

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE RIO CLARO

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Zoologia)

História evolutiva do grupo de *Brachycephalus pernix* (Anura:
Brachycephalidae)

Projeto de doutorado

Pesquisadora: **Juliane Petry De Carli Monteiro**

Orientador: **Prof. Dr. Célio F. B. Haddad**

Rio Claro, SP – Dezembro, 2018

RESUMO

A diversificação em anuros endêmicos da Mata Atlântica muitas vezes é associado a alta especificidade ambiental das espécies e isolamento de populações em áreas elevadas. Este é o caso dos sapos miniaturizados do gênero *Brachycephalus*, cujo grande número de espécies descritos nos últimos anos sugere uma interessante história evolutiva ainda não bem compreendida. Até o momento, com exceção das quatro espécies de sapos-pulga que não constituem um grupo monofilético, dois grupos de espécies podem ser considerados dentro de *Brachycephalus*: o grupo de *B. ephippium* e o grupo de *B. pernix*. Recentemente, *Brachycephalus actaeus*, uma nova espécie do grupo de *B. pernix* foi encontrada no litoral nordeste de Santa Catarina, juntamente com populações diferenciadas fenotipicamente e com baixa divergência genética, o que faz dele um bom modelo para investigar os processos de diferenciação desde o nível populacional a especiação. Nesse sentido, este projeto pretende contribuir para o aprimoramento da taxonomia e do conhecimento dos processos evolutivos envolvidos na especiação do grupo de *Brachycephalus pernix*.

Palavras-chave: bioacústica, Brachycephaloidea, especiação, genética, morfologia, transcriptoma

EQUIPE EXECUTORA E RESPECTIVA INSTITUIÇÃO FILIADORA

- Juliane Petry De Carli Monteiro – aluna 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.
- Thaís Helena Condez – Coorientadora; Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Eli Carlos De Nardin – colaborador em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Délio Pontes Baêta da Costa – colaborador em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Ariadne Fares Sabbag – colaboradora em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Thiago Ribeiro de Carvalho Tavares – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.

- Marcus Thadeu Teixeira Santos – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Leo Ramos Malagoli – colaborador em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Nadya Carolina Pupin – auxiliar em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.
- Carla Martins Lopes – colaboradora em campo – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP.

ÁREAS PROTEGIDAS SOLICITADAS

- Estação Ecológica de Guaraguaçu
- Estação Ecológica Ilha do Mel
- Parque Estadual da Graciosa
- Parque Estadual das Lauráceas
- Parque Estadual do Boguaçu
- Parque Estadual do Pau Oco
- Parque Estadual de Campinhos
- Parque Estadual Pico do Marumbi
- Parque Estadual Pico do Paraná
- Parque Estadual Roberto Ribas Lange
- Parque Estadual Serra da Baitaca
- Parque Estadual do Rio da Onça
- AEIT do Marumbi
- APA Estadual de Guaratuba
- APA Estadual do Iraí
- APA Estadual do Pequeno
- APA Estadual do Piraquara
- Floresta Estadual Metropolitana

INTRODUÇÃO

O Domínio da Mata Atlântica abriga grande riqueza de espécies endêmicas de anuros (cerca de 90% das espécies), consequência da complexidade topográfica que proporciona alta heterogeneidade de ambientes ao longo da região costeira, ou seja, áreas úmidas que são essenciais para esse grupo de organismos (Haddad *et al.*, 2013). A diversidade ambiental favorece

especializações ecológicas, o que potencializa a diversificação de espécies, muitas vezes beneficiadas pelo isolamento em regiões elevadas das montanhas e decorrente interrupção do fluxo de genes (Cruz & Feio, 2007).

O gênero *Brachycephalus* possui 36 espécies (Frost, 2018), é endêmico da Mata Atlântica brasileira e é conhecido principalmente por apresentar espécies miniaturizadas (Clemente-Carvalho *et al.*, 2009) que, geralmente, exibem colorações vibrantes e que podem estar associadas ao aposematismo (Pires *et al.*, 2005). A maioria das espécies de *Brachycephalus* ocorre em áreas elevadas nos complexos de montanhas na Serra do Mar, mas também em áreas da Serra da Mantiqueira, nas Serras do Leste Catarinense e na Serra do Rio de Contas (IBGE 2010; Condez, 2014; Bornschein *et al.*, 2016a). Sua distribuição compreende os estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Bornschein *et al.*, 2016a).

Até o momento, com exceção das quatro espécies de sapos-pulga que não são atribuídas a nenhum grupo, dois grandes grupos podem ser considerados dentro de *Brachycephalus*: o grupo de *B. ephippium* e o grupo de *B. pernix* (Ribeiro *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2018). O grupo de *B. pernix* abrange 19 espécies distribuídas desde o sul de São Paulo até o centro-leste de Santa Catarina (Bornschein *et al.*, 2016a), a saber: *B. actaeus*, *B. albolineatus*, *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. brunneus*, *B. coloratus*, *B. curupira*, *B. ferruginus*, *B. fuscolineatus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. mirissimus*, *B. olivaceus*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. quiririensis*, *B. tridactylus* e *B. verrucosus*. A grande diversidade deste grupo foi revelada nos últimos três anos, quando foram descritas 11 espécies (Ribeiro *et al.*, 2015; Pie & Ribeiro, 2015; Bornschein *et al.*, 2016b; Ribeiro *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Pie *et al.*, 2018).

Muitas dessas espécies novas do gênero foram descritas recentemente, sendo a diagnose principalmente baseadas em coloração. Porém, o polimorfismo de cor encontrado dentro da espécie *Brachycephalus actaeus* (Monteiro, 2017) sugere que este caráter pode não ser adequado para a separação entre espécies, principalmente espécies que podem ser aposemáticas (Pires *et al.*, 2005). Além disso, há uma confusão de termos morfológicos para a determinação de diagnoses específicas (Condez *et al.*, 2017), sugerindo que a taxonomia do grupo precisa ser cuidadosamente revisada. Para a hipótese de novas espécies seria desejável buscar uma abordagem taxonômica mais completa, abrangendo diferentes linhas de evidência (*e.g.*, morfologia externa e interna, bioacústica, evidência molecular; Dayrat, 2005).

A utilização de amostras de sequência de DNA cada vez mais vem proporcionando evidências consistentes para corroborar a delimitação de espécie com taxonomia complexa. Estudos com inferência filogenética para recuperar as relações internas do gênero *Brachycephalus* são recentes e abordam menos da metade das espécies atuais (Clemente-Carvalho *et al.*, 2011; Padial *et al.*, 2014),

sendo que poucas espécies possuem informações moleculares em suas descrições (Condez *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Pie *et al.*, 2018).

A delimitação de espécies no grupo de *Brachycephalus pernix* foi realizada por Firkowski *et al.* (2016), onde as espécies descritas por Ribeiro *et al.* (2015) e Pie & Ribeiro (2015) foram suportadas. Contudo, há uma necessidade de revisão dos limites específicos abordando uma maior representatividade do gênero e adicionando-se evidências além dos dados moleculares, pois dependendo da abordagem utilizada pode-se comprometer negativamente os resultados da análise de limites específicos, levando a uma compreensão ofuscada da diversidade (Carstens *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2017). Ao testarmos o posicionamento de *Brachycephalus actaeus* em uma árvore filogenética com alta representatividade do gênero (Monteiro *et al.*, 2018), evidências moleculares mostraram baixo suporte entre algumas espécies do grupo de *B. pernix* e baixa distância genética entre vários táxons com base em *loci* mitocondrial (16S). Como resultado, muitas espécies atualmente válidas não são monofiléticas, o que sugere a existência de espécies com polimorfismo de cores, e consequentemente uma superestimativa da diversidade do grupo.

As espécies que exibem polimorfismo de cores são um interessante sistema para estudar forças microevolutivas que mantêm a variação genética de populações (Hoffman & Blouin, 2000). Este é o caso de muitas espécies de anuros para as quais se sabe pouco sobre a herança e manutenção seletiva de polimorfismos (Hoffman & Blouin, 2000; Rojas, 2016). O polimorfismo parece ser comum em espécies aposemáticas, como verificado, por exemplo, em *Oophaga pumilio* (Wang & Shaffer, 2008), *Oophaga granulifera* (Brusa *et al.*, 2013), *Adelphobates galactonotus* (Hoogmoed & Avila-Pires, 2012) e *Ranitomeya imitator* (Twomey *et al.*, 2015). A evolução de diferentes fenótipos em uma mesma espécie pode atuar através de fatores ambientais e/ou genéticos, ou seja, em função de sinais antipredatórios, na seleção sexual, na deriva genética, na seleção natural, e/ou a combinação desses e outros fatores adicionais (Brusa *et al.*, 2013). Atualmente, é possível acessar o genótipo onde se pode localizar genes que fornecem informações sobre mecanismos que contribuem para a expressão da coloração, por exemplo (Larson *et al.*, 2013).

Diante deste cenário, onde coloração pode ser variação intraespecífica e não característica diagnóstica entre espécies, se faz necessário um melhor entendimento da real diversidade fenotípica dentro do que denominamos “espécies” em *Brachycephalus* e o conhecimento sobre os padrões de distribuição desses organismos. Para isso, métodos moleculares devem auxiliar na investigação das relações no gênero, usando amostragem em nível populacional e específico (*e.g.*, Brusa *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2017; Roland *et al.*, 2017). Além disso, *Brachycephalus* apresenta espécies crípticas e conspícuas que quando comparadas podem ajudar na busca por genes que expressam a coloração, ainda não estudados no gênero e muito pouco estudados em Anura.

JUSTIFICATIVA

Expedições recentes realizadas no litoral nordeste de Santa Catarina revelaram uma nova espécie de *Brachycephalus* (Monteiro *et al.*, 2018) e apontam para a existência de outras populações fenotipicamente diferentes em uma pequena área geográfica (Monteiro, 2017). A possível variação fenotípica apresentada nestas populações chama a atenção para espécies já descritas em condições similares e salienta a complexidade em se determinar uma unidade taxonômica no gênero. Além disso, muitas populações com variação fenotípica estão sendo encontradas ao longo da distribuição do gênero e ainda não há estudos enfocando essas variações fenotípicas (T.H. Condez, comunicação pessoal).

A ausência de estrutura genética em loci mitocondrial pode ser explicada através do processo de introgressão (Condez, 2014; Pennisi, 2016; e.g., Sequeira *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2013), ou por uma radiação adaptativa recente (Brusa *et al.* 2013; Tarvin *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, a verificação da existência de fluxo gênico entre as populações, aliada ao entendimento biogeográfico e a correlação com a origem dos ambientes montanhosos e ilhas, são temas a serem explorados. Assim, se fazem necessárias abordagens integrativas mais profundas em nível taxonômico, genético e ecológico, para uma melhor compreensão dos fatores evolutivos que influenciaram e estruturaram a diversidade genética.

Estas descobertas são especialmente significativas para o entendimento da taxonomia do gênero *Brachycephalus*, principalmente em regiões onde novas espécies estão sendo descritas (Ribeiro *et al.*, 2015; Pie & Ribeiro, 2015; Bornschein *et al.*, 2016b; Ribeiro *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). A possível presença de populações com polimorfismo de cores em uma área geográfica relativamente pequena representa uma oportunidade única para avaliar o papel das pressões de seleção que atuam na diversificação da coloração. Nosso esforço será pioneiro para o entendimento da expressão gênica no gênero visando marcadores que não são relacionados à ecologia química.

O aumento no número de estudos acerca do gênero *Brachycephalus* é crucial para estratégias e práticas de conservação, visto que a distribuição restrita pode potencializar o grau de ameaça (e.g., *B. pernix*; MMA, 2014). Dessa forma, tendo em vista a distribuição restrita e as ameaças a que estão sujeitas as espécies, como a perda e modificação de habitat, por exemplo, há necessidade de estudos mais completos para o entendimento dos processos evolutivos encontrados em *Brachycephalus*.

OBJETIVOS

Este projeto pretende aprofundar o conhecimento da taxonomia e dos processos evolutivos envolvidos na especiação do grupo de *Brachycephalus pernix*, com os seguintes objetivos específicos:

- (1) Estabelecer áreas potenciais para o encontro de novas populações de *Brachycephalus*.
- (2) Avaliar o status taxonômico das populações de *Brachycephalus* spp. encontradas na Serra do Saí, litoral nordeste de Santa Catarina, através da investigação de caracteres morfológicos, bioacústicos e moleculares.
- (3) Explorar os mecanismos de variação genotípica que poderiam explicar a diversidade de cores nas populações de *Brachycephalus* spp. encontradas na Serra do Saí litoral, nordeste de Santa Catarina.
- (4) Realizar uma revisão taxonômica das espécies do grupo de *Brachycephalus pernix*, com a intenção de reavaliar a diversidade e aprimorar o conhecimento sobre este grupo de espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. A área de estudo abrangerá a área de ocorrência do gênero *Brachycephalus* compreendendo desde o sul do estado da Bahia até o centro-leste do estado de Santa Catarina. O maior investimento em expedições a campo envolve os estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, onde estão distribuídas as espécies do grupo de *Brachycephalus pernix* (Figura 1).

Espécies do estudo. O trabalho de campo será realizado nos primeiros três anos do projeto visando coletar pelo menos 20 espécimes de cada uma das 19 espécies já descritas do grupo de *Brachycephalus pernix* para compor material de análise: *B. actaeus*, *B. albolineatus*, *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. brunneus*, *B. coloratus*, *B. curupira*, *B. ferruginus*, *B. fuscolineatus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. mirissimus*, *B. olivaceus*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. quiririensis*, *B. tridactylus* e *B. verrucosus*. As demais espécies do gênero *Brachycephalus* serão coletadas (máximo 10 indivíduos por espécie) caso seja necessário para comparações morfológicas, osteológicas, bioacústicas e moleculares, visto que, vamos priorizar espécimes de coleções científicas. Também, poderão haver coletas de famílias relacionadas (Brachycephalidae, Bufonidae, Centrolenidae, Ceratophryidae, Carugastoridae, Cycloramphidae, Dendrobatidae, Hemiphractidae, Hylidae, Hylodidae, Leptodactylidae, Phyllomedusidae, Odontophrynidae e Microhylidae; máximo cinco indivíduos por espécie, se houver necessidade). A inclusão de espécimes de outras famílias é fundamental para que uma hipótese filogenética contundente seja gerada para realizar a revisão do grupo de *Brachycephalus pernix*. Quanto a esses táxons, não serão coletadas espécies ameaçadas de extinção segundo as listas vermelhas internacionais, nacionais e estaduais. As séries-tipo dos espécimes serão analisadas através de visitas às coleções zoológicas (Museu de História Natural

Capão da Imbuia, Museu Nacional do Rio de Janeiro e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) ou, quando possível, através de empréstimos de material das coleções. As amostras de tecido para extração de DNA serão obtidas através da coleta de material topotípico.



Figura 1. Mapa de distribuição das espécies do grupo de *Brachycephalus pernix* nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

Coleta e preservação do material. A procura por espécimes será visual e auditiva (adaptado de Crump & Scott, 1994 e Zimmerman, 1994). Os indivíduos coletados serão eutanasiados em lidocaína 5%, fixados em formaldeído 10% e preservados em etanol 70%. Amostras de músculo e fígado serão extraídas, individualizadas e armazenadas em etanol para análises de DNA, antes da fixação em formaldeído. Os espécimes coletados serão depositados na coleção de anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH), Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

As coletas no estado de São Paulo 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 63104, 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 de *Brachycephalus*:

- Estação Ecológica de Guaraguaçu
- Estação Ecológica Ilha do Mel
- Parque Estadual da Graciosa
- Parque Estadual das Lauráceas
- Parque Estadual do Boguaçu

- Parque Estadual do Pau Oco
- Parque Estadual de Campinhos
- Parque Estadual Pico do Marumbi
- Parque Estadual Pico do Paraná
- Parque Estadual Roberto Ribas Lange
- Parque Estadual Serra da Baitaca
- Parque Estadual do Rio da Onça
- AEIT do Marumbi
- APA Estadual de Guaratuba
- APA Estadual do Iraí
- APA Estadual do Pequeno
- APA Estadual do Piraquara
- Floresta Estadual Metropolitana

O projeto terá duração aproximada de quatro anos, 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. No entanto, eventualmente poderemos fazer expedições a campo durante o inverno. 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.

Morfometria. Serão mensurados 14 caracteres morfométricos dos espécimes, conforme Monteiro (2017), obtidos através de lente ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio Zeiss Stemi SV 11. Para a definição sexual será verificada a presença de fenda vocal em machos e a ausência de fendas vocais em fêmeas. Testaremos a diferença de tamanho do corpo entre machos e fêmeas através do teste-T de Welch e, também, os padrões de variação populacional na morfometria serão verificados através de Análise de Variáveis Canônicas (*Canonical Variate Analysis*) (CVA; Manly, 2004), utilizando o programa R (R Development Core Team, 2015).

Osteologia. Dois exemplares de cada espécie serão diafanizados para coloração diferencial de ossos e cartilagens, com vermelho de alizarina e azul de alcian, respectivamente, baseado no procedimento proposto por Taylor & Van Dyke (1985). A descrição do esqueleto dos indivíduos será efetuada através de lente ocular micrométrica acoplada à estereomicroscópio Zeiss Stemi SV 11. A terminologia das estruturas ósseas será baseada em Trueb (1993) e Duellman & Trueb (1994).

Bioacústica. Serão gravados cinco cantos de anúncio de machos de cada espécie. As gravações serão obtidas com o gravador digital Marantz PMD-660 acoplado em um microfone unidirecional Sennheiser ME-66. As análises bioacústicas serão realizadas utilizando o programa RAVEN PRO 1.4 (Bioacoustics Research Program, 2011). Serão obtidos 11 parâmetros dos cantos baseados nas definições de Köhler *et al.* (2017).

Transcriptoma. Utilizaremos como organismos modelos dois pares de espécies dentro do gênero *Brachycephalus*, sendo uma que apresenta coloração conspícua e outra críptica, para identificação de genes candidatos: sendo *B. actaeus* vs *B. sulfuratus* e *B. epphipium* vs *B. hermogenesi*. Em seguida testaremos expressão de genes candidatos nas populações de *B. aff. actaeus* que ocorrem na Serra do Saí, Santa Catarina, abrangendo todos os fenótipos encontrados. Devido ao tamanho diminuto dos espécimes de *Brachycephalus* as amostras contarão com o indivíduo por inteiro armazenado em RNAlater. Três amostras de cada espécie e de cada população de *B. aff. actaeus* serão preservadas para posterior extração de RNA. O RNA será extraído utilizando Trizol (Sanchez *et al.*, 2018). As bibliotecas serão geradas a partir do sequenciamento por Illumina onde serão preparadas usando *NEXTflex Directional RNA Seq Kit* (Bioo Scientific, Austin, TX, USA). Utilizaremos a estratégia de montagem *de novo*, a qual não utiliza um genoma de referência, para realizar a montagem dos transcriptomas seguindo protocolos atuais disponíveis na literatura. Os transcriptomas serão montados individualmente no programa TRINITY e SOAPTrans. Faremos uma anotação preliminar dos genes utilizando Blast2GO visando genes ortólogos em vertebrados que podem estar ligados a coloração. A busca por genes candidatos iniciará pelos genes associados ao metabolismo de melanina, que aparentemente são bem conservados em vertebrados (Hubbard *et al.*, 2010) e apresentaram mutações relacionadas a variações de coloração em anfíbios (Posso-Terranova & Andrés, 2017). Adicionalmente, serão investigados genes associados ao metabolismo de carotenos ou pteridinas. Uma vez selecionados potenciais genes vamos construir *primers* específicos e utiliza-los em PCR quantitativa (Toews *et al.*, 2017) para verificar a presença desses genes, a existência de mutações associadas e sua expressão diferenciada nas populações de *Brachycephalus* da Serra do Saí, Santa Catarina.

Inferência filogenética. Para reconstruir as relações filogenéticas entre as espécies do grupo de *Brachycephalus pernix* serão amplificados fragmentos de genes do DNA mitocondrial (12S, 16S, CYTB), e genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (RAG, TYR). Também, serão utilizadas as sequências disponíveis no GenBank. Para a reconstrução das relações filogenéticas tentaremos incluir todas as espécies do gênero, além das do grupo *pernix*. Vamos tentar sempre incluir mais de um indivíduo por espécie para poder avaliar a variação intra e entre espécies. Para o grupo externo serão selecionadas amostras de representantes do gênero irmão *Ischnocnema*, conforme resultados disponíveis para a superfamília Brachycephaloidea (Padial *et al.*, 2014) e

também espécimes pertencentes a famílias relacionadas. As novas sequências serão editadas para qualidade utilizando o programa Geneious (Kearse *et al.*, 2012), alinhadas no programa Mega 6.06 (Tamura *et al.* 2013) utilizando o algoritmo Muscle (Edgar 2004). A árvore filogenética será construída através do método Bayesiano no BEAST 2.1.3 (Bouckaert *et al.*, 2014).

CUSTOS DO PROJETO

O projeto terá um custo total aproximado de R\$ 8.000,00 e suas atividades contam com recursos do Projeto Temático, intitulado "Diversidade e Conservação dos Anfíbios Brasileiros", processo FAPESP 2013/50741-7, e ao Projeto PITE “Anfíbios do Mosaico de Áreas Protegidas do Lagamar: diversidade, conservação e perspectivas”, processo FAPESP 2014/50342-8, ambos coordenados por Célio Haddad, orientador da candidata.

CRONOGRAMA

As coletas e análises previstas deste projeto foram iniciadas em setembro de 2018, data de admissão no programa de pós-graduação em ciências biológicas (Zoologia) da UNESP-Rio Claro. As coletas de dados em campo só serão prolongadas até 2022 caso haja necessidade.

Atividades	2019			2020			2021			2022	
	Jan-Abr	Mai-Ago	Set-Dez	Jan-Abr	Mai-Ago	Set-Dez	Jan-Abr	Mai-Ago	Set-Dez	Jan-Abr	Mai-Ago
Disciplinas	x	x									
Revisão de literatura	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x
Coleta de dados em campo	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Análises laboratoriais	x	x	x		x	X	x				
Análises laboratoriais						X	x				
Análises de dados	x	x	x		x	X	x	x			
Redação e submissão de artigos			x	x						x	x
Qualificação									x		
Redação da tese		x	x	x	x	X	x	x	x	x	x
Defesa pública da tese											x

REFERÊNCIAS

- Bornschein, M. R.; Firkowski, C. R.; Belmonte-Lopes, R.; Corrêa, L.; Ribeiro, L. F.; Morato, S. A. A.; Antoniazzi-JR, R. L.; Reinert, B. L.; Meyer, A. L. S.; Cini, F. A.; Pie, M. R. 2016a. Geographical and altitudinal distribution of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) endemic to the Brazilian Atlantic Rainforest. *PeerJ*, 4(e2490): 1 – 41.
- Bornschein, M. R.; Ribeiro, L. F.; Blackburn, D. C.; Stanley, E. L.; Pie, M. R. 2016b. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Santa Catarina, southern Brazil. *PeerJ*, 4(e2629): 1 – 19.
- Brusa, O.; Bellati, A.; Meuche, I.; Mundy, N. I.; Pröhl, H. 2013. Divergent evolution in the polymorphic granular poison-dart frog, *Oophaga granulifera*: genetics, coloration, advertisement calls and morphology. *J Biogeogr*, 40: 394 – 408.
- Carstens, B. C.; Pelletier, T. A.; Reid, N. M.; Satler, J. D. 2013. How to fail at species delimitation. *Mol Ecol*, 22: 4369 – 4383.
- Chan, K. O.; Alexander, A. M.; Grismer, L. L.; Su, Y.; Grismer, J. L.; Quah, E. S. H.; Brown, R. M. 2017. Species delimitation with gene flow: a methodological comparison and population genomics approach to elucidate cryptic species boundaries in Malaysian Torrent Frogs. *Mol Ecol*, 26: 5435 – 5450.
- Clemente-Carvalho, R. B. G.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C.; Haddad, C. F. B.; Alves, A. C. R.; Rocha, H. S.; Pereira, G. R.; Oliveira, D. F.; Lopes, R. T.; Reis, S. F. 2009. Hyperossification in miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): microscopic structure and macroscopic patterns of variation. *J Morphol*, 270(11): 1285 – 1295.
- Clemente-Carvalho, R. B. G.; Klaczo, J.; Perez, I.; Alves, A. C. R.; Haddad, C. F. B.; Reis, S. F. 2011. Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Mol Phylogenet Evol*, 61: 79 – 89.
- Condez, T. H.; Monteiro, J. P. C.; Haddad, C. F. B. 2017. Comments on the current taxonomy of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae). *Zootaxa*, 4290(2): 395 – 400.
- Condez, T. H.; Monteiro, J. P. C.; Comitti, E. J.; Garcia, P. C. A.; Amaral, I. B.; Haddad, C. F. B. 2016. A new species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa*, 4083: 40 – 56.
- Condez, T. H. 2014. Diversidade, distribuição e diversificação do gênero *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 (Anura: Brachycephalidae). 163 f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Crump, M. L.; Scott JR, N. J. 1994. Visual encounter surveys. In: Heyer, W. R.; Donnelly, M. A.; McDiarmid, R. W.; Hayek, L. C.; Foster, M. S. (Ed.). *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 84 – 92.
- Cruz, A. G.; Feio, R. N. 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudoeste do Brasil. In: Nascimento, L. B.; Oliveira, M. E. (Eds). *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. p. 117 – 126.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc*, 85: 407 – 415.
- Duellman, W. E.; Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. The Johns Hopkins University Press, London. 670 p.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792 – 1797.
- Firkowski, C. R.; Bornschein, M. R.; Ribeiro, L. F.; Pie, M. R. 2016. Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol*, 100: 345 – 60.

- Frost, D. R. 2018. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 02 mar. 2018.
- Gompert, Z.; Buerkle, C. A. 2010. introgress: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Mol Ecol Resour*, 10: 378 – 384.
- 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, Anolisbooks. p. 544.
- Haddad, C. F. B.; Giovanelli, J. G. R.; Alexandrino, J. M. B. 2008. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. In: Buckeridge, M. (Org.). A biologia e as mudanças climáticas no Brasil. São Carlos: Ed. RIMA. p. 195 – 206.
- Hoffman, E. A.; Blouin, M. S. 2000. A review of colour and pattern polymorphisms in anurans. *Biol J Linn Soc*, 70: 633 – 665.
- Hoogmoed, M. S.; Avila-Pires, T. C. S. 2012. Inventory of color polymorphism in populations of *Dendrobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae), a poison frog endemic to Brazil. *Phyllomedusa* 11(2): 95 – 115.
- Hubbard, J. K.; Uy, J. A. C.; Hauber, M. E.; Hoekstra, H. E.; Safran, R. J. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Genet*, 26(5): 231 – 239.
- IBGE, 2010. Atlas Nacional do Brasil Milton Santos. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Rio de Janeiro, Brasil.
- Jackson, N. D.; Carstens, B. C.; Morales, A. E.; O'Meara, B. C. 2017. Species delimitation with gene flow. *Syst Biol*, 66(5): 799 – 812.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Meintjes, P.; Drummend, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647 – 1649.
- Köhler, J.; Jansen, M.; Rodríguez, A.; Kok, P. J. R.; Toledo, L. F.; Emmrich, M.; Glaw, F.; Haddad, C. F. B.; Rödel, M. O.; Vences, M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251(1): 001 – 124.
- Larson, E.; Andrés, J. A.; Bogdanowicz, S. M.; Harrison, R. G. 2013. Differential introgression in a mosaic hybrid zone reveals candidate barrier genes. *Evolution*, 67(12): 3653 – 3661.
- Manly, B. F. J. 2004. Multivariate statistical methods: a primer. 3 ed. London: Chapman and Hall. 224 p.
- Medina, I.; Wang, I. J.; Salazar, C.; Amézquita, A. 2013. Hybridization promotes color polymorphism in the aposematic harlequin poison frog, *Oophaga histrionica*. *Ecol Evol*, 3(13): 4388 – 4400.
- MMA, 2014. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 444. Reconhece a “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção”. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=121&totalArquivos=144>>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- Monteiro, J. C. P.; Condez, T. H.; Garcia, P. C. A.; Comitti, E. J.; Amaral, I. B.; Haddad, C. F. B. 2018. A new species of *Brachycephalus* (Anura, Brachycephalidae) from the coast of Santa Catarina State, southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa*, 4407(4): 483 – 505.
- Monteiro, J. P. C. 2017. Distribuição e taxonomia de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) (Anura: Brachycephalidae). 114 pp. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências, Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Padial, J. M.; Grant, T.; Frost, D. R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, 3825(1): 1 – 132.

- Pennisi, E. 2016. Shaking up the tree of life. *Science*, 354(6314): 817 – 821.
- Pie, M. R.; Ribeiro, L. F.; Confetti, A. E.; Nadaline, M. J.; Bornschein, M. R. 2018. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ*, (e5683): 1 – 23.
- Pie, M. R.; Ribeiro, L. F. 2015. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Quiriri mountain range of southern Brazil. *PeerJ*, 3(e1179): 1 – 9.
- Pires JR, O. R.; Sebben, 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.
- Posso-Terranova, A.; Andrés, J. Á. 2017. Diversification and convergence of aposematic phenotypes: truncated receptors and cellular arrangements mediate rapid evolution of coloration in harlequin poison frog. *Evolution*, 71(11): 2677 – 2692.
- Ribeiro, L. F.; Blackburn, D. C.; Stanley, E. L.; Pie, M. R.; Bornschein, M. R. 2017. Two new species of the *Brachycephalus pernix* group (Anura: Brachycephalidae) from the state of Paraná, southern Brazil. *PeerJ*, 5(e3603): 1 – 25.
- Ribeiro, L. F.; Bornschein, M. R.; Belmonte-Lopes, R.; Firkowski, C. R.; Morato, S. A. A.; Pie, M. R. 2015. Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ*, 3(e1011): 1 – 36.
- Rojas, B. 2016. Behavioural, ecological, and evolutionary aspects of diversity in frog colour patterns. *Biol Rev*, 1 – 22.
- Roland, A. B.; Santos, J. C.; Carriker, B. C.; Caty, S. N.; Tapia, E. E.; Coloma, L. A.; O’Connell, L. A. 2017. Radiation of the polymorphic little devil poison frog (*Oophaga sylvatica*) in Ecuador. *Ecol Evol*, 7: 9750 – 9762.
- Sequeira, F.; Sodr , D.; Ferrand, N.; Bernardi, J. A. R.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Vallinoto, M. 2011. Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. *Evol Biol*, 11(264): 1 – 15.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725 – 2729.
- Tarvin, R. D.; Powell, E. A.; Santos, J. C.; Ron, S. R.; Cannatella, D. C. 2017. The birth of aposematism: high phenotypic divergence and low genetic diversity in a young clade of poison frogs. *Mol Phylogenet Evol*, 109: 283 – 295.
- Taylor, W. R.; Van Dyke, G. C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9: 107 – 119.
- Toews, D. P. L.; Hofmeister, N. R.; Taylor, S. A. 2017. The evolution and genetics of carotenoid processing in animals. *Trends Genet.*, 33(3): 171 – 182.
- Trueb, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: Hanken, J.; Hall, B. K. (Eds). *The skull*. 2. v. The University of Chicago Press, Chicago and London. p. 255 – 343.
- Twomey, E.; Vestergaard, J. S.; Venegas, P. J.; Summers, K. 2016. Mimetic divergence and the speciation continuum in the mimic poison frog *Ranitomeya imitator*. *Am Nat*, 187(2): 205 – 224.
- Wang, I. J.; Shaffer, H. B. 2008. Rapid color evolution in an aposematic species: a phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Evolution*, 62(11): 2742 – 2759.
- Zimmerman, B. L. 1994. Audio strip transects. In: Heyer, W. R.; Donnelly, M. A.; McDiarmid, R. W.; Hayek, L. C.; Foster, M. S. (Eds). *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 92 – 97.