

PROJETO DE PESQUISA

PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DIVERSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA PARATELMATOBIINAE OHLER & DUBOIS, 2012 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

PROJETO DE DOUTORADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

RESPONSÁVEL: MARCUS THADEU TEIXEIRA SANTOS*

ORIENTADOR: PROF. DR. CÉLIO F. B. HADDAD*

* Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.

Setembro

2017

RESUMO

O domínio da Mata Atlântica abriga uma das maiores diversidades e níveis de endemismo de anfíbios do planeta. Novas espécies e populações têm sido frequentemente descobertas, no domínio como no caso de anuros da subfamília Paratelmatobiinae. Esta subfamília é composta por 13 espécies endêmicas e constitui um grupo modelo para a investigação dos padrões de distribuição e diversificação de grupos endêmicos associados à Mata Atlântica. Nesse contexto, o presente estudo objetiva gerar modelos de distribuição potencial, que servirão como guias para expedições de campo focadas no encontro de novas populações. Também será gerada uma hipótese filogenética com maior amostragem taxonômica e gênica para os relacionamentos entre exemplares de Paratelmatobiinae. Por fim, dados moleculares datados, modelos de distribuição e registros de ocorrência serão integrados para as análises de inferências de biogeografia histórica. Os resultados obtidos serão importantes para um melhor entendimento sobre a história evolutiva de grupos endêmicos da Mata Atlântica e poderão auxiliar na proposição de medidas de conservação em um domínio altamente ameaçado.

PALAVRAS-CHAVE: modelagem de distribuição, sistemática, biogeografia, Mata Atlântica.

EQUIPE EXECUTORA E RESPECTIVA INSTITUIÇÃO FILIADORA

- Marcus Thadeu Teixeira Santos – aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP.
- Célio Fernando Baptista Haddad – orientador; Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Paulo Christiano de Anchietta Garcia – colaborador – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Thiago Ribeiro de Carvalho Tavares – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Paulo Durães Pereira Pinheiro – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Thaís Helena Condez – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.

- Juliane Petry de Carli Monteiro – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Délio Pontes Baêta da Costa – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Leo Ramos Malagoli – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Ana Paula Motta Vieira – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Ariadne Fares Sabbag – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Tiago Leite Pezzuti – auxiliar em campo – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- João Vítor Andrade de Lacerda – auxiliar em campo – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Estevão Jasper Comitti – auxiliar em campo – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ÁREAS PROTEGIDAS SOLICITADAS

- Parque Estadual da Graciosa
- Parque Estadual do Pau Oco
- Parque Estadual do Marumbi
- Parque Estadual Pico do Paraná
- Parque Estadual Roberto Ribas Lange
- Parque Estadual Serra da Baitaca

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um domínio distribuído ao longo do leste do Brasil e Paraguai e nordeste da Argentina, compondo a segunda maior área de floresta tropical úmida da América do Sul (Câmara, 2003). Este domínio apresenta ampla heterogeneidade de condições ambientais, com grandes alcances latitudinal, longitudinal e altitudinal (Câmara, 2003; Ribeiro *et al.*, 2009). Estas características favorecem a alta diversidade e elevado grau de endemismo de espécies neste domínio (Ribeiro *et al.*, 2009). Apesar disso, a Mata Atlântica

encontra-se altamente ameaçada, principalmente devido à perda e fragmentação de habitats (Myers *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2009).

Em relação aos anfíbios, a Mata Atlântica abriga uma das maiores diversidades e níveis de endemismo do planeta, com mais de 500 espécies conhecidas, o que representa quase um décimo da riqueza mundial. Dessas, quase 90% são endêmicas do domínio (Haddad *et al.*, 2013). As serras associadas ao domínio contribuem para este padrão, já que alojam grande número de espécies e alguns gêneros endêmicos (Cruz & Feio, 2007; Haddad *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2014). Mudanças geológicas decorrentes de atividades tectônicas no Neógeno e Quaternário, mudanças no nível do mar no Quaternário (Martins & Coutinho, 1981; Suguio, 2010) e oscilações climáticas no Pleistoceno (Haffer, 1969; Carnaval & Moritz, 2008) podem ter favorecido a formação de enclaves topográficos, fitofisionômicos e climáticos nas áreas de altitude, o que explicaria os numerosos eventos de especiação (Cruz & Feio, 2007).

Ainda que a Mata Atlântica seja um dos domínios mais estudados da região neotropical, novas espécies e/ou populações conhecidas por uma ou poucas localidades têm sido frequentemente descobertas (Vrcibradic *et al.*, 2010; Barata *et al.*, 2013; Teixeira Jr *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015). Dessa forma, existe uma parcela de biodiversidade desconhecida, incluindo aquela presente na região dos complexos serranos. A dificuldade de acesso aos topos de montanhas e às áreas de alta declividade impõe restrições logísticas aos inventários faunísticos, justificando este panorama.

Diante dos níveis alarmantes de perda da biodiversidade na Mata Atlântica (Ribeiro *et al.*, 2009) e da sensibilidade dos anuros à degradação ambiental (e.g. Stuart *et al.*, 2004), populações e espécies podem ser extintas antes mesmo de serem descritas. Sendo assim, métodos que estimem locais de potencial encontro de grupos taxonômicos de interesse podem aumentar a eficiência de novas descobertas e, consequentemente, auxiliar na definição de áreas prioritárias para conservação. Neste contexto, a modelagem de distribuição potencial, utilizada para inferir e predizer a distribuição geográfica de grupos taxonômicos, integrando registros de ocorrência com dados climáticos (Elith & Leathwick, 2009), revela-se uma ferramenta de grande utilidade. Esse método já foi utilizado em grupos taxonômicos com distribuição restrita em regiões serranas da Mata Atlântica (Pie *et al.*, 2013) e auxiliou na descoberta e descrição de novas espécies, como no caso de linhagens dos gêneros *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae; Ribeiro *et al.*, 2015) e *Pithecopus* (Anura: Phyllomedusidae; Giovanelli *et al.* 2008).

A modelagem de distribuição potencial, quando projetada para diferentes cenários paleoclimáticos e associada a hipóteses filogenéticas pode ser utilizada como uma ferramenta

especialmente explícita para investigar os processos que influenciaram os padrões de distribuição de linhagens genealógicas. Este tipo de abordagem tem fornecido avanços sobre o entendimento dos processos de diversificação que influenciaram a biota da Mata Atlântica (Carnaval *et al.*, 2009; Amaro *et al.*, 2012; Carnaval *et al.*, 2014) e identificado particularidades nas respostas, de acordo com características fisiológicas dos organismos estudados (Amaro *et al.*, 2012). No entanto, estudos com grupos taxonômicos endêmicos do domínio e com distribuição restrita a áreas montanhosas foram pouco explorados e são necessários para uma visão mais completa sobre o tema.

Neste contexto, a subfamília Paratelmatobiinae (Anura: Leptodactylidae) constitui um grupo modelo para estudos. Esta subfamília é composta por 13 espécies de anuros endêmicos e de distribuição restrita, alocadas nos gêneros *Crossodactylodes*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys* e *Rupirana*. Os quatro gêneros apresentam um padrão alopátrico de distribuição em um gradiente norte-sul (Fouquet *et al.*, 2013), sendo *Rupirana* endêmico da porção norte da Chapada Diamantina na região central da Bahia; *Crossodactylodes* estendendo-se do sul da Bahia ao centro do Rio de Janeiro; *Paratelmatobius* estendendo-se do limite entre os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo até o sudeste de São Paulo e *Scythrophrys* do sudeste do Paraná ao centro-leste de Santa Catarina (Frost, 2017). (Figura 1). Todos os gêneros são associados a regiões montanhosas, com *Rupirana* distribuída na porção baiana da Serra do Espinhaço e os demais gêneros distribuídos em serras ao longo da Mata Atlântica.

Descobertas de novas espécies e populações (Vrcibradic *et al.*, 2010; Barata *et al.*, 2013; Teixeira Jr *et al.*, 2013) indicam que a diversidade de Paratelmatobiinae está subestimada. Essas descobertas favoreceram o desenvolvimento de estudos com enfoque na subfamília, o que aumentou, por exemplo, o conhecimento a respeito de suas relações filogenéticas (Lourenço *et al.*, 2008; Fouquet *et al.*, 2013; Teixeira Jr *et al.*, 2013; Santos *et al.*, in prep.). No entanto, a amostragem gênica e taxonômica das hipóteses filogenéticas existentes ainda é baixa, assim o aumento de dados poderá fornecer um panorama mais completo sobre a evolução da subfamília.

Diante do cenário apresentado, na primeira etapa deste estudo objetiva-se gerar modelos de distribuição potencial para os gêneros, a partir de registros disponíveis em coleções biológicas, que irão predizer áreas adequadas para o encontro de novas populações. Expedições de campo serão conduzidas nessas áreas com a finalidade de encontrar novas espécies e populações, o que implicaria em um maior conhecimento sobre a diversidade da subfamília.

Tendo em vista que a amostragem gênica e taxonômica das hipóteses filogenéticas de Paratelmatoibiinae disponíveis na literatura é restrita, na segunda etapa do presente estudo objetiva-se gerar uma hipótese filogenética mais abrangente para as relações evolutivas da subfamília. A amostragem taxonômica será aumentada pela incorporação de dados provenientes de coleções taxonômicas e espera-se também aumentá-la a partir das expedições de campo guiadas pelos resultados da primeira etapa. A amostragem gênica será ampliada pelo sequenciamento de novos fragmentos, sobretudo nucleares. A diversidade críptica em linhagens supostamente intraespecíficas será investigada a partir de métodos de delimitação de espécies baseados na teoria da coalescência.

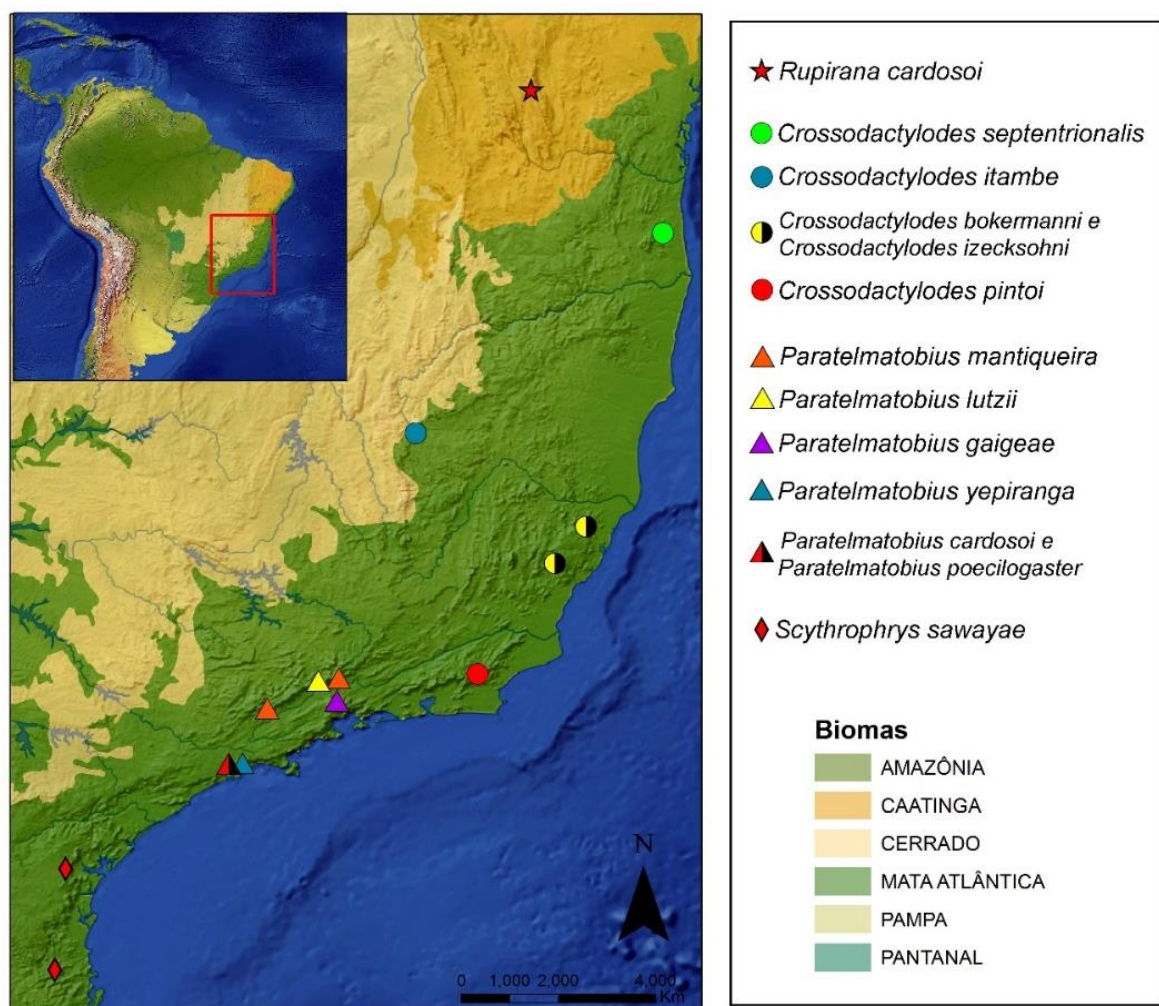


FIGURA 1: Distribuição geográfica das espécies de Paratelmatoibiinae.

Por fim, a última etapa do presente estudo, será realizada pela integração entre registros de ocorrência, inferências genealógicas e modelos de distribuição projetados para diferentes cenários paleoclimáticos. A partir destes dados, será investigada a importância dos eventos geológicos e climáticos sobre a diversificação de linhagens da subfamília Paratelmatoibiinae.

Sendo assim, este estudo contribuirá para o aumento do conhecimento sobre os gêneros endêmicos e de distribuição restrita pertencentes à subfamília Paratelmatoibiinae. Isto poderá auxiliar na compreensão dos processos associados ao padrão de diversificação de linhagens da Mata Atlântica e na proposição de medidas de conservação adequadas.

JUSTIFICATIVA

A Mata Atlântica é um domínio caracterizado por alta diversidade e elevado grau de endemismo em diversos grupos de organismos. Ainda assim, muitas espécies distribuídas no domínio têm sido descritas nos últimos anos, indicando que ainda existe grande parcela da biodiversidade para ser descoberta. Este pode ser o caso de anuros da subfamília Paratelmatoibiinae, que tem parte das espécies descobertas recentemente a partir de inventários com logística complexa nas cadeias de montanhas existentes na Mata Atlântica. Sendo assim, métodos que estimem locais para o potencial encontro de novas populações podem aumentar a eficiência de novas descobertas. Diante dos níveis alarmantes de perda da biodiversidade na Mata Atlântica e da sensibilidade dos anuros a degradação ambiental, especialmente os endêmicos de distribuição restrita, este aumento de eficiência é fundamental para que a diversidade associada a subfamília seja melhor conhecida. Dessa forma, medidas de conservação efetivas poderão ser adotadas.

OBJETIVOS

- Estabelecer áreas potenciais para o encontro de novas populações de Paratelmatoibiinae.
- Aumentar a amostragem e o conhecimento sobre linhagens de Paratelmatoibiinae.
- Investigar as relações filogenéticas entre as espécies e os gêneros de Paratelmatoibiinae.
- Investigar a diversidade críptica dentro dos gêneros de Paratelmatoibiinae.
- Investigar os processos históricos envolvidos com a diversificação das linhagens de Paratelmatoibiinae.
- Comparar os processos encontrados com àqueles obtidos para outros grupos distribuídos na Mata Atlântica.

METODOLOGIA

MODELAGEM DE DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL

Dados de ocorrência e climáticos

Uma lista de registros das espécies de Paratelmatoibiinae será compilada a partir de uma busca intensiva na literatura e consultas aos principais bancos de dados disponíveis (eg: Portal Biodiversidade – ICMBio; Species Link e Global Biodiversity Information Facility - GBIF). As principais coleções taxonômicas também serão consultadas. Todos os registros obtidos terão identificação taxonômica confirmada a partir da análise dos espécimes testemunhos. Espécimes identificados até o nível genérico serão atribuídos a uma espécie válida ou a morfótipos que correspondam a espécies não descritas. Também serão verificados possíveis erros de nomenclatura e de coordenadas geográficas referentes aos registros. Para cada gênero será gerado um modelo de distribuição potencial. Para cada registro de ocorrência serão extraídos valores de 19 variáveis bioclimáticas e de altitude (resolução de 1km), a partir de consulta à base de dados WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005; www.worldclim.org). Para minimizar o efeito de autocorrelação dos dados será utilizada uma análise de correlação par-a-par (Peterson *et al.* 2011).

Procedimentos da modelagem

Os modelos de distribuição potencial serão gerados a partir de três algoritmos distintos: um baseado em envelopes ambientais (BIOCLIM; Nix, 1986), um estatístico (*Support Vector Machines* – SVM; Vapnik, 1995; Drake and Bossenbroek, 2009) e um de inteligência artificial (MAXENT; Phillips *et al.*, 2006), todos implementados no pacote biomod2 (Thuiller *et al.*, 2013) do software R (R Development Core Team 2014). Também serão gerados modelos considerando o consenso entre estes algoritmos. Estes algoritmos foram selecionados devido a disponibilidade apenas de dados de presença e porque eles apresentam premissas ecológicas e estatísticas e processamento matemático distintos (Elith *et al.*, 2006). As variáveis climáticas mais adequadas para cada modelo serão selecionadas por meio de ajustes no modelo completo. Isso será feito a partir de uma análise de bootstrap, incluindo 75% dos registros de ocorrência para treino e os 25% restantes para o teste de cada modelo. O modelo final será avaliado pelo valor de AUC, probabilidade binomial, e erro de omissão (Pearson, 2007).

Implementando os modelos em amostragens de campo

Os mapas de distribuição preditiva serão avaliados em conjunto com mapas de paisagem. Pontos que apresentem alta adequabilidade, baseado nos modelos, e em características fitofisionômicas similares a localidades onde populações já foram registradas, serão selecionados para a realização de expedições de campo. As expedições levarão em conta as especificidades de história natural conhecidas para cada grupo. Para os gêneros *Paratelmatoobius* e *Scythropyrs*, serão selecionados pontos em ambientes temporários em áreas de mata. Para *Rupirana*, poças temporárias rasas e remansos em áreas de campos rupestres, formados durante a estação chuvosa. No caso do gênero bromelígena *Crossodactylodes*, as amostragens serão realizadas a partir da procura visual em diferentes espécies de bromélias, tanto de solo, quanto epífitas.

COLETA DE ESPÉCIMES

A procura por espécimes será feita, principalmente, por meio de busca ativa nos sítios reprodutivos. A captura será feita manualmente, ou com o auxílio de peneiras e tubos sugadores. Devido à dificuldade do encontro de algumas espécies do gênero *Paratelmatoobius*, eventualmente, algumas áreas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, serão selecionadas para a instalação de armadilhas de queda, já que o método permitiu a redescoberta de algumas espécies e populações do gênero (e.g. Zaher et al. 2005). Serão instalados cinquenta baldes de trinta litros por localidade com pequenos furos para escoamento de água, dispostos em linha ou em Y, dependendo dos obstáculos e declividade dos locais escolhidos. No interior dos baldes será colocado um pedaço de isopor. Entre os baldes serão colocadas estacas para a fixação por meio de grampos da lona direcionadora. As armadilhas permanecerão abertas por no máximo 10 dias e serão vistoriadas duas vezes por dia. Após o término das campanhas as armadilhas serão devidamente fechadas e após o término das atividades devidamente removidas. Parte dos espécimes visualizados serão coletados, fotografados, eutanasiados em lidocaína 5%, fixados em formalina a 10% e conservados em álcool 70%. Estes espécimes serão depositados na Coleção Célio Fernando Baptista Haddad, UNESP, Rio Claro, SP.

As coletas no estado do Paraná serão realizadas dentro e fora de Unidades de Conservação. No caso de coletas fora de Unidades de Conservação, possuímos licença de coleta do SISBio (número 59179-1, anexada junto ao projeto). No caso de coletas em Unidades de Conservação, sob gestão do Instituto Ambiental do Paraná, as seguintes

unidades poderão ser visitadas, pois estão localizadas em áreas de distribuição conhecida e/ou potencial de espécies da subfamília Paratelmatobiinae:

- Parque Estadual da Graciosa
- Parque Estadual do Pau Oco
- Parque Estadual do Marumbi
- Parque Estadual Pico do Paraná
- Parque Estadual Roberto Ribas Lange
- Parque Estadual Serra da Baitaca

O projeto terá duração aproximada de quatro anos e cinco meses, e será renovado periodicamente, de acordo com as normas da Portaria IAP nº 017. As expedições de campo serão concentradas no período chuvoso (outubro a março), já que este o período reprodutivo da maioria dos anuros, aumentando a chance de encontro dos espécimes. A equipe (máximo de cinco pessoas) ficará por, no máximo, sete dias em cada unidade de conservação. A data exata de cada expedição dependerá do regime de chuvas e sucesso em outras expedições e estará de acordo com a disponibilidade das Unidades de Conservação.

O material a ser coletado inclui exemplares adultos e girinos dos gêneros *Crossodactylodes*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys* e *Rupirana* (subfamília Paratelmatobiinae, Leptodactylidae) e também espécimes de gêneros pertencentes às outras duas subfamílias de Leptodactylidae (Leiuperinae e Leptodactylinae) e a famílias relacionadas (Cycloramphidae, Centrolenidae, Bufonidae, Hylodidae, Dendrobatidae, Hylidae, Hemiphractidae e Brachycephalidae). A inclusão de espécimes de outras famílias é fundamental para que uma hipótese filogenética contundente seja gerada. Restringiremos-nos às seguintes **quantidades máximas por Unidade de Conservação**:

- *Crossodactylodes*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys* e *Rupirana* (subfamília Paratelmatobiinae: cinco indivíduos adultos e dez girinos por espécie. A inclusão de um maior número amostral de espécimes de Paratelmatobiinae é fundamental para captar a variação intrapopulacional, requerida nas análises de delimitação e biogeográficas.
- Espécies pertencentes às subfamílias Leiuperinae e Leptodactylinae e as famílias Cycloramphidae, Centrolenidae, Bufonidae, Hylodidae, Dendrobatidae, Hylidae,

Hemiphractidae e Brachycephalidae: total de cinco indivíduos (somando adultos e girinos). Quanto a esses táxons, não serão coletadas espécies ameaçadas de extinção segundo as listas vermelhas internacionais, nacionais e estaduais.

Ressalta-se que o conhecimento sobre a subfamília Paratelmatobiinae é bastante escasso e que a amostragem de espécimes da subfamília é bastante complexa, sendo comuns aumentos extensos na distribuição conhecida para os gêneros (Barata et al., 2013; Teixeira Jr et al., 2013), bem como alguns registros ocasionais de espécies previamente pouco conhecidas (Vrcibradic et al., 2010). Isso possivelmente é devido ao pequeno tamanho dos espécimes, a reprodução explosiva, as atividades de vocalizações serem discretas, e a topografia complexa dos locais de ocorrência. Por esta razão considera-se a possibilidade de que os gêneros possam ocorrer em áreas consideravelmente distantes dos pontos de ocorrência conhecidos.

INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS

Amostragem taxonômica

Como grupo interno serão incluídos exemplares dos quatro gêneros de Paratelmatobiinae, contemplando o maior número de indivíduos e localidades possível. Atenção especial será dada a populações que não puderam ser identificadas com segurança a partir de análises morfológicas. A amostragem taxonômica será aumentada pela incorporação de dados provenientes de coleções taxonômicas e espera-se também aumentá-la a partir das expedições de campo, que poderão atenuar possíveis lacunas de amostragem. Como grupo externo serão utilizados espécimes de gêneros pertencentes às outras duas subfamílias de Leptodactylidae: Leiuperinae e Leptodactylinae e também espécimes pertencentes a famílias relacionadas.

Procedimentos de laboratório e amostragem molecular

O DNA de todos os indivíduos será extraído a partir de amostras de tecidos utilizando-se o protocolo modificado por Vilaça *et al.* (2006). Do DNA genômico, serão amplificados, a princípio, dois fragmentos de genes mitocondriais: citocromo oxidase c, subunidade 1 (COI) e citocromo b (CYT-B) e quatro fragmentos nucleares: exon-1 da pró-opiomelanocortina (POMC), exon-1 da tyrosinase (TYR), proteína de ativação da recombinase 1 (RAG-1) e exon-2 do proto-oncogene “*cellular-myelocytomatosis*”

(CMYC), utilizando iniciadores e condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) previamente descritas, podendo ser adaptadas caso necessário.

O produto de cada reação de amplificação será purificado, e em seguida sequenciado pelo método de Sanger. As sequências obtidas serão editadas no software SeqScape v2.6 (Life Technologies®) e alinhadas no módulo ClustalW do programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), com correções manuais utilizando-se o programa Bioedit v. 7.1.3.0 (Hall, 1999). Na análise dos éxons, os códons serão considerados para a ocorrência de ‘indels’.

Análises filogenéticas

Análises de inferência bayesiana serão utilizadas para investigar as relações entre os terminais do presente estudo. O Programa PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012) será utilizado para obtenção dos esquemas de partições. Os modelos selecionados serão implementados em análise de inferência bayesiana no programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012), com duas corridas independentes de 100 milhões de gerações, cada uma com quatro cadeias de Markov Monte-Carlo rodando em paralelo, amostrando-se uma árvore a cada 5000 gerações. Uma taxa de 25% dos estágios iniciais da cadeia será eliminada como *burnin*. O tamanho amostral efetivo de cada parâmetro será avaliado no programa Tracer v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013).

Delimitação de espécies

Com a hipótese filogenética gerada, clados específicos serão selecionados para as análises de delimitação de espécies. Para os terminais pertencentes a estes clados, serão sequenciados mais três fragmentos nucleares de evolução neutra. Essa adição acarretará em maior acurácia nos testes de delimitação (Knowles & Carstens, 2007; Camargo & Sites, 2013). Uma vez obtidas as sequências, as genealogias serão geradas utilizando métodos baseados na teoria da coalescência (Maddison, 1997; Knowles & Carstens, 2007). Estes métodos possuem a vantagem de acomodarem incongruências entre árvores gênicas resultantes dos processos aleatórios que ocorrem a nível populacional (Knowles & Carstens, 2007; Carstens *et al.*, 2013). Uma abordagem taxonômica integrativa por congruência será utilizada para verificar a identidade e o nível de conectividade entre as populações (Padial *et al.*, 2010), partindo da hipótese de isolamento geográfico em ilhas de altitude, seguido por especiação. O teste de congruência será feito entre as sequências de DNA e dados morfométricos.

Datação molecular

A árvore de espécies obtida será utilizada para o cálculo dos tempos de divergência entre os clados, que serão gerados a partir do método do relógio molecular relaxado. Devido à ausência de calibrações baseadas no registro fóssil para Leptodactylidae, *priors* de calibração probabilísticos serão utilizados. Dessa forma as incertezas da calibração são incorporadas de maneira mais adequada aos modelos evolutivos (Drummond *et al.*, 2006). A taxa de mutação de DNA mitocondrial codificante e do fragmento nuclear *cmcy*, propostas por Crawford (2003), serão utilizadas como *priors*, assim como os modelos evolutivos das distintas partições e informações genealógicas obtidas nas análises filogenéticas prévias. A partir disto, as taxas de substituição relativas serão estimadas utilizando inferência bayesiana implementada no programa BEAST v.2.0 (Bouckaert *et al.*, 2014).

ANÁLISES DE BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA

As análises biogeográficas serão geradas a partir dos algoritmos S-DIVA, DEC, S-DEC e BayArea, todos implementados no pacote RASP (Yu *et al.* 2015). O grau de congruência entre os modelos será comparado e modelos considerando o consenso entre estes algoritmos também serão gerados.

Os modelos de distribuição potencial previamente obtidos serão utilizados para a construção de mapas de condutância para os gêneros de Paratelmatoibiinae utilizando o Programa Circuitscape v. 4.0.5 (McRae *et al.*, 2013). Este método utiliza a teoria de circuitos para modelar a conectividade entre localidades em paisagens heterogêneas e possuem a capacidade de avaliar as contribuições de múltiplas rotas de dispersão, simultaneamente (McRae *et al.*, 2013). Os modelos de distribuição potencial gerados serão projetados para três cenários paleoclimáticos, um que simula o último período interglacial (Otto-Bliesner *et al.*, 2006, disponível em: <http://pmip2.lsce.ipsl.fr/>) e dois que simulam o último máximo glacial: CCSM3 ("*Community Climate System Model*", disponível em: <http://www.ccsm.ucar.edu>) e MIROC ("*Model of Interdisciplinary Research on Climate*", disponível em: <http://www.ccsr.utokyo.ac.jp/kyosei/hasumi/MIROC/tech-repo.pdf>). Os mapas referentes aos modelos atuais e paleoclimáticos, juntamente com os polígonos de ocorrência das linhagens de Paratelmatoibiinae serão utilizados como entrada para o Programa Circuitscape. Dessa forma, será calculado um mapa de condutância entre todos os pares de localidades amostradas. Estes mapas serão sobrepostos para destacar as áreas

de alta condutância, que podem ser interpretadas como corredores estáveis que favorecem rotas de dispersão. Todo o processamento geográfico utilizado nas análises será realizado no programa ArcGis v.10 (ESRI; Redlands, CA). Os resultados encontrados serão comparados com os de outros estudos para a realização de inferências sobre processos de diversificação de linhagens ocorridos na Mata Atlântica.

CUSTOS DO PROJETO

O projeto terá um custo total aproximado de R\$ 3.000,00 e suas atividades serão realizadas com recursos da FAPESP (projeto temático, processo 2013/50741-7).

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Desde o início do projeto, em março de 2016, já foram realizadas diversas etapas, dentre elas, o levantamento bibliográfico básico, realização de disciplinas e outros compromissos referentes ao programa de Pós-Graduação, visitas à algumas coleções e obtenção de algumas amostras de tecidos. Abaixo segue uma tabela com o cronograma trimestral para os próximos meses. As coletas de dados em campo só serão prolongadas até 2021 caso haja necessidade.

[illegible]

BIBLIOGRAFIA

- Amaro, R.C., Carnaval, A.C., Yonenaga-Yassuda, Y. & Rodrigues, M.T. (2012) Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(3), 880–888.
- Barata, I.M., Santos, M.T.T., Leite, F.S.F. & Garcia, P.C.A. (2013) A new species of *Crossodactylodes* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Brazil: first record of genus within the Espinhaço Mountain Range. *Zootaxa*, 3731 (4), 552–560.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J. (2014) BEAST2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, e1003537.
- Câmara, I.G. (2003) Brief history of conservation in the Atlantic Forest. *In*: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.), *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. CABS and Island Press, Washington, pp. 31–42.
- Camargo, A., Sites, J.W. (2013) Species delimitation: a decade after renaissance. *In*: Pavlinov, I.Y. (Ed.), *The species problem: ongoing issues*. Croatia: Intech, pp. 225–247.
- Carnaval, A.C., Moritz, C. (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35, 1187–1201.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, 323, 785–789.
- Carnaval, A.C., Waltari, E., Rodrigues, M.T., Rosauer, D., VanDerWal, J., Damasceno, R., Prates, I., Strangas, M., Spanos, Z., Rivera, D., Pie, M.R., Firkowski, C.R., Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F. & Moritz, C. (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20141461.
- Carstens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M., Satler, J.D. (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22, 4369–4383.
- Crawford, A.J. (2003) Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, 12, 2525–2540.

- Cruz, C.A.G. & Feio, R.N. (2007) Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *In*: Nascimento, L.B. & Oliveira, M.E. (Eds.), *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Herpetologia, pp. 117–126.
- Drake, J.M. & Bossenbroek, J.M. (2009) Profiling ecosystem vulnerability to invasion by zebra mussels with support vector machines. *Theor. Ecol.* 2, 189–198.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5), e88.
- Elith, J., Leathwick, J.R. (2009) Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 677–697.
- Fouquet, A., Blotto, B.L., Maronna, M.M., Verdade, V.K., Juncá, F.A., de Sá, R. & Rodrigues, M.T. (2013) Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67, 445–457.
- Frost, D.R. (2017) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. Available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Archived by WebCite at <http://www.webcitation.org/6S99mtdKG> on 05 September 2017.
- Giovanelli, J.G.R., Araujo, C.O., Haddad, C.F.B., Alexandrino, J. (2008) Ecological modelling of *Phyllomedusa ayeaye* (Anura: Hylidae): prediction of new occurrence areas for a rare species. *Neotropical Biology and Conservation*, 3, 59–65.
- Haddad, C.F.B., Toledo, L.F., Prado, C.P.A., Loebmann, D., Gasparini, J.L. & Sazima, I. (2013) *Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia*. São Paulo: Editora Anolis Books. 544 p.
- Haffer, J (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131–137.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965–1978.
- Knowles, L., Carstens, B.C. (2007) Delimiting species without monophyletic trees. *Systematic Biology*, 56, 887–895.

- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y., Guindon, S. (2012) Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–1701.
- Lourenço, L.B., Bacci-Junior, M., Martins, V.G., Recco-Pimentel, S.M. & Haddad, C.F. (2008) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132 (3), 255–266.
- Maddison, W.P. (1997) Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46, 523–536.
- Martins, L.R., Coutinho, P.N. (1981) The Brazilian continental margin. *Earth-Science Reviews*, 17, 87–107.
- McRae, B.H., Shah, V.B. & Mohapatra, T.K. (2013) Circuitscape 4 User Guide. The Nature Conservancy. <http://www.circuitscape.org> (acessado em 20 de setembro de 2015).
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Otto-Bliesner, B.L., Marshall, S.J., Overpeck, J.T., Miller, G.H., Hu, A. (2006) Simulating Arctic climate warmth and icefield retreat in the last interglaciation. *Science*, 311, 1751–1753.
- Padial, J.M., Miralles, A., De La Riva, I., Vences, M. (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7 (16).
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M., Peterson, A.T. (2007) Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*, 34, 102–117.
- Peterson, A.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M., Araújo, M.B. (2011) Ecological Niches and Geographic Distribution. Princeton University Press, 315p.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231–259.
- Pie, M.R., Meyer, A.L.S., Firkowski, C. R., Ribeiro, L.F. & Bornschein, M.R. (2013) Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecological Modelling*, 250, 165–176.

- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W. & Drummond, A.J. (2013) Tracer v.1.6. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J. & Hirota, M.M. (2009) The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142 (6), 1141–1153.
- Ribeiro L.F., Bornschein, M.R., Belmonte-Lopes, R., Firkowski, C.R. & Morato, S.A.A. (2015) Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ* 3:e1011.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61 (3), 539–542.
- Santos, M.T.T., Magalhães, R.F., Vittorazzi, S.E., Lorenço, L.B., Santos, F.R., Garcia, P.C.A. (in prep.). Phylogeny of the bromeligenous genus *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura: Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. & Waller, R.W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306, 1783–1786.
- Suguio, K. (2010) Geologia do Quaternário e mudanças ambientais. Oficina de textos, São Paulo, pp. 1–408.
- Teixeira Jr., M., Recoder, R.S, Amaro, R.C, Damasceno, R.P, Cassimiro, J. & Rodrigues, M.T. (2013) A new *Crossodactylodes* Cochran, 1938 (Anura: Leptodactylidae: Paratelmatobiinae) from the highlands of the Atlantic Forests of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 3702 (5), 459–472.
- Thuiller, W., Münkemüller, T., Lavergne, S., Mouillot, D., Mouquet, N., Schiffrers, K., & Gravel, D. (2013) A road map for integrating eco-evolutionary processes into biodiversity models. *Ecology Letters*, 16, 94–105.
- Vapnik, V. (1995) The Nature of Statistical Learning Theory. Springer-Verlag, New York, 332p.
- Vasconcelos, T.S., Prado, V.H.M., Silva, F.R. & Haddad, C.F.B. (2014) Biogeographic distribution patterns and their correlates in the diverse frog fauna of the Atlantic Forest hotspot. *PLoS ONE* 9(8), e104130.

- Vilaça, S.T., Lacerda, D.R., Sari, E.H.R., Santos, F.R. (2006) DNA-based identification applied to Thamnophilidae (Passeriformes) species: the first barcodes of Neotropical birds. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14, 7–13.
- Vrcibradic, D., Ariani, C.V., Van Sluys, M. & Rocha, C.F.D. (2010) Amphibia, Leptodactylidae, *Paratelmatobius mantiqueira*: Distribution extension. *Check List*, 6 (1), 1–2.
- Zaher, H., Aguiar, E. & Pombal Jr., J.P. (2005) *Paratelmatobius gaigeae* (Cochran, 1938) rediscovered (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, 63, 321-328.
- Yu, Y., Harris, A.J., Blair, C., He, X. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87: 46-49.

