

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *MELANOPHRYNISCUS CAMBARAENSIS* (ANURA: BUFONIDAE) NA FLORESTA NACIONAL DE SÃO FRANCISCO DE PAULA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

VALENTINA Z. CAORSI¹, RAQUEL R. SANTOS², TARAN GRANT³ E MÁRCIO BORGES MARTINS¹

¹Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Cep 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

²Polar Meio Ambiente, Rua Itororó, 195. Cep 90110-290 Porto Alegre, RS, Brasil

³Laboratório de Sistemática de Vertebrados, Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Cep 91530-000, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO: Os anuros apresentam uma grande diversidade reprodutiva, associada às características ambientais de onde vivem. O gênero *Melanophryniscus*, família Bufonidae, apresenta, atualmente, 26 espécies distribuídas ao sul da América do Sul. A espécie *Melanophryniscus cambaraensis* é endêmica do Planalto das Araucárias, Rio Grande do Sul, Brasil e é considerada, no estado, ameaçada de extinção. A mesma apresenta reprodução do tipo explosiva, caracterizado por ocorrer em poucos dias e desencadeado por intensas chuvas que formam um riacho temporário. O estudo teve como objetivo descrever o comportamento reprodutivo da população de *M. cambaraensis* na Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA SFP), Rio Grande do Sul, Brasil. Os dados foram coletados durante três eventos reprodutivos dessa população ocorridos em 2009, onde foram analisados os seguintes comportamentos: corte, amplexo, interações agonísticas e desova; posteriormente observados, também, o tempo de desenvolvimento do estágio de ovo e girino até sua metamorfose. Durante o evento, os machos de *M. cambaraensis* apresentaram dois comportamentos de corte: o canto e a procura ativa. As fêmeas desovaram durante um período de seis horas de amplexo no sítio reprodutivo e 36 horas em cativeiro e em ambos os casos as posturas foram realizadas em parcelas. Durante o evento reprodutivo, machos de *M. cambaraensis* empregaram a estratégia de macho deslocador e foram observadas oito táticas aplicadas pelo mesmo durante o combate para desfazer o amplexo e roubar a fêmea. O desenvolvimento larval em cativeiro durou sete dias do estágio de ovo até girino e a metamorfose dos indivíduos até o estágio 42 de Gosner levou 34 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Anura, Bufonidae, *Melanophryniscus cambaraensis*, reprodução explosiva, amplexo, desova, estratégias reprodutivas, desenvolvimento larval.

ABSTRACT: The diversity of reproductive modes in amphibians is much greater than any other groups of tetrapod vertebrates, that's, in part, a reflection of the environmental characteristics of where they live. The genus

Melanophryniscus (Bufonidae) is currently composed of 26 species geographically distributed in the south of South America. *Melanophryniscus cambaraensis* is a vulnerable red-bellied toad, endemic to the subtropical southeastern Araucaria Plateau in the Campos de Cima da Serra's micro region, Rio Grande do Sul, Brazil. It is an explosive breeder, so the reproductive events occur after intense rains and breeding activity last only a few days. In this study we described the reproductive behavior of *M. cambaraensis* from Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA SFP), Rio Grande do Sul, Brazil. We collected data in 2009 at a temporary stream in FLONA SFP during three reproductive events. We observed reproductive behaviors as courtship, amplexus, scramble competition and oviposition and also larval development. During the reproductive event, males used two courtship behaviors: vocalization and mate searching. Spawning behavior in *M. cambaraensis* occurred during, at least, six hours of amplexus in the reproductive site and 36 hours in captivity. During the event, males of *M. cambaraensis* had an aggressive behavior. We observed them using eight tactics to try to displace the amplexed male. Larval development, in captivity, took seven days from egg to tadpole and 34 days from egg to Gosner stage 42.

KEYWORDS: Anura, Bufonidae, *Melanophryniscus cambaraensis*, explosive breeding, amplexus, oviposition, reproductive strategies, larval development.

INTRODUÇÃO

A diversidade reprodutiva dos anfíbios, especialmente dos anuros, é maior do que a observada em outros grupos de vertebrados tetrápodes. Isso é um reflexo, principalmente, das características ambientais de onde eles vivem (Duellman e Trueb, 1986) e do sucesso da sua conquista em diversos microhabitats, por exemplo, os da Mata Atlântica (Haddad e Prado, 2005). Dentro dessa diversidade, o ciclo reprodutivo mais comum entre os anuros é caracterizado por desovas postas em corpos d'água, desenvolvimento exotrófico das larvas em girinos e posterior metamorfose, supridos de energia fornecida pela gema do ovo e pela alimentação na água. Após a metamorfose, transformam-se em sapos ou rãs de hábito terrestre ou semiterrestre (Haddad e Prado, 2005).

O comportamento reprodutivo dos anfíbios pode ser agrupado em dois padrões temporais básicos: a reprodução explosiva ou

prolongada, embora esses representem dois extremos de um contínuo, de espécies que se reproduzem em apenas uma noite em uma poça temporária até aqueles que se reproduzem durante o ano inteiro (Wells, 1977). O padrão de reprodução explosiva enquadra aquelas espécies que se reproduzem em um curto período de tempo (poucos dias), possuem alta densidade de machos durante o evento, a migração de machos e fêmeas ao sítio reprodutivo é sincronizada e existe uma baixa oportunidade de escolha do parceiro. As espécies com reprodução prolongada, em contrapartida, apresentam um período reprodutivo longo, com a chegada assincronizada de machos e fêmeas no sítio e a oportunidade de escolha dos parceiros (Wells, 1977). Segundo Lucas *et al.*, (1996), essa variação parece estar relacionada tanto com fatores abióticos, como a distribuição sazonal da chuva e a formação dos corpos d'água usados na reprodução, como com fatores bióticos como a predação e a competição.

A vocalização é uma característica visível do comportamento dos anuros associada à reprodução e, provavelmente, serve para atrair parceiros (Wells, 2007). Uma revisão feita por Wells (2007) dividiu o cantos dos anuros em seis tipos: 1) O canto de anúncio, emitido por machos durante o evento reprodutivo pode ter tanto a função de atrair fêmeas conspecíficas, como de avisar o posicionamento de um macho para os outros, ajudando-os a manter uma distância para vocalizar no sítio reprodutivo ou, ainda, de saber o tamanho corporal do macho vocalizando e seu potencial para disputar uma fêmea ou um sítio de vocalização. 2) O canto nupcial é emitido por machos para chamar a atenção das fêmeas quando estão por perto, podendo ser emitido em resposta a aproximação de uma fêmea ou, por exemplo, na intenção de tornar seu canto o mais evidente dentro de um coro. 3) O canto de reciprocidade é observado apenas em algumas espécies e é emitido por fêmeas receptivas em resposta ao canto emitido por um macho da mesma espécie. 4) Canto agressivo, emitido por machos durante qualquer forma de interações agonísticas. 5) Canto de soltura, um sinal acústico usado para avisar que foi agarrado um par inapropriado para a reprodução. Este canto pode ser emitido tanto por machos, solteiros ou pareados, quando outro tenta abraçá-los ou por fêmeas quando essas não estão receptivas ou já completaram a oviposição. 6) Canto de angústia, alerta e defesa, um som chamativo produzido por indivíduos de ambos os sexos em resposta a distúrbios e possivelmente para alertar vizinhos de algum perigo ou assustar um predador.

O padrão temporal de reprodução tem implicações sobre a maneira como os machos irão investir seu tempo e sua energia durante o evento (Wells, 1977). A reprodução explosiva, por ocorrer em um curto período de tempo, permite que os machos invistam sua energia em um curto prazo, porém limita a possibilidade de escolha do parceiro. Devido a isso, é comum observar em espécies de reprodução explosiva a competição entre machos como um fator importante na variação do sucesso reprodutivo. A estratégia de macho deslocador (*sensu* Wells, 2007) consiste em um macho solteiro tentar expulsar um macho em amplexo para roubar-lhe a fêmea. Esta tática é comumente observada em espécies de reprodução explosiva, em eventos com alta densidade de machos no sítio reprodutivo (Wells, 2007).

A família Bufonidae inclui 558 espécies válidas, distribuídas em 48 gêneros (Frost, 2011). Estudos mostraram que muitas espécies deste grupo apresentam reprodução explosiva e algumas empregam diferentes estratégias para tentar aumentar o seu sucesso reprodutivo. Essas estratégias envolvem, por exemplo, a procura ativa por fêmeas, onde o macho em vez de vocalizar procura ativamente fêmeas ovígeras no sítio reprodutivo ou, ainda, comportamentos agressivos, como a técnica de macho deslocador (Wells, 2007).

O gênero *Melanophryniscus* Gallardo, 1961, pertence à família Bufonidae e inclui 26 espécies válidas (Caramschi e Cruz, 2011; Frost, 2011). Sua distribuição geográfica é restrita ao sudeste da América do Sul, indo desde o Uruguai, até o sul do Brasil, cruzando o centro e norte da Argentina, o Paraguai e a Bolívia central (Kwet *et al.*, 2005). O gênero além de secretar toxinas como alcalóides e

bufadienolides para sua defesa (Daly *et al.*, 2008) é, popularmente, conhecido como os sapinhos-de-barriga-vermelha, por apresentar coloração aposemática, junto com o comportamento de relexo “unken”, que serve para mostrar a coloração vermelha e laranja do ventre quando são perturbados (Kwet *et al.*, 2005; Langone *et al.*, 2008; Santos e Grant, 2011).

A maioria das espécies do gênero são de reprodução explosiva, associada a fortes chuvas que formam um riacho temporário (Baldo e Basso, 2004; Bustos, Singer e Gutiérrez, 1997; Cairo *et al.*, 2008; Fernández, 1927; Goldberg, *et al.*, 2006; Kwet *et al.*, 2005; Maneyro e Kwet, 2008; Prigioni e Garrido, 1989; Vaira, 2005). As únicas duas espécies do gênero conhecidas que não se reproduzem em riachos temporários, mas sim em ambientes fitotelmatos são *Melanophryniscus alipioi* (Langone *et al.*, 2008) e *M. vilavelhensis* (Steinbach-Padilha, 2008). Durante a reprodução, foi registrado para o gênero, o uso de estratégias como macho deslocador e procura ativa por fêmeas Goldberg, *et al.* (2006).

A espécie *Melanophryniscus cambaraensis* Braun & Braun, 1979, conhecida popularmente como sapinho-verde-de-barriga-vermelha é uma espécie endêmica do Planalto das Araucárias na micro-região dos Campos de Cima da Serra, Rio Grande do Sul, Brasil. A espécie é considerada ameaçada extinção no estado e sua principal ameaça é a destruição do habitat onde vive, uma vez que sua distribuição geográfica é restrita, mesmo considerando que as duas populações conhecidas estão localizadas dentro de áreas de preservação (Garcia e Vinciprova, 2003).

Melanophryniscus cambaraensis apresenta reprodução explosiva, associada a fortes chuvas que formam um riacho temporário, para onde os indivíduos de ambos os sexos migram simultaneamente e se reproduzem em um evento com poucos dias de duração (Santos *et al.*, 2010). Segundo Santos e Grant (2011), a atividade migratória da espécie é, claramente, diurna. Os autores sugerem que as defesas químicas dos bufonídeos podem ter evoluído como resultado de sua atividade diurna, que os colocou em contato com predadores diurnos, orientados pela sua visão.

Alguns aspectos, como a migração desta espécie são, atualmente, conhecidos, entretanto o comportamento reprodutivo dela permanece desconhecido. Apenas um trabalho referente à descrição do girino de *Melanophryniscus cambaraensis* (Bernardo-Silva *et al.*, 2010) é encontrado na literatura.

Considerando que a espécie é ameaçada de extinção, compreender seus aspectos reprodutivos pode ser relevante para, no futuro, planejar e implementar estratégias de conservação. Assim, o objetivo deste trabalho é descrever o comportamento reprodutivo de uma população de *Melanophryniscus cambaraensis* na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Melanophryniscus cambaraensis é uma espécie endêmica do Planalto das Araucárias, micro-região dos Campos de Cima da Serra,

Rio Grande do Sul, Brasil. Atualmente, são conhecidas apenas duas populações dessa espécie encontradas em localidades distanciadas por, aproximadamente, 50 km: Cambará do Sul (localidade-tipo da espécie) e São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil (Garcia e Vinciprova, 2003). O estudo foi realizado com a população conhecida de São Francisco de Paula, restrita à Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA SFP). A Floresta Ombrófila Mista nativa é dominada por uma espécie, a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntz 1898 (Sonego *et al.*, 2007) e cobre cerca de 56% do total de 1606.70 ha da FLONA. O restante é composto por silvicultura de *A. angustifolia*, *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. (Bonatti *et al.*, 2006). O clima do local é classificado como Temperado superúmido (Maluf, 2000), com temperaturas variando de -3 a 18°C nos meses de inverno e de 18.3–27°C nos meses de verão, com média anual de temperatura de 14.5°C. A região possui níveis elevados de pluviosidade, com precipitação média de 200 mm em todos os meses do ano (Buriol *et al.* 2009) e uma média anual de precipitação de mais de 2.200 mm (Backes *et al.* 2005).

O comportamento reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* foi estudado em um riacho temporário, formado por intensas chuvas (29°25'41.3"S 50°23'44.5"W, 866 m de altitude). Esse é o único sítio reprodutivo conhecido em São Francisco de Paula e está localizado sobre um afloramento rochoso à beira de uma pequena estrada não asfaltada. Como a estrada está em um declive, após a chuva, a água corre constantemente pelo sítio reprodutivo, formando um córrego. A vegetação do córrego é formada por gramíneas (Poaceae) e gravatás (*Eryngium* sp.) (Fig. 1). O lado da estrada oposto ao sítio

reprodutivo é formado por vegetação de arbustos e araucárias plantadas e mais adentro por floresta nativa. As temperaturas variaram entre 17.3–27.3°C durante o primeiro campo (dados do Instituto Nacional de Meteorologia, estação meteorológica automática próxima ao município de Canela, 29°22' S, 50°49' W, 830 de altitude) e entre 5,3–22,4°C (das 8:00 às 23:00 h) na segunda saída (dados coletados em campo).



Figura 1. Sítio reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* na FLONA SFP, RS, Brasil.

Coleta de dados

O trabalho de campo foi realizado durante o verão (15 Janeiro - 24 de Fevereiro, 2009) e durante o inverno (8-23 Agosto, 2009). No verão, foi observado apenas um evento reprodutivo, acompanhando um período contínuo de 24 horas. As observações começaram junto com início da atividade reprodutiva no dia 17 e se estenderam durante 24 horas até o dia 18 de fevereiro de 2009. No período de inverno, foram observados dois eventos reprodutivos, um do dia 9-15 e outro de 17-20 de Agosto de 2009.

Como o objetivo do estudo era caracterizar o comportamento reprodutivo da espécie, o foco das observações foram os

comportamentos e as interações que estão diretamente ligadas à reprodução: comportamento agressivo, vocalização, amplexo e desova. Outros aspectos também são relevantes para a reprodução, entretanto não fazem parte do propósito do presente trabalho.

As observações das interações e dos comportamentos foram realizadas pelo método de observação focal dos animais (Lehner, 1987). Experiências prévias indicam que é possível observar os sapos a uma distância próxima sem perturbar eles ou suas interações, por isso, os comportamentos foram observados a uma distância de ≤ 1 m. As observações foram iniciadas quando encontrado um indivíduo realizando um comportamento em particular e registradas até seu fim. Foram caracterizados os movimentos dos indivíduos dentro do sítio reprodutivo, assim como seus comportamentos e as vocalizações emitidas. Também foram registradas as características ambientais bióticas (presença de vegetação) e abióticas (presença de rochas, profundidade da água) do local onde foi realizado o comportamento e do seu uso. Os machos foram identificados pela presença de calo nupcial no primeiro e segundo dedos da mão e pela emissão do canto de anúncio e as fêmeas foram identificadas pelo maior tamanho corporal e pela ausência de calo nupcial (Braun & Braun, 1979).

No evento reprodutivo do verão, além da amostragem focal, foi estimada a variação da atividade de vocalização dos machos no período diurno e noturno. Para isso, foi amostrado, de hora em hora, o número de indivíduos vocalizando em um intervalo de cinco minutos, totalizando um período de 24 horas de amostragem. Os dados foram

analisados pelo PAST (Paleontological Statistics), aplicando-se o teste t de Student para avaliar a relação entre o número de machos cantando durante o período diurno e noturno. O número total de indivíduos que participaram do evento reprodutivo foi estimado a partir da captura e marcação manual dos indivíduos e pelo uso de armadilhas de funis, que permitiam acesso de entrada e saída do sítio. Esses funis foram posicionados junto a uma lona de plástico que cercava completamente o sítio reprodutivo (para mais detalhes ver Santos *et al.*, 2010). Durante os dias 17 e 18 de fevereiro de 2009, as armadilhas foram revisadas três vezes por dia: uma no amanhecer, uma ao meio dia e outra no entardecer. Assim, foi possível estimar o número de machos e fêmeas entrando e saindo do sítio reprodutivo e o total de indivíduos que participou do evento.

Durante os eventos reprodutivos do inverno, foram registradas as desovas e as características físicas do sítio de oviposição, incluindo localização, substrato, vegetação, profundidade da água nas poças (régua de plástico 1mm) e temperatura da água (termômetro digital de precisão 0,1°C). Sem perturbar as desovas, foram medidas suas dimensões *in situ* com o uso de um paquímetro (precisão 0,05mm) e contados o número de ovos.

Observações iniciais mostraram que os animais em amplexo, frequentemente, desapareciam na vegetação ou iam para baixo de pedras para desovar. Então, para poder completar as observações sobre os comportamentos durante o amplexo e a oviposição, foram realizados experimentos em cativeiro com um casal. O mesmo foi levado

para o laboratório na FLONA SFP e posto em um aquário contendo rochas, vegetação e água do sítio reprodutivo. Após as observações, os sapos foram devolvidos ao sítio. De uma desova realizada em cativeiro, foi medido o diâmetro de três ovos e calculada a sua média. As medidas foram feitas imediatamente após a desova e após 1,5 h, 2,5h, e 18 h.

As observações do desenvolvimento embrionário começaram no dia 13 de agosto e foram realizadas em dois aquários no laboratório na FLONA SFP. Em cada recipiente foram colocados ovos de quatro diferentes desovas misturados, totalizando 50 ovos por aquário. Duas vezes por dia era controlada a temperatura dos aquários e feita a contagem do número de ovos e girinos. Enquanto os ovos eclodiam, os girinos foram alimentados com alface cozido. Após a eclosão de todos os ovos, os girinos foram devolvidos para o sítio reprodutivo, com exceção de 14 exemplares que foram levados para o laboratório em Porto Alegre, RS, Brasil. Foi observado o tempo de metamorfose desses indivíduos até o estágio 42 (Gosner, 1960), que caracteriza girinos que já desenvolveram os quatro membros e que estão passando pela fase de metamorfose da cabeça, principalmente da boca. Posteriormente, alguns desses indivíduos foram depositados na coleção do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS. Todas as interações, comportamentos e o tempo de desenvolvimento das larvas foram cronometrados usando um cronômetro e registrados através de vídeos e fotografia com câmeras digitais, Nikon Coolpix L10 5.0 MP, Sony DSC-W210 12.1 MP, Sony DSC-W90 8.1 MP e Sony DSC-P200 7.2 MP

RESULTADOS

Os eventos reprodutivos observados durante o estudo iniciaram após chuvas de, aproximadamente, 60 mm. Foram observados machos e fêmeas chegando, simultaneamente, ao sítio reprodutivo.

ESTRATÉGIAS DE CORTE

Durante os eventos reprodutivos, foram observadas duas estratégias de corte usadas pelos machos de *Melanophryniscus cambaraensis*: vocalização e procura ativa por fêmeas.

No evento, machos de *Melanophryniscus cambaraensis* emitiram três diferentes tipos de canto: 1) o canto de anúncio da espécie 2) um canto curto e contínuo, emitido pelo macho durante o amplexo 3) um sinal acústico junto a uma vibração corporal emitido quando um macho solteiro ou em amplexo era abordado por outro macho. Os machos vocalizaram durante o período contínuo de 24 horas no evento reprodutivo, não havendo diferença entre o número de machos vocalizando no período do dia e da noite ($p < 0,05$). Sete indivíduos participaram do evento durante o dia e oito durante a noite. O número de machos vocalizando simultaneamente variou entre três e oito indivíduos em ambos os períodos (moda = 7 durante o dia, moda = 4 durante a noite e moda = 4 no período total das 24 horas). O macho extra que foi ouvido vocalizando durante o dia reflete a impossibilidade de capturar todos os indivíduos com o método dos funis.

A outra estratégia usada por machos foi a procura ativa por fêmeas no sítio reprodutivo.

Aparentemente eles não distinguiam machos de fêmeas, pois foram observados pulando sobre indivíduos de ambos os sexos. Nos casos em que os machos pularam sobre uma fêmea, a mesma não pareceu reagir, entretanto, quando pularam sobre um macho solteiro, na tentativa de amplexo, ele reagiu emitindo, em 50% dos casos, uma vocalização diferente da do canto de anúncio e movimentando-se de forma agressiva para tentar escapar.

AMPLEXO

Durante os eventos reprodutivos, foram observados quatro casais de *Melanophryniscus cambaraensis* em atividade reprodutiva. O amplexo é do tipo axilar (Fig.2A) e o período mínimo de cópula observado foi de seis horas *in situ* e de 36 horas em cativeiro. Durante o amplexo, o macho emitiu uma vocalização suave, constante e de curta duração.

Observações *in situ*: A formação do amplexo foi observada em dois casais, que foram seguidos até o momento da desova e de sua posterior separação. Esse comportamento

iniciou com o macho pulando sobre o corpo da fêmea, vindo de qualquer posição. Enquanto isso, não houve reação agressiva por parte da mesma. Em um dos casos, o macho pulou no sentido oposto à fêmea, segurando-a pela região das coxas em vez das axilas. Em outro caso, o macho pulou caindo sobre o corpo da fêmea na posição transversal. O macho, então, a segurou firme com algum dos membros e usou outros para contornar o corpo da fêmea, levando 3 minutos até chegar à posição de amplexo axilar. Já na posição de amplexo, a fêmea carregou o macho até o sítio de oviposição, que, na maioria dos casos, foi uma poça d' água com uma rocha central, onde foram, posteriormente, aderidas as posturas.

Uma vez no sítio e dentro da água, o casal permaneceu, por algum tempo, colocando a cabeça para dentro e para fora da água e mais tarde mergulharam e ficaram em baixo da pedra central da poça, onde não havia mais visibilidade para observar seu comportamento. Depois saíram de baixo da pedra e ficaram na água, repetindo essa seqüência de comportamentos mais umas três vezes.



Figura 1. Amplexo axilar de *Melanophryniscus cambaraensis* (A). Casal no momento da desova: macho friccionando os pés na região cloacal da fêmea (B).

Observações em cativeiro: Após 25 horas de cópula, o macho posicionou seus pés juntos à região cloacal da fêmea e movimentou suas pernas, friccionando os pés contra sua cloaca, enquanto isso, a fêmea foi liberando os ovos (Fig.2B). Após a liberação dos ovos, o macho empurrou a desova com seus pés e aderiu a uma pedra que havia dentro do aquário. No total o casal realizou três posturas.

Após 36 horas de amplexo, o macho estimulou a fêmea, movimentando suas pernas na região posterior do corpo e na sua cloaca, mas nenhum outro ovo foi liberado, então, o macho a soltou.

DESOVA

Observações *in situ*: Casais de *Melanophryniscus cambaraensis* usaram como sítios de oviposição pedras e vegetação parcialmente submersas na água. Durante o evento reprodutivo observado na estação de inverno, foram registrados, em quatro dias, dez desovas aderidas em baixo de uma pedra (dimensões 48cm x 25cm x 11cm), 3 desovas sob outra pedra (dimensões 42cm x 16cm x 14cm) e mais algumas na vegetação parcialmente submersa. A Profundidade da água nos sítios de oviposição variou entre



Figura 3. Desova de *Melanophryniscus cambaraensis* do tipo rosário (A) e agrupado em uma massa (B). Casal aderido à sua desova (C). Amplexo com macho empurrando e aderindo os ovos na vegetação parcialmente submersa (D). Macho no sítio reprodutivo, aparentemente, cuidando de uma desova (E).

4-6,8cm e a temperatura da água de 12,1-14,8°C (com registros feitos entre as 8:00 e 10:00 e, novamente, entre 16:00 e 18:00 h). O tamanho das desovas registradas variou de 11 a 64 ovos (n=13), sendo a média de ovos por postura $27 \pm 16,15$ e o total de ovos contados 357.

O modo da desova no momento da oviposição é do tipo rosário (*sensu* Altig e McDiarmid, 2007): um cordão de ovos comprido, uniseriado e de consistência gelatinosa entre cada um dos ovos (Fig.3A). A desova, quando aderida sob a pedra ou vegetação ficava organizada em uma massa de ovos (Fig.3B).

Durante o estudo, quando uma das pedras centrais foi levantada para fazer a contagem das desovas, foi encontrado um casal desovando que ficou grudado pelo cordão gelatinoso de sua postura (Fig. 3C), o que mostrou a sua consistência. Após alguns segundos o casal já havia se desgrudado.

Outro casal foi encontrado na água ao lado de uma porção de vegetação submersa, onde havia uma massa de ovos boiando encostadas nas suas pernas. O casal em amplexo, quando encontrado, estava de barriga para cima e a fêmea com a região cloacal na direção de uma pedra, onde havia outra desova. Após cinco minutos, o casal se desvirou, ficando a desova atrás deles (Fig.3D). O ventre da fêmea sofreu algumas contrações, entretanto nenhum outro ovo foi liberado. Nesse momento, um cordão de ovos ainda permanecia aderido à perna do macho, então, o mesmo empurrou os pés contra a vegetação, ficando os ovos presos esta. O casal separou-se e deixou o sítio de oviposição e o

macho foi embora com um ovo grudado no seu pé.

Um comportamento peculiar foi observado apenas uma vez com um macho que parecia estar cuidando uma desova (Fig.3E). O mesmo foi induzido a sair do local, mas continuou voltando sempre para o mesmo lugar.

Observações em cativeiro: A média do diâmetro dos ovos logo após a postura foi 2,36mm, 3,7mm após 1,5h, 3,7mm após 2,5h e 3,9mm após 18h. A temperatura da água do aquário variou entre 12-20°C (com registros feitos entre as 8:00 e 10:00 e, novamente, entre 16:00 e 18:00 h). O desenvolvimento embrionário de *Melanophryniscus cambaraensis*, em cativeiro, levou sete dias do estágio de ovo até girino e 34 dias até chegar ao estágio 42 (Gosner, 1960).

COMPORTAMENTO AGRESSIVO

O comportamento agressivo apresentado por machos de *Melanophryniscus cambaraensis* foi a estratégia de macho deslocador e também, a de machos solteiros se defendendo quando agarrados por outro macho. Ao total, foram observadas 31 disputas (12 registradas desde seu início), que duraram de 0,5 minutos a 2,66 horas. Vinte e três das 31 lutas envolviam um macho deslocador tentando separar um casal. Foram feitas observações detalhadas em 17 desses combates. O sexo do intruso foi confirmado, quando possível.

Em 75% das lutas observadas desde o início (n=12), os machos intrusos se



Figura 4. Amplexo em baixo e macho deslocador em cima, agarrando a cabeça do macho do casal, fazendo força e puxando (Fig. 4A). Região posterior do corpo da fêmea exposta no centro da imagem, macho deslocador do lado esquerdo, chutando o macho do amplexo (na direita) e empurrando-o para a lateral do corpo da fêmea (Fig. 4B). Casal de *M. cambaraensis* e um macho deslocador em baixo deles, introduzindo seu braço na região abdominal do macho em amplexo, tentando separar o casal e abraçando a fêmea. (Fig. 4C). Amplexo de *M. cambaraensis* à esquerda da fotografia e à direita o agressor (sapo com coloração verde escuro) segurando as pernas da fêmea (Fig. 4D). Macho deslocador abraçando com suas pernas a cabeça do casal, como se fosse uma chave de perna (Fig. 4E). Combate com um amplexo (a fêmea está no meio dos três macho e seu par é o macho mais escuro da foto que está em cima dela) e mais dois machos deslocadores, que, no final, conseguiram separar o amplexo (Fig. 4F).

aproximaram de outro sapo e pularam nas suas costas. Durante os combates envolvendo um amplexo e, um ou mais machos deslocadores (n=17), foram usadas oito estratégias pelo macho intruso: 1) em todos os casos o macho deslocador agarrou com força o corpo do macho em amplexo. 2) Em 30% dos casos o macho deslocador agarrou a cabeça do macho do casal, fazendo força e puxando (Fig. 4A). 3) Em 30% dos combates o macho deslocador, com as pernas apoiadas na vegetação, tentou introduzir sua cabeça entre o corpo do macho e da fêmea em amplexo. 4) Em um caso o macho deslocador chutou o macho do amplexo, empurrando-o para a lateral do corpo da fêmea (Fig. 4B). 5) Em três casos, o macho deslocador tentou separar o casal introduzindo seu braço entre as regiões gular ou abdominal do macho em amplexo e abraçar a fêmea. Em um desses casos, introduziu seu braço entre o casal e foi fazendo força e se empurrando para entrar entre o corpo deles (Fig. 4C). 6) Em dois casos o macho deslocador atacou com a estratégia de entrar em baixo do casal e empurrar até conseguir virar o casal de cabeça para baixo. 7) Em um dos casos o agressor usou como tática segurar as pernas da fêmea, assim quando tentou fugir, carregava não apenas o seu par, mas o intruso também (Fig. 4D). 8) Em apenas uma luta, após uma série de movimentos entre o casal e o macho deslocador, este abraçou com suas pernas a cabeça do casal, como se fosse uma chave de perna e apertou com força (Fig. 4E).

Em todos os casos, o macho deslocador sempre tentou abraçar a fêmea como conseguia, enquanto expulsava o macho original do casal. As táticas foram usadas, em geral, em combinação, entretanto ficou

evidente que a estratégia usada pelo macho deslocador dependia da possibilidade de ataque ao casal e de suas respostas e reações ao longo do combate.

A resposta do macho do amplexo foi chutar o macho deslocador com suas pernas e palmas dos pés e, ao mesmo tempo, segurar-se fortemente no corpo da fêmea. Em 53% dos combates, o macho do amplexo emitiu um canto diferente do canto de anúncio da espécie. A fêmea reagiu aos ataques, chutando o agressor com suas pernas e caminhando ou nadando para tentar fugir. A taxa de deslocamento foi 11,7% (n=17). Isto representa que em apenas duas lutas o macho deslocador teve sucesso em deslocar o macho do amplexo e separar o casal. Um desses casos foi a disputa que teve maior tempo de duração registrada (2,66 horas) e envolveu apenas um macho deslocador. O outro caso foi um combate envolvendo dois machos deslocadores atacando o mesmo casal (Fig. 4F).

Oito brigas envolveram um macho tentando amplexo com outro. Em todos os casos o macho atacado tentou escapar se empurrando contra a vegetação e em 50% dos casos ele emitiu um canto diferente daquele de anúncio da espécie. O macho agressor, ainda na tentativa de amplexo com o outro, insistiu em segurá-lo pela cabeça e pelo tronco e quando o macho atacado finalmente conseguiu se soltar, o agressor voltou a pular sobre seu corpo e tentou agarrá-lo novamente.

DISCUSSÃO

Melanophryniscus cambaraensis apresenta o padrão de reprodução do tipo explosivo, assim como outras espécies do gênero [*M. devincenzii* (Maneyro e Kwet, 2008), *M. dorsalis* (Kwet *et al.*, 2005), *M. krauczuki* (Baldo e Basso, 2004) *M. montevidensis* (Kwet *et al.*, 2005; Prigioni and Garrido, 1989), *M. stelzneri* (Bustos, Singer e Gutiérrez, 1997; Fernández, 1927), *M. rubriventris* (Vaira, 2005; Goldberg, *et al.*, 2006) e *Melanophryniscus* sp. (Cairo *et al.*, 2008)]. A atividade reprodutiva observada em *M. cambaraensis* ocorreu após chuvas de 60 mm, enquanto para *Melanophryniscus* sp. foi registrada após chuvas de 35 mm (Cairo *et al.*, 2008) e de 3 a 30 mm em *M. stelzneri* (Bustos, Singer e Gutiérrez, 1997). Observamos neste trabalho, eventos reprodutivos no verão, no mês de Fevereiro e no inverno, durante o mês de Agosto. Os outros meses do ano tiveram eventos reprodutivos reportados em outros trabalhos (Garcia e Vincipora, 2003; Santos *et al.* 2010; com. pess. P. Colombo), ressaltando que a chuva na FLONA SFP é bem distribuída ao longo de todos os meses do ano, permitindo a formação do riacho temporário. Eventos reprodutivos durante a estação de inverno foram observados, apenas, nas espécies *M. krauczuki* (Baldo e Basso, 2004) e *M. devincenzii* (Maneyro e Kwet, 2008).

Além da vocalização como estratégia de corte, os machos de *Melanophryniscus cambaraensis* também usaram a estratégia de procura ativa por fêmeas no sítio reprodutivo, já descrita dentro do gênero em *M. rubriventris* (Vaira, 2005) e para outras espécies de reprodução explosiva (Wells, 2007). Esta estratégia pode estar relacionada à

elevada concentração de indivíduos no evento (Wells, 1977) e, assim como foi observado em *M. cambaraensis*, é comum observar em outras espécies, machos na tentativa de amplexo não apenas nas fêmeas, mas em machos outros solteiros (Wells, 2007). Aparentemente, os machos não conseguem distinguir visualmente aspectos como tamanho, sexo ou espécie de outros indivíduos, então, existe a tentativa de amplexo em qualquer coisa em movimento (Marco *et al.*, 1998; Marco e Lizana 2002). Assim como descrito por Bustos, Singer e Gutiérrez (1997) para *M. stelzneri* Caramaschi e Cruz, 2002, machos de *M. cambaraensis*, quando agarrados por outro, emitem um canto diferente do canto de anúncio da espécie, pelos autores classificado como canto de soltura acompanhado de vibração corporal. Este comportamento, observado também em outros bufonídeos, serve para indicar o macho que ele está tentando amplexo com um par inapropriado para a reprodução (Peters, 1973; Wells, 2007).

Melanophryniscus cambaraensis apresenta amplexo axilar sem nenhuma evidência de escolha do macho por parte da fêmea, assim como descrito para outras espécies do gênero (Baldo e Basso, 2004; Cairo e Zalba, 2007; Di-Bernardo *et al.*, 2006; Fernández, 1927; Garcia e Strüssmann, 1998; Kolenc, 1987; Kwet *et al.*, 2005; Maneyro e Kwet, 2008; Vaira, 2002;). O comportamento de desova de *M. cambaraensis*, em que o macho movimenta suas pernas contra o corpo da fêmea, fricciona seus pés na sua cloaca e adere os ovos à uma superfície, foi o mesmo observado para outras espécies do gênero [*M. moreirae* (Starrett, 1967), *M. rubriventris* (Goldberg, *et al.*, 2006), *Melanophryniscus* sp. (Cairo *et al.*, 2008) e *M. stelzneri* (Bustos, Singer e Gutiérrez, 1997)].

Bustos, Singer e Gutiérrez (1997) observaram um casal *M. stelzneri* desovar no sítio após um período de 20 a 30 minutos de amplexo, enquanto que na espécie *Melanophryniscus* sp., em seu ambiente natural, a postura foi realizada após 24 horas e durou de 10 a 120 horas em cativeiro (Cairo *et al.*, 2008). A postura de *M. cambaraensis* no sítio reprodutivo foi registrada durante um período de, no mínimo, seis horas de amplexo, aumentando para 36 horas quando em cativeiro.

A desova de *Melanophryniscus cambaraensis* realizada em parcelas mostrou-se semelhante ao descrito para outras espécies do gênero: *M. stelzneri* (Bustos Singer e Gutiérrez, 1997), *Melanophryniscus* sp. (Cairo *et al.*, 2008), inclusive por Braun & Braun (1979) para a população-tipo da espécie. Essa estratégia pode ser interpretada como adaptação contra a predação e como forma de aumentar as trocas gasosas em ambientes pobres em oxigênio (Wells, 2007). As desovas foram aderidas, pelo macho, às pedras ou à vegetação submersa, como descrito anteriormente por Braun & Braun (1979) para a população-tipo da espécie, por Bustos Singer e Gutiérrez (1997) para *M. stelzneri* e por Cairo *et al.*, (2008) para *Melanophryniscus* sp. Presumes-se que esse modelo de postura evitaria o congelamento da desova em dias muito frios (Altig & McDiarmid, 2007), que podem ser observados na FLONA SFP durante a estação de inverno. A respeito da quantidade de ovos colocados por desova, Bustos, Singer e Gutiérrez (1997) contaram de 5 a 35 ovos para posturas de *M. stelzneri* e Goldberg, *et al.* (2006) contaram de 5 a 18 ovos para *M. rubriventris*. As fêmeas de *M. cambaraensis* desovaram de 11 a 64 ovos por postura,

enquanto Braun & Braun (1979) observou mais de 100 ovos por desova para a população-tipo desta espécie.

Algumas espécies do gênero *Melanophryniscus* tiveram seu desenvolvimento embrionário observado em cativeiro. A duração do processo de metamorfose das larvas variou de 48 a 72 horas em *M. stelzneri* (Bustos, Singer e Gutiérrez, 1997), quatro dias em *M. moreirae* (Starrett, 1967) até 20 a 30 dias em *Melanophryniscus* sp. (Cairo *et al.*, 2008), sendo o maior tempo observado o de *Melanophryniscus cambaraensis*, que durou 34 dias até o estágio 42 Gosner (1960). Bustos, Singer e Gutiérrez (1997) reportaram que o tempo de metamorfose das larvas de *M. stelzneri* está associado ao nível de água nas poças, sendo que o desenvolvimento foi mais rápido quando o nível de água caiu e a poça estava secando. Um estudo realizado por Moore (1939) mostrou que existe uma correlação entre o ambiente usado para a reprodução e suas características geográficas como altitude, latitude e a tolerância a variação de temperatura com a taxa de desenvolvimento dos ovos de quatro espécies do gênero *Lithobates*, descrevendo inclusive que cada espécie está adaptada a uma faixa mais estreita dependendo das condições ambientais durante o evento reprodutivo.

As interações agonísticas observadas durante o evento reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* foram reportadas por Goldberg *et al.* (2006) para *M. rubriventris* (Vellard, 1947) e para outros bufonídeos (Davies e Halliday, 1978; Jaslow, 1979; Peters, 1973; Wells, 1979) e observados em *M. simplex* durante uma saída de campo realizada em setembro de 2009 na Florestal

Gateados, Campo Belo do Sul, Santa Catarina, Brasil.

A taxa de deslocamento observada durante os combates em *B. bufo* (38,5%) (Davies e Halliday, 1978) foi mais alta do que em *M. cambaraensis* (11,7%). Segundo Wells (2007), em geral, os machos em amplexo tem vantagem nos combates, então a taxa de deslocamento costuma ser menor que 5% na maioria das espécies. Os dados de um estudo realizado por Wells (1979) com *Rhinella margaritifera* (Laurenti, 1768) também tiveram como resultado uma baixa taxa de deslocamento observada. Ele sugeriu que uma possível razão para a diferença com a espécie *B. bufo* seria a duração do período reprodutivo, uma vez que casais desta espécie podem permanecer em amplexo por dias (Heusser, 1963) e os machos deslocadores levam, aproximadamente, sete horas para deslocar um macho em amplexo 10 mm menor que eles (David e Halliday, 1977), enquanto que o curto período reprodutivo de *R. margaritifera* poderia não ser necessário para o rearranjo de casais de acordo com seus tamanhos Wells, (1979).

Embora a taxa de deslocamento em *M. cambaraensis* não tenha sido tão alta quanto a encontrada em outros grupos, é comum observar, em espécies de reprodução explosiva (Wells, 1977) e em bufonídeos (Wells, 2007), machos alternando diferentes estratégias reprodutivas. Essas estratégias variam, muitas vezes, com a densidade de machos que há no sítio reprodutivo, então, os machos, muitas vezes, abandonam o comportamento de procura ativa ou vocalização e desenvolvem outra estratégia (Wells, 1977).

Ainda são necessários mais estudos para compreender outros aspectos da biologia

e do comportamento reprodutivo de *Melanophryniscus cambaraensis* para poder aumentar o conhecimento sobre a espécie e os fatores ambientais que estão relacionados à sua sobrevivência no local. Estudos que contribuam para o conhecimento sobre outras espécies do gênero também podem ajudar a entender esses fatores, além de possibilitar melhor entendimento do grupo e de suas relações.

AGRADECIMENTOS

O estudo foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis pela licença número 17288-1 e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 305473/2008-5 e 476789/2009-5 ao Taran Grant e a Raque Rocha Santos) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2008/50928-1). Agradecemos à Edenice Brandão Ávila de Souza e ao pessoal da Floresta Nacional de São Francisco de Paula por todo o apoio e ao IBAMA/RAN pela licença para a coleta (No. 16683-1).

Agradeço pela dedicação e todo apoio à minha família, Alejandra, Daniel, Facundo, Elena e Guilherme, aos quais sou grata por poder ter pessoas tão especiais sempre ao meu lado, inclusive nas saídas de campo em baixo da tempestade. Às maravilhosas discussões, sugestões e ensinamentos do Taran, Raquel, Patrick, Camila, Márcio, Gláucia e a todos os colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para minha formação e para o prazer de trabalhar todos os dias. Aos meus amigos e colegas da biologia, Thais, Fernando, Laura, Thayná, Luana, Angela, Rafael, Camila, Michelle, Giuliano e Luis por fazer desses anos os melhores até hoje.

BIBLIOGRAFIA

- Altig, R. and R. W. McDiarmid. 2007. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs*, 21:1–32.
- Backes, A., L. Felipe and M.G. Viola. 2005. Produção de serapilheira em Floresta Ombrófila Mista, em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Botânica Brasileira* 19:155-160.
- Baldo, D. and N. G. Basso. 2004. A new species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae), with comments on the species of the genus reported for Misiones, Northeastern Argentina. *Journal of Herpetology*, 38(3):393-403.
- Bernardo-Silva, J. S., R. R. Santos, C. C. Both. 2010. The tadpole of *Melanophryniscus cambaraensis* Braun & Braun, 1979 (Anura: Bufonidae). *Zootaxa* (Online), 2569:67-68.
- Bonatti, C., M. Marczwski, G. S. Rebelato, C. F. Silveira, F. D. Campello, G. Rodrigues, T. Guerra, and S. M. Hartz. 2006. Trilhas da Floresta Nacional de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil: Mapeamento, Análise e Estudo da Capacidade de Carga Turística. *Revista Brasileira de Biociências*, 4:15-26.
- Braun, P. C. and C. A. S. Braun. 1979. Nova espécie de *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Anura, Bufonidae). *Iheringia. Sér. Zool.*, 54:7-16.
- Buriol, G. A., V. Estefanel, M. S. A. Gracioli, A. C. Chagas and D. C. Fontineli. 2009. Climatic zoning of conditions for the development of the larva of the mosquito that transmits the dengue fever virus in the State of Rio Grande do Sul. *Electronic Journal of Communication, Information & Innovation in Health*, 3:24-36.
- Bustos Singer, R. and M. Gutiérrez. 1997. Reproducción y desarrollo larval del sapo enano *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura: Bufonidae). *Cuadernos de Herpetología*, 11:21-30.
- Cairo, S. L., S. M. Zalba, C. A. Úbeda. 2008. Reproductive behaviour of *Melanophryniscus* sp. from Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *South American Journal of Herpetology*, 3(1):10-14.
- Caramaschi, U. and C. A. G. Gonçalves Cruz. 2011. A new, possibly threatened species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 from the state of Minas Gerais, Southeastern Brazil (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Boletim do Museu Nacional. Zoologia*, 528. ISSN 0080-312X
- Davies, N. B., and T. R. Halliday. 1977. Optimal mate selection in the toad *Bufo bufo*. *Nature*, 269: 56-58.
- Davies, N. B., and T. R. Halliday. 1978. Deep croaks and fighting assessment in toads *Bufo bufo*. *Nature*, 274:683-685.
- Duellman, W. E. and L. Trueb. 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York. 670 pp.
- Fernández, K. 1927. Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos. Segunda Parte. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*, 29:271–320.
- Frost, Darrel R. 2011. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garcia, P. C. A. and G. Vinciprova. 2003. Anfíbios. Pp. 147-164. In: Fontana, C.S., Bencke, G. A. and Reis, R. E. (Eds.). *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Goldberg, F. J. , S. Quinzio and M. Vaira. 2006. Oviposition-site selection by the toad *Melanophryniscus rubriventris* in an unpredictable

- environment in Argentina. *Canadian Journal of Zoology*, 84:699–705.
- Gosner, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183–190.
- Haddad, C. F. B. and C. P. A. Prado. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3):207-217.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Heusser, H. 1963. Die Ovulation des Erdkrötenweibchens in Rahmen der Verhaltensorganisation von *Bufo bufo*. L. *Revue suisse Zool.* 70: 741-757.
- Jaslow, A. P. 1979. Vocalization and aggression in *Atelopus chiriquiensis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Journal of herpetology* 13(2):141-145.
- Kwet, A., R. A. Maneyro, Zillikens and D. Mebs. 2005. Advertisement calls of *Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933) and *M. montevidensis* (Philippi, 1902), two parapatric species from southern Brazil and Uruguay, with comments on morphological variation in the *Melanophryniscus stelzneri* group (Anura: Bufonidae). *Salamandra*, 41(1/2):1-18.
- Langone, J. A., M. V. Segalla, M. Bornschein and R. O. DE SÁ. 2008. A new reproductive mode in the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae) with description of a new species from the state of Paraná, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 3(1): 1-9.
- Lehner, P. N. 1987. Design and execution of animal behavior research: an overview. *Journal of Animal Science*, 65: 1212-1219.
- Lucas, J. R., R. D. Howard, and J. G. Palmer. 1996. Callers and satellites: Chorus behaviour in anurans as a stochastic dynamic game. *Animal Behaviour*, 51:501–18.
- Maluf, J. R. T. 2000. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 8(1): 141-150.
- Maneyro, R. and A. Kwet. 2008. Amphibians in the border region between Uruguay and Brazil: updated species list with comments on taxonomy and natural history (Part I: Bufonidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*, 1: 95-121.
- Marco, A. and M. Lizana. 2002. The absence of species and sex recognition during mate search by male common toads, *Bufo bufo*. *Ethology, Ecology and Evolution*, 14:1–8.
- Marco, A., J. M. Kiesecker, D. P. Chivers, and A. R. Blaustein. 1998. Sex recognition and mate choice by male western toads, *Bufo boreas*. *Animal Behaviour*, 55:1631–1635.
- Moore, J.A. 1939. Temperature tolerance and rates of development in the eggs of Amphibia. *Ecology*, 20:459–78.
- Peters, J. A. 1973. The frog genus *Atelopus* in Ecuador (Anura: Bufonidae). *Smithsonian Contributions in Zoology*, 154:1–49.
- Prigioni, C. M. and R. R. Garrido . 1989. Algunas observaciones sobre la reproducción de *Melanophryniscus stelzneri montevidensis* (Anura, Bufonidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* (2a época) 5:13–14.
- Santos, R. R. and T. Grant. 2011. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evolutionary Ecology*, 25: 249-258.
- Santos, R. R., S. B. Leonardi, V. Z. Caorsi and T. Grant. 2010. Directional Orientation of Migration in an Aseasonal Explosive Breeding Toad from Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 26:415–421.
- Sonego, R. C., A. Backes, and A. F. Souza. 2007. Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-

paramétricos de riqueza e rarefãõ de amostras. *Acta Botânica Brasileira*, 21:943-955.

Starret, P. 1967. Observations on the life history of frogs of the family Atelopodidae. *Herpetologica*, 23(3):195-204.

Steinbach-Padilha, G. C. 2008. A new species of *Melanophryniscus* (Anura, Bufonidae) from the Campos Gerais region of southern Brazil. *Phyllomedusa*, 7: 99-108.

Vaira, M. 2005. Annual variation of breeding patterns of the toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Vellard, 1947). *Amphibia-Reptilia*, 26:193–199.

Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour*, 25:666–93.

Wells, K. D. 1979. Reproductive behavior and male mating success in a neotropical toad, *Bufo typhoni*. *Biotropica*, 11:301-307

Wells, K. D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago. 1400 pp.