

**Título da Pesquisa: ECOLOGIA DE ANUROS DE ALTITUDE
(BRACHYCEPHALIDAE: *Brachycephalus* e BUFONIDAE: *Melanophryniscus*)**

Pesquisador responsável:

Marcio Roberto Pie
Prof. Adjunto II
Departamento de Zoologia
Universidade Federal do Paraná
pie@ufpr.br

Instituição Financiadora

Fundação Boticário para a Proteção da Natureza

INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é considerada um dos maiores *hotspots* de riqueza e biodiversidade no mundo, abrigando mais de 8.500 espécies endêmicas (MYERS *et al.* 2000). Estima-se que a distribuição original da Floresta Atlântica excedia 1.5 milhões de km², incluindo uma grande diversidade de zonas climáticas e formações vegetacionais estendendo-se do nordeste brasileiro a partes do Paraguai e Argentina (GALINDO-LEAL & CÂMARA 2003). Atualmente, mais de 93% dessa distribuição foi perdida (MYERS *et al.* 2000) e esforços consideráveis têm sido feitos para definir estratégias eficientes e regiões prioritárias para a proteção das áreas remanescentes (TABARELLI *et al.* 2005).

Um dos maiores desafios à conservação de um bioma tão complexo como a Floresta Atlântica é compreender os processos que geraram e mantém sua biodiversidade (MORITZ 2002). Neste sentido, pouco se sabe sobre a história evolutiva da Floresta Atlântica e os mecanismos responsáveis pela distribuição atual de suas espécies. Estudos biogeográficos tem indicado que a distribuição de espécies ao longo da Floresta Atlântica não é homogênea, evidenciando a existência de refúgios biogeográficos acompanhando as flutuações climáticas do Quaternário (CARNAVAL *et al.* 2009). Porém, os autores não tem concordado quanto ao número de áreas de endemismo e suas delimitações (ex. COSTA & LEITE 2000, SILVA *et al.* 2004, SIGRIST & CARVALHO, 2008).

Um importante avanço no conhecimento da história evolutiva recente da Floresta Atlântica foi obtido em um estudo por Carnaval *et al.* (2009), onde dados de modelagem paleoclimática foram integrados à genética de populações de três

espécies de anuros, fornecendo evidências para a persistência de três refúgios florestais na Floresta Atlântica durante as flutuações climáticas do Pleistoceno tardio. Estas regiões teriam sido a fonte para a colonização de outras áreas da Floresta Atlântica, particularmente no sentido norte-sul. Embora estudos posteriores tenham mostrado alguns padrões diferentes para outras espécies (ex. FITZPATRICK *et al.* 2009, THOMÉ *et al.* 2010), o conjunto destas evidências indicam claramente um impacto severo das flutuações climáticas pleistocênicas na distribuição geográfica das espécies da Floresta Atlântica e o potencial de estudos comparativos para elucidar estes impactos.

Em geral, esses padrões de distribuição de espécies baseiam-se em espécies de baixada com ampla distribuição geográfica. Contudo, para espécies adaptadas a condições frias de ambientes montanos as implicações das variações climáticas no passado evolutivo recente provavelmente foram consideravelmente diferentes. Há possibilidade de migração altitudinal em busca de condições climáticas favoráveis. Em função destas tolerâncias climáticas, populações antes contínuas teriam se tornado fragmentadas, gerando novas espécies com um alto grau de endemismo, particularmente no caso de anuros (ex. POMBAL *et al.* 1998, RIBEIRO *et al.* 2005, ALVES *et al.* 2006).

Dois grupo de anuros tem se mostrado particularmente ideais para investigar esta questão em função de diversas peculiaridades de sua história de vida. São os gêneros *Brachycephalus* (Terrarana: Brachycephalidae) e *Melanophryniscus* (Amphibia: Bufonidae). *Brachycephalus* compreende sapos diminutos que incluem alguns dos menores tetrápodes terrestres conhecidos (IZECKSOHN 1971, ESTRADA & HEDGES 1996, LEHR & CATENAZZI 2009). Características singulares como o desenvolvimento direto a partir de ovos terrestres, a baixa capacidade de dispersão e preferência por habitats montanos fez com que uma grande quantidade de espécies do gênero permanecessem isoladas em florestas nebulares de diferentes conjuntos de montanhas (POMBAL 1992, 1999, CLEMENTE-CARVALHO *et al.* 2011). É comum encontrar espécies de *Brachycephalus* conhecidas somente em montanhas específicas da Serra do Mar (ex. POMBAL *et al.* 1998; RIBEIRO *et al.* 2005; ALVES *et al.*, 2006). Para *Melanophryniscus*, foi recentemente descoberto um exemplo desse fenômeno, *Melanophryniscus alipioi* (Amphibia: Bufonidae; LANGONE *et al.* 2008). Ao contrário das outras espécies que ocorrem em planícies no sul da América do Sul e se reproduzem em poças ou ambientes similares, *M. alipioi* é encontrado em campos de altitude na Serra do Capivari (PR) reproduzindo-se em bromélias.

Algumas características das espécies de *Brachycephalus* e *Melanophryniscus*

fazem com que o seu estudo seja particularmente prioritário. A extrema limitação de suas distribuições geográficas em "ilhas" no topo de montanhas faz com que estas espécies estejam particularmente vulneráveis à extinção, tanto por um alto grau de endogamia e baixa variabilidade genética, quanto por distúrbios ambientais como incêndios e descaracterização por espécies de plantas exóticas. Por outro lado, estas peculiaridades de suas distribuições geográficas tornam estas espécies excelentes modelos para entender a dinâmica desses habitats montanos durante seu passado evolutivo recente. Finalmente, além de sua importância ecológica, espécies de *Brachycephalus* e *Melanophryniscus* apresentam uma diversidade de toxinas em sua pele, similares à tetrodotoxina (SEBBEN *et al.* 1986, PIRES *et al.* 2005) e alcalóides e indolizidinas (MEBS *et al.* 2005, DALY 2007), respectivamente. Cada uma dessas substâncias é o resultado de milhões de anos de seleção natural contra inimigos naturais e a perda de qualquer uma de suas espécies eliminaria consigo diversos compostos de grande potencial farmacológico.

JUSTIFICATIVA

Expedições de nosso grupo de pesquisa nos últimos dois anos conseguiram detectar ao longo do sul da Floresta Atlântica 13 espécies novas de *Brachycephalus* e 6 de *Melanophryniscus*. Dado o número de outros locais com ambientes semelhantes no sul do Brasil, a possibilidade de ser encontrado um grande número de espécies ainda desconhecidas desses anuros é muito grande. Além da diversidade de espécies em si, o conhecimento obtido será de fundamental importância para a elaboração de modelos para investigar a evolução de espécies endêmicas de ambientes montanos na Floresta Atlântica.

OBJETIVOS

O principal objetivo da presente proposta é investigar a diversidade de *Melanophryniscus* e do clado sulino de *Brachycephalus*. Nossas metas específicas são:

- (i) Explorar potenciais locais onde novas espécies dos gêneros possam ser encontradas e descritas;
- (ii) Através dos dados obtidos, fornecer subsídios para uma conservação mais eficiente das espécies de anuros montanos do sul da Floresta Atlântica.

MATERIAIS & MÉTODOS

Prazo de duração e previsão de início

O projeto proposto tem a duração de dois anos, a contar do início da autorização de coleta e transporte. A data esperada para o início das coletas é o final do mês de outubro de 2011.

Equipe executora

MARCIO ROBERTO PIE	CPF: 852.605.339-68	RG. 5.787.058-3
CARINA RAUEN FIRKOWSKI	CPF: 073.844.649-19	RG: 8.434.868-6
LUIZ FERNANDO RIBEIRO	CPF: 962.272.579-15	RG: 4.843.581-5
MARCOS RICARDO BORNSCHEIN	CPF: 787.646.379-72	RG: 4.392.832-5
FELIPE AUGUSTO CINI DA SILVA	CPF:	088.132.339-06 RG:9.330.225-7

Serão realizadas expedições para localidades onde espécies de *Brachycephalus* e *Melanophryniscus* podem potencialmente ser encontradas, tendo em vista o conhecimento prévio sobre os tipos de ambientes onde estas espécies poderiam ser encontradas. As unidades de conservação que contém as localizadas a serem amostradas são:

APA Estadual da Escarpa Devoniana
APA Estadual de Guaraqueçaba
APA Estadual de Guaratuba
APA Estadual da Serra da Boa Esperança
Parque Estadual da Graciosa
Parque Estadual das Lauráceas
Parque Estadual de Vila Velha
Parque Estadual do Pau Oco
Parque Estadual Pico do Marumbi
Parque Estadual Pico Paraná
Parque Estadual Roberto Ribas Lange
Parque Estadual serra da Baitaca

Em cada localidade, buscaremos a coleta de ao menos 10 - 15 indivíduos e a

gravação de uma amostra representativa de suas vocalizações. Este número de indivíduos é justificado já que boa parte das espécies são novas e necessitam de uma caracterização morfológica formal para sua descrição, principalmente tendo em vista a variação no padrão de coloração comumente encontrado nas espécies já descobertas. Uma vez no laboratório, cada indivíduo será anestesiado, descrito quanto ao padrão de coloração, sacrificado e fixado em formol a 10%. Todos os indivíduos serão então fixados e depositados em duas coleções herpetológicas brasileiras. Informações sobre a morfologia, vocalização e genética de cada espécie serão integradas para suas descrições taxonômicas formais.

RESULTADOS ESPERADOS

A presente proposta fornecerá uma contribuição importante para o entendimento da diversidade de *Brachycephalus* e *Melanophryniscus* do sul do Brasil e fornecendo subsídios importantes para a sua conservação.

Outras contribuições envolvem:

- Descrição formal das novas espécies de *Brachycephalus* e *Melanophryniscus* em artigos científicos;
- Depósito de material testemunho na coleção herpetológica do departamento de zoologia da UFPR (DZUP);
- Relatório abrangente sobre o conhecimento gerado acerca das espécies de *Melanophryniscus* de campos de altitude da Serra do Mar como subsídios para o desenvolvimento de um Plano de Ação Nacional para a conservação do gênero *Melanophryniscus* no Brasil, atualmente sendo desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, sob coordenação de Ivan Borel Amaral e apoio do ICMBio e do Ministério do Meio Ambiente.

CRONOGRAMA

	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4
Coletas	X	X		X
Trabalho de laboratório	X	X	X	
Descrição da morfologia	X	X		
Medição de espécimes	X	X	X	

Análise de sonogramas			X	X
Análise comparativa dos dados			X	X
Redação de relatórios, resumos, manuscritos	X	X	X	X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.C.R.; RIBEIRO, L.F.; HADDAD, C.F.B & REIS, S.F. 2006. Two New Species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná State, Southern Brazil. *Herpetologica* 62(2):221-233.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; RODRIGUES, M.T.; HADDAD, C.F.B. & MORITZ, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* 323:785-789.

CLEMENTE-CARVALHO, R.G.B, ALVES, A.C.R., PEREZ, S.I., HADDAD, C.F.B. & REIS, S.F. 2011. Morphological and molecular variation in the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium*. *J. Herpetology* 45:94-99.

COSTA, L.P. & Y.L.R. LEITE, 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic forest. *Biotropica* 32:872-881.

DALY, J.W.; WILHAM, J.M.; SPANDE, T.F.; GARRAFFO, H.M.; GIL, R.R.; SILVA, G.L. & VAIRA, M. 2007. Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): Temporal and geographic determinants for two Argentinian species. *J. Chem. Ecol.* 33:871-887.

EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.

ESTRADA, A. R. & HEDGES, S. B. 1996. At the lower size limit in tetrapods: a new diminutive frog from Cuba (*Leptodactylidae*:*Eleutherodactylus*). *Copeia* 1996:852-859.

IZECKSOHNI, E. 1971. Novo gênero e nova espécie de *Brachycephalidae* do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional (Zoologia)* 280:1-12.

GALINDO-LEAL, C. & CAOMARA, I.G. 2003. *Atlantic forest hotspots status: an overview*. IN C. Galindo-Leal & I.G. Caomara (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. p. 3-11. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C.

- LANGONE, J.A., SEGALLA, M.V.; BORNSCHEIN, M.R. & DE SÁ, R. O. 2008. New reproductive mode in the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae) with description of a new species from the State of Parana. *South American Journal of Herpetology* 3:1–9.
- LEHR, E. & CATENAZZI, A. 2009. A new species of minute *Noblella* (Anura: Strabomantidae) from Southern Peru: the smallest frog of the Andes. *Copeia* 2009:148-156.
- MEBS, D.; PODOGA, W.; MANEYRO, R. & KWET, A. 2005. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46(6):641-50.
- MORITZ, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the processes that sustain it. *Systematic Biology* 51:238-254.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- PIRES JR., O.R.; SEBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; MORALES, R. A. V.; BLOCH JR., C.; SCHWARTZ, C. A. 2005. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. *Toxicon* 45:73-79.
- POMBAL JR., J.P. 1992. *História natural de Brachycephalus ephippium* (Anura; Brachycephalidae), na região de Campinas, Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- POMBAL JR., J.P.; WISTUBA, E.M. & BORNSCHEIN, M.R. 1998. A new species of brachycephalid (Anura) from Atlantic rain forest. *Journal of Herpetology* 31:70-74.
- POMBAL JR., J.P. 1999. Ovoposição e desenvolvimento de *Brachycephalus ephippium* (Spix) (Anura: Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16:967-976.

RIBEIRO, L.F.; ALVES, A.C.R. & HADDAD, C.F.B. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional (Zoologia)* 519:1-18.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; VALENTE, D.; MENDES, E. G. 1986. A tetrodotoxin-like substance found in the brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon* 24:799-806.

SIGRIST, M.S. & CARVALHO, C.J.B. 2008. Detection of areas of endemism on two spatial scales using Parsimony Analysis of Endemicity (PAE): the Neotropical region and the Atlantic Forest. *Biota Neotrop.* 8:33–42.

SILVA, J.M.C.; SOUSA, M.C. & CASTELLETTI, C.H.M. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecol. Biogeogr.* 13:85–92.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. *Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira*. IN Conservation International Brasil.

THOMÉ, M.T.C.; K.R., ZAMUDIO; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA, F.A. & ALEXANDRINO, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55(3):1018-1031.