005.

SANTANA-CORNÉLIO, G.; ARAÚJO-DE-OLIVEIRA, E.; MAGALHÃES-XAVIER, K.; BARROS-DA-SILVA, G. W.; FRANÇA, I.; RIBEIRO RODRIGUES, L. R.; HERNÁNDEZ-RUZ, E. J. The genetic structure of *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae) mirrors traits of their life history. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 44, n. 172, p. 729-739, 2020.

SANTANA, D. J.; FONSECA, E. M.; NEVES, M. D. O.; CARVALHO, R. M. H. A new species of *Adelophryne* (Anura: Eleutherodactylidae) from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Salamandra**, v. 48, n.8, p. 187-192, 2012.

SEGALLA, M. V.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. G.; GARCIA, P. D. A.; LANGONE, J. A. List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n.1, p. 121-216., 2021.

SEMA. 2022. Diário Oficial do Estado – CE. **Portaria SEMA N° 146**, de 27 de setembro de 2022 – Dispõe sobre a lista vermelha dos anfíbios e répteis continentais ameaçados de extinção do Ceará. Disponível em: <http://imagens.seplag.ce.gov.br/PDF/20220927/do20220927p01.pdf>. Acesso em: 10 Set. 2023.

SHAFFER, H.B.; FELLERS, G.F.; MAGEE, A.; VOSS, S.R. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo camorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Ecology**, v.9, p. 245–257, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2000.00835.x.

SILVA, M.A. **Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina, Brasil**. 32p. Dissertação de Mestrado (Escola de Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SILVA, W.; LINHARES, K.; CAMPOS, A.A. **Plano de Ação Nacional para a Conservação do soldadinho-do-araripe**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 2011.

SILVA, B. L.; ORLANDO, T. C.; SILVA, V. X.; COTULIO, V. R. M. High genetic variability in a small toad from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 1, p. 6392-6423, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-433>

SILVEIRA, A. P.; MENEZES, B. S. D.; LOIOLA, M. I. B.; LIMA-VERDE, L. W.; ZANINA, D. N.; CARVALHO, E. C. D. D.; ARAUJO, F. S. D. Flora and annual distribution of flowers and fruits in the Ubajara National Park, Ceará, Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 27, 2020a.

SILVEIRA, A. P.; LOIOLA, M. I. B.; GOMES, V. D. S.; LIMA-VERDE, L. W.; OLIVEIRA, T. S.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, F. S. Flora of Baturité, Ceará: a wet island in the Brazilian semiarid. **Floresta e Ambiente**, 27, 2020b.

SIMMONS, R. B.; WELLER, S. J. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Mol.*

Phylogenet. **Evol**, v. 20, p. 196–210, 2001.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

SOULÉ, M.E. What is Conservation Biology? **Bioscience**, v. 35, p. 727-734, 1985. DOI: <https://doi.org/10.2307/1310054>.

SOULÉ, M.E.; SIMBERLOFF, D. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? **Biological Conservation**, v.35, p. 19-40, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(86\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0006-3207(86)90025-X)

SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A. Conservation Biology: An Evolutionary Ecological Perspective. Sunderland: **Sinauer Associates**, 1980.

SOUZA, T.O.; LUNA, L.W.; ARARIPE, J.; MELO, M.A.; SILVA, W.A.; SCHNEIDER, H.; REGO, P.S. Characterization of the genetic diversity and population structure of the manakin genus *Antilophia* through the development and analysis of microsatellite markers. **Journal of Ornithology**, v. 160, p. 825-830, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10336-019-01655-w>

TABARELLI, M.; SANTOS, A. M. M. Uma Breve Descrição Sobre a História Natural dos Brejos Nordestinos, p. 17-24. In: K. C. Porto, J. J. P. Cabral e M. Tabarelli (orgs.) **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004.

TAKAMATSU, C.; UMEDA, S.; OHSATO, T.; OHNO, T.; ABE, Y.; FUKUOH, A.; SHINAGAWA, H.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Regulation of the mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. **Embo reports**. v. 3, n. 5, p. 451-456, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol**. v.28, p. 2731–2739, 2011.

TAUCCE, P.P.G.; COSTA-CAMPOS, C. E.; HADDAD, C. F.; DE CARVALHO, T. R. A new Amazonian species of the diminutive frog genus *Adelophryne* (Anura: Brachycephaloidea: Eleutherodactylidae) from the state of Amapá, northern Brazil. **Copeia**, v. 108, n. 4, p. 746-757, 2020.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; HADDAD, C. F.; ALEXANDRINO, J. Delimiting genetic units in Neotropical toads under incomplete lineage sorting and hybridization. **BMC Evolutionary Biology**, v.12, p. 1-13, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v, 22, n.1, p. 4673–4680, 1997.

- TOLEDO, L. F.; DE CARVALHO-E-SILVA, S. P.; DE CARVALHO, A. M. P. T.; GASPARINI, J. L.; BAÊTA, D.; REBOUÇAS, R.; CARVALHO, T. A retrospective overview of amphibian declines in Brazil's Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 277, p. 109845, 2023.
- TREVISAN, C. C.; BATALHA-FILHO, H.; GARDA, A. A.; MENEZES, L.; DIAS, I. R.; SOLÉ, M., NAPOLI, M. F. Cryptic diversity and ancient diversification in the northern Atlantic Forest *Pristimantis* (Amphibia, Anura, Craugastoridae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 148, p.106811, 2020.
- VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1991.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; MEIJDEN, A. V. D.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, n. 5, p. 1-12, 2005.
- WAGNER, R. S.; MILLER, M. P.; CRISAFULLI, C. M.; HAIG, S. M. Geographic variation, genetic structure, and conservation unit designation in the Larch Mountain salamander (*Plethodon larselli*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n. 3, p. 396-406, 2005.
- WARES, J. P.; CUNNINGHAM, C. W. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. **Evolution**, v.12, p. 2455–2469, 2001.
- WEI, S.; LI, Z.; MOMIGLIANO, P.; FU, C.; WU, H.; MERILÄ, J. The roles of climate, geography and natural selection as drivers of genetic and phenotypic differentiation in a widespread amphibian *Hyla annectans* (Anura: Hylidae). **Molecular Ecology**, v. 29, n. 19, p. 3667-3683, 2020.
- WEIR, B.S.; HILL, W. G. Estimating F-statistics. **Annual Review of Genetics**, v. 36, n.1, p. 721–750, 2002.
- WELLS, K.D. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. Chicago, USA: The University of Chicago Press, 2007.
- WILSON, A.C.; MAXSON, L.R.; SARICH, V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 71, p. 2843-2847, 1974.
- WU, Z. Y.; GUANG-XIN, E.; RAN, H.; WANG, D. H.; YANG, T. Y. Intraspecific Diversity Analysis of Rice Frogs, *Fejervarya multistriata* (Anura: Ranidae), Based on mtDNA D-Loop Sequences, in Tongren, Guizhou Province, China. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 3, p. 1011-1016, 2019.
- YANG, B.; ZHAO, H.; KRANZLE, H.R.; GELERNTER, J. Practical population group assignment with selected informative markers: characteristics and properties of Bayesian clustering via STRUCTURE. **Genet Epidemiol**, v.28, p. 302-312, 2005.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T.J.C. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. **Heredity**, v.101, n. 2, p. 09-119, 2008.

ZOLET, A. C. T.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; SILVA, C. P. D.; FREITAS, L. B. D. **Guia prático para estudos filogeográficos**. Sociedade Brasileira de Genética, 2013.

ZOLET, A. C. T.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, 2017.