

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

VARIAÇÃO CROMÁTICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR EM *Brachycephalus* DA
SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.
Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis

Campinas
Fevereiro de 2005

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

VARIAÇÃO CROMÁTICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR EM *Brachycephalus* DA
SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.
Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, Universidade Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis

Campinas
Fevereiro de 2005

A Newton Freire-Maia e Ernst Mayr

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer a todos aqueles que de modo direto ou indireto contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dailey Fischer, por todo companheirismo, incentivo, amparo e contribuição dispensados durante todo o desenvolvimento desse trabalho sem o qual não teria sido concluído.

Ao Prof. Sergio Furtado dos Reis, pela orientação no decorrer do planejamento, execução e redação deste trabalho.

Aos Profs. Anderson Ferreira da Cunha, Vinicius Bonato e Wesley Augusto Conde Godoy pelas sugestões durante a pré-banca.

Aos meus pais, Lourdes Ribeiro e Dilson Ribeiro pelo incentivo.

À Serlei Ranzi pelo incentivo.

A Marcelo Brotto, pela ajuda preciosa no trabalho de campo e por me acompanhar nos pontos mais remotos da Serra.

À Dailey Fischer, André Ribeiro, Eloísa Wistuba, Rodrigo Torres, Márcio Pie, Eduardo Ranzi, Caetano Ranzi, Leosergio Ranzi, Lélis Ribeiro, Anderson Camarão, Alan Dalai, Jefferson Azevedo pela ajuda no trabalho de campo.

À Ana Claudia Reis Alves pela ajuda no laboratório.

Ao Ricardo Wodzynski do Laboratório de Sistema de Informações Geográficas da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental pela imagem de satélite da região da Serra do Mar e pela ajuda.

Ao Eivor Martins-Júnior pelo incentivo e pelas cópias dos artigos enviados da Universidade de São Paulo.

Ao Rodrigo Torres pelo empréstimo das cartas topográficas da Serra do Mar, dos equipamentos fotográficos e pelo uso de dezenas de vezes do *scanner* para a digitalização de imagens.

A Capes, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.



“As montanhas têm segredos, são outros planetas”.

Guto Goffi e Ezequiel Neves, Barão Vermelho,
Supermercados da Vida (1992)

“A natureza é recatada: não expõe os seus segredos nos dados que dela colhemos; diz uma coisa mas quer significar outra. Podemos lentamente ir desvendando sua nudez, arrancando-lhe, pouco a pouco, os densos véus que a recobrem. Mas, quanto mais véus retiramos, mais véus encontramos à nossa espera. A nossa arte não consiste em colocar o manto diáfano da fantasia sobre a nudez forte da verdade”.

Eça de Queiroz (1845 – 1900)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS GERAIS	4
3. SERRA DO MAR: ASPECTOS GEOGRÁFICOS, GEOLÓGICOS, FLORÍSTICOS E CLIMÁTICOS	6
4. CAPÍTULO 1. VARIAÇÃO CROMÁTICA EM <i>Brachycephalus</i> DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)	11
4.1. INTRODUÇÃO	11
4.1.1. Diversidade de Anfíbios	11
4.1.2. Diversidade da Família Brachycephalidae	12
4.1.3. Objetivos	15
4.1.4. Justificativa	16
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.2.1. Locais e Procedimentos de Coleta	16
4.2.2. Caracterização da Coloração	16
4.3. RESULTADOS	17
4.4. DISCUSSÃO	18
4.4.1. Variação inter-populacional	18
4.4.2. Variação intra-populacional	19

5. CAPÍTULO 2. VARIAÇÃO MORFOLÓGICA EM <i>Brachycephalus</i> DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)	30
5.1. INTRODUÇÃO	30
6. CAPÍTULO 3. VARIAÇÃO MOLECULAR EM <i>Brachycephalus</i> DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)	59
6.1. INTRODUÇÃO	59
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	59
6.2.1. Extração de DNA Genômico	59
6.2.2. Amplificação do Gene Mitocondrial Citocromo <i>b</i>	60
6.2.3. Seqüenciamento do Gene Mitocondrial Citocromo <i>b</i>	61
6.2.4. Seleção de modelos de substituição de nucleotídeos	62
6.2.5. Interferência Filogenética	63
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.3.1. Composição de Bases, Variação nas Sequências e Sinal Filogenético	64
6.3.2. Seleção de Modelos de Substituição de Nucleotídeos	65
6.3.3. Relações Filogenéticas	67
7. DISCUSSÃO GERAL	74
8. CONCLUSÕES	78
9. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução geral

Figura 1. *Brachycephalus ephippium* da localidade de Atibaia, São Paulo. (Foto Ricardo J. Sawaya.); **pág. 03.**

2. Objetivos gerais

Figura 2. Serra do Mar do Estado do Paraná e localidades de coleta: Pico Caratuva (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP). Imagem de satélite cedida pelo Laboratório de Sistema de Informações Geográficas da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS); **pág. 05.**

3. Serra do Mar: Aspectos geográficos, geológicos, florísticos e climáticos

Figura 3. Perfil dos tipos vegetacionais da Serra do Mar no Estado do Paraná (SEMA, 2002); **pág. 09.**

Figura 4. Representação tridimensional da Serra do Mar no Estado do Paraná. A linha branca separa a Serra do Mar do Primeiro Planalto (SEMA, 2002); **pág. 10.**

4. Capítulo 1. Variação cromática em *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná (Amphibia: Brachycephalidae)

Figura 1. Família Brachycephalidae e sua distribuição geográfica. (a) *Brachycephalus ephippium*; (b) *Brachycephalus hermogenesi*; (c) A região laranja no mapa mostra a distribuição geográfica da família Brachycephalidae (Foto figura a: Heyer et al., 1990; foto figura b: Giaretta & Sawaya, 1998); **pág. 22.**

Figura 2. Serra do Mar do Estado do Paraná e localidades de coleta: Pico Caratuva (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP). Imagem de satélite cedida pelo Laboratório de Sistema de Informações Geográficas da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS); **pág. 23.**

Figura 3. Variação da coloração ventral do *Brachycephalus* do Pico Caratuva. A cor escura corresponde à cor marrom e a cor branca corresponde à cor laranja (Desenhos: J. Somera); **pág. 24.**

Figura 4. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico Caratuva. (a), (b) e (d) Indivíduos adultos sobre o folheto; (c) indivíduo jovem ao lado de um adulto; (e) indivíduo adulto - cada traço da régua graduada corresponde a 1 mm; (f) coloração ventral de um indivíduo adulto (Fotos: L. F. Ribeiro); **pág. 25.**

Figura 5. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico Marumbi. Indivíduos adultos sobre o folheto (Fotos: L. F. Ribeiro); **pág. 26**.

Figura 6. Variação da coloração de *Brachycephalus pernix* do Pico Anhangava. (a), (b), (d), (e) e (f) Indivíduos adultos sobre o folheto; (c) indivíduos adultos ao lado de uma lapiseira; (g) indivíduo jovem sobre o folheto (Fotos: L. F. Ribeiro); **pág. 27**.

Figura 7. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico da Igreja. Indivíduos adultos sobre o folheto (Fotos: L.F. Ribeiro); **pág. 28**.

Figura 8. Variação da coloração do *Brachycephalus* da Torre da Prata. Indivíduos adultos sobre o folheto (Fotos: L. F. Ribeiro); **pág. 29**.

5. Capítulo 2. Variação morfológica em *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná (Amphibia: Brachycephalidae)

Figura 1. *Brachycephalus* sp. 1, CFBH 7388 (holotype), adult male from Pico Torre da Prata, between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil. (a) Dorsal view, (b) ventral view. SVL = 10.5 mm; **pág. 45**.

Figura 2. *Brachycephalus* sp. 1, CFBH 7388 (holotype). (a) Dorsal view of body, (b) lateral view of head, (c) left hand, and (d) left foot; **pág. 46**.

Figura 3. Live specimen of *Brachycephalus* sp. 1 from Pico Torre da Prata, between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil; **pág. 47**.

Figura 4. *Brachycephalus* sp. 2, CFBH 7879 (holotype). (a) Dorsal view of body, (b) lateral view of head, (c) left hand, and (d) left foot; **pág. 48**.

Figura 5. Live specimen of *Brachycephalus* sp. 2 from Pico Caratuba (25° 14' S; 48° 50' W), municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil; **pág. 49**.

Figura 6. Colour variation of *Brachycephalus* sp. 2 in ventral view; **pág. 50**.

Figura 7. *Brachycephalus* sp. 1 (CFBH 7374, 7378). (a) Dorsal, (b) ventral and (c) lateral views of skull, (d) ventral view of mandible and hyoid apparatus; **pág. 51**.

Figura 8. *Brachycephalus* sp. 1 (CFBH 7374, 7378). (a) Dorsal view of vertebral column and pelvic girdle, (b) ventral view of pectoral girdle with scapula and suprascapula deflected, (c) dorsal view of right hand, (d) dorsal view of right foot; **pág. 52**.

Figura 9. *Brachycephalus* sp. 2 (CFBH 7903-05). (a) Dorsal, (b) ventral and (c) lateral views of skull, (d) ventral view of mandible and hyoid apparatus; **pág. 53**.

Figura 10. *Brachycephalus* sp. 2 (CFBH 7903-05). (a) Dorsal view of vertebral column and pelvic girdle, (b) ventral view of pectoral girdle with scapula and suprascapula deflected, (c) dorsal view of right hand, (d) dorsal view of right foot; **pág. 54.**

6. Capítulo 3. Variação molecular em *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná (Amphibia: Brachycephalidae)

Figura 1. Localidades na Serra do Mar no Estado do Paraná de *Brachycephalus pernix* e populações do Pico Caratuva, Pico Marumbi, Pico da Igreja e Torre da Prata; **pág. 69.**

Figura 2. Relações filogenéticas entre as populações de *Brachycephalus* do Estado do Paraná inferidas pelo método de verossimilhança máxima. O grupo-externo utilizado foi *Brachycephalus ephippium*; **pág. 70.**

LISTA DE TABELAS

4. Capítulo 1. Variação cromática em *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná (Amphibia: Brachycephalidae)

Tabela 1. Distâncias aproximadas em linha reta entre as cinco localidades estudadas de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Paraná. Pico Caratuva (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP); **pág. 21.**

6. Capítulo 3. Variação molecular em *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná (Amphibia: Brachycephalidae)

Tabela 1. Escore de verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo I; **pág. 71.**

Tabela 2. Escore de verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo II; **pág. 72.**

Tabela 3. Escore de verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo III; **pág. 73.**

RESUMO

O gênero *Brachycephalus* compreende atualmente seis espécies, viz., *B. ephippium* (SPIX, 1824), *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, 1920, *B. pernix* POMBAL-JR, WISTUBA & BORNSCHEN, 1998, *B. vertebralis* POMBAL-JR, 2001, *B. didactyla* (IZECKSOHN, 1971) e *B. hermogenesi* (GIARETTA & SAWAYA, 1998), que são endêmicas da Mata Atlântica. *Brachycephalus didactyla* e *B. hermogenesi*, originalmente descritas no gênero *Psyllophryne*, ocorrem desde o nível do mar até cerca de 700 m de altitude, ao passo que *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix* e *B. vertebralis*, ocorrem na faixa de altitude de 700 a 1600 m (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA & SAWAYA, 1998; POMBAL-JR, 2001). Estas quatro espécies (*B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix* e *B. vertebralis*) têm distribuição disjunta nas Serras do Mar e da Mantiqueira nos Estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná e este padrão de distribuição sugere a existência de populações diferenciadas ainda não caracterizadas e descritas formalmente. Em particular, para o Estado do Paraná, somente uma espécie, *B. pernix*, foi descrita até o momento. O presente estudo envolveu a amostragem de populações de *Brachycephalus* na Serra do Mar do Estado do Paraná das localidades de Pico Caratuva na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja, além de *B. pernix* do Pico Anhangava, que foram caracterizadas na coloração, morfologia e seqüências do gene mitocondrial citocromo *b*. As populações de *Brachycephalus* do Pico Caratuva, Pico Marumbi, Torre da Prata e Pico da Igreja, apresentam padrões de coloração exclusivos e podem ser unicamente diagnosticadas com base na cor e também diferem no padrão de coloração de *B. pernix*. Estas populações diferem também entre si e de *B. pernix* na sua morfologia externa e óssea. Com base nos padrões únicos de coloração e atributos morfológicos, as populações do Pico Caratuva, Pico Marumbi, Torre da Prata e Pico da Igreja são reconhecidas neste estudo como novas espécies, sendo que as populações do Pico Caratuva e Torre da Prata foram formalmente descritas neste estudo. A filogenia inferida com base nas seqüências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b* mostrou que os *taxa* do Estado do Paraná formam um grupo monofilético com relação ao grupo externo, representado por *B. ephippium*. Os dois *taxa* representados pelas populações das localidades de Torre da Prata e Pico da Igreja formam uma linhagem cujo grupo-irmão é composto por *B. pernix* e os *taxa* das localidades de Pico Marumbi e Pico Caratuva. Nesta última linhagem, *B. pernix* e o *taxon* do Pico Marumbi compartilham um ancestral comum mais recente.

Palavras chave: Anura, Brachycephalidae, espécie nova, citocromo *b*.

ABSTRACT

The genus *Brachycephalus* currently includes six species, viz., *B. ephippium* (SPIX, 1824), *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, 1920, *B. pernix* POMBAL-JR, WISTUBA & BORNSCHEN, 1998, *B. vertebralis* POMBAL-JR, 2001, *B. didactyla* (IZECKSOHN, 1971) and *B. hermogenesi* (GIARETTA & SAWAYA, 1998), which are endemic to the Atlantic Forest of eastern Brazil. *Brachycephalus didactyla* e *B. hermogenesi*, originally described in the genus *Psyllophryne*, occur from sea level to near 700 m of altitude, whereas *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, and *B. vertebralis*, occur from 700 to 1600 m of altitude (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA & SAWAYA, 1998; POMBAL-JR, 2001). *Brachycephalus ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, and *B. vertebralis* have disjunct distributions in the Serra do Mar and Serra da Mantiqueira in the states of Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, and Paraná and this pattern of distribution suggests the existence of differentiated populations still not characterized and formally described. In particular, for the state of Paraná, only one species, *B. pernix*, has been described so far. The present study involved the sampling of populations of *Brachycephalus* in the Serra do Mar in the state of Paraná from the localities of Pico Caratuva in the Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi in the Serra do Marumbi, Torre da Prata in the Serra da Prata, and Pico da Igreja in the Serra da Igreja, in addition to *B. pernix* from Pico Anhangava. All samples were characterized from the perspectives of variation in color, morphology, and sequences derived from the mitochondrial cytochrome *b* gene. Populations of *Brachycephalus* from Pico Caratuva, Pico Marumbi, Torre da Prata e Pico da Igreja, display unique color patterns and can be uniquely diagnosed on the basis of color and they also differ in color pattern from *B. pernix*. These populations also differ among themselves and from *B. pernix* in their morphology. Based on unique color patterns and morphological traits, the populations from Pico Caratuva, Pico Marumbi, Torre da Prata, and Pico da Igreja are recognized here as new species, and the populations from Pico Caratuva and Torre da Prata are formally described. The phylogeny inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene indicates that all taxa in the state of Paraná comprise a monophyletic group, having *B. ephippium* as an outgroup. The two taxa from the localities of Torre da Prata and Pico da Igreja are joined in a lineage whose sister-group is composed of *B. pernix* and the taxa from Pico Marumbi and Pico Caratuva. In this latter lineage, *B. pernix* and the taxon from Pico Marumbi share a most recent common ancestor.

Keywords: Anura, Brachycephalidae, new specie, cytochrome *b*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Brachycephalidae GÜNTHER é endêmica da Mata Atlântica no sudeste e sul do Brasil e inclui espécies de anuros que apresentam, em geral, colorido marcante (Figura 1). As espécies desta família podem ser diagnosticadas por atributos incluindo o pequeno tamanho dos indivíduos cujo comprimento rostro-cloacal varia de 8,0 a 18,0 mm, a redução dos dígitos e do número de artelhos, a ossificação completa da cintura peitoral, a presença de ossos epicoracóides justapostos e um saco vocal que se estende até o abdômen (POMBAL JR. *et al.*, 1998; GIARETTA; SAWAYA, 1998; FROST, 2004).

Os Brachycephalidae tradicionalmente eram compostos por dois gêneros, *Brachycephalus* FITZINGER e *Psyllophryne* IZECKSOHN, diagnosticados morfológicamente pela ausência em *Brachycephalus* do omosterno, um elemento associado com os ossos procoracóide e clavícula da cintura peitoral (TRUEB, 1993) e pela presença deste elemento em *Psyllophryne* (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA; SAWAYA, 1998; POMBAL JR. *et al.*, 1998). Originalmente, foram descritas quatro espécies para o gênero *Brachycephalus*, *B. ephippium* (SPIX, 1824), *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, 1920, *B. pernix* POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEN, 1998 e *B. vertebralis* POMBAL JR., 2001 e duas espécies para o gênero *Psyllophryne*, *P. didactyla* IZECKSOHN, 1971 e *P. hermogenesi* GIARETTA; SAWAYA, 1998.

A validade da diagnose do gênero *Psyllophryne*, com base na presença do omosterno, parecia ser corroborada pelo fato desta estrutura ter sido relatada como ausente em *Brachycephalus* por TRUEB (1993). Todavia, recentemente, KAPLAN (2002) demonstrou a presença do omosterno em um dos taxa do gênero *Brachycephalus*, *B. ephippium*, invalidando assim a diagnose do gênero *Psyllophryne*. KAPLAN (2002) sugeriu então a inclusão das espécies de *Psyllophryne* no gênero *Brachycephalus* e este gênero é agora composto por seis espécies, *viz.*, *B. ephippium* (SPIX, 1824), *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, 1920, *B. pernix* POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEN, 1998, *B. vertebralis* POMBAL JR., 2001, *B. didactyla* (IZECKSOHN, 1971) e *B. hermogenesi* (GIARETTA; SAWAYA, 1998).

Os Brachycephalidae são endêmicos da Floresta Atlântica do sudeste e sul do Brasil, ocorrendo do Espírito Santo até o Paraná (FROST, 2004). Os limites de distribuição altitudinal, todavia, variam nas diferentes espécies. *Brachycephalus didactyla* e *B. hermogenesi*, inicialmente

descritos para o gênero *Psyllophryne*, ocorrem desde o nível do mar até cerca de 700 m de altitude ao passo que as outras espécies, originalmente descritas para o gênero *Brachycephalus*, ocorrem na faixa de altitude de 700 a 1600 m (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA; SAWAYA, 1998; MIRANDA-RIBEIRO, 1920; POMBAL JR., 2001; POMBAL JR. *et al.*, 1998). Os *taxa* de *Brachycephalus* ocorrem em habitats caracterizados por florestas ombrófilas densas alto-montanas e têm distribuição disjunta nas Serras do Mar e da Mantiqueira. A distribuição geográfica disjunta dos *taxa* de *Brachycephalus* associada a filopatria e fidelidade aos sítios de acasalamento, características da biologia populacional de anfíbios (PETRANKA *et al.*, 2004), sugere que populações ainda não amostradas nestas cadeias montanhosas possam ter divergido de ancestrais comuns e se diferenciado nos níveis fenotípico e molecular.



Figura 1. *Brachycephalus ephippium* da localidade de Atibaia, São Paulo (Foto Ricardo J. Sawaya.).

2. OBJETIVOS GERAIS

Todas as espécies de *Brachycephalus* descritas até o momento ocorrem nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, exceto por *B. pernix*, que foi recentemente descrita do Estado do Paraná (POMBAL JR. *et al.*, 1998). Considerando os padrões de distribuição de altitude observados para os *taxa* originalmente descritos para o gênero *Brachycephalus* e, dado que a topografia da Serra do Mar no leste do Estado do Paraná é caracterizada pela existência de diversos serras com picos isolados, foi levantada a possibilidade da existência de populações de *Brachycephalus* não descritas e caracterizadas nesta região. O trabalho de campo realizado na Serra do Mar na região leste do Estado do Paraná revelou a existência de populações de *Brachycephalus* ainda desconhecidas para a ciência em quatro localidades (Figura 2), *viz.*, Pico Caratua na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja. Assim, os objetivos gerais desta tese foram os seguintes: 1) Descrever e caracterizar a coloração das populações que ocorrem nestas quatro localidades, 2) descrever e caracterizar no nível de espécie a variação morfológica em duas das populações amostradas, em particular, as populações de Torre da Prata e do Pico Caratua e 3) descrever e caracterizar seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* e inferir relações filogenéticas entre as populações de *Brachycephalus* na Serra do Mar do Estado do Paraná e da espécie já descrita da mesma região, *B. pernix*.

Este manuscrito inclui, além da Introdução geral e dos Objetivos gerais, três capítulos nos quais são descritas a variação na coloração da pele (Capítulo 1), a variação morfológica incluindo a descrição formal no nível de espécie de duas das populações analisadas (Capítulo 2), uma hipótese de relações filogenéticas deduzida de um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b* (Capítulo 3), uma Discussão geral e as Conclusões.

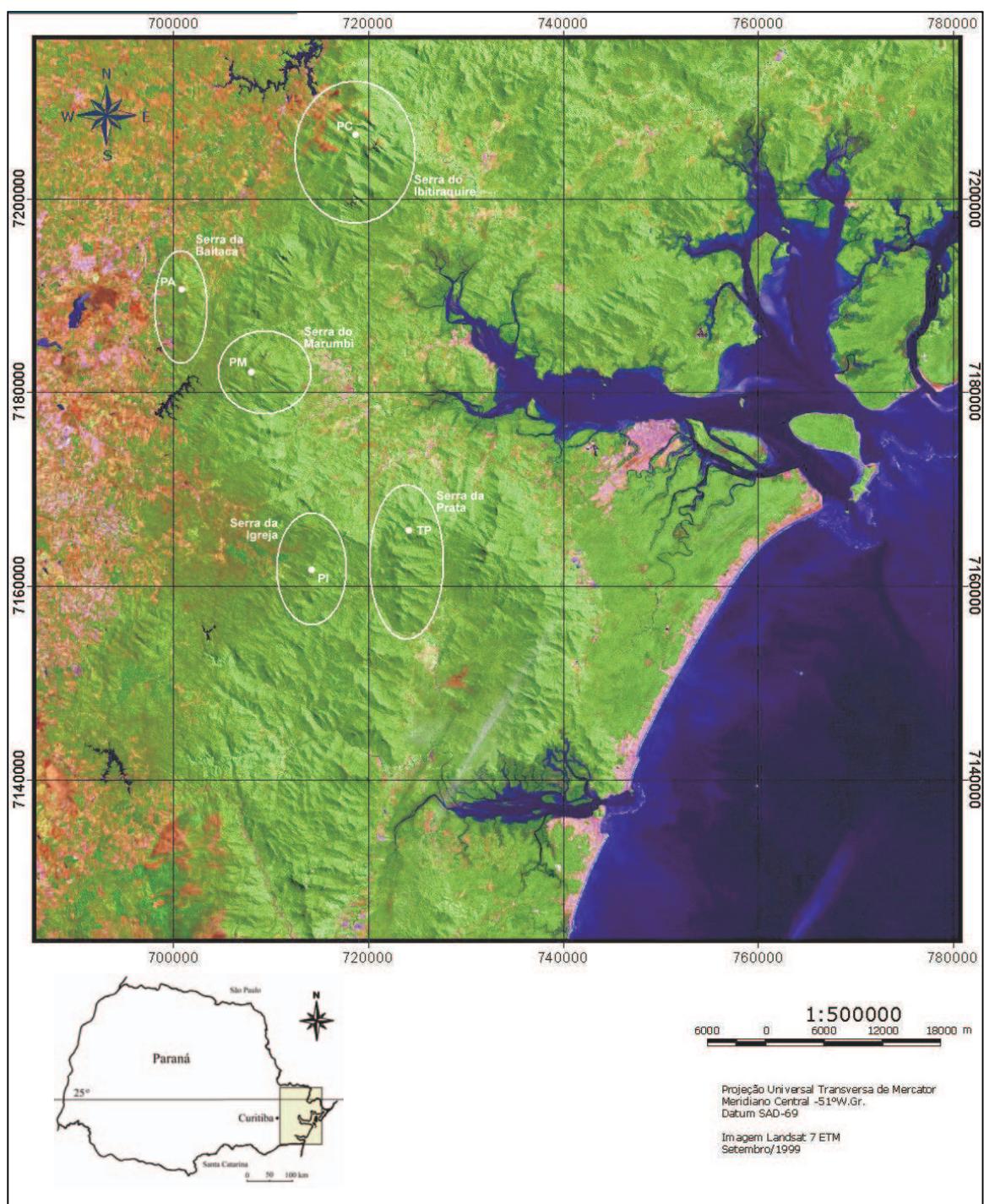


Figura 2. Serra do Mar do Estado do Paraná e localidades de coleta: Pico Caratuvá (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP). Imagem de satélite cedida pelo Laboratório de Sistema de Informações Geográficas da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS).

3. SERRA DO MAR: ASPECTOS GEOGRÁFICOS, GEOLÓGICOS, FLORÍSTICOS E CLIMÁTICOS

A Serra do Mar compreende um conjunto de montanhas localizadas paralelamente à linha litorânea, com cerca de 1000 Km de extensão, desenvolvendo-se do sul do Espírito Santo até o norte de Santa Catarina. No Estado do Paraná, a Serra do Mar constitui uma linha limítrofe entre a planície litorânea e o Planalto de Curitiba (primeiro planalto), distante do oceano Atlântico desde alguns quilômetros até cerca de 50 Km, sem nunca formar escarpas diretamente sobre o mar (Figura 4). A Serra paranaense é um conjunto de montanhas em blocos (serras descontínuas), cuja altitude varia de 1000 a quase 2000 metros (MAACK, 1981; Figura 3). Sua conformação geral é de um arco com a concavidade voltada para a direção leste sub-paralelo à linha da costa, posicionando-se na direção ENE-WSW na porção norte, na direção NE-SW na porção sul e na direção NNW-SSE na porção mais meridional. Os maciços descontínuos da Serra recebem nomes regionais, como a Serra Ibitiraquire na porção norte, posicionada no sentido perpendicular em relação à escarpa principal, onde se encontram os pontos culminantes da região Sul do Brasil, entre eles o Pico Caratuva (Figura 2).

Mais ao sul encontram-se a Serra da Graciosa, a Serra da Farinha Seca e, em direção ao sudoeste, a Serra da Baitaca (Figura 2). Esta última, posicionada paralelamente à escarpa principal, possui montanhas com altitudes entre 1000 e 1472 metros, onde se localiza o Pico Anhangava (Figura 2). A Serra da Baitaca é formada por picos de baixa altitude, sendo o Pico Anhangava o mais elevado deles, estando completamente isolado dos demais maciços da Serra. Pouco mais ao sul encontra-se o Pico Marumbi, localizado no Maciço do Marumbi (Figura 2). Trata-se de um complexo de montanhas bastante escarpadas com altitudes acima dos 1500 metros e muito próximas umas das outras, mas também completamente isoladas de outras serras. Este maciço desenvolve-se a partir da Serra do Melaço, a oeste, que progressivamente aumenta de altitude na direção leste, posicionando-se na direção oblíqua em relação à escarpa principal. Ao sul do conjunto do Marumbi a escarpa ramifica-se na direção leste, originando as Serras da Igreja, da Prata e das Canavieiras, posicionadas paralelas à escarpa principal (Figura 2). Tratam-se de longas cadeias de montanhas isoladas umas das outras, desenvolvendo-se na direção N-S.

Nas serras de mesmo nome, encontram-se o Pico da Igreja e a Torre da Prata (Figura 2; BIGARELLA, 1978).

A tectônica que gerou a porção oriental do Paraná é responsável pela fisionomia do revelo em blocos de montanhas escarpadas, moldadas por processos erosivos policíclicos. No entanto, os aspectos que norteiam a origem e a evolução da Serra do Mar, ainda são pouco conhecidos. O soerguimento da cadeia de montanhas relaciona-se provavelmente a movimentos verticais ocorridos no Cenozóico. Após uma grande transgressão marinha, seguida de erosão subaérea e submarina, ocorrida na Bacia de Santos entre 86 e 89 milhões de anos (Paleoceno), seguiu-se um importante evento tectônico que resultou no soerguimento da área oeste da bacia até o interior do continente. Este processo prosseguiu durante toda a metade do Cenozóico e ocorreu de maneira progressiva e episódica na plataforma continental vizinha à Bacia de Santos. O soerguimento foi o resultado de um efeito de compensação isostática entre a bacia em afundamento e a área continental em elevação e erosão, funcionando, portanto, como um processo compensatório de alívio de carga. Associado a este processo, também ocorreram manifestações magmáticas que resultaram em intrusões basálticas. No entanto, deve-se considerar que a Serra do Mar originalmente não ocupava a posição atual (posicionava-se mais a leste), sofrendo um recuo erosivo nos 30 a 40 milhões de anos que se seguiram ao evento tectônico que originou o soerguimento da Serra (ALMEIDA; CARNEIRO, 1998).

Devido às características físicas da Serra, principalmente as declividades acentuadas, os recursos naturais são ainda pouco explorados. Por conseguinte, a cobertura vegetal encontra-se em alto grau de preservação, contendo porções de formação primitiva e estágios avançados de sucessão ecológica secundária. A fisionomia ecológica da vegetação da Serra do Mar, que compreende uma região de floresta ombrófila densa, está dividida em três formações vegetais: floresta sub-montana, floresta montana e floresta alto-montana. A floresta sub-montana ocupa uma faixa altimétrica de 30/50 a 400/500 metros com dossel bastante elevado, de 20 a 35 metros de altura, com sub-bosque rico em palmáceas, epífitas e pteridófitas e possui solo do tipo latossolo vermelho-amarelo e cambissolos álicos colúviais. A floresta montana compreendida entre 400/500 a 1.000/1.200 metros de altitude localiza-se em uma região da Serra com maior declividade que a anterior. Com solo do tipo cambissolos álicos, possui os mais elevados índices pluviométricos. A floresta é bastante desenvolvida e com sub-bosque também rico em epífitas,

pteridófitas e palmáceas, sobretudo do gênero *Euterpe*. A floresta alto-montana, localizada acima dos 1.000/1.200 metros de altitude, possui formação arbórea de porte reduzido em alta densidade, tendo não mais que cinco metros de altura, sobre solo do tipo litólico. As massas úmidas de ar são freqüentes e as espécies florestais estão associadas principalmente a mirtáceas e melastomatáceas, formando um único estrato arbóreo. À medida que a altitude se eleva, o porte das árvores decresce e acima de 1.400 metros de altitude encontra-se uma formação herbáceo-graminóide e afloramentos de rocha denominados de refúgios vegetacionais (IPARDES, 1989; IBGE, 1992; SEMA, 2002).

O clima regional da Serra do Mar é do tipo Cfb, segundo a classificação de Köppen, caracterizado por uma estação quente e chuvosa no verão e fria, com distintos períodos secos, no inverno. A média pluviométrica anual é bastante elevada, em torno de 1.500 mm e alta umidade relativa do ar.

Neste estudo foram amostradas as populações de *Brachycephalus* dos seguintes locais de coleta, entre 25° – 26° S e 48° 30' – 49° W (Figura 2): (1) Pico Caratuva na Serra Ibitiraquire (25° 14' S, 48° 50' W), em altitudes variando entre 1.400 e 1520 metros; (2) Pico Anhangava na Serra da Baitaca (25° 22' S, 48° 58' W), próximo ao cume a 1.420 metros de altitude; (3) na encosta do Pico Marumbi na Serra do Marumbi (25° 26' S, 48° 55' W), em altitudes variando entre 850 e 1200 metros; (4) Torre da Prata na Serra da Prata (25° 37' S, 48° 46' W), a 1300 metros de altitude; (5) Pico da Igreja na Serra da Igreja (25° 39' S, 48° 51' W), a 1300 metros de altitude. A população do Pico Anhangava na Serra da Baitaca é conhecida formalmente como *B. pernix* (POMBAL JR. *et al.*, 1998), ao passo que as populações das quatro outras localidades são ainda desconhecidas para a ciência.

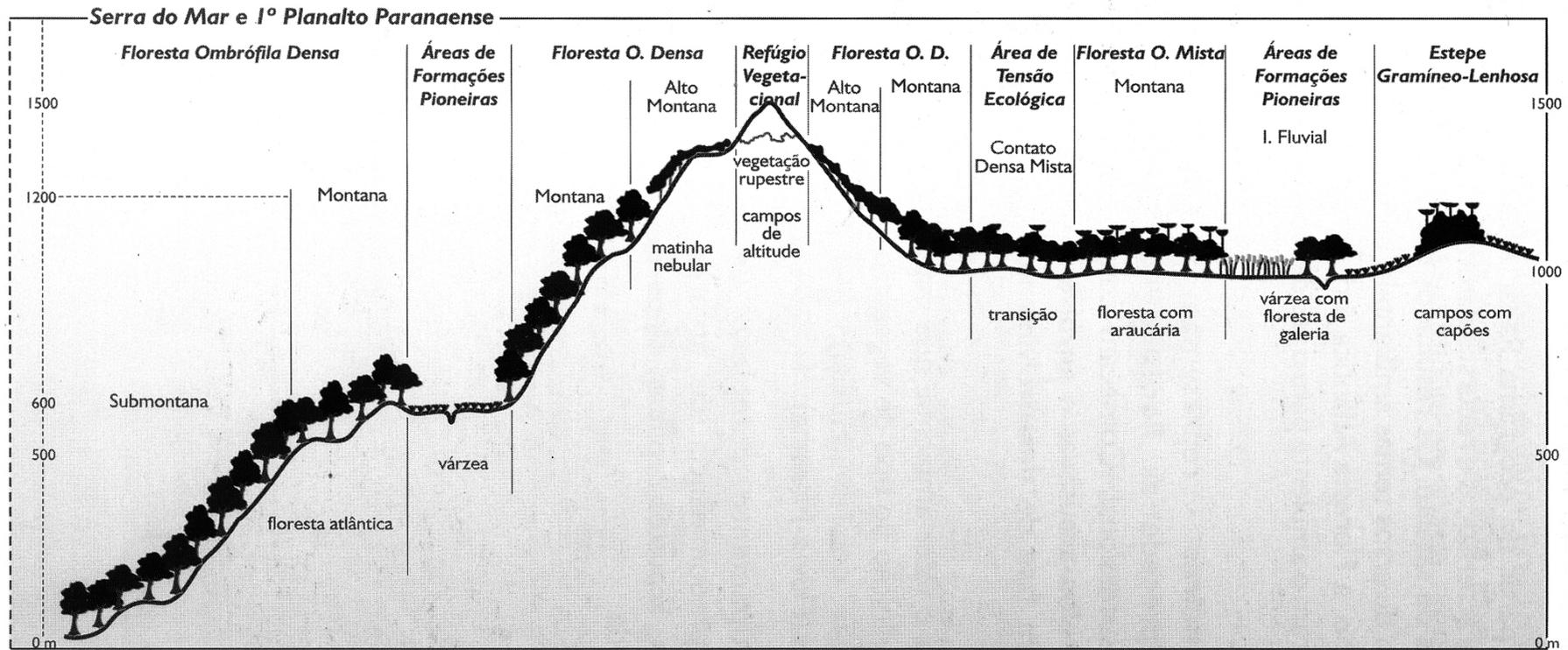


Figura 3. Perfil dos tipos vegetacionais da Serra do Mar no Estado do Paraná (SEMA, 2002).



Figura 4. Representação tridimensional da Serra do Mar no Estado do Paraná. A linha branca separa a Serra do Mar do Primeiro Planalto (SEMA, 2002).

4. CAPÍTULO 1. VARIAÇÃO CROMÁTICA EM *Brachycephalus* DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. Diversidade de anfíbios

Atualmente no mundo são conhecidas cerca de 5.500 espécies de anfíbios (Classe Amphibia), que apresentam uma grande variação na forma do corpo, no tamanho, na ecologia e no comportamento (FROST, 2004). A classe Amphibia compreende três ordens: Caudata (salamandras), Gymnophyona (cobras-cegas) e Anura (rãs, pererecas e sapos). Os anuros são o grupo mais abundante e diversificado, com mais de 4800 espécies (FROST, 2004; POUGH *et al.*, 2001; DUELLMAN; TRUEB, 1986). No Brasil, os anuros são representados por cerca de 600 espécies, sendo 60% dessas endêmicas (FEIO *et al.*, 1998). A Mata Atlântica é um ecossistema que abriga um grande número de endemismos, onde das 280 espécies conhecidas de anfíbios, 253 são espécies endêmicas (MYERS *et al.*, 2000). As outras duas ordens de anfíbios estão pobremente representadas no Brasil, tendo sido registrada apenas uma espécie de salamandra (*Bolitoglossa altamazonica*), restrita à região Amazônica, e algumas espécies de cobras-cegas (FEIO *et al.*, 1998).

Estudos sobre a história natural e ecologia são ainda escassos para a maioria das espécies brasileiras de anfíbios, principalmente para a região Amazônica e da Mata Atlântica. Entre os poucos estudos de levantamento da fauna de anuros da Mata Atlântica, podem ser citados: FEIO *et al.* (1998) para o Parque Estadual do Rio Doce (Estado de Minas Gerais) levantaram 38 espécies distribuídas em seis famílias; HADDAD; SAZIMA (1992) para a Serra do Japi (Estado de São Paulo) detectaram 24 espécies distribuídas em 5 famílias; HEYER *et al.* (1990) para a Estação Biológica da Boracéia (Estado de São Paulo) encontraram 64 espécies distribuídas em 6 famílias. KWET; DI-BERNARDO (1999) para a Serra Geral no Rio Grande do Sul (Floresta Ombrófila Mista), levantaram 37 espécies de cinco famílias. A Mata Atlântica é considerada um dos 25 centros de alta biodiversidade (*hotspots*) do planeta por MYERS *et al.* (2000). Estes autores utilizaram os seguintes critérios para a definição dos centros de alta biodiversidade: (1) alta concentração de espécies; (2) alto índice de endemismo (no mínimo 0,5% de plantas vasculares endêmicas) e (3) baixo estado de conservação do habitat (com no máximo 30% da cobertura vegetal original). Juntos, os 25 centros de alta biodiversidade contém 44% de todas as espécies de plantas vasculares e 35% das espécies de vertebrados do mundo (exceto peixes), distribuídas em apenas 1,4% da

superfície terrestre levando em conta a porção de habitat intacto. No total, os 25 centros de alta biodiversidade já perderam 88% da sua cobertura vegetal original.

Alguns centros de alta biodiversidade contêm mais diversidade biológica do que outros. Se considerada a concentração e o número de espécies endêmicas de plantas e vertebrados (2,7% e 2,1% de todas as espécies respectivamente) e o remanescente da cobertura vegetal original, a Mata Atlântica ocupa a quarta posição de maior biodiversidade, antecedida pela Ilha de Madagascar, pelas florestas das tropicais das Filipinas e pelos Andes Tropicais respectivamente (BROOKS *et al.*, 2002; MYERS *et al.*, 2000; KITCHING, 2000). A Mata Atlântica, por sua alta concentração de espécies endêmicas e seu baixo percentual de *habitats* remanescentes, necessita de um aprofundamento nos estudos sobre a variação presente nas espécies, sob diversas perspectivas incluindo variação morfológica e molecular. Esses estudos deverão gerar informação que podem ser úteis na conservação não apenas das próprias espécies, mas do ecossistema como um todo. Considerando o acelerado processo de degradação de habitats naturais que vem atingindo os centros de alta biodiversidade, em especial a Mata Atlântica, faz-se necessária à conservação dessas áreas. Para preservar tais espécies, são imprescindíveis esforços para preservar não apenas a biodiversidade, mas também os processos que geram e mantêm essa diversidade (SMITH *et al.*, 2001).

4.1.2. Diversidade da família Brachycephalidae

A família Brachycephalidae GÜNTHER, 1858, atualmente é composta por apenas um gênero: *Brachycephalus* FITZINGER, 1826, sendo todas as espécies endêmicas da Mata Atlântica (DUELLMAN; TRUEB, 1986). O gênero *Brachycephalus* ocorre a partir do Estado do Espírito Santo estendendo-se até o Estado do Paraná (Figura 1). São reconhecidas as seguintes espécies para o gênero: *B. ephippium* SPIX, 1824 encontradas nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, 1920 (HEYER *et al.*, 1990) encontrada apenas no Estado de São Paulo, *B. didactyla* (IZECKSOHN, 1971) encontrada apenas no Estado do Rio de Janeiro, *B. pernix* POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEIN, 1998 encontrada apenas no Estado do Paraná, *B. hermogenesi* (GIARETTA; SAWAYA, 1998) encontrada no norte do Estado de São Paulo, e *B. vertebralis* POMBAL JR., 2001 encontrada no Estado do Rio de Janeiro.

Até o ano de 2002 reconheciam-se dois gêneros para a família Brachycephalidae: *Brachycephalus* e *Psyllophryne*. No entanto, KAPLAN (2002) demonstrou que a única sinapomorfia que separava os dois gêneros, ausência de omosterno em *Brachycephalus* e

presença de omosterno em *Psyllophryne*, não pode ser considerada válida e, portanto, não há evidência de que *Psyllophryne* seja um grupo monofilético. Em seu estudo, KAPLAN mostrou histologicamente que ambos os gêneros apresentam omosterno, sugerindo que as espécies *P. didactyla* e *P. hermogenesi* fossem incorporadas a *Brachycephalus*. Além dessa característica ambos possuem redução digital e completa ossificação das cartilagens epicoracóides, procoracóides e clavículas. Entretanto, o número de espécies deve aumentar com o aprofundamento de estudos do gênero, como alguns autores sugerem que possam existir mais espécies reunidas em *B. ephippium* (MIRANDA-RIBEIRO, 1920; WISTUBA, 1998; POMBAL JR. *et al.*, 1998; POMBAL JR., 2001). Para o Estado do Paraná, há indícios de que também possam existir mais de uma espécie, devido a diferenças na coloração e distribuição geográfica descontínua. Além do mais, *B. pernix* foi encontrado apenas na sua localidade tipo (WISTUBA, 1998).

As espécies melhor estudadas até o momento são *B. ephippium* e *B. pernix*. Para *B. ephippium*, POMBAL JR. (1992; 1999) e POMBAL JR. *et al.* (1994) levantaram dados sobre hábito alimentar, comportamento social e vocal, época e modo de reprodução, período de atividade (diário e sazonal) e descrição das fases de desenvolvimento. Para *B. pernix*, WISTUBA (1998) estudou comportamentos de deslocamento, limpeza, vocalização, defesa, morfologia das glândulas epidérmicas, comunicação visual e combates físicos, além de hábito e comportamento alimentar.

Todas as espécies do gênero *Brachycephalus* ocupam habitats similares vivendo sob a serapilheira, em geral em altitudes elevadas. Altitude de até 1545 metros acima do nível do mar foi registrada para *B. vertebralis* (POMBAL JR., 2001). Para as populações do Paraná, a altitude das populações estudadas varia de 1.000 a 1.520 metros acima do nível do mar, localizadas no cume ou nas encostas de montanhas. Possuem atividade diurna e podem ser observados caminhando vagarosamente sobre o chão da floresta, algumas vezes empoleirados, ou então identificados através da vocalização. *Brachycephalus ephippium* possui uma coloração alaranjada intensa por todo corpo. *Brachycephalus pernix* é alaranjado-amarelo intenso, com manchas pretas nas laterais do corpo podendo variar amplamente de intensidade. *Brachycephalus vertebralis* é alaranjado com manchas pretas na cabeça e sobre a coluna vertebral, que correspondem a co-ossificações dérmicas, e *Brachycephalus nodoterga* possui coloração cinza escura (POMBAL JR., 1992, 1999; POMBAL JR. *et al.*, 1994; POMBAL JR. *et al.*, 1998; WISTUBA, 1998; POMBAL JR., 2001).

A atividade de *Brachycephalus* é variável ao longo do ano. Para *B. pernix* as variáveis climáticas que mais influenciam na sua atividade são a temperatura e umidade do ar e do solo. Para esta espécie o maior número de indivíduos visualizados, bem como um ritmo diário acentuado de vocalização, foram registrados nos meses de temperatura e umidade mais elevados, notadamente com temperatura acima de 17,5° C, umidade relativa do ar acima de 89% e umidade relativa do solo acima de 20%. Apesar disso, as condições do solo parecem ser importantes para a atividade de *B. pernix*, uma vez que WISTUBA (1998) constatou que mesmo com a temperatura e a umidade relativa do ar baixas, mas com a temperatura e umidade do solo acima do nível anual, vários indivíduos permaneciam ativos. Para *B. ephippium* seu período de maior atividade foi muito semelhante, sendo mais ativos nos meses mais quentes e chuvosos. No entanto, o principal fator medido que influencia sua atividade é a umidade do ar (POMBAL JR., 1992; POMBAL JR. *et al.*, 1994).

A alimentação em geral de *Brachycephalus* constitui-se de pequenos artrópodes disponíveis no seu habitat. Para *B. ephippium* foi identificado que sua dieta é constituída na sua maior parte de colembolas, ortópteros e larvas holometábolos, sendo estes grupos encontrados com maior freqüências à daquela encontrada no ambiente, indicando seletividade de presas por parte dessa espécie (POMBAL JR., 1992). *Brachycephalus pernix* possui uma preferência alimentar por ácaros e himenópteros da série parasítica (Chalcidoidea). Entretanto, conforme a época do ano, sua dieta pode variar: no inverno aranhas também são selecionadas com maior freqüência do que a encontrada no ambiente (WISTUBA, 1998). Embora poucos estudos tenham sido realizados para as espécies de *Brachycephalus*, seus hábitos e métodos de caça podem ser bastante variáveis. HEYER *et al.* (1990), apontam que *B. nodoterga* é um predador de espera, permanecendo parado no chão da mata a espera de presas. Por outro lado, *B. pernix* foi considerada por WISTUBA (1998) como um predador ativo, ou seja, desloca-se na mata enquanto busca suas presas. Esse comportamento é corroborado pela presença de ácaros na sua dieta alimentar em maior freqüência do que no ambiente durante o ano todo, e alta freqüência de larvas durante a primavera, obrigando o predador a deslocar-se para encontrá-las.

Tanto *B. pernix* quanto *B. ephippium* apresentam comportamento de territorialidade, defendendo seu território em encontros agonísticos. O confronto pode restringir-se a movimentos de levantar e abaixar o braço na altura do olho, chegar até a vocalizações, perseguições e contatos físicos. WISTUBA (1998) descreveu por mais de uma ocasião, um indivíduo sobre o outro, no qual o indivíduo que se mantinha por cima abraçava o outro na

região axilar, mantendo as pernas no chão enquanto caminhavam. Essas disputas acabavam quando os dois indivíduos se separavam e deslocavam-se em direções opostas, com um dos indivíduos permanecendo no local do confronto. POMBAL JR. (1992) E POMBAL JR. *et al.* (1994) descreveram encontros semelhantes, sendo que na maioria das vezes sinais vocais e visuais eram suficientes para que um dos indivíduos deixasse o local do confronto. Tal comportamento possivelmente tem a função de defesa dos recursos de sobrevivência, de sítios de ovoposição e de corte. Comportamentos de limpeza também foram registrados para *B. pernix* e *B. ephippium*. Quando recobertos de partículas do solo, esfregam seus membros sobre o próprio corpo, em regiões como nos olhos, na boca, na região do saco vocal, nas laterais do corpo, e podem também esfregar seus membros um no outro.

Foi demonstrado que *B. ephippium* possui uma substância tóxica presente na epiderme, denominada ephippiotoxina, similar à tetrodotoxina de ação neurotóxica (SEBBEN *et al.*, 1986; PIRES JR, *et al.*, 2002, 2003). Essa substância pode estar associada ao seu hábito diurno e à sua coloração conspícua, como um mecanismo de defesa. WISTUBA (1998) identificou em *B. pernix* glândulas epidérmicas contendo uma substância que pode ser uma toxina armazenada. PIRES JR. *et al.* (2005) identificou essa toxina como sendo também similar à tetrodotoxina. Para *B. pernix* outros mecanismos de defesa foram descritos, tais como, diminuição do volume do corpo, tanatose, e saltos. Caminhado sobre a serapilheira, é possível observar que os indivíduos expostos assim que avistados tendem a diminuir seu volume corpóreo, flexionando os membros junto ao corpo e em seguida permanecem imóveis ou abrigam-se sob o folheto. Quando manipulados, mantêm os membros junto ao corpo e permanecem imóveis. Não é difícil observar indivíduos que realizam saltos quando se defrontam com invertebrados de maior tamanho, ou quando são tocados (WISTUBA, 1998).

4.1. 3. Objetivos

- 1) Caracterizar os padrões de variação intra e inter-populacional na coloração em populações de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Paraná.
- 2) Verificar se a variação observada de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Paraná apresenta regularidade geográfica.
- 3) Inferir os fatores determinantes, biológicos, geológicos e climáticos que podem ter gerado os padrões observados.

4.1.4. Justificativa

A importância do presente estudo consiste em preencher, em parte, a lacuna existente sobre o conhecimento da variação e a evolução de anfíbios do Paraná. Em particular visa compreender como a variação cromática está distribuída entre as populações de *Brachycephalus*, relacioná-la com sua distribuição geográfica e evolução, dando suporte para a conservação, não apenas de suas próprias populações, mas do seu habitat como um todo.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Locais e procedimento de coleta

Os pontos de coleta do presente estudo estão localizados na Serra do Mar no Estado do Paraná, em uma faixa entre 25°–26° S e 48°30'–49° W. Foram cinco as localidades amostradas (Figura 2), localizadas (1) na encosta do Pico Caratua – PC (25° 14' S, 48° 50' W), numa altitude que varia de 1400 a 1520 m, (2) no Pico Anhangava – PA (25° 22' S, 48° 58' W), próximo ao cume, a 1420 m de altitude, (3) na encosta do Pico Marumbi – PM (25° 26' S, 48° 55' W), numa altitude que varia de 1000 a 1200 m, (4) nas proximidades do cume da Torre da Prata – TP (25° 37' S, 48° 46' W) a 1300 m de altitude, e (5) nas proximidades do cume do Pico da Igreja – PI (25° 39' S, 48° 51' W), a 1300 m de altitude. Os municípios a que pertencem essas cinco localidades são Campina Grande do Sul, Quatro Barras, Morretes e Guaratuba, respectivamente.

Os espécimes de *Brachycephalus* foram coletados diretamente de seu ambiente natural. As amostras foram coletadas em incursões semanais ao campo durante a estação quente e chuvosa, entre os meses de dezembro a fevereiro, entre os anos de 2000 a 2003. A busca dos exemplares foi realizada remexendo o folheto sobre o chão da mata. Assim que os indivíduos eram localizados, eram colocados em frascos contendo folhas do chão da mata. Do campo eram levados para o laboratório onde eram mantidos vivos até o momento da análise.

4.2.2. Caracterização da coloração

A descrição da coloração da pele foi baseada no catálogo de cores de SMITHE (1975), utilizando luz natural.

4.3. RESULTADOS

Os indivíduos de *Brachycephalus* do Pico Caratuva possuem íris preta, dorso marrom (umber burnt, #22) e pele dorsal coberta com pequenos tubérculos. A superfície dorsal dos membros é de cor marrom (umber burnt, #22). Quase não possuem pigmentação na ponta dos dedos (pale cream, #54). Na superfície ventral da barriga, da garganta e dos membros, possuem cor marrom (umber burnt, #22), com uma quantidade variável de manchas e pontos de cor laranja (spectrum orange, #17). A superfície ventral dos braços e antebraços é geralmente de cor laranja. A superfície ventral das mãos e dos pés é de cor creme-pálido (cream color, #54). Na superfície ventral, na barriga, possuem pele com aspecto glandular. Os indivíduos jovens possuem coloração marrom, mais clara que dos indivíduos adultos, com os membros e a porção posterior do corpo sem pigmentação (Figuras 3 e 4).

Os indivíduos de *Brachycephalus* do Pico Marumbi possuem um padrão de coloração com o dorso laranja brilhante (orange yellow, # 18). A pele dorsal é coberta com pequenos tubérculos e com aspecto glandular na lateral do corpo. Na porção central dorsal do corpo e da cabeça possuem manchas irregulares marrom-avermelhadas (maroon, #31), que variam de extensão de um indivíduo para outro. As áreas laterais do corpo e nas coxas possuem pequenos pontos marrom-escuro (sepia, #219), que variam em intensidade e quantidade entre os indivíduos. Os braços são de cor laranja (spectrum orange, #17) e pernas são de cor laranja-brilhante (orange yellow, # 18). A garganta e a barriga são de cor laranja (spectrum orange, #17) com pequenos pontos cinza-esverdeados (olive gray, #42). A barriga possui um aspecto glandular e com pontos marrons (raw umber, #23). A íris é de cor preta. (Figura 5). Na localidade do Pico Anhangava a espécie aqui citada foi descrita por POMBAL JR. *et al.* (1998).

Os indivíduos de *B. pernix* do Pico Anhangava possuem dorso de cor laranja, podendo ter manchas marrom na região da cabeça. Nas laterais do corpo possuem pele com aspecto glandular e manchas de cor marrom que variam em quantidade de um indivíduo para outro. As manchas podem se estender até quase a cobrir o dorso e sobre a superfície dorsal dos membros, mais intensamente nas pernas. O ventre, as pernas, os braços e a superfície ventral dos pés e mãos são de cor laranja. A cor da íris é preta. Os indivíduos jovens apresentam coloração marrom escuro com a ponta dos membros sem pigmentação (Figuras 6).

Os indivíduos de *Brachycephalus* do Pico da Igreja possuem dorso laranja (do espectro orange (#17) para o chrome orange (#16)). A pele do dorso é coberta com pequenos tubérculos quase imperceptíveis e com aspecto glandular. Na lateral do corpo possuem

pequenas glândulas de cor laranja-escuro (chrome orange, #16) ou ligeiramente marrons (raw umber, #23). Possuem uma linha dorsal sobre a coluna vertebral de cor amarelo-pálido brilhante (sulfur yellow, # 157). As articulações das pernas são de cor amarelo-pálido brilhante (sulfur yellow, # 157). Porção central da cabeça geralmente mais esverdeada do que o restante da cabeça (olive gray, #42). Membros e garganta de cor laranja-escuro (chrome orange, #16), barriga de cor laranja (spectrum orange, #17), com aspecto glandular. As glândulas da barriga são de cor laranja-escuro (chrome orange, #16) com ou sem pequenos pontos e manchas marrons (raw umber, #23) – (Figura 7).

Os indivíduos de *Brachycephalus* da Torre da Prata possuem dorso laranja, com uma mancha aproximadamente circular no centro da cabeça de cor verde brilhante, que varia de tamanho entre os indivíduos. Barriga, pescoço, membros na superfície ventral e dorsal completamente de cor laranja. Nas laterais do corpo e na barriga, possuem manchas de cor laranja-escuro podendo apresentar cor ligeiramente marrom. A quantidade dessas manchas varia de um indivíduo para outro. A pele nas laterais do corpo apresenta aspecto glandular. A íris apresenta cor preta (Figura 8).

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Variação inter-populacional

As cinco populações de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Paraná, aqui estudadas, são alopátricas e apresentam variação inter-populacional no padrão de coloração. Cada localidade possui um padrão exclusivo por causa do isolamento entre as populações de *Brachycephalus*, localizadas em regiões geográficas distintas ao longo da Serra do Mar. Como a Serra é formada por maciços descontínuos e *Brachycephalus* apresenta atividade vocal a partir da altitude mínima de 1000 metros, o trânsito de indivíduos entre as localidades estudadas é improvável. Ocasionalmente eventos de migração entre uma localidade e outra são incompatíveis com a distância que separa as populações de *Brachycephalus* (Tabela 1). Embora para muitas espécies de anfíbios esta separação não seja um impedimento para o seu trânsito, no caso de *Brachycephalus*, quando considerados aspectos do habitat e da biologia, a distância é um impedimento. Os indivíduos de *Brachycephalus* vivem sob a serapilheira de floresta alto-montana e portanto são restritos a esse tipo de habitat. Essa especialização pode estar associada a uma estratégia para evitar a desidratação pelo calor e a outras especializações relacionadas com a miniaturização do corpo (HANKEN; WAKE, 1993). A

temperatura média anual é mais baixa nos cumes das montanhas mais elevadas, do que nos vales da Serra do Mar, como observado por RODERJAN (1994) no Pico Anhangava.

Foram descritos comportamentos de territorialidade para *B. ephippium* (POMBAL JR., 1992; POMBAL JR. *et al.*, 1994) e *B. pernix* (WISTUBA, 1998), mostrando uma tendência dos indivíduos de permanecerem no mesmo local. Além disto, o tamanho diminuto (POMBAL JR. *et al.*, 1998) e a forma de deslocamento das espécies de *Brachycephalus*, considerados andarilhos e não-saltadores eficientes (WISTUBA, 1998), torna difícil o deslocamento entre grandes distâncias. Desse modo acredita-se que a vagilidade dos indivíduos das espécies de *Brachycephalus* seja muito baixa, contribuindo para o isolamento entre as populações.

De um modo geral, a distribuição dos padrões de coloração das populações de *Brachycephalus* possuem uma regularidade geográfica. A população de *Brachycephalus* do Pico Caratua possui um padrão geral marrom e está localizado na porção Norte da Serra paranaense. Na porção Meridional se encontram as populações do Pico Anhangava e do Pico Marumbi, exibindo um padrão geral laranja-marrom. Na porção Sul, estão localizadas as populações do Pico da Igreja e da Torre da Prata, possuindo um padrão geral laranja. Existem poucos estudos sobre a biologia geral e a ecologia das espécies de *Brachycephalus* do Estado do Paraná, o que possibilita a existência de outros padrões de coloração e de distribuição geográfica ainda não diagnosticados.

4.4.2. Variação intra-populacional

Todas as populações de *Brachycephalus* apresentam variação intra-populacional, como descrito na seção 4.3. Notadamente essa variação é mais intensa nas populações de *Brachycephalus* dos picos Caratua, Marumbi e Anhangava. Em *B. ephippium* (SEBBEN, 1986) e recentemente em *B. pernix* (PIRES JR. *et al.*, 2005) foi comprovada a presença de toxinas, que podem estar associadas ao hábito diurno e à coloração conspícua exibida por essas espécies, funcionando como um mecanismo de defesa passivo. Esse mecanismo também pode ser utilizado pelos *Brachycephalus* dos picos Marumbi, da Igreja e da Torre da Prata. Já na população do Pico Caratua, em princípio, esse mecanismo de defesa pode estar associado à coloração ventral, uma vez que sua coloração dorsal é críptica.

O aposematismo, combinando características de cor conspícua e substâncias tóxicas, ocorre em algumas espécies de anfíbios, como *Phyllobates terribilis*, predominantemente de cor amarela e *Dendrobates histrionicus*, que possui um padrão de cor marrom-escuro e laranja

(DUELLMAN; TRUEB, 1986). Por outro lado, algumas espécies utilizam tanto a estratégia críptica quanto a aposemática como defesa passiva. A salamandra venenosa *Taricha rivularis* possui coloração dorsal críptica e ventral aposemática (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Quando esse animal está diante de um potencial predador exibe o ventre com a coloração aposemática, inibindo seus ataques. O anuro *Bombina variegata* também apresenta comportamento semelhante, exibindo o ventre, as palmas das mãos e as solas dos pés aposemáticos (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

A variação do padrão de coloração, observada nas populações de *Brachycephalus*, principalmente as dos picos Anhangava, Marumbi e Caratua, não indica uma definição de padrão comum em uma mesma população. Isso era esperado devido à pressão de seleção estabilizadora produzida pela predação, como ocorre, por exemplo, com as borboletas *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene* (BROWER, 1994, 1996). Essas duas espécies de borboletas possuem várias raças geográficas com padrões de coloração definidos. Cada padrão é mantido pela intensa predação dos indivíduos portadores de padrões híbridos, existentes nas zonas de contato entre os padrões.

A ampla variação intra-populacional do padrão de coloração das populações de *Brachycephalus* aqui estudadas indica que os indivíduos não estão sofrendo pressão de seleção por parte de seus potenciais predadores. Suas características cromáticas e de toxicidade podem estar associadas a outros fenômenos biológicos. As estratégias de defesa anti-predação relacionadas com o padrão de coloração, tanto ventral, quanto dorsal, de *Brachycephalus* do Estado do Paraná, estão ainda pouco esclarecidas. É provável que estas estratégias sejam complexas e possivelmente envolvam vários fenômenos biológicos. Um aspecto da ecologia de *Brachycephalus* que pode contribuir para esclarecer tais dúvidas é o conhecimento de seus predadores e das suas estratégias de predação.

Tabela 1. Distâncias aproximadas em linha reta entre as cinco localidades estudadas de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Paraná. Pico Caratuva (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP).

Localidades	PC	PA	PM	PI	TP
PC	-				
PA	26	-			
PM	30	12	-		
PI	45	32	21	-	
TP	41,5	34	23	11	-

Distâncias em Km (FOLHA SG.22-X-D/SG.23-V-C MIR-514/515, IBGE, 1983)

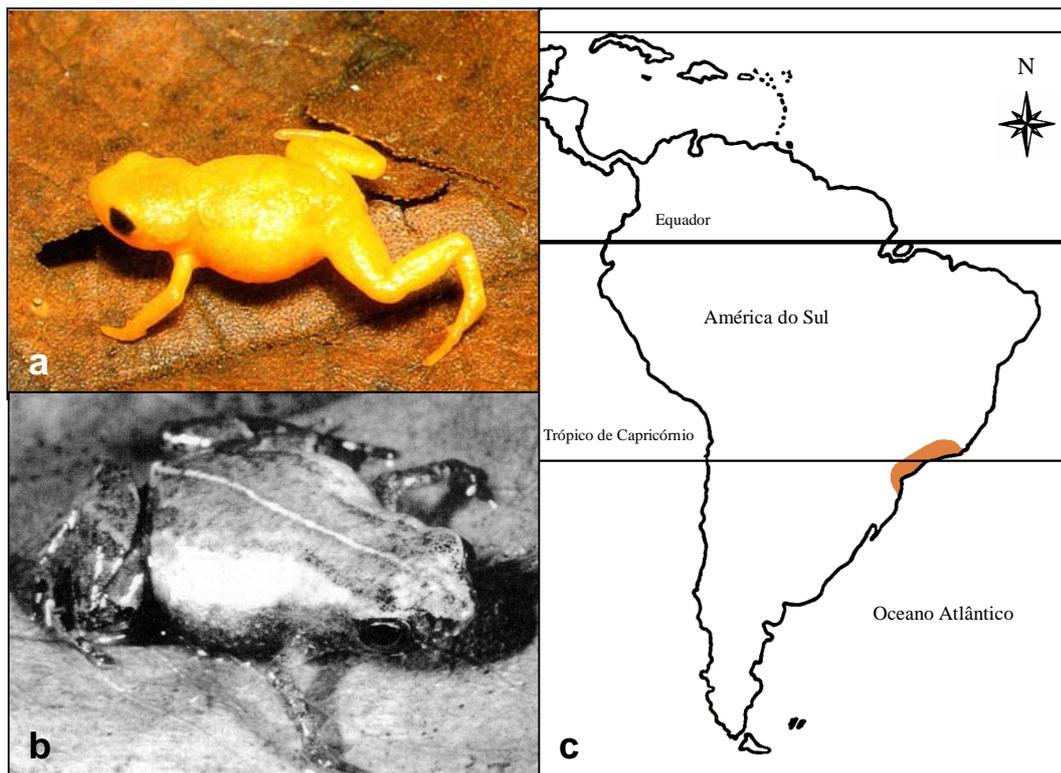


Figura 1. Família Brachycephalidae e sua distribuição geográfica. (a) *Brachycephalus ephippium*; (b) *Brachycephalus hermogenesi*; (c) A região laranja no mapa mostra a distribuição geográfica da família Brachycephalidae (Foto figura a: HEYER *et al.*, 1990; foto figura b: GIARETTA; SAWAYA, 1998).

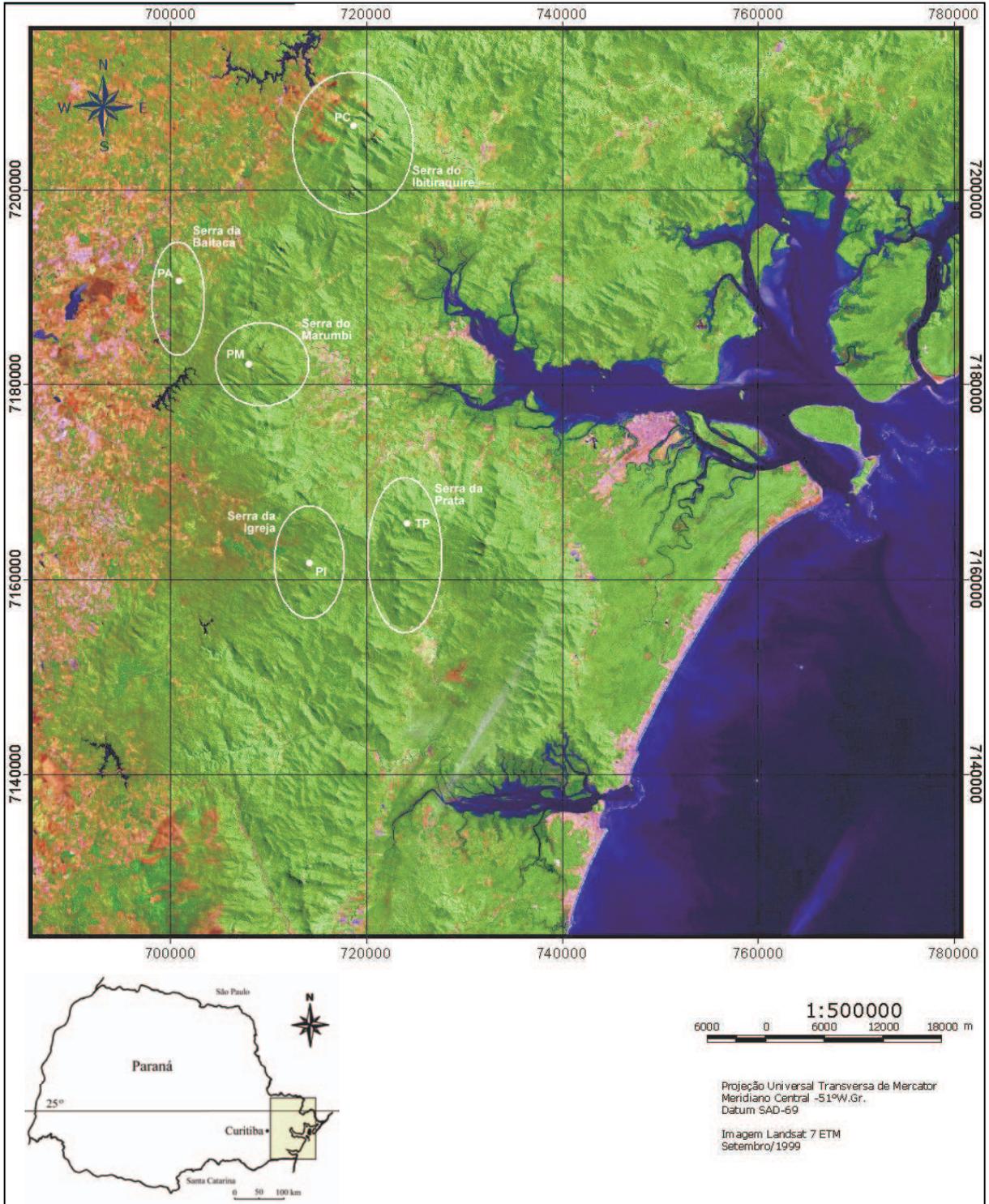


Figura 2. Serra do Mar do Estado do Paraná e localidades de coleta: Pico Caratuva (PC), Pico Anhangava (PA), Pico Marumbi (PM), Pico da Igreja (PI) e Torre da Prata (TP). Imagem de satélite cedida pelo Laboratório de Sistema de Informações Geográficas da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS).

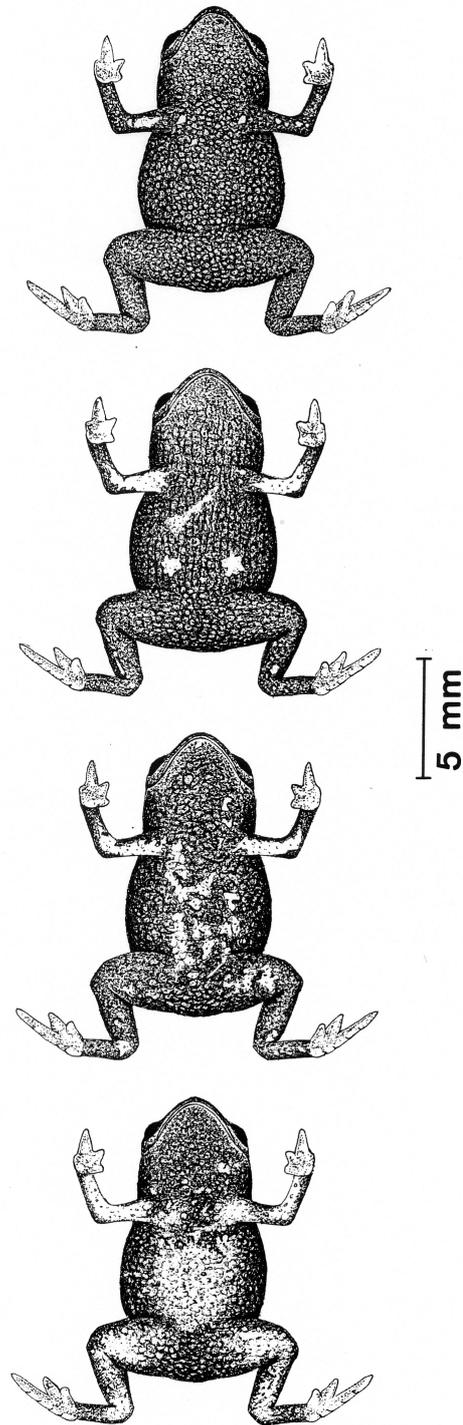


Figura 3. Variação da coloração ventral do *Brachycephalus* do Pico Caratuva. A cor escura corresponde à cor marrom e a cor branca corresponde à cor laranja (Desenhos: J. SOMERA).



Figura 4. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico Caratua. (a), (b) e (d) Indivíduos adultos sobre o folheto; (c) indivíduo jovem ao lado de um adulto; (e) indivíduo adulto - cada traço da régua graduada corresponde a 1 mm; (f) coloração ventral de um indivíduo adulto (Fotos: L. F. RIBEIRO).



Figura 5. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico Marumbi. Indivíduos adultos sobre o folhedo (Fotos: L. F. RIBEIRO).



Figura 6. Variação da coloração de *Brachycephalus pernix* do Pico Anhangava. (a), (b), (d), (e) e (f) Indivíduos adultos sobre o folheto; (c) indivíduos adultos ao lado de uma lapiseira; (g) indivíduo jovem sobre o folheto (Fotos a-f: L. F. RIBEIRO; foto g E. WISTUBA).



Figura 7. Variação da coloração do *Brachycephalus* do Pico da Igreja. Indivíduos adultos sobre o folheto (Fotos: L.F. RIBEIRO).



Figura 8. Variação da coloração do *Brachycephalus* da Torre da Prata. Indivíduos adultos sobre o folheto (Fotos: L. F. RIBEIRO).

5. CAPÍTULO 2. VARIAÇÃO MORFOLÓGICA EM *Brachycephalus* DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)

5.1. INTRODUÇÃO

No Capítulo 1 desta tese foi caracterizada a variação cromática nas populações ainda não descritas de *Brachycephalus* que ocorrem nas localidades de Pico Caratua na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja na Serra do Mar no Estado do Paraná. Neste segundo capítulo será apresentada a descrição formal, no nível de espécie, de duas populações; uma com ocorrência na Torre da Prata na Serra da Prata e outra no Pico Caratua na Serra Ibitiraquire. As descrições aqui apresentadas são baseadas em características externas e caracteres morfológicos que incluem tamanho, grau de ossificação e co-ossificação, presença e distribuição de tecido glandular, grau de fusão dos ósseos cranianos, presença ou ausência de ossos cranianos e presença e número de dentes. As descrições são complementadas, ainda, com dados de história natural e comparações são feitas com as demais espécies atualmente reconhecidas para o gênero *Brachycephalus*.

Um aspecto importante enfatizado na descrição da variação morfológica dos novos taxa de *Brachycephalus* apresentada neste capítulo é o processo de miniaturização — a redução no tamanho do corpo além de um determinado limite (HANKEN; WAKE, 1993) — que pode acarretar modificações marcantes na morfologia, fisiologia e ecologia nas espécies de uma determinada linhagem. Estas modificações são várias podendo, por exemplo, levar a retenção de traços embrionários nos juvenis da espécie ancestral nos indivíduos adultos da espécie descendente e a ausência ou fusão de elementos ósseos devido ao truncamento do desenvolvimento. Com relação à ausência de ossos, frequentemente, quatro ossos do crânio, *viz.*, septomaxila, palatino, columela e quadrado-jugal, podem estar ausentes em espécies de anuros que sofreram o processo de miniaturização (YEH, 2002). Estes três últimos elementos ósseos do crânio estão entre os últimos a se ossificarem durante a ontogenia em anfíbios, sugerindo a ocorrência de pedomorfose (YEH, 2002). A interpretação da variação morfológica no contexto da miniaturização é, por conseguinte, de importância fundamental para a compreensão dos fenômenos evolutivos que geraram a variação morfológica observada nos organismos de interesse.

**TWO NEW SPECIES OF *BRACHYCEPHALUS* (ANURA: BRACHYCEPHALIDAE)
FROM PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL¹**

(With 10 figures)

LUIZ F. RIBEIRO^{2,3}

ANA C. R. ALVES^{4,5}

CÉLIO F. B. HADDAD^{4,6}

SÉRGIO F. DOS REIS⁷

ABSTRACT: Two new species of brachycephalid frogs are described from Pico Torre da Prata, between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, and Pico Caratua, municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil. The new species share the following attributes: body bufoniform; skin on the head dorsum and central body dorsum smooth with no dermal co-ossification; outer metatarsal tubercle distinct; dermal roofing bones of skull unornamented; all paired cranial bones distinct and not fused; quadratojugals, neopalatines, and maxillary odontoids present. The new species from Pico Torre da Prata is characterized by male SVL = 10.3-12.1 and female SVL = 12.5-13.1 mm; general colour orange; snout mucronate in dorsal view; and absence of external trace of toe V. The new species from Pico Caratua is characterized by male SVL = 9.3-11.3 and female SVL = 10.9-12.0 mm; general colour brown; snout rounded in dorsal view; and presence of external trace of toe V. Comparisons with other brachycephalid species are provided.

KEY WORDS: Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Brachycephalus*, new species, osteology, Atlantic Forest, Southern Brazil

INTRODUCTION

The family Brachycephalidae is endemic to the Atlantic rain forest of southeastern and southern Brazil and ranges in distribution from the state of Espírito Santo to the state of Paraná (FROST, 2004). Until recently, the family Brachycephalidae consisted of two genera, *Brachycephalus* GÜNTHER, 1858 and *Psyllophryne* IZECKSOHN, 1971. The two genera were defined by the presence of an omosternum in *Psyllophryne* and the absence of this

¹ Manuscrito submetido a revista Boletim do Museu Nacional. Submetido em 11 de janeiro de 2005. Aceito em 25 de janeiro de 2005.

² Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

³ Mater Natura, Instituto de Estudos Ambientais, Rua Desembargador Westphalen, 15 – 16º andar, 80010-110, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: luxf@superig.com.br

⁴ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, C.P, 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

⁵ Bolsista de Pós-doutorado da FAPESP. E-mail: anaalves@uol.com.br

⁶ E-mail: haddad@rc.unesp.br

⁷ Departamento de Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: sfreis@unicamp.br

structure in *Brachycephalus*. KAPLAN (2002) demonstrated the presence of a reduced but distinct omosternum in *B. ephippium* (SPIX), a finding that invalidated the genus *Psyllophryne*. The two known *Psyllophryne* species, *P. didactyla* IZECKSOHN and *P. hermogenesi* GIARETTA; SAWAYA, were then assigned to the genus *Brachycephalus*. As currently understood, the genus *Brachycephalus* has six species, *B. didactyla*, *B. ephippium*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga* MIRANDA-RIBEIRO, *B. pernix* POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEIN, and *B. vertebralis* POMBAL JR.

Brachycephalus pernix, described from the locality of Pico Anhangava in the State of Paraná, Brazil, is the southernmost known record for the family Brachycephalidae (POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEIN, 1998). Here, we describe two species of *Brachycephalus* from the Atlantic forest of the Serra do Mar mountain range, in the State of Paraná, one of which represents an extension in the southern distribution of this family.

MATERIAL AND METHODS

Adult specimens were anaesthetized with diluted ethanol, fixed in 10% formalin, and preserved in 70% ethanol. Measurements were made with micrometric eyepiece in a stereomicroscope. The abbreviations used were as follows: SVL (snout-vent length); HL (head length; from tip of snout to angle of jaw); HW (head width; greatest width of head located between angles of jaw); ND (nostril diameter); IND (internostril distance; between inner margins of nostrils); ED (eye diameter); IOD (interorbital distance; between anterior corners of the eyes); END (eye-nostril distance; from anterior corner of the eye to posterior margin of nostril); THL (thigh length); TBL (tibia length). All measurements were in millimeters. The terminology used for the external morphology and texture of the skin followed LYNCH; DUELLMAN (1997). The colour codes used in the colour descriptions are those of SMITHE (1975). The bones and cartilages were cleared and double-stained with alizarin red and alcian blue according to TAYLOR; VAN DYKE (1985). Drawings were made using a Zeiss stereomicroscope fitted with a drawing tube.

Specimens used in the description or examined for comparison are in the AL-MN (Adolpho Lutz collection, deposited in the Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brazil), CFBH (Célio F. B. Haddad collection, deposited in the Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brazil), MHNCI (Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil), MNRJ (Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brazil), MZUSP (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo,

Brazil), and ZUEC (Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil). The material examined in the comparisons is listed in Appendix I. Osteological comparisons involved specimens of *B. ephippium*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*.

RESULTS

Brachycephalus sp. 1

HOLOTYPE – CFBH 7388 (Fig. 1a, b), adult male collected at Pico Torre da Prata (25° 47' S; 48° 83' W), between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil, on 22 January 2003 by L. F. Ribeiro and A. Camarão.

PARATOPOTYPES – CFBH 7374 (cleared and stained), 7375-77, four adult females collected with the holotype; 7378-79 (cleared and stained), 7380-87, ten adult males collected with the holotype.

DIAGNOSIS – (1) male SVL = 10.3-12.1 and female SVL = 12.5-13.1; (2) body bufoniform; (3) skin on the head dorsum and central body dorsum smooth with no dermal co-ossification; that on the dorsolateral surfaces of the body, flanks, and dorsal surface of thighs granular; (4) dorsum orange with lateral small glands dark orange with small olive gray central points; limbs, throat, and belly orange; (5) snout rounded in dorsal and lateral views; (6) no external trace of toe V; (7) outer metatarsal tubercle distinct, large, and ovoid; (8) dermal roofing bones of skull unornamented; (9) all paired cranial bones distinct and not fused to slightly fused with surrounding elements; (10) quadratojugals present and slender; (11) neopalatines present; (12) maxillary odontoids present and few in number (6-8).

DISTRIBUTION – *Brachycephalus* sp. 1 is known only from Pico Torre da Prata (25° 47' S; 48° 83' W), between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil.

DESCRIPTION OF HOLOTYPE – Body robust, bufoniform (Fig. 1, 2a). Head slightly wider than long, as wide as body; head length 37% of snout-vent length (Fig. 2a); snout short with length almost equal to eye diameter, rounded in dorsal and lateral views (Fig. 2a, b); nostrils protuberant, directed anterolaterally; canthus rostralis not distinct; loreal region weakly concave; lips nearly sigmoid; eye slightly protruding in dorsal and lateral views, eye diameter 28% of head length; tympanum absent; vocal sac not expanded externally; vocal slits present; tongue longer than wide, posterior 1/2 not adherent to floor of mouth; choanae relatively small and round; vomerine odontophores absent. Arm and forearm relatively slender, arm approximately as long as forearm (Fig. 2a); fingers I–III robust, short and distinct; finger IV

reduced; tip of finger I slightly rounded, tips of fingers I–III pointed; relative lengths of fingers $IV < I < II < III$; subarticular tubercles and inner and outer metacarpal tubercles absent (Fig. 2c). Legs relatively short, thigh robust; thigh length 34% of snout-vent length, tibia length 98% of thigh length (Fig. 2a); toes II–IV short and relatively distinct; toes I and V externally absent; relative lengths of toes $II < III < IV$; subarticular tubercles and inner metatarsal tubercles absent; outer metatarsal tubercle distinct, large, and ovoid (Fig. 2d).

Skin on head dorsum and central body dorsum smooth with no dermal co-ossification (Fig. 1, 2a); skin on dorsolateral surfaces of body, flanks, and dorsal surface of thighs granular; skin on venter and ventral surfaces of the legs smooth; skin on ventrolateral surfaces of body and area around the cloacal opening granular.

MEASUREMENTS OF HOLOTYPE (mm) – SVL 10.5; HL 3.9; HW 4.5; ND 0.2; IND 1.0; ED 1.1; IOD 2.1; END 0.5; THL 3.6; TBL 3.5.

COLOURATION IN LIFE (Fig. 3) – Iris black. Dorsum orange (spectrum orange, #17); lateral small glands dark orange (chrome orange, #16) with small olive gray (#42) points. Limbs, throat, and belly orange (spectrum orange, #17)

COLOURATION IN PRESERVATIVE – General pale cream (pale pinkish buff, #121D).

VARIATION IN THE TYPE SERIES – Measurements and proportions of ten males and four females are given in Tables 1 and 2, respectively.

NATURAL HISTORY – At the type locality, *B. sp. 1* inhabits thick layers of leaf litter in the Atlantic rain forest at an altitude of approximately 1,000 m. This species is active by day and is locally abundant. Adult males were always exposed on the litter when calling.

Brachycephalus sp. 2.

HOLOTYPE – CFBH 7879, adult female, one of a series collected at Pico Caratuva (25° 14' S; 48° 50' W), municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil, on 16 April 2003 by L. F. Ribeiro.

PARATOPOTYPES – Pico Caratuva (25° 14' S; 48° 50' W), municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil. 7903 (cleared and stained), one male collected on February 1996 by E. Wistuba and L. F. Ribeiro; 7905 (cleared and stained), one male collected on 28 March 2000 by L. F. Ribeiro; 7906 (cleared and stained), one male collected on 12 April 2000 by L. F. Ribeiro; 7888, 7890-94, 7897, seven males collected on 27 November 2002 by L. F. Ribeiro; 7899, 7901, 7902, three males collected on 03 January 2003 by C. Ranzi, E. Ranzi and L. F. Ribeiro; CA-PR 7880-7882, 7884 four males collected with the holotype on 16

April 2003 by L. F. Ribeiro; 7904 (cleared and stained), one female collected on 28 March 2000 by L. F. Ribeiro; 7889, 7895, 7896 three females collected on 27 November 2002 by L. F. Ribeiro; 7898, one female collected on 03 January 2003 by C. Ranzi, E. Ranzi and L. F. Ribeiro; 7900 (cleared and stained) one female collected on 03 January 2003 by C. Ranzi, E. Ranzi and L. F. Ribeiro; 7883, 7885-87 four females collected with the holotype on 16 April 2003 by L. F. Ribeiro.

DIAGNOSIS – (1) male SVL = 9.3-11.3 and female SVL = 10.9-12.0; (2) body bufoniform; (3) skin on the head dorsum and central body dorsum smooth with no dermal co-ossification; that on dorsolateral surfaces of the body, flanks, and dorsal surface of thighs granular; (4) dorsum brown; belly, throat, and ventral surface of limbs brown with variable amount of orange markings and spots; (5) snout mucronate in dorsal view, rounded in lateral view; (6) external trace of toe V present; (7) outer metatarsal tubercle distinct, large, and ovoid; (8) dermal roofing bones of skull unornamented; (9) all paired cranial bones distinct and not fused to slightly fused with surrounding elements; (10) quadratojugals present and slender; (11) neopalatines present; (12) maxillary odontoids present and few in number (6-8).

DISTRIBUTION – *Brachycephalus* sp. 2 is known only from Pico Caratua (25° 14' S; 48° 50' W), municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil.

ETYMOLOGY – The specific epithet is a Latin noun meaning brown. The name is used in allusion to its general colour brown.

DESCRIPTION OF HOLOTYPE – Body robust, bufoniform (Fig. 4a). Head as wide as long, slightly narrower than body; head length 36% of snout-vent length (Fig. 4a); snout short with length almost equal to eye diameter, mucronate in dorsal view, rounded in lateral view (Fig. 4a, b); nostrils protuberant, directed anterolaterally; canthus rostralis distinct, sinuous, with curvature slightly concave just anterior to the orbit and just posterior to the nostrils but convex throughout the nostrils; loreal region weakly concave; lips nearly sigmoid; eye slightly protruding in dorsal and lateral views, eye diameter 24% of head length; tympanum absent; tongue longer than wide, posterior 1/2 not adherent to floor of mouth; choanae relatively small and round; vomerine odontophores absent. Arm and forearm relatively slender, arm approximately as long as forearm (Fig. 5); fingers I-III robust, short and distinct; finger IV reduced (Fig. 4c); tip of finger I slightly rounded, tips of fingers II-III pointed; relative lengths of fingers IV < I < II < III; subarticular tubercles and inner and outer metacarpal tubercles absent (Fig. 4c). Legs relatively short, thigh robust; thigh length 37% of snout-vent length, tibia length 94% of thigh length (Fig. 5); toes II-IV short and relatively distinct; toe V very

reduced, toe I externally absent; relative lengths of toes $V < II < III < IV$; subarticular tubercles and inner metatarsal tubercles absent; outer metatarsal tubercle distinct, large, and ovoid (Fig. 4d).

Skin on head dorsum and central body dorsum smooth and with no dermal co-ossification (Fig. 4; Fig. 5); skin on dorsolateral surfaces of body, flanks, and dorsal surface of thighs granular; skin on venter and ventral surfaces of the legs smooth; skin on ventrolateral surfaces of body and area around the cloacal opening granular.

MEASUREMENTS OF HOLOTYPE – SVL 11.9; HL 4.3; HW 4.4; ND 0.2; IND 1.0; ED 1.0; IOD 2.4; END 0,6; THL 4.4; TBL 4.2.

COLOURATION IN LIFE (Fig. 5) – Iris black. Dorsum brown (umber burnt, #22); dorsal surface of limbs brown (umber burnt, #22) with small orange (spectrum orange, #17) irregular spots and points; finger tips almost without pigmentation (pale cream, #54). Belly, throat, and ventral surface of limbs brown (umber burnt, #22) with orange (spectrum orange, #17) markings and spots. Ventral surface of arms and forearms orange; ventral surface of hands and feet pale cream (cream colour, #54).

COLOURATION IN PRESERVATIVE – General colour brown (vandyke brown, #221); spots and markings pale greyish (smoke gray, #44).

VARIATION IN THE TYPE SERIES – Measurements and proportions of 15 males and nine females are given in Tables 3 and 4, respectively. Snout shape varies from mucronate to slightly mucronate in dorsal view. Colour in life on belly, throat, and ventral surface of limbs varies from brown (umber burnt, #22) with different amounts of orange (spectrum orange, #17) markings and spots to brown with no marks and spots (Fig. 6).

NATURAL HISTORY – At the type locality, *B. sp. 2* inhabits thick layers of leaf litter in the Atlantic forest at elevations from 1300 to 1600 m. This species is active by day and is locally abundant. Individuals have been observed from November to April, although they were active mainly from December to February, when temperatures and air humidity are higher. Active males were exposed on the litter when calling. *Brachycephalus sp. 2* displayed tanatosis upon touching. The brown dorsal colour of adult *B. sp. 2* closely matches that of the litter. Three juvenile individuals had a dorsal surface colouration varying from light-gray to gray.

OSTEOLOGY OF *B. sp. 1* AND *B. sp. 2* – Skull slightly wider than long in dorsal view; the greatest width at level of the squamosals (Fig. 7a, 9a). Dermal roofing bones of the skull unornamented and without co-ossification of skin to bones (Fig. 7a, 9a). Premaxillae broad and triangular in dorsal view, not fused medially; pars dentalis of each premaxilla with

approximately 2-3 (*B. sp. 1*, $n = 2$; *B. sp. 2*, $n = 2$) reduced odontoids; alary process of premaxillae distinct, about two or three times the height of pars dentalis and narrowly separated from the nasal; in ventral view, pars palatina with palatine process distinct and slightly pointed. Maxillae arched; pars dentalis of each maxilla with approximately 6-8 (*B. sp. 1*, $n = 2$; *B. sp. 2*, $n = 2$) reduced odontoids distributed in the anterior half of the bone; pars facialis modestly developed, pars palatina not developed. Quadratojugals present (Fig. 7c, 9c), slender, relatively long, and strongly deflected ventrally from the plane of the maxillae, completing the maxillary arcade posteriorly. Posterior ends of each quadratojugal articulate with the ventral ramus of squamosal. Anterior tips of quadratojugals narrowly overlapped by maxillae. Nasals approximately triangular in dorsal view, widely separated medially and not fused with surrounding elements; their anterior margins overlie the nasal capsule and their posterior margins barely overlap the sphenethmoid (Fig. 7a, 9a). Sphenethmoid entire, thin and poorly ossified, invested by the cultriform process of parasphenoid ventrally. Frontoparietals paired, almost rectangular, narrowly separated medially, slightly articulate or fused with one another, and not fused to slightly fused with surrounding elements (Fig. 7a, 9a); frontoparietal fontanelle completely roofed; frontoparietal fenestra absent. Anteriorly, frontoparietals overlap the posterior margin of the sphenethmoid, and posteriorly they overlap part of the prootic and exoccipital. Vomers reduced; dentigerous process absent, prechoanal and postchoanal ramus reduced but distinct (Fig. 7b, 9b). Neopalatines present, short, very slender and articulate with sphenethmoid (Fig. 7b, 9b). Parasphenoid robust; cultriform process broad and terminates at the level or slightly posterior to neopalatines; alary process broad and long. Squamosals T-shaped in lateral view, anterior zygomatic ramus short, with approximately 1/2 of posterior otic ramus length; posterior otic ramus articulates with distal portion of crista parotica (Fig. 7c, 9c). Pterygoids relatively robust; anterior ramus long and articulates with maxillary arch; posterior ramus short and articulates with the ventral ramus of squamosal; medial ramus short and articulates with prootic. Exoccipitals and prootics fused, without visible sutures; occipital condyles well developed and widely separated from each other. Operculum, stapes, and tympanic annulus absent. Mandible edentate. Hyoid plate about twice as long as wide at midline; hyoglossal sinus U-shaped; hyales slender and long; anterior process of hyale slender and with approximately 1/3 of hyale length; lateral process of hyoid plate short; posteromedial process of hyoid plate bony and slender, its length approximately equal to hyoid plate length (Fig. 7d, 9d).

Pectoral girdle arciferal and robust; procoracoid and epicoracoid completely ossified; procoracoid and epicoracoid synosteotically united with clavicle, coracoid and scapula; suprascapula broadly expanded, anterior half ossified as cleithrum; omosternum well developed, cartilaginous, its distal portion expanded; sternum absent (Fig. 8b, 10b). Vertebral column composed of eight presacral, procoelous and non-imbricate vertebrae; first presacral vertebra (atlas) lacks transverse process, all other presacral vertebrae have slender transverse processes; transverse processes of presacrals III-VI perpendicular to the notochordal axis, those of the presacrals II, VII-VIII directed anteriorly. Lengths of the transverse process of presacrals along with that of the sacral diapophyses: III > SD > IV > V > II > VI \cong VII \cong VIII in *B. sp. 1* (Fig. 8a) and III > IV \cong SD > V \cong VI \cong VII > VIII \cong II in *B. sp. 2* (Fig. 10a). Sacral diapophyses moderately expanded and directed posteriorly, distal end of diapophyses with a flat, slightly calcified cartilage that articulates with the ilial shaft of the pelvic girdle. Urostyle with a dorsal flange and joined to the sacrum by a bicondylar articulation, urostyle length approximately 2/3 of the length of the presacral portion of the vertebral column (Fig. 8a, 10a). Pelvic girdle V-shaped in dorsal view; ilial shaft with a long crest; ischia fused to one another medially; pubis developed (Fig. 8a, 10a).

Forelimbs with humerus slightly curved and possessing a small crest on the proximal end of the ventral surface; radius and ulna not fused. Manus with distal carpals (I-IV) fused with centrale; radiale and ulnare about the same size; prepolex elements absent in *B. sp. 1* (Fig. 8c), and present with two elements in *B. sp. 2* (Fig. 10c); phalangeal formula 1-2-3-1; tips of the terminal phalangeal elements of fingers arrow-shaped (Fig. 8c, 10c). Hindlimbs with tibia and fibula fused forming the tibiofibula; femur and tibiofibula of approximately the same length; fibulare and tibiale fused, but distinguishable. Pes with distal tarsal element I absent, II-III fused, centrale present; one very reduced ossified prehallical element; toe I and V reduced, phalangeal formula 0-2-3-4-0; tips of the terminal phalangeal elements of toes II-IV arrow-shaped (Fig. 8d, 10d).

DISCUSSION

A comparison of the external morphology and osteology of *B. sp. 1* and *B. sp. 2* with that of other brachycephalid species showed that the new species can be distinguished by: (1) Body shape – bufoniform in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, and *B. vertebralis*; leptodactyliform in *B. didactyla* and *B. hermogenesi*. (2) Texture of skin – head dorsum and central body dorsum smooth with no dermal co-ossification; granular on the

dorsolateral surfaces of body, flanks, and dorsal surface of thighs in *B. sp. 1*, *B. sp. 2* and *B. pernix*; smooth, granular only on the ventral surface around the cloacal opening in *B. didactyla* and *B. hermogenesi*; with dermal co-ossification on head dorsum and central body dorsum in *B. ehippium* and *B. vertebralis*; and with ossified warts in *B. nodoterga*. (3) Colour in life – orange without marks or spots in *B. sp. 1* and *B. ehippium*; brown with variable amount of orange markings and spots on belly, throat, and ventral surface of limbs in *B. sp. 2*; brownish with a dorsal dark X mark, lateral surfaces dark brown in *B. didactyla* (IZECKSOHN, 1971); brownish yellow to pale brown, eventually with dark grey stripes on dorsal surfaces of hind limbs and a lateral dark brown stripe from the posterior edges of eye to flank in *B. hermogenesi* (GIARETTA; SAWAYA, 1998); orange greyish in *B. nodoterga* (HEYER *et al.*, 1990); orange with black spots on dorsolateral surfaces, flanks and hind limbs in *B. pernix* (POMBAL JR. *et al.*, 1998); unknown in *B. vertebralis*, but probably orange. (4) Snout shape in dorsal view – rounded in *B. sp. 1*, *B. ehippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix* and *B. vertebralis*; mucronate in *B. sp. 2*; short pointed with a rounded tip (subacuminate) in *B. didactyla* and *B. hermogenesi*. (5) Nostrils shape – protuberant in *B. sp. 1* and *B. sp. 2*; not protuberant in *B. ehippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. vertebralis*, *B. didactyla* and *B. hermogenesi*. (6) Canthus rostralis shape – not distinct in *B. sp. 1*, *B. didactyla*, *B. ehippium*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, *B. pernix* and *B. vertebralis*; distinct and sinuous in *B. sp. 2*. (7) External trace of toe V – absent in *B. sp. 1* and *B. pernix*; present but reduced in *B. sp. 2*, *B. didactyla*, *B. ehippium*, *B. nodoterga*, and *B. vertebralis*; present and functional in *B. hermogenesi*. (8) Outer metatarsal tubercle – present in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. didactyla*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, and *B. vertebralis*; absent in *B. ehippium* and *B. pernix*.

A comparison of the osteology of *B. sp. 1* and *B. sp. 2* with that of other brachycephalid species showed that the new species can be distinguished by: (9) Ornamentation of skull dermal roofing bones – unornamented and with no co-ossification of skin to bones in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; exostosis and co-ossification present in *B. ehippium*. (10) Degree of fusion of paired skull bones – distinct and not fused with surrounding elements in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; completely fused in *B. ehippium*. (11) Presence and form of quadratojugals – present and slender in *B. sp. 1*, *B. sp. 2* and *B. pernix*; very slender in *B. hermogenesi*; absent in *B. ehippium*. (12) Presence of neopalatines – present in *B. sp. 1*, *B. sp. 2* and *B. pernix*; absent in *B. hermogenesi* and *B. ehippium*. (13) Presence and number of maxillary odontoids – present and few in number (6-8) in *B. sp. 1*, *B. sp. 2* and *B. pernix*; present and numerous in *B. hermogenesi*;

absent in *B. ehippium*. (14) Degree of reduction of vomers – reduced in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; very reduced in *B. ehippium*. (15) Form of squamosals – complete in *B. sp. 1*, *B. sp. 2* and *B. pernix*; with anterior zygomatic ramus reduced and ramus ventral laterally expanded in *B. hermogenesi*; fused to prootic and with zygomatic ramus very reduced in *B. ehippium*. (16) Form of pterygoids – relatively robust in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; very slender in *B. ehippium*. (17) Fusion of the cultriform process of parasphenoid to sphenethmoid – not fused in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; fused in *B. ehippium*. (18) Fusion of IV-V and VI-VII presacral vertebrae – absent in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix*; present in *B. ehippium*. (19) Form of tips of the terminal phalangeal elements – arrow-shaped in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. ehippium*, and *B. pernix*; claw-shaped in *B. hermogenesi*. (20) Form of hyoid – about twice as long as wide at midline and with lateral process of hyoid plate short in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. ehippium*, and *B. pernix*; three times as long as wide and without lateral process of hyoid plate in *B. hermogenesi*.

According to POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEIN (1998), a diagnostic character of *B. pernix* is the absence of co-ossification dorsal to the vertebrae. In the present study, we verified that *B. sp. 1* and *B. sp. 2* also lack the co-ossification dorsal to the vertebrae and, furthermore, we verified that in *B. pernix*, *B. sp. 1*, and *B. sp. 2* the skull does not show co-ossification. This condition of vertebrae and skull co-ossification is also present in *B. hermogenesi* (ALVES, unpublished data). The absence of hyperossification in the skull of *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix* results also in the paired skull bones not being fused. Of the species of *Brachycephalus* for which osteology has been described, *B. ehippium* is uniquely characterized by a high degree of hyperossification, with exostosis and co-ossification of the skull and vertebral column, fusion of paired skull bones, of the squamosals to the prootic, of the cultriform process of the parasphenoid to the sphenethmoid, and of the IV-V and VI-VII presacral vertebrae (ALVES unpublished data; TRUEB, 1993; YEH, 2002).

We also observed that the skull of *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. hermogenesi*, and *B. pernix* has bone elements that are not present in *B. ehippium* and *B. didactyla*; the two species for which information on skull osteology is available (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TRUEB, 1993; YEH, 2002). Of the three skull bones absent in *B. ehippium* and *B. didactyla* (YEH, 2002) two, the quadratojugals and neopalatines, are present in *B. sp. 1* and *B. sp. 2*. The quadratojugals are also present in *B. pernix* and *B. hermogenesi*. The neopalatines are present in *B. pernix* but not in *B. hermogenesi*. The third bone element, the columel, is absent in all

Brachycephalus species analysed here. Other skull bones, including the vomers, squamosals and pterygoids, showed different degrees of reduction.

The appendices of the species analysed in this study also showed patterns of presence, reduction, and absence. The manus phalangeal formula (1-2-3-1) is identical and preplex elements are absent (or very reduced) in all of the species examined. The pes phalangeal formulae show different degrees of reduction: 0-2-3-4-0 in *B. sp. 1*, *B. sp. 2*, *B. ephippium*, and *B. pernix*, and 0-2-3-4-2 in *B. hermogenesi*, which has the functional toe V with two phalanges. Prehallical elements are very reduced in all species. The usual anuran manus phalangeal formula is 2-2-3-3, and that of pes is 2-3-3-4-3. All of the species analysed show loss of phalanges in the manus and pes.

Patterns of presence, reduction, and absence of the osseous elements such as those seen here can be explained in terms of ontogenetic development or processes of miniaturization. In the case of the skull, the bones that are lost or reduced are frequently those that appear late in ontogeny, usually after metamorphosis. Although this may be a common phenomenon in miniaturized species, the loss or reduction is not correlated with size (YEH, 2002). On the other hand, the reduction in hands and feet involving the loss of phalanges is related to the evolution of miniaturization, which is operationally defined as a maximum SVL of 25 mm in adult individuals (YEH, 2002). Based on this definition, all species of *Brachycephalus* described so far are miniaturized since the SVL varies from 8 to 18 mm (MIRANDA-RIBEIRO, 1920; IZECKSOHN, 1971; GIARETTA; SAWAYA, 1998; POMBAL JR.; WISTUBA; BORNSCHEIN, 1998; POMBAL JR., 2001).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Camarão for helping in the fieldwork, J. Somera for the line drawings, G. Machado for the photographs, and J. P. Pombal Jr. for loaning material under his care. We are indebted to S. Hyslop for reviewing the English of the manuscript. Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 473996/03-0 and 302341/02-1), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP 2000/00805-9 and 2001/13341-3). L. F. Ribeiro was supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) doctoral scholarship and A. C. R. Alves by a postdoctoral FAPESP fellowship (03/12396-4).

LITERATURE CITED

- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L., 1986 – **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill Book Co., New York, New York, 696 pp.
- FROST, D. R., 2004 – **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GIARETTA, A.A.; SAWAYA, R.J., 1998 – Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). **Copeia**, **1998**, 985–987.
- HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E., 1990 – Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia (São Paulo)**, **31**, 231-410.
- IZECKSOHN, E., 1971 – Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Boletim do Museu Nacional (Zoologia)**, **280**, 1-12.
- KAPLAN, M., 2002 – Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus *Psyllophryne* (Brachycephalidae). **Amphibia-Reptilia**, **23**, 225–227.
- LYNCH, J.D.; DUELLMAN, W.E., 1997 – Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. **Special Publication of the University of Kansas, Natural History Museum**, **23**, 1–236.
- MIRANDA-RIBEIRO, A., 1920 – Os brachycephalideos do Museu Paulista. **Revista do Museu Paulista**, **12**, 306-318.
- POMBAL JR., J.P., 2001 – A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Atlantic rain forest of southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, **22**, 179-185.
- POMBAL JR., J.P.; WISTUBA, E.M.; BORNSCHEIN, M.R., 1998 – A new species of brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. **Journal of Herpetology**, **32** (1), 70–74.
- SMITHE, F.B., 1975 – **Naturalist's Color Guide**. American Museum of Natural History, New York, New York.
- TAYLOR, W.; VAN DYKE, G.C., 1985 – Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bones and cartilage study. **Cybium**, **9**, 107–119.
- TRUEB, L., 1993 – Patterns of diversity in the Lissamphibian skull. *In*: HANKEN, J., J.; HALL, B.K. (Eds.), **The Skull. Vol. 2. Patterns of Structural and Systematic Diversity**. University of Chicago Press, Chicago, pp. 255-343.

YEH, J., 2002 – The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs.
Evolution, **56**, 628-641.

APPENDIX I

Comparative specimens examined – **Brachycephalus didactylus**: *Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Ilha Grande MNRJ 31201; Sacra Família do Tinguá MNRJ 25402–25404, 25415–25421. B. ephippium: *Rio de Janeiro, Rio de Janeiro MNRJ 25346, 27577–78, 30919–29; Itatiaia MNRJ 23581–86; São Paulo, Atibaia CFBH 7389 (cleared and stained). B. hermogenesi: *São Paulo, Ubatuba CFBH 4041 (cleared and stained), MNRJ 18662–63 (paratopotypes), 18624–25 (paratypes). B. nodoterga: *São Paulo, Serra da Cantareira MZUSP 0975 (holotype); Boracéia MUZUSP 30625–26, 30653; Ilha Bela MNRJ 23633–641. B. pernix: *Paraná, Quatro Barras ZUEC 9433–37 (paratopotypes), MHNCI 1818–19 (paratopotypes), 3000–04, CFBH 7390 (cleared and stained). B. vertebralis: *Rio de Janeiro, Parati MNRJ 11098 (holotype), 11094–96, 11106–11107, 11116–11118, 11120, 11131–1132 (paratopotypes).******

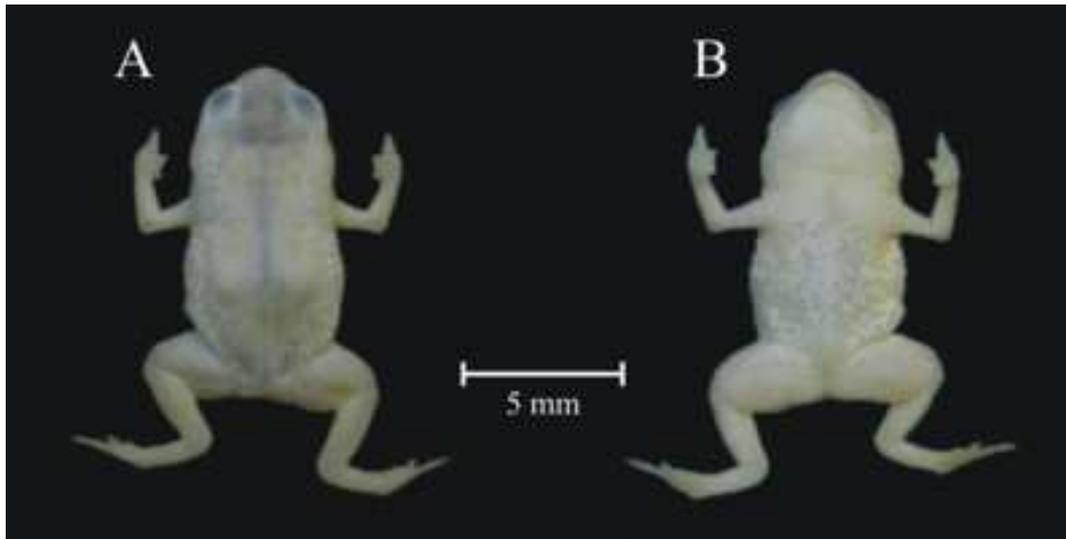


Fig. 1 – *Brachycephalus* sp. 1, CFBH 7388 (holotype), adult male from Pico Torre da Prata, between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil. (a) Dorsal view, (b) ventral view. SVL = 10.5 mm.

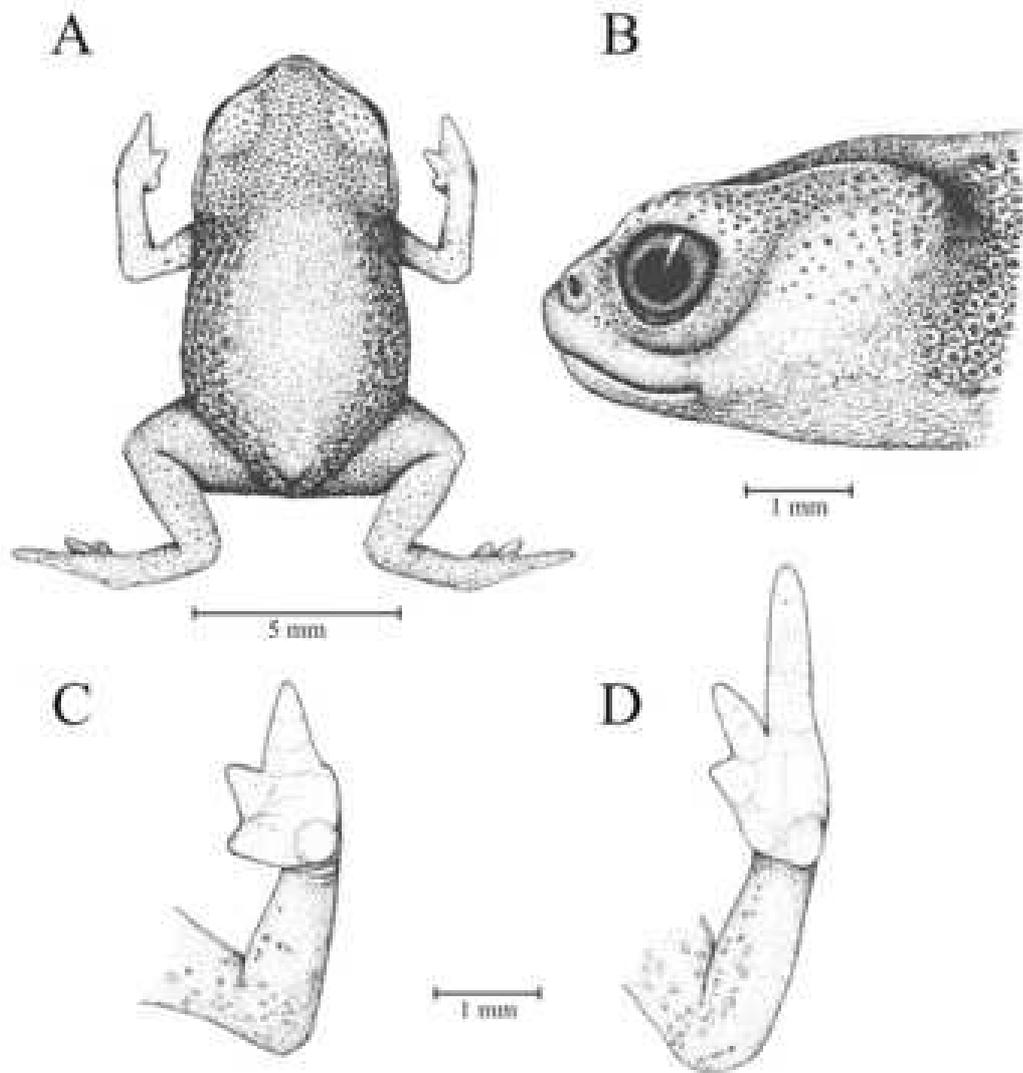


Fig. 2 – *Brachycephalus* sp. 1, CFBH 7388 (holotype). (a) Dorsal view of body, (b) lateral view of head, (c) left hand, and (d) left foot.



Fig. 3 – Live specimen of *Brachycephalus* sp. 1 from Pico Torre da Prata, between the municipalities of Guaratuba and Paranaguá, Paraná State, southern Brazil.

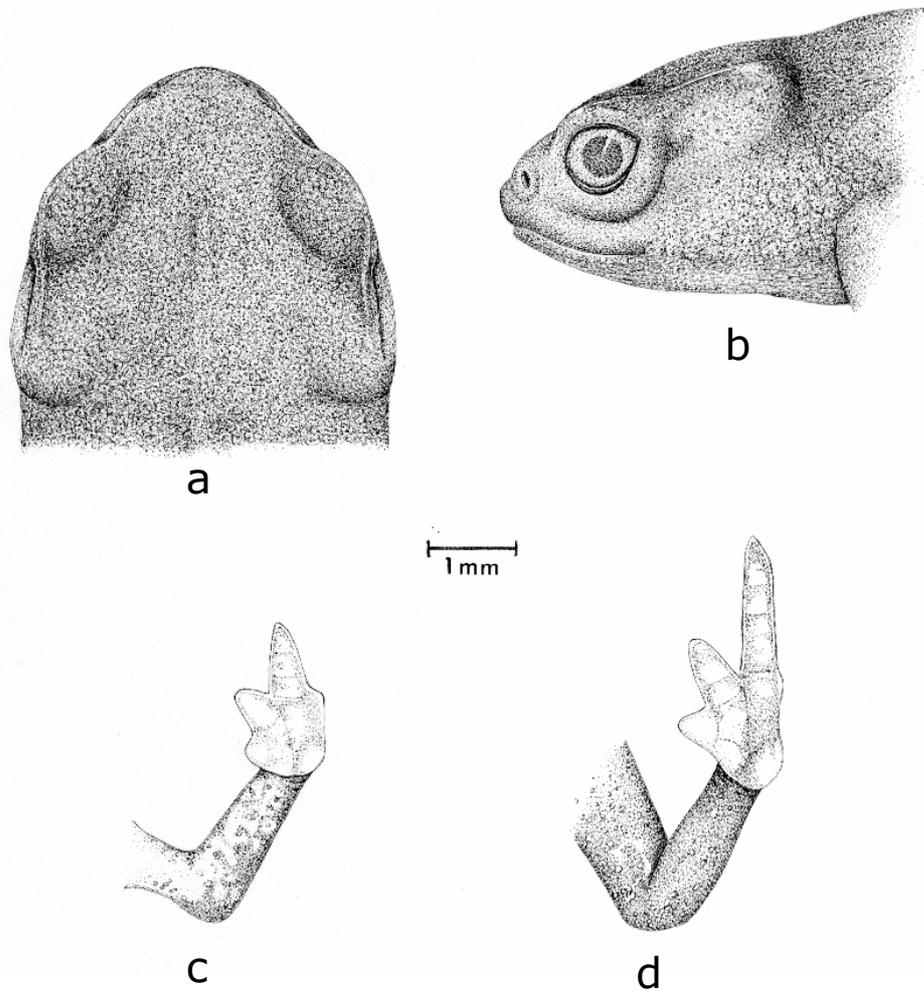


Fig. 4 – *Brachycephalus* sp. 2, CFBH 7879 (holotype). (a) Dorsal view of body, (b) lateral view of head, (c) left hand, and (d) left foot.



Fig. 5 – Live specimen of *Brachycephalus* sp. 2 from Pico Caratuva (25° 14' S; 48° 50' W), municipality of Campina Grande do Sul, Paraná State, southern Brazil.

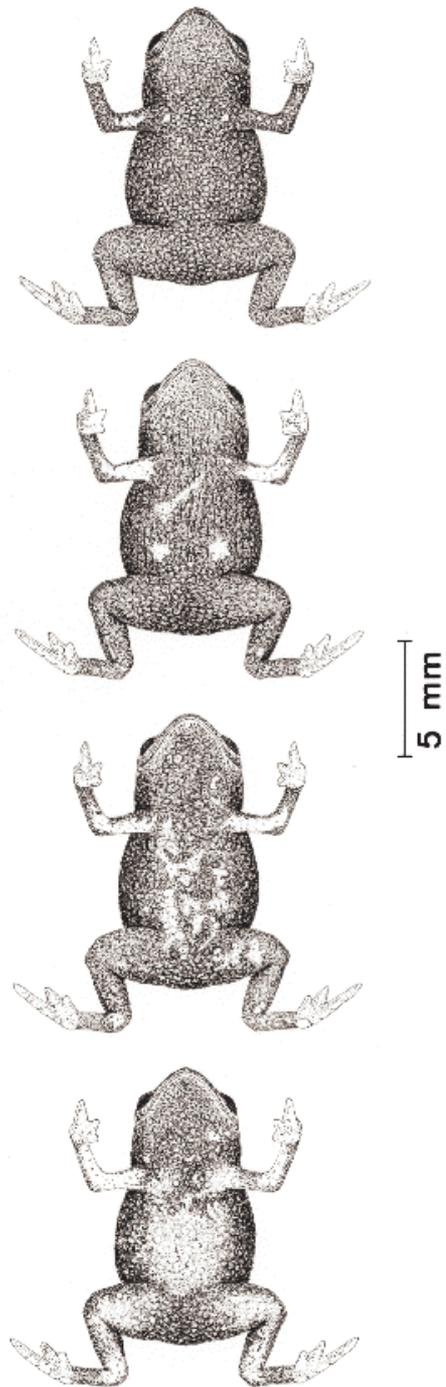


Fig. 6 – Colour variation of *Brachycephalus* sp. 2 in ventral view.

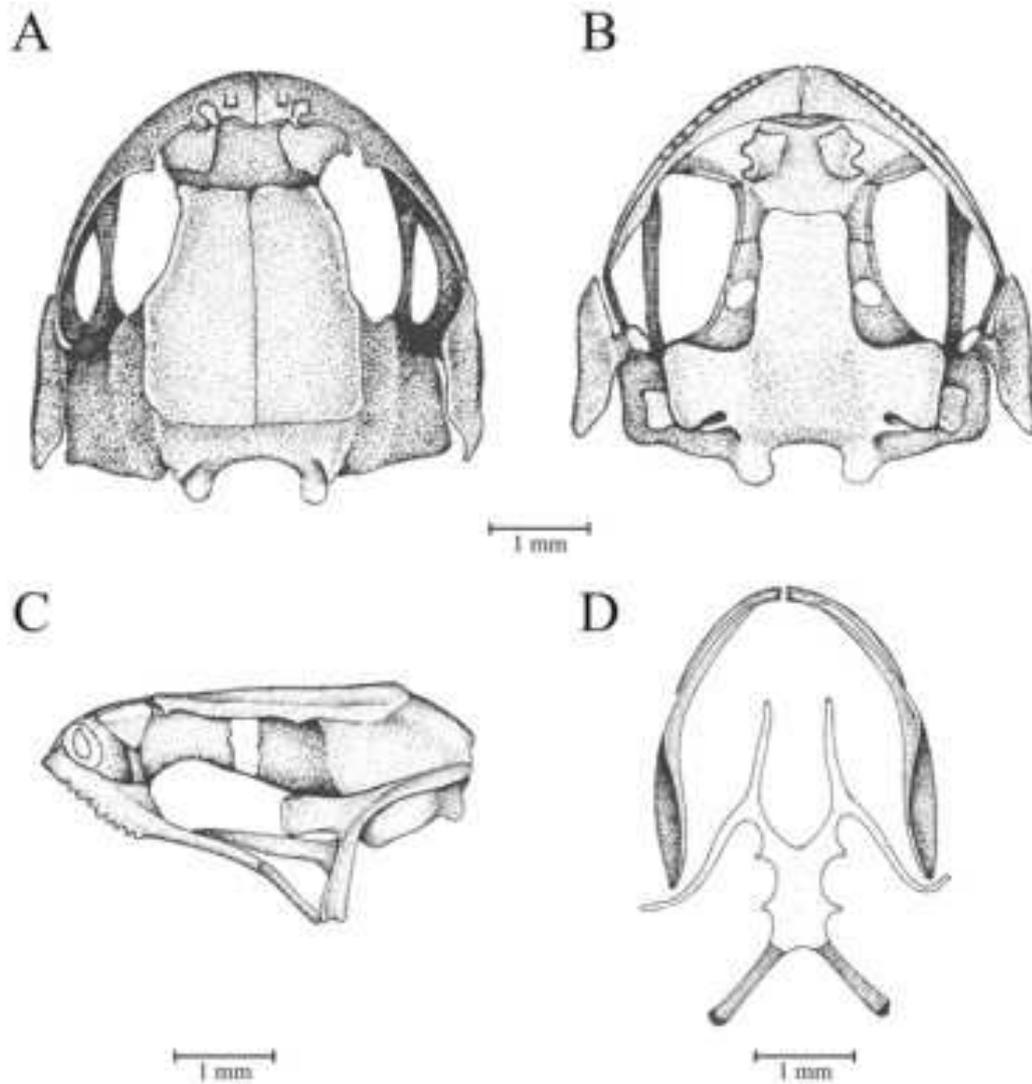


Fig. 7 – *Brachycephalus* sp. 1 (CFBH 7374, 7378). (A) Dorsal, (B) ventral and (C) lateral views of skull, (D) ventral view of mandible and hyoid apparatus.

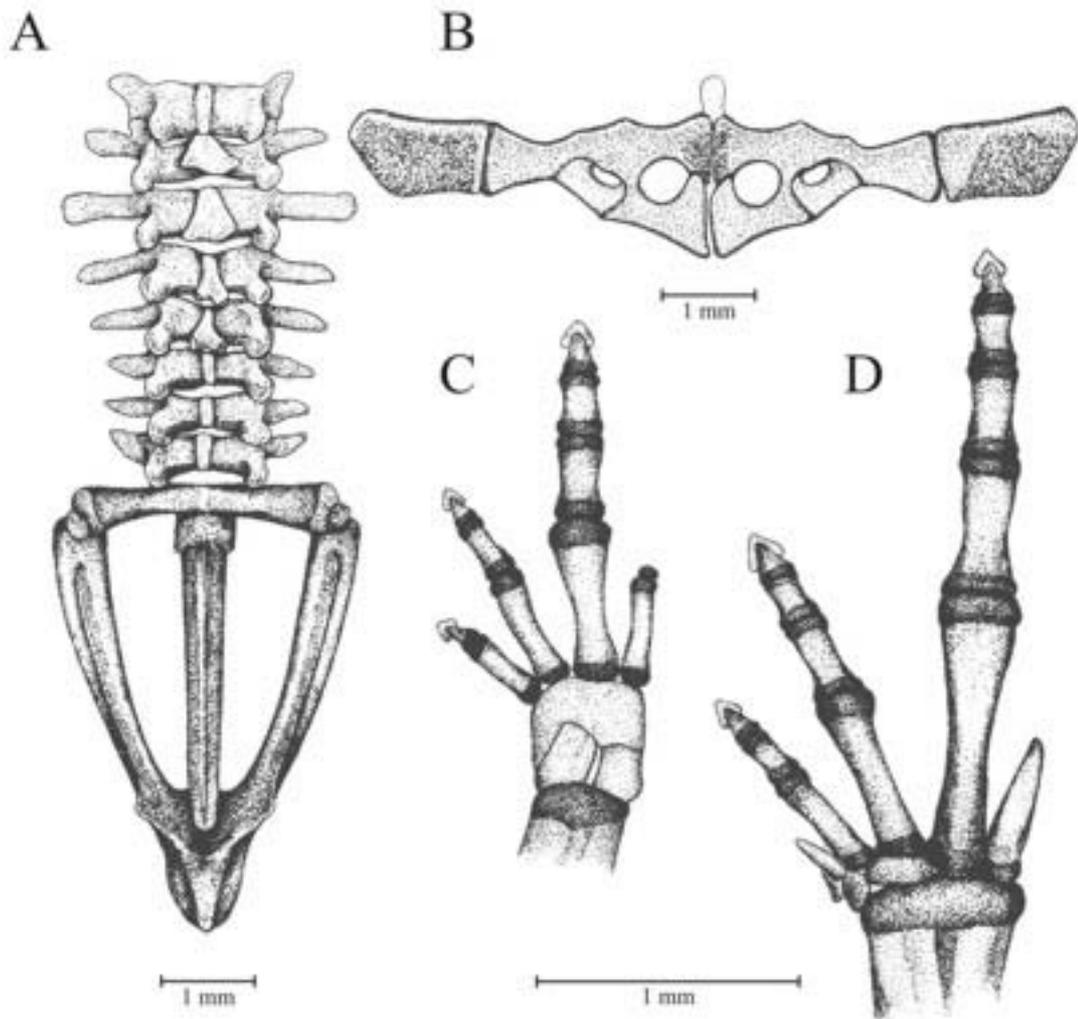


Fig. 8 – *Brachycephalus* sp. 1 (CFBH 7374, 7378). (A) Dorsal view of vertebral column and pelvic girdle, (B) ventral view of pectoral girdle with scapula and suprascapula deflected, (C) dorsal view of right hand, (D) dorsal view of right foot

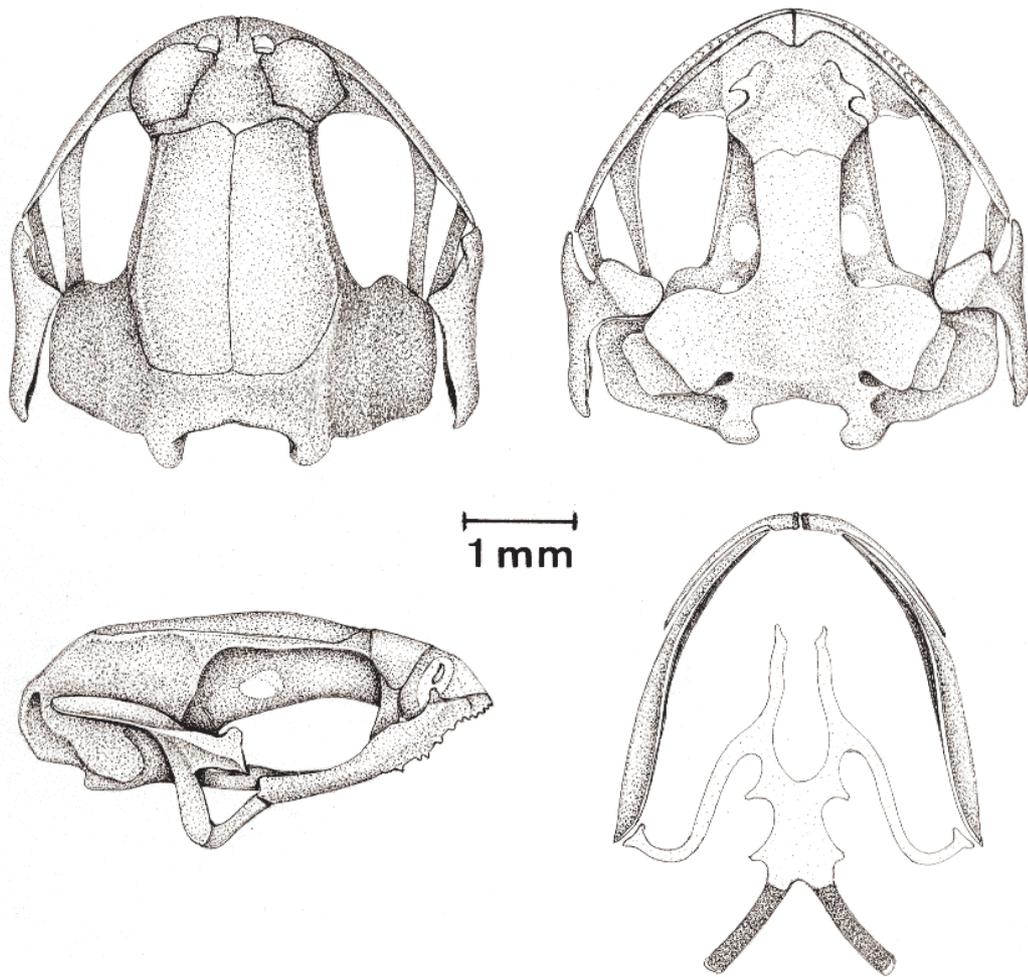


Fig. 9 – *Brachycephalus* sp. 2 (CFBH 7903-05). (a) Dorsal, (b) ventral and (c) lateral views of skull, (d) ventral view of mandible and hyoid apparatus.

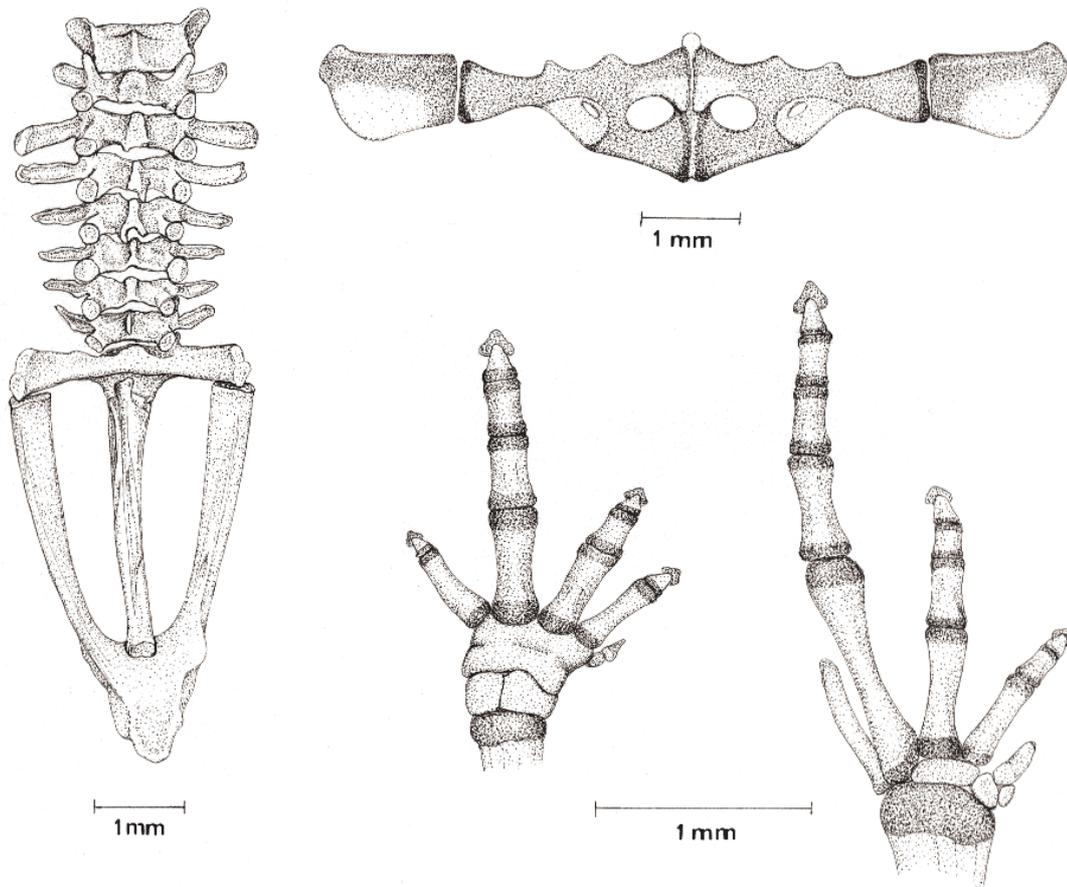


Fig. 10 – *Brachycephalus* sp. 2 (CFBH 7903-05). (a) Dorsal view of vertebral column and pelvic girdle, (b) ventral view of pectoral girdle with scapula and suprascapula deflected, (c) dorsal view of left hand, (d) dorsal view of left foot.

Table 1. Measurements in millimeters of the type series *Brachycephalus* sp. 1 (\bar{x} = mean; SD = standard deviation). Character abbreviation listed in the Material and Methods.

	Males ($n = 11$)			Females ($n = 4$)		
	\bar{x}	SD	Range	\bar{x}	SD	Range
SVL	11.1	0.5	10.3-12.1	12.8	0.2	12.5-13.1
HL	4.1	0.3	3.8-4.5	4.5	0.2	4.3-4.6
HW	4.5	0.2	4.3-4.8	5.3	0.2	5.0-5.5
ED	1.1	0.0	1.0-1.2	1.1	0.1	1.0-1.2
ND	0.2	0.0	0.2-0.2	0.2	0.0	0.2-0.2
IOD	2.0	0.1	1.9-2.2	2.2	0.1	2.1-2.4
IND	1.0	0.1	0.9-1.2	1.2	0.1	1.1-1.2
END	0.6	0.0	0.5-0.6	0.7	0.0	0.6-0.7
THL	4.1	0.2	3.6-4.3	4.6	0.2	4.3-4.8
TBL	3.8	0.3	3.4-4.4	4.3	0.2	3.9-4.5

Table 2. Proportions in % of the type series of *Brachycephalus* sp. 1 (\bar{x} = mean; SD = standard deviation). Character abbreviation listed in the Material and Methods.

	Males ($n = 11$)			Females ($n = 4$)		
	\bar{x}	SD	Range	\bar{x}	SD	Range
THL/SVL	37	2	34-39	36	1	34-38
TBL/THL	95	5	84-102	93	7	84-104
HL/SVL	37	2	33-40	35	1	34-36
ED/HL	27	1	25-30	25	2	22-27

Table 3. Measurements in millimeters of the type series *Brachycephalus* sp. 2 (\bar{x} = mean; SD = standard deviation). Character abbreviation listed in the Material and Methods.

	Males ($n = 15$)			Females ($n = 9$)		
	\bar{x}	SD	Range	\bar{x}	SD	Range
SVL	10.2	0.65	9.3-11.3	11.7	0.36	10.9-12.0
HL	3.8	0.18	3.6-4.3	4.4	0.22	3.9-4.8
HW	3.9	0.18	3.8-4.4	4.5	0.12	4.3-4.7
ED	0.9	0.08	0.8-1.0	1.0	0.07	0.9-1.1
ND	0.2	0.00	0.2-0.2	0.2	0.00	0.2-0.2
IOD	2.0	0.10	1.8-2.1	2.2	0.12	2.1-2.4
IND	0.9	0.09	0.7-1.1	1.1	0.13	0.9-1.3
END	0.5	0.07	0.4-0.6	0.6	0.07	0.5-0.7
THL	3.6	0.22	3.4-4.2	4.1	0.23	3.7-4.3
TBL	3.3	0.28	2.9-3.9	3.6	0.29	3.3-4.0

Table 4. Proportions in % of the type series of *Brachycephalus* sp. 2 (\bar{x} = mean; SD = standard deviation). Character abbreviation listed in the Material and Methods.

	Males ($n = 15$)			Females ($n = 9$)		
	\bar{x}	SD	Range	\bar{x}	SD	Range
THL/SVL	35%	2%	32-38%	35%	2%	32-37%
TBL/THL	92%	6%	82-100%	89%	5%	84-100%
HL/SVL	37%	2%	33-41%	37%	1%	36-40%
ED/HL	24%	2%	20-29%	23%	2%	19-24%

6. CAPÍTULO 3. VARIAÇÃO MOLECULAR EM *Brachycephalus* DA SERRA DO MAR NO ESTADO DO PARANÁ (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE)

6. 1. INTRODUÇÃO

No Capítulo 1 desta tese, as populações de *Brachycephalus* das localidades de Pico Caratuva na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja ocorrendo na Serra do Mar na região leste do Estado do Paraná foram caracterizadas em termos da variação cromática e foi demonstrado que cada uma das populações pode ser unicamente diagnosticada pela cor do tegumento. No Capítulo 2 foram descritas formalmente no nível de espécie as populações das localidades Pico Caratuva na Serra Ibitiraquire e Torre da Prata na Serra da Prata, tendo sido também demonstrado que estas duas entidades podem ser unicamente diagnosticadas por combinações de traços osteológicos. A descrição formal, no nível de espécie, das populações de Pico Marumbi na Serra do Marumbi e Pico da Igreja na Serra da Igreja não é apresentada nesta tese, mas os nossos dados demonstram que estas populações também são unicamente diagnosticadas por traços osteológicos.

Neste Capítulo, as relações filogenéticas dos *taxa* ocorrendo no Estado do Paraná (Figura 1), ou seja, *B. pernix*, *B. sp. 1* (Pico da Torre da Prata), *B. sp. 2* (Pico Caratuva) e as populações ainda não formalmente descritas das localidades de Pico Marumbi e Pico da Igreja foram investigadas utilizando seqüências do gene mitocondrial citocromo *b*. Este gene mitocondrial tem sido intensamente utilizado para inferir relações filogenéticas em diferentes níveis de divergência em anfíbios (*e.g.*, GOEBEL *et al.*, 1999) e, por conseguinte, tem o potencial de ser informativo para descrever relações de ancestralidade comum mais recente nas populações de *Brachycephalus* que ocorrem no Estado do Paraná.

6. 2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído seguindo protocolos delineados por BRUFORD *et al.* (1992) e MIYAKI *et al.* (1998). Um pequeno fragmento de tecido com aproximadamente 2 mg de cada espécimen foi colocado em tubo *Eppendorf* contendo tampão de lise composto por 300 µl TNE 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 6,3 mM pH 8,0), 30 µl Tris-HCl 1M

pH 8,0, 20 µl de SDS 10% e 25 µl de proteinase K (10 mg/ml). As amostras imersas em tampão de lise foram mantidas a 55° C por quatro horas ou até que todo o tecido fosse digerido. Durante a última hora da etapa de lise do tecido, ou seja, após três horas de permanência dos tubos na estufa a 55° C, foram adicionados 8 µl de RNase A (10 mg/ml). Após a digestão completa do tecido, o DNA genômico foi obtido a partir de duas extrações sucessivas, utilizando-se 400 µl (300 µl na segunda extração) de fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1). Em cada extração, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi concentrado com 60 µl de acetado de sódio (NaAc) 3M pH 5,3, precipitado com 600 µl de etanol absoluto e levado ao *freezer* (– 20° C) por 12 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm e os precipitados de DNA foram lavados duas vezes com etanol 70% e ressuspendidas com 150 µl de água estéril. A qualidade e concentração do DNA extraído foram verificadas em gel de agarose de 0,7 %, em tampão TAE 0,5X e corado com brometo de etídio para visualização em luz ultra-violeta. Para a quantificação do DNA extraído foram utilizados padrões de peso molecular (DNA λ). As amostras de DNA extraído foram armazenadas no *freezer* (– 20° C).

6.2.2. Amplificação do gene mitocondrial citocromo *b*

Um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b* foi amplificado com os *primers* MVZ15-L (5' GAACTAATGGCCCACACWWTACG 3') e Cytba-H (5' TCTTCTACTGGTTGWCCYCCRATTC 3'; GOEBEL *et al.*, 1999). O tamanho predito do fragmento, com relação à escala de referência do genoma mitocondrial de *Rana* (YONEYAMA, 1987) é de 850 pares de bases. As amplificações pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas em um termociclador *Perkin-Elmer – Gene Amp PCR System 9700*. Cada reação de PCR incluiu 10,0 µl de dNTP 1,25 mM, 5,0 µl de tampão (10X) para Taq polimerase, 0,5 µl de Taq polimerase 5000U/ml, 5,0 µl de cada um dos *primers* em concentração 5µM, 0,2-1,0 de amostra de DNA (concentração de 30 ng/µl na reação) e a quantidade de ddH₂O necessária para completar o volume de 50 µl. As condições para amplificação por PCR para um total de 36 ciclos foram as seguintes: desnaturação, 94°C – 30 segundos; hibridização, 63°C – 45 segundos;

extensão, 72°C – 1 minuto; extensão final, 72°C – 7 minutos. Os produtos amplificados nas reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2%, solubilizado em tampão TAE 0,5X e corado com brometo de etídio para visualização em luz ultra-violeta. O tamanho dos produtos obtidos nas reações de PCR foi confirmado com os pesos moleculares de 1 kilo-bases e 100 pares de bases.

6.2.3. Seqüenciamento do gene mitocondrial citocromo *b*

Os fragmentos do gene mitocondrial citocromo *b* obtidos pela reação em cadeia de polimerase com os *primers* MVZ15-L e CYTBA-H em concentração de 5µM foram purificados em coluna (*Concert Rapid Gel Extraction Systems — Gibco*) para eliminação de fragmentos inespecíficos e seqüenciados no seqüenciador automático ABI 377. As reações de seqüenciamento foram feitas para as fitas leve e pesada, utilizando o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit — Applied Biosystems*. Cada reação de seqüenciamento continha 2,0 µl de tampão de seqüenciamento, 2,0 µl do *kit* para seqüenciamento, 1,0 µl do *primer* MVZ15-L (*forward*) ou do Cytba-H (*reverse*), 0,5–1,0 µl do produto de PCR purificado (concentração de 10 ng/µl de DNA na reação) e a quantidade de ddH₂O necessária para completar o volume de 10 µl. As condições para as reações de seqüenciamento foram as seguintes: 30 segundos a 96° C para desnaturação inicial; 25 ciclos de 10 segundos a 96° C para desnaturação, 30 segundos a 50° C para hibridização do *primer* e 4 minutos a 60° C para extensão da molécula. A validade das seqüências obtidas foi verificada submetendo-as ao *Nucleotide-nucleotide Blast (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/)*. Todas as seqüências apresentaram alto índice de similaridade com as seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* de anuros depositados no *GenBank*. A acurácia das seqüências obtidas foi garantida (1) pelo seqüenciamento de pelo menos dois espécimens de cada táxon e (2) pela sobreposição das fitas leve e pesada sempre que possível.

As seqüências foram editadas no programa *Sequence Navigator (Applied Biosystems)*, traduzidas com o programa *Gene Runner* e alinhadas com o programa de alinhamento múltiplo *Clustal X (THOMPSON et al., 1997)*. Os seguintes passos foram observados para avaliar a possibilidade das seqüências obtidas neste estudo serem realmente seqüências originais do gene mitocondrial citocromo *b* e não cópias de pseudogenes integradas ao núcleo (BENSASSON *et*

al., 2001): (a) as seqüências de nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos para verificar a existência de códon de parada ou mudanças do quadro de leitura e (b) as freqüências dos nucleotídeos foram calculadas para verificar a existência de *deficit* de guanina, típico de fragmentos de regiões codificadoras do DNA mitocondrial (VENCES *et al.*, 2004).

6.2.4. Seleção de modelos de substituição de nucleotídeos

O modelo mais geral de substituição de nucleotídeos é descrito pela matriz de taxas instantâneas (TAVARÉ, 1986),

$$\mathbf{Q} = \{q_{ij}\} = \begin{pmatrix} - & r_{AC}\pi_C & r_{AG}\pi_G & r_{AT}\pi_T \\ r_{AC}\pi_A & - & r_{CG}\pi_G & r_{CT}\pi_T \\ r_{AG}\pi_A & r_{AG}\pi_C & - & r_{GT}\pi_T \\ r_{AT}\pi_A & r_{CT}\pi_C & r_{GT}\pi_G & - \end{pmatrix}.$$

Nesta matriz, cada elemento q_{ij} na i -ésima linha e j -ésima coluna especifica a taxa relativa de mudança do nucleotídeo i para o nucleotídeo j e os elementos da diagonal, representados por traços, são definidos de modo que a soma de cada linha seja zero. A freqüência de cada um dos i -ésimos nucleotídeos é denotada por π . Supondo que as taxas de mutação direta e reversa são idênticas, como denotado na matriz acima, este modelo é conhecido como modelo geral reversível no tempo e incorpora seis parâmetros de taxas relativas, r_{AC} , r_{AG} , r_{AT} , r_{CG} , r_{CT} , r_{GT} e quatro parâmetros de freqüências de bases, π_A , π_C , π_G , π_T . Este modelo geral pode ser reduzido ao modelo mais simples, como o modelo de Jukes-Cantor (JUKES; CANTOR, 1969), impondo as restrições de taxas relativas de substituição idênticas e freqüência do i -ésimo nucleotídeo igual a 0,25.

A escolha do modelo de substituição que melhor descreve a evolução das seqüências do fragmento do gene mitocondrial citocromo b em estudos de sistemática molecular é geralmente feita de forma automática como implementado, por exemplo, no programa *MODELTEST* (POSADA; CRANDALL, 1998). Todavia, tem-se demonstrado recentemente que os procedimentos automatizados, como aqueles implementados no programa *MODELTEST*, não necessariamente geram o modelo que melhor descreve o processo de substituição nas seqüências de DNA de um determinado grupo de organismos (HUELSENBECK *et al.*, 2004). Por conseguinte, neste estudo foi utilizado o procedimento de seleção *backward* (DRAPER; SMITH,

1981). Neste procedimento o escore da máxima verossimilhança de uma dada topologia é calculado para o modelo completo, neste caso o modelo geral reversível no tempo. Em seguida, os escores de máxima verossimilhança de modelos aninhados e reduzidos no número de parâmetros foram computados e a significância estatística da diferença entre os modelos foi inferida pelo teste da razão de máxima verossimilhança (KENDALL; STUART, 1979; HUELSENBECK; CRANDALL, 1997). A estatística deste teste, δ , é dada por $\delta = 2 \log \Lambda$ para $\Lambda = \frac{\max[\log_e L_0]}{\max[\log_e L_1]}$, onde L_0 é o escore da máxima verossimilhança sob o modelo com menor número de parâmetros (hipótese nula) e L_1 é o escore da máxima verossimilhança sobre o modelo com o maior número de parâmetros (hipótese alternativa). Para o caso de modelos aninhados, como no presente estudo, a estatística δ tem distribuição assintótica χ^2 , com grau de liberdade igual a diferença no número de parâmetros livres entre os dois modelos (KENDALL; STUART, 1979; HUELSENBECK; CRANDALL, 1997). Quando o valor do teste da razão de máxima verossimilhança é significativo (*i.e.*, $< 0,05$), a inclusão de parâmetros adicionais no modelo alternativo aumenta significativamente a máxima verossimilhança dos dados e, por conseguinte, o modelo mais complexo é favorecido. Por outro lado, um valor de δ próximo de zero indica que a hipótese alternativa não ajusta os dados de maneira significativamente melhor do que a hipótese nula (KENDALL; STUART, 1979; HUELSENBECK; CRANDALL, 1997).

A hipótese de taxas constantes de substituição de nucleotídeos nas diferentes linhagens de *Brachycephalus* do Estado do Paraná, ou seja, a existência de um relógio molecular foi testada calculando o escore de máxima verossimilhança com a topologia obtida pelo método *Neighbor-Joining* com os parâmetros delineados pelo modelo que melhor descreve a evolução das seqüências segundo o protocolo descrito acima. O escore foi então calculado para a topologia com a imposição da hipótese do relógio molecular e com esta imposição relaxada e o modelo de melhor ajuste foi escolhido pelo teste hierárquico da razão de máxima verossimilhança (HUELSENBECK and CRANDALL, 1997).

6.2.5. Inferência filogenética

Todas as análises filogenéticas foram realizadas com o programa *PAUP** versão 4.0b4 (SWOFFORD, 2000). A quantidade de sinal filogenético foi estimada com a estatística g_1

(HILLIS, 1991; HILLIS; HUELSENBECK, 1992), calculada examinando a distribuição de comprimento de 10.000 árvores geradas aleatoriamente pelo método de máxima parcimônia. A existência de saturação foi avaliada plotando o número de substituições contra a divergência entre as seqüências, expressa em percentagem, para as três posições dos códons.

As relações filogenéticas entre os *taxa* do Estado do Paraná foram estimadas com os métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança (SWOFFORD *et al.*, 1996; FELSENSTEIN, 2004). O taxon *B. ephippium*, coletado na localidade de Atibaia no Estado de São Paulo, foi utilizado como grupo externo para enraizar as árvores filogenéticas. A análise de máxima parcimônia foi conduzida com busca heurística com as árvores iniciais obtidas com o procedimento de *stepwise addition* com 50 replicações aleatórias, usando o rearranjo de ramos *treebisection and reconnection*. Esta análise emprega um esquema de ponderação dinâmico que corrige as taxas de variação nas transições e transversões (WILLIAMS; FITCH, 1990). A estabilidade das árvores de máxima parcimônia foi avaliada por *bootstrap* não-paramétrico (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 pseudo-réplicas e os valores de *bootstrap* acima de 70% foram considerados como evidência de corroboração para um dado nó (HILLIS; BULL, 1993). As árvores de máxima verossimilhança foram obtidas com buscas heurísticas com o mesmo procedimento utilizado para as árvores de máxima parcimônia, utilizando o modelo de substituição de melhor ajuste definido procedimento de seleção *backward* (DRAPER; SMITH, 1981).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Composição de bases, variação nas seqüências e sinal filogenético

As bases nucleotídicas nos quatro taxa de *Brachycephalus* do Estado do Paraná examinados apresentaram os seguintes valores médios: A = 0,32; C = 0,24; G = 0,20; T = 0,24, sendo que nenhum dos taxa apresentou desvio significativo na composição das bases com relação aos demais ($P > 0,05$). Este resultado demonstra que, do ponto de vista estatístico, as seqüências são homogêneas. As frequências listadas acima mostram que a composição de bases observada apresenta um desvio negativo contra a guanina, no sentido desta base ter a menor frequência observada. Este desvio contra a guanina já foi observado para o genoma de diversos anfíbios anuros (*e.g.*, DAWOOD *et al.*, 2002; MACEY *et al.*, 1998; MULCAHY; MENDELSON, 2000),

sendo que este viés é característico para o genoma mitocondrial, embora não o seja para o genoma nuclear (LI, 1997). O viés observado contra a guanina e a ausência de códons de término nas seqüências analisadas neste estudo sugerem fortemente que os fragmentos amplificados representam seqüências mitocondriais do gene citocromo *b* e não cópias de genes mitocondriais integradas ao núcleo (ZHANG; HEWITT, 1996).

O número de substituições aumentou linearmente com a divergência entre as seqüências dos cinco taxa de *Brachycephalus* do Paraná, expressa em porcentagem, para as três posições dos códons. Esta relação linear indica que não há saturação e, por conseguinte, as três posições dos códons podem ser empregadas nas análises filogenéticas. Como esperado (LI, 1997), a taxa de variação das substituições em relação a divergência entre as seqüências é mais elevada para a terceira posição do que para as primeira e segunda posições dos códons. Ainda como esperado (LI, 1997), a taxa de variação primeira posição do códon é mais elevada do que a da segunda posição do códon.

A quantidade de informação filogenética nos dados de seqüências foi estimada com a estatística g_1 (HILLIS, 1991; HILLIS and HUELSENBECK, 1992), examinando a distribuição do comprimento de 10.000 árvores geradas aleatoriamente por máxima parcimônia. Nestes cálculos o taxon representando o grupo externo, *B. ephippium* foi excluído. Esta distribuição foi significativamente assimétrica à esquerda ($g_1 = -1,279$; $P < 0,01$), indicando a presença de sinal filogenético hierárquico nas seqüências analisadas (HILLIS, 1991; HILLIS; HUELSENBECK, 1992).

6.3.2. Seleção de modelos de substituição de nucleotídeos

O modelo geral reversível no tempo (TAVARÉ, 1986) foi utilizado como ponto de partida para a escolha do modelo de substituição que melhor descreve a evolução das seqüências do gene citocromo *b* amostradas dos cinco taxa de *Brachycephalus* analisados neste estudo. O teste para a escolha do melhor modelo de substituição exige uma topologia que pode ser construída com qualquer um dos métodos de reconstrução filogenética e, visto que a estimativa de parâmetros do modelo não é sensível a topologia (YANG *et al.*, 1995; POSADA; CRANDALL, 2001), uma topologia inicial foi construída utilizando um método simples como o de *Neighbor-Joining*

(SAITOU; NEI, 1987) para os cinco taxa de *Brachycephalus* utilizando a distância genética *logdet* (STEEL, 1994)

$$d_{xy} = -\ln(\det \mathbf{F}_{xy}).$$

Nesta fórmula, “det” se refere ao determinante de \mathbf{F}_{xy} , a matriz de divergências entre quaisquer seqüências x e y, estimada pelas freqüências relativas de cada par de nucleotídeos para um dado par de seqüências x e y. Estas distâncias representam uma boa estimativa inicial por serem robustas a desvios como, por exemplo, o viés na composição de bases (SWOFFORD *et al.*, 1996).

A topologia gerada pelo método de *Neighbor-Joining* com distância *logdet* foi então utilizada para estimar pelo método de máxima verossimilhança os parâmetros do modelo de substituição de nucleotídeos saturado que inclui seis taxas relativas de substituição entre nucleotídeos, o parâmetro de forma da distribuição Γ que modela as taxas variáveis dos sítios e as freqüências de nucleotídeos (Tabela 1). Podemos observar no modelo I (Tabela 1) que as taxas relativas de substituição para as duas transições r_{AG} e r_{CT} são muito semelhantes (*i.e.*, aproximadamente 4,1). Por conseguinte, um primeiro passo na simplificação do modelo de substituição saturado é igualar as duas taxas r_{AG} e r_{CT} , reduzindo o número de parâmetros. Uma nova estimativa dos parâmetros do modelo saturado foi obtida pelo método de máxima verossimilhança e a diferença entre o escore desta topologia e aquele da topologia anterior é trivial, 20642.708 *versus* 20642.703 (Tabela 2). Por conseguinte, esta segunda versão do modelo, na qual os dois tipos de transições foram combinados é aceita. Podemos observar ainda (Tabela 2) que a taxa relativa para a substituição *CG* ($r_{CG} = 1,158$) pouco difere da taxa para a substituição *GT* ($r_{GT} = 1$). Estas duas taxas relativas também foram agrupadas, calculando-se novamente o escore de máxima verossimilhança da topologia (Tabela 3). O escore da máxima verossimilhança deste modelo (20643.187) pouco difere do escore de máxima verossimilhança do modelo anterior (20642.708), sendo que a diferença entre os dois escores, 0,479, não é estatisticamente diferente como indicado pelo teste da razão de máxima verossimilhança ($P = 0,33$).

Este mesmo protocolo foi aplicado à topologia inicial para testar modelos mais simplificados envolvendo a combinação de distintas classes relativas de substituição e a

suposição de frequências de bases idênticas. Todavia, em todos os casos os escores de máxima verossimilhança foram estatisticamente menores que o escore do modelo sumarizado na Tabela 3. Portanto, o modelo III (Tabela 3), que envolve frequências distintas para cada nucleotídeo, diferentes taxas relativas para as substituições e taxas variáveis ao longo dos sítios com distribuição Γ é aquele que melhor descreve o padrão de evolução espaço-temporal da substituição dos nucleotídeos nas seqüências de *Brachycephalus* analisadas neste estudo.

É interessante notar que o melhor aqui escolhido como a melhor aproximação do processo que gerou a variabilidade observada nas seqüências do gene citocromo *b* nos cinco taxa de *Brachycephalus* analisados não se encontra entre os modelos classicamente utilizados (HUELSENBECK; CRANDALL, 1997). Este modelo não teria sido encontrado utilizando procedimentos de seleção de modelos automatizados como aqueles implementados no programa *MODELTEST* (POSADA; CRANDALL, 1998). Neste sentido procedimentos não-automatizados de seleção de modelos como a estratégia *backward* aqui utilizada parecem ser mais informativos, pois permitiram demonstrar que o modelo aqui escolhido como aquele que melhor se ajusta aos dados das seqüências dos *Brachycephalus* não faz parte dos modelos definidos no programa *MODELTEST*. Resultados semelhantes foram obtidos recentemente por HUELSENBECK *et al.* (2004), embora em um contexto teórico diferente, utilizando inferência Bayesiana para seleção de modelos.

A premissa de relógio molecular resultou em uma árvore com um escore de máxima verossimilhança menor do que o escore da árvore mais complexa sem a suposição de um relógio molecular ($\log L_{\text{com relógio}} = -6605,80$, $\log L_{\text{sem relógio}} = -6509,55$; estatística do teste da razão de máxima verossimilhança $\delta = 192,50$; $P < 0,05$). Por conseguinte, a árvore mais simples com taxas de substituição idênticas em todas as seqüências foi rejeitada, demonstrando, assim, que as diferentes linhagens de *Brachycephalus* aqui analisadas possuem taxas de evolução molecular distintas.

6.3.3. Relações filogenéticas

O conjunto de dados do fragmento do gene citocromo *b* com os cinco taxa de *Brachycephalus* do Paraná e o grupo externo, *B. ephippium* da localidade de Atibaia no Estado de São Paulo, compreende 850 pares de bases dos quais 383 variaram nos taxa amostrados e destes

195 foram informativos segundo o critério de máxima parcimônia. Como demonstrado anteriormente, não houve evidência de saturação na terceira posição do códon para o fragmento do gene citocromo *b* e, por conseguinte, os dados para as três posições do códon foram utilizados nas análises filogenéticas. A análise de máxima parcimônia recuperou uma única árvore mais parcimoniosa com valores de *bootstrap* para os nós superiores a 90%. Uma topologia idêntica, que é apresentada na Figura 2, foi obtida pela análise de máxima verossimilhança (escore de verossimilhança = 1.0481,49), com valores de *bootstrap* para o nós também superiores a 90%. A árvore filogenética inferida por máxima verossimilhança mostra que os *taxa* do Estado do Paraná formam um grupo monofilético com relação ao grupo externo, aqui representado por *B. ephippium*. Os dois *taxa* representados pelas populações das localidades de Torre da Prata (*Brachycephalus* sp. 1) e Pico da Igreja formam linhagem cujo grupo-irmão é composto por *B. pernix* e os *taxa* das localidades de Pico Marumbi e Pico Caratua (*Brachycephalus* sp. 2). Nesta última linhagem, *B. pernix* e o *taxon* do Pico Marumbi compartilham um ancestral comum mais recente.

A topologia da árvore filogenética para os *taxa* de *Brachycephalus* do Estado do Paraná é altamente consistente uma vez que foi gerada não somente pelos métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, mas também pelo método de *Neighbor-Joining* utilizado como condição inicial (FELSENSTEIN, 2004) na escolha do melhor de substituição de nucleotídeos (ver *Seleção de modelos de substituição de nucleotídeos*). O gene mitocondrial citocromo *b*, assim como demonstrado em outros estudos (e.g., TARKHNISHVILI *et al.*, 2000; KOSUCH *et al.*, 2000; AUSTIN *et al.*, 2004), mostrou-se extremamente útil para resolver as relações filogenéticas nos *taxa* de *Brachycephalus* do Estado do Paraná. Estes resultados sugerem que os *taxa* de *Brachycephalus* do Estado do Paraná formam um grupo monofilético, embora no presente estudo apenas uma espécie de *Brachycephalus*, *B. ephippium*, com distribuição fora do Estado do Paraná tenha sido amostrada. Naturalmente a hipótese de monofiletismo dos *Brachycephalus* do Estado do Paraná só poderá ser confirmada com uma análise filogenética de todos os *taxa* de *Brachycephalus*.

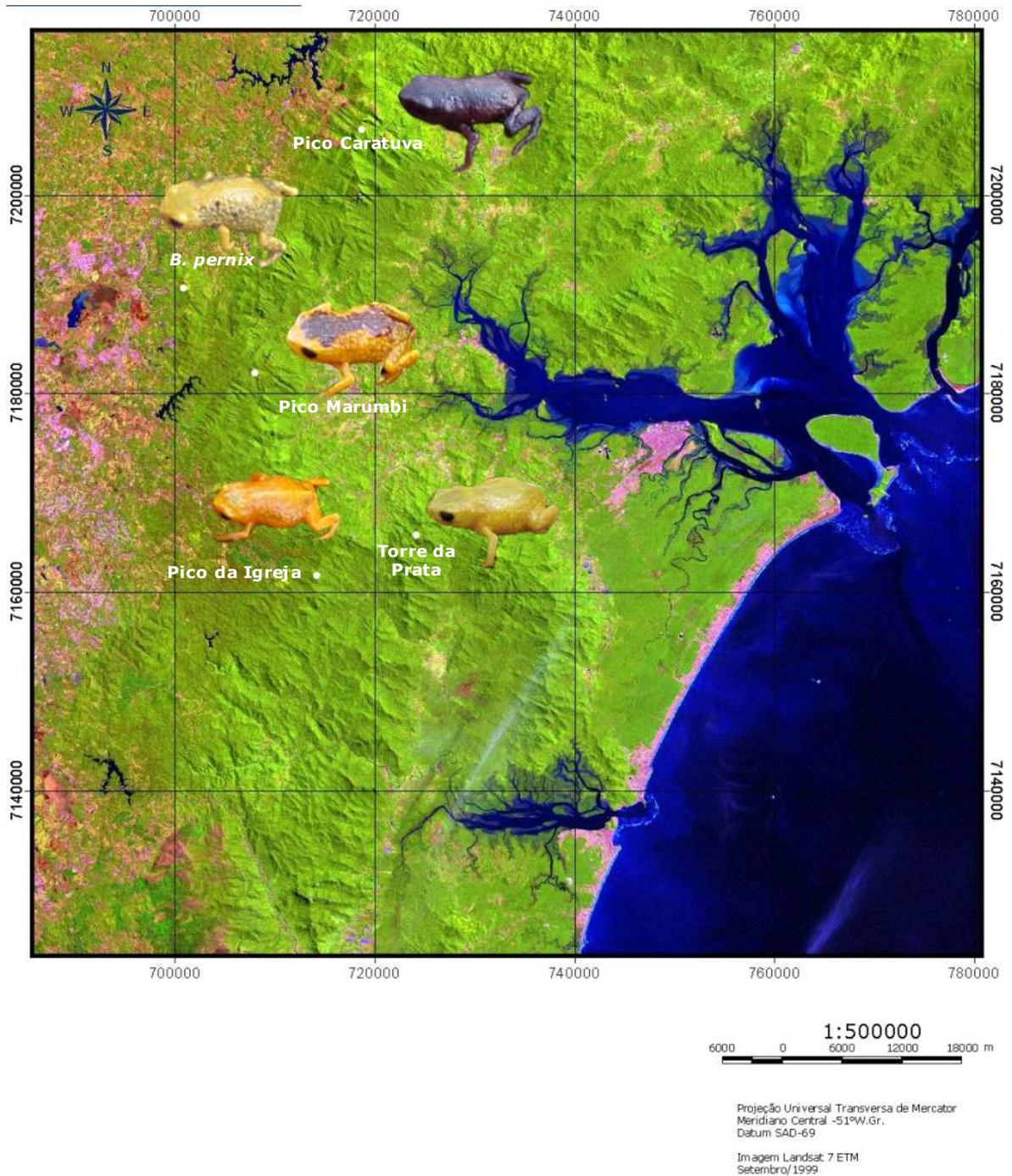


Figura 1. Localidades na Serra do Mar no Estado do Paraná de *Brachycephalus pernix* e populações do Pico Caratuva, Pico Marumbi, Pico da Igreja e Torre da Prata.

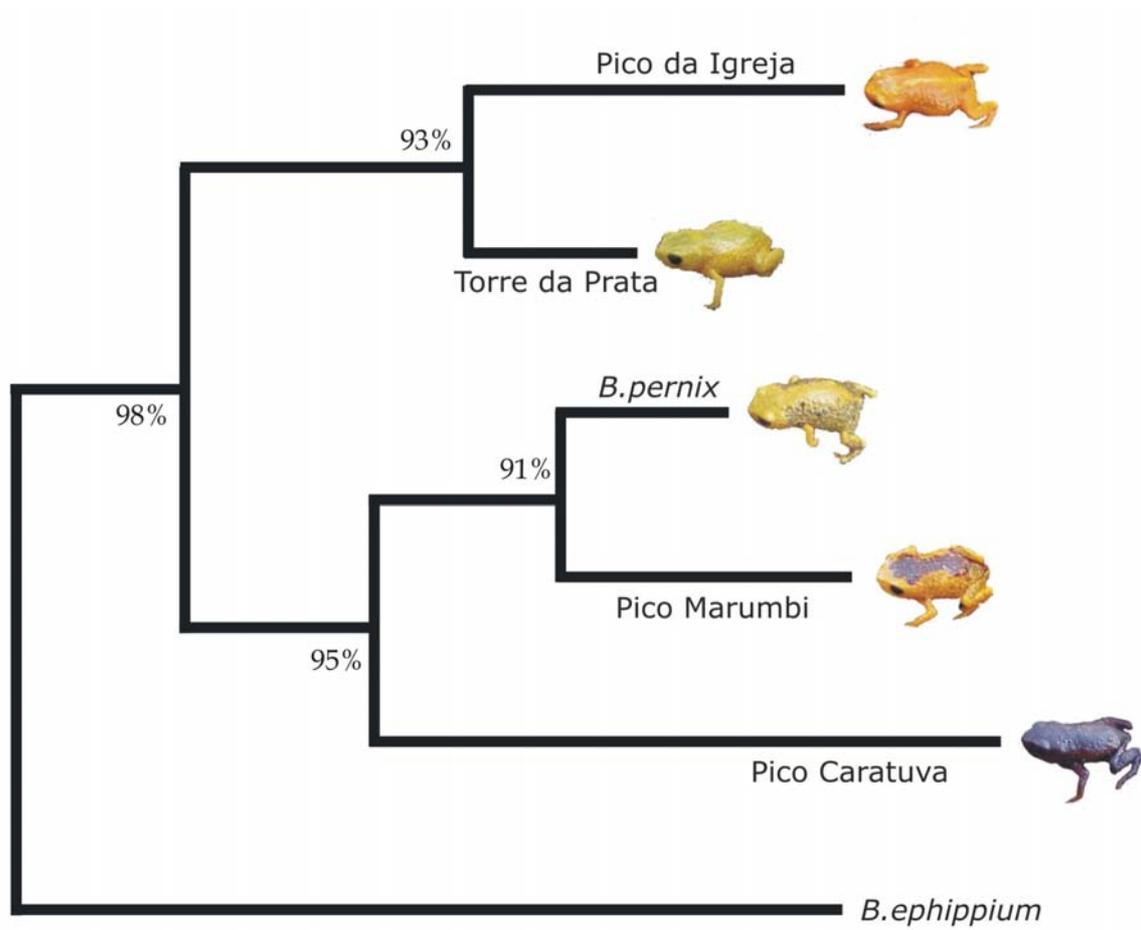


Figura 2. Relações filogenéticas entre as populações de *Brachycephalus* do Estado do Paraná inferidas pelo método de máxima verossimilhança. O grupo-externo utilizado foi *Brachycephalus ephippium*.

Tabela 1. Escore de máxima verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo I.

Modelo I	
-ln	20642.70321
Frequências de bases	
A	0,32
C	0,24
G	0,20
T	0,24
Matriz de taxas	
AC	2,0087
AG	4,1287
AT	0,7281
CG	1,1566
CT	4,0963
GT	1,0000
Forma	0,8020

Tabela 2. Escore de máxima verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo II.

Modelo II	
-ln	20642.70755
Frequências de bases	
A	0,32
C	0,24
G	0,20
T	0,24
Matriz de taxas	
AC	2,0117
AG	4,1172
AT	0,7285
CG	1,1576
CT	4,1172
GT	1,0000
Forma	0,8020

Tabela 3. Escore de máxima verossimilhança, estimativas de frequências de bases, taxas estimadas de substituição relativa de bases e estimativa do parâmetro de forma da distribuição Γ para o modelo III.

Modelo III	
-ln	20643.18670
Frequências de bases	
A	0,32
C	0,24
G	0,20
T	0,24
Matriz de taxas	
AC	1,8942
AG	3,8822
AT	0,6865
CG	1,0000
CT	3,88229
GT	1,0000
Forma	0,8049

7. DISCUSSÃO GERAL

O gênero *Brachycephalus* é composto atualmente por seis espécies, *viz.*, *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. vertebralis*, *B. didactyla* e *B. hermogenesi*. *Brachycephalus didactyla* e *B. hermogenesi* foram originalmente descritas no gênero *Psyllophryne*, ao passo que *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix* e *B. vertebralis* foram originalmente descritas no gênero *Brachycephalus*. Embora todas essas espécies sejam alocadas atualmente ao gênero *Brachycephalus* (KAPLAN, 2002), existem diferenças marcantes nos seus padrões de distribuição de altitude. *Brachycephalus didactyla* e *B. hermogenesi* ocorrem do nível do mar até 700 m do nível do mar, ao passo que as demais espécies de *Brachycephalus* ocorrem na faixa de altitude de 700 a 1600 m nas Serras do Mar e da Mantiqueira (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA; SAWAYA, 1998; MIRANDA-RIBEIRO, 1920; POMBAL JR., 2001; POMBAL JR. *et al.*, 1998). A distribuição disjunta das espécies originalmente descritas no gênero *Brachycephalus*, ou seja, *B. ephippium*, *B. nodoterga*, *B. pernix* e *B. vertebralis*, sugere fortemente que populações diferenciadas ainda não conhecidas da ciência possam existir ao longo da distribuição deste grupo.

O objetivo deste estudo foi avaliar esta possibilidade na Serra do Mar do Estado do Paraná, região para qual somente uma espécie de *Brachycephalus*, *B. pernix*, havia sido descrita até o momento (POMBAL JR. *et al.*, 1998). A coleta de espécimens em quatro localidades, *viz.*, Pico Caratuva na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja, revelou a existência de populações diferenciadas. Estas quatro populações foram caracterizadas com relação a variação na coloração da pele e duas delas, as populações da Torre da Prata e do Pico Caratuva, foram descritas formalmente como novas taxa no nível de espécie. Finalmente, as relações filogenéticas entre as populações do Pico Caratuva, Pico Marumbi, Torre da Prata e Pico da Igreja e *B. pernix* foram inferidas, tendo *B. ephippium* como grupo externo.

O estudo da caracterização da coloração da pele mostrou que cada uma das quatro populações do Estado do Paraná analisadas podem ser unicamente diagnosticadas com base neste traço. O mesmo resultado foi obtido com o estudo morfológico destas populações que são também unicamente diagnosticadas por combinações de traços morfológicos. Embora a descrição

formal no nível de espécie tenha sido apresentada somente para as populações das localidades de Torre da Prata e do Pico Caratua, as outras duas populações das localidades de Pico Marumbi e Pico da Igreja já foram analisadas e também podem ser unicamente diagnosticadas por combinações de traços morfológicos e serão descritas formalmente como novas espécies.

Com relação à morfologia, o aspecto mais notável das espécies do gênero *Brachycephalus* é a redução no tamanho corporal. A redução no tamanho do corpo além de um determinado limite é um processo evolutivo denominado de miniaturização, que pode acarretar modificações marcantes na morfologia, fisiologia e ecologia nas espécies de uma determinada linhagem (HANKEN; WAKE, 1993). A evolução de tamanho reduzido deve-se, freqüentemente, ao truncamento precoce do desenvolvimento resultando em pedomorfose, ou seja, a retenção de traços embrionários ou juvenis da espécie ancestral no adulto da espécie descendente (HANKEN, 1984). Todavia, a morfologia de espécies de tamanho reduzido não resulta, necessariamente, apenas do truncamento do desenvolvimento, ou seja, a morfologia do adulto pode ser um complexo mosaico de traços pedomórfico e não-pedomórficos (HANKEN; WAKE, 1993).

A miniaturização é um processo reconhecidamente importante na evolução dos anfíbios (BOLT, 1979; BOY; SUES, 2000) e ocorre nas três principais linhagens, *viz.*, Anura, Gymnophiona e Caudata, sendo, todavia, particularmente prevalente na ordem Anura (CLARKE, 1996). As conseqüências do processo de miniaturização na morfologia dos anfíbios têm sido observadas principalmente em termos qualitativos, como a ausência ou fusão de elementos ósseos devido ao truncamento do desenvolvimento (HANKEN, 1993). Freqüentemente, quatro ossos do crânio, septomaxila, palatino, columela e quadrado-jugal, estão ausentes em espécies de anuros que sofreram o processo de miniaturização. Estes três últimos elementos ósseos do crânio estão entre os últimos a se ossificarem durante a ontogenia em anfíbios, sugerindo a ocorrência de pedomorfose (TRUEB; ALBERCH, 1985). A redução nos elementos ósseos ocorre também como conseqüência da interação entre o processo de miniaturização e mecanismos de desenvolvimento, levando a perda de falanges nos apêndices anteriores e posteriores (HANKEN, 1982). A complexidade dos padrões de variação na morfologia dos anuros devida ao processo de miniaturização pode ser ainda maior devido a ocorrência de hiper-ossificação. A hiper-ossificação é, na verdade, um processo reverso ao da pedomorfose e ocorre em algumas espécies de anuros que sofreram miniaturização (TRUEB; ALBERCH, 1985).

A definição operacional de miniaturização é baseada no comprimento rostro-cloacal dos indivíduos adultos. O valor limite desta métrica que define o estado de miniaturização varia segundo diferentes autores, sendo de 20 mm para CLARKE (1996) de 25 mm para YEH (2002). Nas espécies do gênero *Brachycephalus* já formalmente descritas, assim como nas novas espécies da Serra do Mar no Estado do Paraná, o comprimento rostro-cloacal varia de 8,0 a 18,0 mm. Por conseguinte, as espécies deste gênero obedecem a definição operacional do estado de miniaturização. Nas duas espécies examinadas até o momento, *B. ephippium* e *B. didactyla*, os elementos ósseos columela, palatino e quadrado-jugal estão ausentes e existe redução óssea nos apêndices anteriores e posteriores (YEH, 2002). Além disto, em *B. ephippium* os ossos do crânio e das vértebras apresentam marcada hiper-ossificação.

As informações disponíveis até o momento sobre a morfologia óssea em *Brachycephalus* mostram padrões complexos devidos não somente à redução e perda de elementos ósseos, mas também a ocorrência de processos de hiper-ossificação. Todavia, em *B. pernix* descrita do Pico Anhangava no Estado do Paraná (POMBAL JR. *et al.*, 1998) e nas populações analisadas neste estudo, também do Estado do Paraná, o crânio e as vértebras não apresentam o mesmo grau de hiper-ossificação observado em *B. ephippium*. Estes resultados sugerem, por conseguinte, que os padrões de variação morfológica em *Brachycephalus* podem ser ainda mais complexos do que concebido atualmente.

A ausência de hiper-ossificação do crânio e vértebras é um traço morfológico compartilhado entre todas as populações de *Brachycephalus* da Serra do Mar no Estado do Paraná caracterizadas até o momento neste estudo, sugerindo que este grupo possa ser uma unidade natural. Esta hipótese foi corroborada neste estudo pela inferência das relações filogenéticas utilizando um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b*. Os três critérios de reconstrução filogenética, matrizes de distâncias, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, recuperaram a mesma topologia para as unidades taxonômicas do Estado do Paraná, *viz.*, *B. pernix* (POMBAL JR. *et al.*, 1998) e as quatro novas populações aqui analisadas formaram um grupo monofilético fortemente corroborado, como demonstrado pelos valores de *bootstrap*. Neste estudo, todavia, apenas um representante das demais espécies descritas de *Brachycephalus*, *B. ephippium* foi utilizado como grupo externo. Portanto, a hipótese de que as unidades taxonômicas

do Estado do Paraná representam um grupo monofilético só poderá ser avaliada quando todos os taxa de *Brachycephalus* forem incluídos em uma análise filogenética.

As populações de *Brachycephalus* das quatro localidades na Serra do Mar do Estado do Paraná analisadas neste estudo foram reconhecidas e descritas como espécies novas. Esta decisão foi baseada na análise de traços morfológicos tradicionalmente empregados no delineamento de novos taxa específicos em anfíbios em geral e em *Brachycephalus* em particular (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA; SAWAYA, 1998; MIRANDA-RIBEIRO, 1920; POMBAL JR., 2001; POMBAL JR. *et al.*, 1998). As nossas descrições e dados não-publicados mostraram que cada uma das quatro populações de *Brachycephalus* da Serra do Mar apresenta descontinuidades morfológicas, que representam em princípio, as bases materiais que definem unidades morfológicas na natureza (COYNE; ORR, 2004). Todavia, nenhum conceito de espécies, quer seja de padrão ou processo (CLARIDGE *et al.*, 1997; COYNE; ORR, 2004), foi utilizado neste estudo no reconhecimento e delineamento das unidades específicas de *Brachycephalus*. Serão necessários estudos futuros visando determinar qual(is) conceito(s) de espécie poderão ser aplicados a este grupo de modo a inferir como o processo de especiação produziu a diversidade observada em *Brachycephalus*. Como mencionado neste trabalho, os taxa originalmente descritos para o gênero *Brachycephalus* ocorrem em altitudes de 700 a 1600 m nas Serras do Mar e da Mantiqueira e têm distribuição disjunta. Por conseguinte, o grau de isolamento reprodutivo entre as unidades taxonômicas de *Brachycephalus* não poderá ser avaliado na natureza, impedindo, assim, a utilização do conceito de isolamento (CLARIDGE *et al.*, 1997; COYNE; ORR, 2004). Os dados morfológicos associados aos dados moleculares poderão, todavia, ser utilizados para definir os limites de espécies empregando conceitos baseados em reconstruções filogenéticas (WILEY, 1978; FROST; HILLIS, 1990). Este enfoque tem gerado resultados robustos e deverá também ser útil no estudo da sistemática e evolução dos anfíbios do gênero *Brachycephalus*.

8. CONCLUSÕES

1. As populações de *Brachycephalus* das localidades de Pico Caratua na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja ocorrendo na Serra do Mar na região leste do Estado do Paraná possuem padrões exclusivos de coloração da pele e podem ser unicamente diagnosticadas, diferindo também na cor de *Brachycephalus pernix* do Pico Anhangava.
2. As populações de *Brachycephalus* das localidades de Pico Caratua na Serra Ibitiraquire, Pico Marumbi na Serra do Marumbi, Torre da Prata na Serra da Prata e Pico da Igreja na Serra da Igreja ocorrendo na Serra do Mar na região leste do Estado do Paraná podem ser unicamente diagnosticadas por combinações de traços morfológicos e osteológicos, diferindo nestes traços de *Brachycephalus pernix* do Pico Anhangava.
3. Com base nos padrões de coloração únicos e na combinação de traços morfológicos e osteológicos as populações do Pico Caratua, Pico Marumbi, Torre da Prata e Pico da Igreja são reconhecidas como unidades evolutivas no nível de espécie.
4. O gene mitocondrial citocromo *b* apresentou resolução para definir as relações filogenéticas nas populações estudadas, como demonstrado pelos altos valores de *bootstrap* (> 90%) obtidos para os nós das árvores filogenéticas.
5. Os três critérios de escolha de árvores filogenéticas empregados, *viz.*, distâncias, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, geraram a mesma topologia para as populações analisadas.
6. Os dados moleculares sugerem que as populações do Estado do Paraná incluindo as amostradas do Pico Caratua, Pico Marumbi, Torre da Prata, Pico da Igreja e *Brachycephalus pernix* formam um grupo monofilético.

9. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. F. M.; CARNEIRO, C. D. R. 1998. Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências* 28:135-150.
- AUSTIN, J. D.; LOUGHEED, S. C.; BOAG, P. T. 2004. Discordant temporal and geographic patterns in maternal lineages of eastern North American frogs, *Rana catesbeiana* (Ranidae) and *Pseudacris crucifer* (Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:799–816
- BENSASSON, D.; ZHANG, D.-X.; HARTL, D. L.; HEWITT, G. M. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* 16:314–321.
- BIGARELLA, J. J. (coord.). 1978. A Serra do Mar e a porção oriental do Estado do Paraná. Editores BIGARELLA, J. J.; BECKER, R. D.; MATOS, D. J. de; WERNER, A. Governo do Paraná, Secretaria do Estado do Planejamento, Associação de Defesa e Educação Ambiental.
- BOLT, J. R. 1979. *Amphibamus grandiceps* as a juveneli dissorophid: evidence and implications. Pp 529-563. In: Nitecki, M. H. (Ed.). *Mazon creek fossils*. Academic Press, New York.
- BOY, J. A.; SUES, H. D. 2000. Branchiosaurs: larvae, metamorphosis, and heterochrony in temnospondyl and seymouriamorph amphibians. Pp. 1150-1197. In: Heatwole, H.; Carroll (Eds.). *Amphibian Biology. Vol. 4. Paleontology*. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, New South Wales, Australia.
- BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. B.; RYLANDS, A. B.; KONSTANT, W. R.; FLICK, P.; PILGRIM, J.; OLDFIELD, S.; MAGIN, G.; HILTON-TAYLOR, C. 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology* 16:909-923.
- BROWER, A. V. Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6491-6495.

- BROWER, A. V. Z. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterfly: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50: 195-221.
- BRUFORD, M. W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J. F. Y.; BURKE, T. 1992. Single-locus and multi-locus DNA fingerprinting. Pp. 225-270 in A. R. Hoelzel, ed. *Molecular Genetic Analysis in Conservation*. IRL Press, Oxford.
- CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. 1997. *Species: the Units of Biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- CLARKE, B. T. 1996. Small size in amphibians: its ecological and evolutionary implications. *Symposium of the Zoological Society of London* 69: 201-224.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. 2004. *Speciation*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- DAWOOD, A.; CHANNING, A.; BOGART, J. P. 2002. A molecular phylogeny of the frogs *Tomopterna* in southern Africa: examining species boundaries with mitochondrial 12S rDNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22:407-413.
- DRAPER, N. R.; SMITH, H. 1981. *Applied Regression Analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. 1986. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- FEIO, R. N.; BRAGA, U. M. L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P. S. 1998. *Anfíbios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais)*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- FELSENSTEIN, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- FROST, D. R. *Amphibian Species of the World: An Online Reference*. V. 3.0 (22 de agosto de 2004). The American Museum of Natural History.
<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>
- FROST, D. R.; HILLIS, D. M. 1990. Species in concept and practice: Herpetological applications. *Herpetologica* 46: 87-104.
- GIARETTA, A. A.; SAWAYA, R. J. 1998. Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 4:985-987.
- GOEBEL, A. M.; DONNELLY, J. M.; ATZ, M. E. 1999. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome *b* in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11:163-199.
- HADDAD, C. F. B.; SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: MORELLATO, L.P.C. Org. *História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma Área Florestal do Sudeste do Brasil*. Editora da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- HANKEN, J. 1982. Appendicular skeletal morphology in minute salamanders, genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae): growth regulation, adult size determination and natural variation. *Journal Morphology* 174: 57-77.
- HANKEN, J. 1984. Miniaturization and its effects on cranial morphology in plethodontid salamanders, genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae) I. Osteological variation. *Biological Journal of Linnean Society* 23: 55-75.
- HANKEN, J. 1993. Adaptation of bone growth to miniaturization of body size. Bone Vol. 7: Bone Growth-B, ed. B. K. Hall, pág. 79-104
- HANKEN, J.; WAKE, D. B. 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:501-519.

HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO, O. L.; NELSON, C. E. 1990. *Frogs of Boracéia*. *Arquivos de Zoologia, São Paulo* 31: 231-410.

HILLIS, D. M. 1991. Discriminating between phylogenetic signal and random noise in DNA sequences. pp. 278-294 In: M. Miyamoto; J. Cracraft, eds. *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Oxford University Press, New York.

HILLIS, D. M.; HUELSENBECK, J. P. 1992. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *Journal of Heredity* 83:189-195.

HILLIS, D. M.; BULL, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192.

HUELSENBECK, J.; CRANDALL, K. A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:437-466.

HUELSENBECK, J. P., LARGET, B.; ALFARO, M. E. 2004. Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Molecular Biology and Evolution* 21:1123-1133.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 1992. Manual técnico da vegetação brasileira.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. 1989. Zoneamento do litoral paranaense. Caracterização da cobertura vegetal natural das áreas de influência atlântica do estado do Paraná, Curitiba.

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

JUKES, T. H.; C. R. CANTOR. 1969. Evolution of proteins molecules. pp. 21-123. In: MUNRO, H. N. ed. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

- KAPLAN, M. 2002. Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus *Psyllophryne* (Brachycephalidae). *Amphibia Reptilia*. 23:225-227.
- KENDALL, M.; STUART, A. 1979. *The advanced theory of statistics*. 4th ed., London, Charles Griffin.
- KITCHING, R. 2000. Biodiversity, hotspots and defiance. *Trends in Ecology and Evolution* 15:84-485.
- KOSUCH, J.; VENCES, M.; DUBOIS, A.; OHLER, A.; BOEHME, W. 2001. Out of Asia: Mitochondrial DNA evidence for an oriental origin of tiger frogs, genus *Hoplobatrachus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21:398–407.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. 1999. *Anfibios*. Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e Universität Tübingen, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- LI, W.-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- LYNCH, J. D.; DUELLMAN, W. E. 1997. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. *The University of Kansas, Natural History Museum, Special Publication* 23:1-236.
- MAACK, R. 1981. *Geografia física do Estado do Paraná*. , J. Olympio, Rio de Janeiro, RJ.
- MACEY, R. J.; SHULTE II, J. A.; LARSON, A.; FANG, Z. ; WANG, Y.; TUNIYEV, B. S.; PAPENFUSS, T. J. 1998. Phylogenetic relationships of toads of the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9:80-87.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. 1920. Os Brachycephalideos do museu paulista. *Revista do Museu Paulista* 12: 12: 308-315.

- MIYAKI, C. Y.; MATIOLI, S. R.; BURKE, T.; WAJNTAL, A. 1998. Parrot evolution and phylogeographical events: mitochondrial DNA evidence. *Molecular Biology and Evolution* 15:544-551.
- MULCAHY, D.G.; MENDELSON III, J. R. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17:73-189.
- MYERS, M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- PETRANKA, J. W.; SMITH, C. K.; SCOTT, A. F. 2004. Identifying the minimal demographic unit for monitoring pond-breeding amphibians. *Ecological Applications* 14:1065-1078.
- PIRES JR., O. R.; SEBBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; LARGURA, S. W. R.; BLOCH JR., C.; MORALES, R. A. V.; SCHWARTZ, C. A. 2002. Occurrence of tetrodotoxin and analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Toxicon* 40:761-766.
- PIRES JR., O. R.; SEBBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; BLOCH JR., C.; MORALES, R. A. V.; SCHWARTZ, C. A. 2003. The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon* 42:563-566.
- 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.
- 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. 1999. Ovoposição e desenvolvimento de *Brachycephalus ephippium* (Spix) (Anura: Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16:967-976.

- POMBAL JR., J. P. 2001. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Atlantic Rain Forest of southeastern Brazil. *Amphibia Reptilia* 22:179-185.
- POMBAL JR., J. P.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. 1994. Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 26:516-519.
- POMBAL JR., J. P.; WISTUBA, E. M.; BORNSCHEIN, M. R. 1998. A new species of Brachycephalidae (Anura) from the Atlantic Rain forest of Brazil. *Journal of Herpetology* 32:70-74.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note* 14:817-818.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. 2001. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution* 18:897-906.
- POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. 2001. *Herpetology*. 2nd edition. Prentice Hall, New Jersey.
- RODERJAN, C. V. 1994. O gradiente da floresta ombrófila densa no Morro Anhangava Quatro Barras, PR, aspectos climáticos, pedológicos e fitossociológicos. Curitiba. Tese, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 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.
- SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. 2002. Mapeamento da floresta atlântica do estado do Paraná. Curitiba, Paraná.

- SMITH, T. B.; KARK, S.; SCHNEIDER, C. J.; WAYNE, R. K.; MORITZ, C. 2001. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology and Evolution* 16:431.
- SMITHE, F. B. 1975. *Naturalist's Color Guide*. American Museum of Natural History, 1975.
- STEEL, M. 1994. The maximum likelihood point for a phylogenetic trees is not unique. *Syst. Biol.* 43: 560-564.
- SWOFFORD, D. L. 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. 1996. Phylogenetic inference. pp. 407-514. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MARBLE, B. K. Eds. *Molecular Systematics* 2nd ed. Sinauer, Sunderland.
- TARKHNISHVILI, D. N.; THORPE, R. S.; ARNTZEN, J.W. 2000. Pre-Pleistocene Refugia and Differentiation between Populations of the Caucasian Salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14:414–422.
- TAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. Pp. 57-86 in Lectures in Mathematics in the Life Sciences, vol. 17. Springer Verlag, Berlin.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876–4882.
- TRUEB, L., 1993 – Patterns of diversity in the Lissamphibian skull. In: HANKEN, J.; HALL, B.K. (Eds.), *The Skull. Vol. 2. Patterns of Structural and Systematic Diversity*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 255-343.
- TRUEB, L.; ALBERCH, P. 1985. Miniaturization and the anuran skull – a case-study of heterochrony. *Fortschritte der Zoologie* 30:113-121.

VENCES, M.; CHIARI, Y.; RAHARIVOLOLONIAINA, L.; MEYER, A. 2004. High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:295–307.

WILEY, E. O. 1978. *Phylogenetics*. John Wiley & Sons Editors.

WILLIAMS, P. L.; FITCH, W. M. 1990. Phylogeny determination using a dynamically weighted parsimony method. *Methods in Enzymology* 183:615–626.

WISTUBA, E. M. 1998. História natural de *Brachycephalus pernix* Pombal Jr., Wistuba; Bornschein, 1998 (Anura) no Morro Anhangava, município de Quatro Barras, Estado do Paraná. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

YANG, Z.; GOLMAN, N.; FRIDAY, A. 1995. Maximum likelihood trees from DNA sequences: a peculiar statistical estimation problem. *Systematic Biology* 44:384-399.

YEH, J. 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution* 56:628-641.

YONEYAMA, Y. 1987. The nucleotide sequences of the heavy and light strand replication origins of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 54: 429-440.

ZHANG, D. -X.; HEWITT, G. M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* 11:247–251.