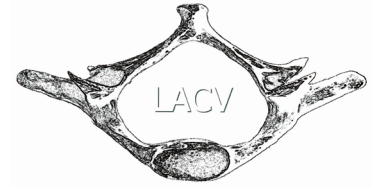




Pós-graduação em Biologia Animal
Laboratório de Anatomia Comparada de Vertebrados
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília



Sistemática filogenética do gênero *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 (Anura: Brachycephalidae) com base em dados morfológicos

Tese apresentada ao Programa
de pós-graduação em Biologia
Animal para a obtenção do título
de doutor em Biologia Animal

Leandro Ambrósio Campos
Orientador: Antonio Sebben
Co-orientador: Helio Ricardo da Silva

Maio de 2011

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

TESE DE DOUTORADO

LEANDRO AMBRÓSIO CAMPOS

Título:

“Sistemática filogenética do gênero *Brachycephalus* Fitzinger,
1826 (Anura: Brachycephalidae) com base em dados
morfológicos.”

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sebben
Presidente / Orientador
UnB

Prof. Dr. José Peres Pombal Jr.
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
Museu Nacional - UFRJ

Prof. Dr. Lílian Gimenes Giugliano
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB

Prof. Dr. Cristiano de Campos Nogueira
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB

Prof. Dr. Rosana Tidon
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 30 de maio de 2011

*Dedico esse trabalho à minha mãe Corina e
aos meus irmãos Flávio, Luciano e Eliane*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Sebben, pela orientação, dedicação, paciência e companheirismo ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Helio Ricardo da Silva pela orientação, companheirismo e pelo auxílio imprescindível nas expedições de campo.

Aos professores Carlos Alberto Schwartz, Elizabeth Ferroni Schwartz, Mácia Renata Mortari e Osmindo Pires Jr. pelos auxílios prestados ao longo do trabalho.

Aos técnicos Pedro Ivo Mollina Pelicano, Washington José de Oliveira e Valter César Fernandes Silveira pelo companheirismo e auxílio ao longo do trabalho.

Aos alunos do laboratório de anatomia comparada dos vertebrados, Lucélia, Tainã Rappi Py-Daniel, Núbia Ester de Oliveira e Rafael Magalhães pelos auxílio e companheirismo ao longo do trabalho.

À bióloga Cristiana Vieira de Souza e Silva pelo companheirismo e pelo grande e imprescindível trabalho na edição das pranchas.

Aos alunos do Laboratório de Toxinologia pelo companheirismo e auxílio ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad e Magno Segalla pela doação de espécimes.

As coleções do Museu de Zoologia da Universidade de Campinas (ZUEC), Coleção Herpetológica da Universidade de Minas Gerais e à Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília pelo empréstimo de espécimes.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas e financiamento do projeto e ao ICMBio pela licença concedida para coleta de espécimes.

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por conceder as instalações necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução	1
Posicionamento de Brachycephalidae entre os Neobatrachia.....	2
Materiais e métodos	7
Técnicas aplicadas.....	7
Táxons.....	7
Análise filogenética.....	8
Caracteres.....	9
Resultados	27
Análise realizada com base em dados de exame direto dos espécimes.....	27
Relacionamento entre os grupos externos.....	27
Análise incluindo dados de reinterpretação da literatura.....	35
Discussão	38
Monofiletismo do gênero <i>Brachycephalus</i>	38
Miniaturização e redução de dígitos.....	43
<i>Brachycephalus</i> com placas.....	45
Populações com a atribuição do nome <i>Brachycephalus ephippium</i>	47
Grupos irmãos de <i>Brachycephalus</i> e status de Brachycephalidae.....	47
Conclusão	52
Referências bibliográficas	53
Anexos	58
Anexo 1 Lista de material examinado.....	58
Anexo 2 Matriz.....	60
Anexo 3. Artigo publicado: Campos, L. A., Silva, H. R., Sebben, A. 2010. Morphology and development of additional bony elements in the genus <i>Brachycephalus</i> (Anura: Brachycephalidae). <i>Biological Journal of the Linnean Society</i> , 99: 752–767.....	67

Índice de Figuras

- Figura 1.** Hipóteses de relações de parentesco entre *Brachycephalus* e outros anuros de desenvolvimento direto publicadas até o presente. Em A- trecho do cladograma de Frost *et al.* (2006); B e C- trechos de cladogramas publicados por Hedges *et al.* (2008) e em D- trecho de cladograma de Heinicke *et al.* (2009).5
- Figura 2.** Vistas laterais (A-D) e ventrais (E-G) do crânio e arco maxilar. A- *Adelophryne* sp.; B- *Ischnocnema juipoca*; C- *Brachycephalus toby*; D- *Brachycephalus hermogenesi*; E- *I. parva*; F- *I. parva*; G- *B. pernix*. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado (setas). max= maxila; pmax= premaxila; mand= arco mandibular; pesf= parasfenóide; sq= esquamosal e vom= vomer. Barras equivalem a 1 milímetro.....10
- Figura 3.** Vistas dorsais e laterais dos crânios. A e E- *Ischnocnema ramagi*; B e F- *Holoaden bra-dei*; C e G- BTE RJ3; D e H- *Brachycephalus toby*. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. esft= esfenetímóide; fpar= frontoparietal; nas= nasal. Barras equivalem a 1 milímetro.....14
- Figura 4.** Vistas dorsais e ventrais das vértebras presacrais e sacral. A- *Brachycephalus toby*; B- *Barycholos ternetzi*; C e D- BAT SP3; E e F *B. garbeana*. I a VIII: vértebras presacrais de I a VIII; pe I a VIII: placas espinhais de I a VIII; hi: haste do íleo; ppv: placa paravertebral; sacr: vértebra sacral; uros: uróstilo. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. Barras equivalem a 1 milímetro.....19
- Figura 5.** Vistas ventrais e laterais da cintura escapular de *Brachycephalus garbeana* (A e B), *Barycholos ternetzi* C e D) e vistas dorsais e laterais de cinturas pélvicas de *B. toby* (E), *B. ternetzi* (D e H) e *B. garbeana* (G) . clav: clavícula; cor: coracóide; esc: escápula; est: esterno; hi: haste do íleo; isq: ísquio; pub: púbis; uros: uróstilo. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. Barras equivalem a 1 milímetro.....21
- Figura 6.** Esqueleto dos membros anteriores e posteriores. A- Vista ventral do membro posterior de *Barycholos ternetzi* e em detalhe do artelho IV. Em D, vista ventral do membro posterior de BMC SP4 e em E detalhe dos artelhos IV e III. Em F, vista ventral do membro anterior de BMC SP4. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. I- IV número dos dígitos e artelhos; dist: falange distal; mc: metacarpo; mt: metatarso; Barras de A- C equivalem a 1 milímetro. Barras de D a F equivalem a 0,5 milímetros.....24
- Figura 7.** Hipótese filogenética entre espécies de *Brachycephalus* e outros gêneros de desenvolvimento direto do Novo Mundo. Árvore de consenso resumindo as três árvores mais parcimoniosas. À direita a classificação sensu Hedges *et al.* (2008). Números à esquerda da barra ou isolados correspondem aos valores de Bremer, enquanto números à direita da barra aos valores de Bootstrap < 50 (valores menores foram omitidos.....28
- Figura 8.** Trecho do cladograma destacando as populações para as quais se atribuía o nome *Brachycephalus ephippium*. Ramos proporcionais ao número de passos. Números indicam os caracteres que são apomorfias de cada ramo.33

Figura 9. Cladograma de consenso resumindo as duas árvores mais parcimoniosas da análise que inclui dados da literatura. Números à esquerda da barra ou isolados correspondem aos valores de Bremer, enquanto números à direita da barra aos valores de Bootstrap < 50 (valores menores foram omitidos).....36

Figura 10. Árvore de consenso da análise onde forçamos o monofiletismo das espécies sem placas do gênero *Brachycephalus*. Árvore com 391 passos.....41

Figura 11. Árvore de consenso da análise onde forçamos o monofiletismo das espécies sem placas do gênero *Brachycephalus* e incluímos dados da literatura. Árvore com 412 passos.....42

Índice de Tabelas

Tabela 1. Apomorfias que sustentam a distinção entre *B. didactylus* e BMA RJ1.....31

Tabela 2. Apomorfias que sustentam os ramos do trecho do cladograma correspondente as espécies que apresentam grandes placas ósseas.....34

Tabela 3. Fórmulas falangeais dos membros anteriores e posteriores dos gêneros onde se reporta redução nos dedos (*Adelophryne*, *Brachycephalus* e *Euparkerella*).....44

Resumo

O gênero *Brachycephalus* é endêmico da Mata Atlântica, com registros nas regiões Sul, Sudeste, e Nordeste associados às Serras do Mar e da Mantiqueira. Atualmente são reconhecidas 17 espécies para o gênero. No entanto, dados de história natural, biogeografia, coloração, morfologia externa e interna e de osteologia indicam que a diversidade de espécies de *Brachycephalus* é claramente subestimada. Duas grandes revisões recentes da taxonomia dos anfíbios anuros, motivadas por estudos das relações filogenéticas com base em dados moleculares, resultaram na realocação de várias espécies de anuros de desenvolvimento direto para a família Brachycephalidae. Segundo a proposta mais recente, Brachycephalidae seria composta pelos gêneros *Brachycephalus* (17 spp.) e *Ischnocnema* (34 spp.). Contudo, as relações filogenéticas entre espécies do gênero *Brachycephalus* ainda não haviam sido acessadas. A grande diversidade morfológica registrada para o gênero indica a possibilidade de existirem grupos monofiléticos entre as espécies de *Brachycephalus*. Nesse trabalho realizamos uma análise filogenética do gênero *Brachycephalus* com base em dados morfológicos colhidos para 20 espécies (incluindo 11 não descritas). Para enraizamento das hipóteses mais parsimoniosas foram incluídos nas análises exemplares representativos de espécies de todas as famílias de Terrarana com os objetivos de: 1) tratar do monofiletismo do gênero *Brachycephalus*; 2) discutir a posição de *Brachycephalus* entre os Terrarana e 3) avaliar de forma explícita a composição da família Brachycephalidae. Para esta análise produzimos 100 caracteres anatômicos com base na morfologia de ossos e do tegumento. Outros dados foram retirados da literatura, totalizando 145 caracteres. Submetemos a matriz a análises de máxima parcimônia no programa TNT. Esta análise resultou em três árvores mais parcimoniosas que diferem apenas quanto as relações entre os grupos sem placas. Nossos resultados confirmam o monofiletismo de *Brachycephalus* e indicam várias sinapomorfias morfológicas que poderão ser usadas para diagnose do gênero. As espécies de *Brachycephalus* que apresentam placas ósseas formaram um grupo monofilético. No entanto, as espécies sem placas não formam um grupo monofilético. Ou seja, nossos resultados não suportam a validade do gênero *Psyllophryne*. Com base nos resultados encontrados estabelecemos uma nova composição para a família Brachycephalidae, com o seguinte arranjo: (*Ischnocnema* spp. e *Barycholos ternetzi*) (*Holoaden bradei* (*Euparkerella*

cochranae (*Adelophryne* sp.(*Brachycephalus* spp.)))). Desta forma, *Adelophryne* seria o grupo irmão de *Brachycephalus*, com *Euparkerella* e *Holoaden* também próximos de *Adelophryne* e *Brachycephalus*. Para recuperar o monofiletismo do gênero *Ischnocnema* é necessário que *Barycholos ternetzi* seja alocado em *Ischnocnema*. Esse arranjo difere dos anteriormente propostos, mas em nenhum dos trabalhos precedentes, de cunho sistemático, usou-se uma amostra tão completa de representantes de *Brachycephalus*, tão pouco se explorou tanto da variabilidade morfológica desse grupo. Ainda assim, esperamos que novos arranjos surjam ao se melhorar a amostragem de espécies de *Brachycephalus* sem placas, além de espécies dos gêneros *Adelophryne*, *Euparkerella* e *Holoaden*. Mesmo com o avanço e vantagens óbvias nas técnicas de uso de sequências de DNA para a reconstrução da filogenia de vários organismos, deixar de usar esses dados morfológicos e propor hipóteses sobre a evolução dos mesmos seria desperdiçar um grande volume de informação biológica relevante.

Abstract

Brachycephalus is a genus of frogs endemic to the Atlantic Rain Forest, found in south, southeastern and northeast of Brazil, in Serra do Mar and Serra da Mantiqueira. Currently, seventeen species are recognized amongst this genus. However, new data on natural history, biogeography, coloration, external and internal morphology, including osteology, points to obvious underestimation on the species diversity on the genus *Brachycephalus*. Great taxonomic changes shown on works, such as Frost, *et al.* (2007) and Hedges, *et al.* (2008) resulted on the relocation of many direct developing species in the family Brachycephalidae. According to the most recent proposal, Brachycephalidae contains the genus *Brachycephalus* (17 spp.) and *Ischnocnema* (34 spp.). Though, the phylogenetic relationships amongst the species of the genus *Brachycephalus* were not approached yet. The great morphological diversity registered on this genus points to the probable existence of monophyletic groups amongst the species of *Brachycephalus*. The recognition of such groups of species using phylogenetic tools is of critical importance on taking decisions concerning biological conservation. On the present work, we ran a phylogenetic analysis based on morphological data from 20 species of *Brachycephalus* (including 11 undescribed). To rooting, we include specimens that represent all the families that belong to Terrarana. Our goals are: 1) Deal with the monophyly of the genus *Brachycephalus*; 2) discuss the phylogenetic relationship among the genus *Brachycephalus* and others Terrarana and 3) evaluate the composition of the family Brachycephalidae. We discovered one hundred anatomic characters from the bones and tegument. Other data were taken from the literature, bringing the total of 145 characters. We submitted the data matrix to maximum parsimony analyses on TNT software. This analysis revealed 3 most parcimonious tree, divergent only in the without plates *Brachycephalus* relationship. The results confirm the monophyly of *Brachycephalus* and indicate a great number of morphological synapomorphies that should be used for diagnosis of the genus. Species of *Brachycephalus* that show bone plates formed a monophyletic group. On the other hand, species with no plates is not monophyletic. Consequently, our results do not support the validity of *Psyllophryne*. We established a new arrangement for the family Brachycephalide based on these results, which is: (*Ischnocnema*

spp. and *Barycholos ternetzi*) (*Holoaden bradei* (*Euparkerella cochranæ* (*Adelophryne* sp. (*Brachycephalus* spp.)))). Thus, *Adelophryne* is the sister group of *Brachycephalus*, and *Euparkerella* and *Holoaden* are close to *Adelophryne* and *Brachycephalus*. It was mandatory to propose that placement of *Barycholos ternetzi* in *Ischnocnema*, in order to recover the genus monophyly. Our proposal is different from the previous ones, but none of the systematic based on previous works used such broad sample of specimens of *Brachycephalus* or explored the morphological variations so thoughtfully. Even so, we hope that new arrangements will show up with a better sampling of plateless *Brachycephallus*, and also from the geni *Adelophryne*, *Euparkerella* and *Holoaden*. Despite the clear advances and advantages of using DNA sequence data in reconstructing phylogenies, not using such a database of morphological variation for this group of frogs and with that propose hypotheses regarding their evolution would represent a great deal of waste of relevant biological information.

Introdução

Brachycephalus é um gênero de anuros endêmico da Mata Atlântica das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. As espécies deste gênero são diurnas e vivem no chão da mata, vocalizando sobre a serrapilheira ou empoleirados a poucos centímetros do solo (Pombal *et al.*, 1994; Verdade *et al.*, 2008). *Brachycephalus* faz parte de um grupo de aproximadamente 900 espécies de anuros com desenvolvimento direto, para o qual Hedges *et al.* (2008) atribuíram o nome, não ranqueado, de Terrarana. As espécies de *Brachycephalus* ocorrem em um gradiente altitudinal, com *B. didactylus* e *B. hermogenesi* encontradas numa faixa de altitude de 0 - 800 metros acima do nível do mar (Izecksohn, 1971; Giaretta e Sawaia, 1998; Pimenta *et al.*, 2007; Verdade *et al.*, 2008), enquanto as demais espécies habitam regiões de montanha acima de 600 metros de altitude (Ribeiro *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006, 2010; Pombal e Gasparini, 2006). A associação dessas espécies com montanhas equivale a uma distribuição insular (Haddad *et al.*, 2010) e pode indicar que os processos de especiação no grupo estejam associados aos fenômenos geológicos que modelaram as Serra do Mar e da Mantiqueira. Dados geológicos reportam que tais fenômenos ocorreram no início do Cenozóico, há cerca de 60 milhões de anos (Almeida e Carneiro, 1998).

Descrita inicialmente como *Bufo ephippium* por Spix (1824), a espécie tipo do gênero, *Brachycephalus ephippium*, figurou por décadas como a única representante do gênero criado por Fitzinger (1826). A família Brachycephalidae foi criada por Günther em 1858. Em 1865, Cope alocou os gêneros *Brachycephalus* e *Atelopus* na família Engystomatidae. O mesmo autor em 1867 inclui *Brachycephalus*, *Atelopus* e *Phryniscus* na família Phryniscidae. Noble (1922) retoma o nome Brachycephalidae da qual faziam parte os gêneros *Atelopus*, *Brachycephalus*, *Dendrobates*, *Hyloxalus* (= *Colostethus*), *Phyllobates*, *Rhinoderma* e *Sminthillus*. Em 1926 o mesmo autor acrescenta *Dendrophryniscus brevipolicatus* à Brachycephalidae e estabelece grupos que mais tarde foram elevados ao status de família por Davis (1935). Neste arranjo, *Brachycephalus* passou para a família Atelopodidae juntamente com *Atelopus*, *Dendrophryniscus* e *Oreophrynella*. Griffiths (1954) restringiu Atelopodidae aos gêneros *Atelopus* e *Brachycephalus*.

No início da década de 70, dois autores, de forma independente, revalidaram a família

Brachycephalidae. Izecksohn (1971) descreveu *Psyllophryne didactyla*, e McDiarmid (1971), invalidou Atelopodidae e realocou *Atelopus*, *Melanophryniscus* e *Oreophrynella* em Bufonidae e *Brachycephalus* em Brachycephalidae. Desde então a família passou a ser composta por dois gêneros monotípicos. Entretanto, com a descoberta de uma segunda espécie de *Psyllophryne* (Giaretta e Sawaya, 1998) e de uma segunda espécie de *Brachycephalus* (Pombal *et al.*, 1998) o monofiletismo desses gêneros tornou-se questionável. Como a única evidência que servia de suporte para distinção entre esses dois gêneros era a inexistência de omosterno em *Brachycephalus* (Pombal *et al.* 1998), uma investigação mais refinada dessa estrutura tornou-se necessária. Por esta razão, Kaplan (2002) estudou a morfologia das estruturas cartilaginosas da cintura escapular de *Brachycephalus ephippium* e descobriu a existência de um omosterno vestigial. Com base nessa observação, ele sugeriu que o gênero *Psyllophryne* fosse sinonimizado a *Brachycephalus*. Esta decisão taxonômica é aceita até hoje.

Nos últimos 12 anos, 8 espécies foram descritas e 4 revalidadas para o gênero *Brachycephalus*, que conta atualmente com 17 espécies reconhecidas: *Brachycephalus alipioi* Pombal e Gasparini, 2006; *B. atelopoide*, Miranda-Ribeiro, 1920, *B. brunneus*, Ribeiro, Alves, Haddad, e Reis, 2005; *B. bufonoide*, Miranda-Ribeiro, 1920; *B. ephippium*, (Spix, 1824); *B. ferruginus*, Alves, Ribeiro, Haddad, e Reis, 2006; *B. garbeana*, Miranda-Ribeiro, 1920; *B. hermogenesi*, (Giaretta e Sawaya, 1998) *B. izecksohni*, Ribeiro, Alves, Haddad, e Reis, 2005; *B. nodoterga*, Miranda-Ribeiro, 1920; *B. pernix*, Pombal, Wistuba, e Bornschein, 1998; *B. pitanga*, Alves, Sawaya, Reis, e Haddad, 2009; *B. pombali*, Alves, Ribeiro, Haddad, e Reis, 2006; *B. pulex*, Napoli, Caramaschi, Cruz, and Dias, 2011. *B. toby*, Haddad, Alves, Clemente-Carvalho e Reis, 2010; e *B. vertebralis*, Pombal, 2001.

Posicionamento de Brachycephalidae entre os Neobatrachia

Por grande parte do Século XX acreditou-se que Brachycephalidae representasse um táxon entre os Bufonoidea, sem que se soubessem suas relações com outros Neobatrachia (Duellman e Trueb, 1986; Ford e Cannatella, 1993). O primeiro trabalho que tratou de *Brachycephalus* em contexto filogenético (*senso* Hennig, 1966) foi o de Darst e Cannatella, (2004), que apresenta uma hipótese filogenética construída com base em dados moleculares,

onde Brachycephalidae aparece inserida entre membros do gênero *Eleutherodactylus*, então alocados na tribo Eleutherodactynini. Os autores decidiram por não proceder as adaptações taxonômicas que a descoberta requeria, reconhecendo que seriam extensas e afirmando que seriam apresentadas em outro trabalho, que nunca chegou a ser publicado. Tal mudança é então proposta por Dubois, (2005), que sinonimiza Eleutherodactylini à Brachycephalidae.

Posteriormente, três trabalhos se debruçam sobre a tarefa de gerar hipóteses de relacionamentos para os anfíbios anuros com base em conjuntos de dados amplos, todos com implicações diretas na compreensão do posicionamento de Brachycephalidae. No primeiro desses trabalhos, Frost *et al.* (2006) propõem novas relações filogenéticas para todos os anfíbios vivos, usando dados de seqüências de DNA em combinação com dados morfológicos. Este resultou em uma hipótese que incluiu na família Brachycephalidae 17 gêneros, todos com espécies Neotropicais com desenvolvimento direto, a saber: *Adelophryne*, *Atopophrynus*; *Barycholos*; *Craugastor*; *Dischidodactylus*; *Eleutherodactylus*; *Euhyas*; *Euparkerella*, *Ischnocnema* *Geobatrachus*, *Holoaden*, *Oreobates*, *Pelorius*, *Phrynopus*, *Phyllonastes*, *Phyzelaphryne* e *Syrrhophus*. Desta forma, Brachycephalidae passaria a incluir 882 espécies. Os autores reconhecem algumas limitações de amostragem deste trabalho que, para definir as relações de parentesco das 882 espécies de Brachycephalidae *sensu lato*, utilizou seqüências de apenas 16 espécies. Embora os gêneros *Euparkerella* e *Adelophryne* não tenham sido incluídos nas análises desse trabalho, supostas semelhanças no padrão de redução de dedos entre estes gêneros foram evocadas para agrupá-los (Izecksohn, 1971; Frost *et al.*, 2006). No entanto, da Silva *et al.* (2007) constataram que os padrões de redução de dedos entre esses gêneros não são semelhantes e, portanto, não serviriam como evidência de relação de parentesco entre esses gêneros e *Brachycephalus*.

Um segundo trabalho, com amostragens tão impressionantes como o anterior, apresenta hipóteses de relacionamento para os anuros com desenvolvimento direto do Novo Mundo com amostras de 344 das 882 espécies conhecidas até então (Hedges *et al.*, 2008). Este trabalho corrobora o monofiletismo dos anuros com desenvolvimento direto do Novo Mundo e batiza o clado descoberto com o nome não ranqueado Terrarana, que é subdividido em quatro famílias: Brachycephalidae, Craugastoridae, Eleutherodactylidae e Strabomantidae. Nesta nova proposta

a família Brachycephalidae passa a ter dois gêneros: *Brachycephalus* com 14 espécies e *Ischnocnema* com 32 espécies (ver Frost, 2011).

Mais recentemente, um terceiro trabalho descreve uma nova família para Terrarana: Ceuthomantidae (Heinicke, *et al.*, 2009) e propõem outra hipótese filogenética para os anuros de desenvolvimento direto do Novo Mundo. Apesar das semelhanças entre as hipóteses filogenéticas de Heinicke *et al.* (2009) e Hedges *et al.* (2008), encontramos algumas divergências, principalmente em relação à posição de *Brachycephalus* entre os outros gêneros de Terrarana (Figura 1).

As diferentes hipóteses destacadas na figura 1 têm em comum um grupo formado por *Brachycephalus* e *Ischnocnema*, mas variam quanto a posição desse clado em relação aos outros táxons. Segundo Frost *et al.* (2006) os gêneros *Haddadus* e *Barycholos* formariam um grupo, irmão do clado formado por *Brachycephalus* + *Ischnocnema* (Fig. 1A). Hedges, *et al.* (2008), propõem duas hipóteses no mesmo trabalho (Fig 1B e C). Na árvore B, *Adelophryne* e *Haddadus* formam um clado irmão de *Brachycephalus* + *Ischnocnema*, enquanto *Barycholos* e *Holoaden* formam um outro clado irmão de clado que reúne ((*Adelophryne*, *Haddadus*) (*Brachycephalus*, *Ischnocnema*)). Por último, na árvore D temos uma topologia muito semelhante à árvore C, exceto pela adição de *Ceuthomantis*, como representante da família Ceuthomantidae, que seria o clado irmão de possível ancestral dos demais anuros de desenvolvimento direto do Novo Mundo.

O gênero *Brachycephalus* apresenta grande diversidade morfológica (Izecksohn, 1971; Clemente-Carvalho *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2010). Questões taxonômicas dentro do gênero *Brachycephalus* vêm sendo tratadas fora do contexto filogenético. A sinonimização do gênero *Psyllophryne* permanece por ser confirmada com uma abordagem filogenética. Adicionalmente, termos diferentes são usados para descrever os mesmos atributos anatômicos, como por exemplo, as placas parótica, espinhais e para-vertebrais que já foram tratadas como osteodermes (Ruibal e Shoemaker, 1984; Duellman e Trueb, 1986) ou como resultado de hiperossificação e exostose das vértebras e ossos do crânio (Clemente-Carvalho *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2010; Pombal, 2010). Entretanto, Campos *et al.* (2010), com base em evidências ontogenéticas, concluíram que esses elementos ósseos são, *de fato*, estruturas ósseas adicionais distintas.

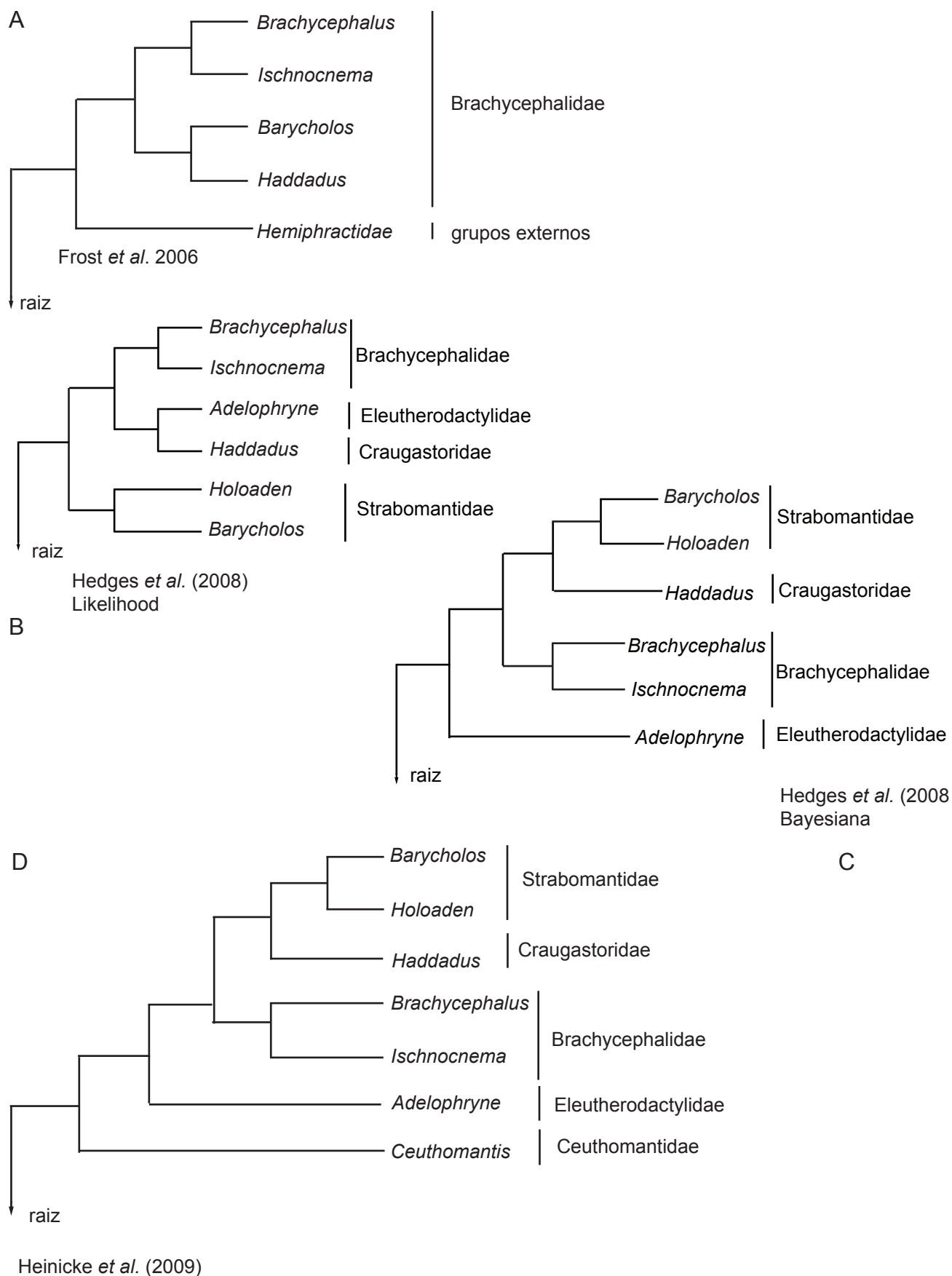


Figura 1. Hipóteses de relações de parentesco entre *Brachycephalus* e outros anuros de desenvolvimento direto publicadas até o presente. Em A- trecho do cladograma de Frost *et al.* (2006); B e C- trechos de cladogramas publicados por Hedges *et al.* (2008) e em D- trecho de cladograma de Heinicke *et al.* (2009).

Como definiu Pinna (1991), quando observamos fenótipos semelhantes e criamos a expectativa de que essa semelhança pode ser explicada por herança comum estamos fazendo conjecturas sobre homologia primária. Ao codificarmos esses atributos numa análise filogenética estamos testando essas conjecturas que, se corroboradas pelo método da sistemática filogenética, passam a ser hipóteses de homologias secundárias. Da Silva *et al.* (2007) e Campos *et al.* (2010) propuseram novas conjecturas de homologias primárias para atributos morfológicos do ouvido médio e placas ósseas. A exploração desses caracteres morfológicos no contexto da sistemática filogenética poderá trazer novos elementos para a discussão sobre a homologia secundária e a importância taxonômica desses atributos.

Os trabalhos aqui mencionados sobre sistemática de *Brachycephalus* contêm dados obtidos de amostras de *Brachycephalus ephippium*, que, embora seja a espécie tipo, não contempla toda a diversidade morfológica existente no gênero. O uso de mais espécies de *Brachycephalus* em análises filogenéticas de Terrarana poderia gerar hipóteses mais confiáveis sobre a sistemática filogenética dos anuros de desenvolvimento direto do Novo Mundo.

Nesse trabalho realizamos uma análise filogenética com base em dados morfológicos, contendo exemplares representativos de todas as famílias de Terrarana com os objetivos de: 1) tratar do monofiletismo do gênero *Brachycephalus*; 2) discutir a posição de *Brachycephalus* dentro de Terrarana e as consequências na composição da família Brachycephalidae; 3) sugerir a primeira hipótese filogenética para as espécies do gênero *Brachycephalus*, abordando questões taxonômicas como a viabilidade do nome *Psyllophryne*.

Materiais e métodos

Técnicas aplicadas

Os animais foram eutanasiados com sobredose de Cloridrato de Lidocaína (2%), em volumes de 0,1 a 0,2 ml de anestésico injetados intracranialmente, *via foramen magnum*. Para as dissecações, observações e documentação fotográfica foram empregadas as técnicas descritas por Sebben (2007). Para obtenção dos dados osteológicos utilizamos a técnica de diafanização e coloração com Alisarina e Alcian Blue (Taylor e VanDyke, 1985). Alguns exemplares foram macerados, os ossos limpos com solução diluída de hipoclorito de sódio, seguido de imersão em H₂O₂, e posterior desidratação em baterias crescentes de álcool. O material foi analisado e fotografado no estereomicroscópio Leica S6D equipado com a máquina digital Leica D-Lux 3.

Táxons

Grupo Interno

A lista com o material examinado, localidades, números de tombo estão no Anexo1. Das espécies reconhecidas de *Brachycephalus* utilizamos as seguintes amostras: *Brachycephalus brunneus*, *B. didactylus*; *B. garbeana*, *B. hermogenesi*, *B. nodoterga*, *B. pernix*, *B. pitanga*, *B. toby*. Usamos ainda amostras de populações coletadas nos municípios de Tijucas do Sul (BTS PR) no Paraná, Biritiba-Mirim (código de referência: BBM SP1) e Cunha (BCU SP2), no estado de São Paulo; Mangaratiba (BMA RJ1) e Engenheiro Paulo Frontin (BPF RJ2), no Rio de Janeiro.

Foram usadas, ainda, amostras das seguintes localidades: Atibaia (BAT SP3), Mogi das Cruzes (BMC SP4), Cotia (BCO SP5) – São Paulo; Itamonte (BIT MG1) e Santa Bárbara do Monte Verde (BMV MG2) - Minas Gerais; Petrópolis (BPT RJ3) e Teresopolis (BTE RJ4) - Rio de Janeiro. Todas essas amostras, identificadas como *B. ephippium* em vários trabalhos (Alberch e Gale, 1985; Sebben *et al.*, 1986; Pombal *et al.*, 1998 e outros), foram tratadas como táxons terminais para verificar o monofiletismo das mesmas, de modo a permitir a tomada de decisões taxonômicas, quando necessárias.

Dados da literatura

Dados osteológicos de *Ceuthomantis smaragdinus* foram obtidos a partir de imagens de tomografia publicadas em Heineke *et al.* (2009). Buscamos na literatura sobre *Brachycephalus* dados osteológicos para serem utilizados em nossas análises. Ribeiro *et al.* (2005) descreveram características osteológicas de *B. brunneus* e *B. izecksohni* ilustradas com desenhos em nanquim produzidos em câmara clara, incluindo crânio em vista dorsal, ventral e lateral; vértebras em vista dorsal, cinturas escapular e pélvica, mãos e pés. Da mesma forma, Alves *et al.* (2006) apresentaram descrições osteológicas de *B. ferruginus* e *B. pombali*. Adicionalmente, Clemente-Carvalho *et al.* (2009) publicaram dados osteológicos de várias espécies de *Brachycephalus*, incluindo imagens radiográficas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Haddad, *et al.* (2010) também publicaram dados de osteologia de várias espécies do gênero com imagens de varredura. Depois da análise minuciosa das imagens e texto desses trabalhos extraímos dados com consistência suficiente para incluir *B. izecksohni*, *B. ferruginus* e *B. pombali* em nossa matriz de dados osteológicos. No entanto, fizemos duas análises, uma incluindo a reinterpretação dos dados osteológicos de *B. izecksohni*, *B. ferruginus* e *B. pombali* e outra com exclusivamente com dados das amostras de *Brachycephalus* por nós examinada.

Grupo externo

Como grupo externo foram analisados *Ischnocnema guentheri* (Mogi das Cruzes, São Paulo), *I. juipoca* (Munhoz, MG) , *I. lactea* (Itatiaia, RJ); *I. ramagi* (João Pessoa, PB), e *I. parva* (Itatiaia, RJ), representando cada grupo de espécies do gênero; *Haddadus binotatus* (Ubatuba, SP), como representante da família Craugastoridae; *Barycholos ternetiz* (Brazlândia, DF), *Holoaden bradei* (Itatiaia, RJ) e *Euparkerella cochranae* (Santo Aleixo, RJ), como representantes de Strabomantidae; *Adelophryne* sp., como representante de Eleutherodactylidae e *Ceuthomantis smaragdinus*, como representante de Ceuthomantidae. Adotamos *Ceuthomantis smaragdinus* como raiz da árvore, uma vez que segundo Heineke *et al.* (2009), este seria o táxon mais externo em relação à nossa amostra.

Análise dos caracteres

Conceito de caractere: Usamos o conceito de Hennig (1966) que define caractere como uma peculiaridade que distingue ou discrimina os portadores dessa peculiaridade (semaforontes). Embora pareça óbvio, essa definição esclarece dois pontos importantes. Em primeiro lugar distingue a descrição dos caracteres para análise filogenética das descrições anatômicas clássicas, que podem se dedicar à toda a morfologia dos organismos estudados. Em segundo lugar, essa definição deixa claro que buscamos atributos intrínsecos dos organismos. Embora a definição da maioria dos caracteres e os respectivos estados tenham sido feitas neste trabalho, usamos a nomenclatura anatômica dos seguintes trabalhos (Lynch, 1971, 1973; Trueb, 1973, 1993, Duellman e Trueb, 1986; Heyer *et al.*, 1990). Demais trabalhos que também nos inspiraram pontualmente na definição de alguns caracteres serão mencionados posteriormente.

Análise filogenética

A matriz de caracteres foi construída no programa Mesquite (Maddison e Maddison, 2010). *Máxima parcimônia*- A matriz foi submetida ao programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008) onde realizamos a busca *New Technology*. Trata-se de um método heurístico (não exaustivo) que realiza buscas setoriais (Goloboff, 1999) onde se cria partições da árvore nas quais serão realizadas mini-análises em cada partição. Se uma solução melhor é encontrada a partição é incorporada à árvore original. Uma busca global usando TBR (*tree bisection and reconnection*) é feita a cada número de rearranjos determinado pelo usuário. Foi usada a busca setorial aleatória (RSS) onde as partições são determinadas aleatoriamente. Usando as configurações padrão do programa, em partições com número de nós e ramos terminais menor que 75 realizou-se uma análise setorial de três ciclos de RAS (*random additional sequence Wagner trees*) + TBR. Se as três sequências são de mesmo tamanho a mini-análise é interrompida. Caso contrário um novo ciclo de RAS + TBR é feito. Se um setor é maior que 75, seis ciclos de *Tree drifting* (Goloboff, 1999) são realizados. Durante o DTF (*tree drifting*) os ramos sofrem rearranjos como nas análises anteriores com a diferença de que soluções subótimas podem ser aceitas. O que determina a aceitação ou rejeição desses novos rearranjos seria uma combinação entre o comprimento das árvores e as diferenças de suporte relativos dos ramos (Goloboff e Farris

2001).¹ Para avaliar o suporte dos ramos usamos os índices de Bremer e Bootstrap. Todos os ramos de uma ou mais árvores mais parcimoniosas tem valor de Bremer mínimo de 1 (um) e quando mais apomorfias não ambíguas maior será o valor de Bremer (Bremer, 1994). Alguns autores propuzeram que os valores de Bootstrap poderiam ser usados como o intervalo de confiança para corroborar ou negar os ramos (Felsenstein, 1985; Sanderson, 1989; Hedges, 1992). Nesse contexto surgiu um debate sobre o valor de Bootstrap limiar para determinar a aceitabilidade de um ramo (Felsenstein, 1985; Hills e Bull, 1993; Efron *et al.*, 1996). No entanto, no presente trabalho seguimos a recomendação de não considerar o valor de Bootstrap como um parâmetro para negar ou corroborar os ramos (Carpenter, 1996; Kitching *et al.*, 1998) e, portanto, não houve necessidade de estabelecer valores limiares para a aceitação dos ramos.

Resultados

Caracteres

CRÂNIO (total de 73 caracteres)

Arco maxilar (14 caracteres)

1- *Dentes no arco maxilar.* Embora dentes estejam presentes em três diferentes elementos ósseos, maxila, pré-maxila e vômer, faltam evidências de que a ausência de dentes nesses três elementos ocorra de forma independente, uma vez que em todos os anuros desdentados como, por exemplo, em espécies de Bufonidae e Allophrynidae, há ausência de dentes em todos os ossos citados. Assim, a ausência de dentes foi codificada como uma só série de transformação da seguinte maneira: presença de dentes (Figura 2B) (0); ausência de dentes (Figura 2A) (1).

2- *Base do processo alar do pré-maxilar.* O processo alar do osso pré-maxilar apresenta uma variação quanto à posição de sua base que pode estar mais próxima à margem anterior do pré-maxilar (Figura 2B) (0); ou mais próxima à margem posterior do pré-maxilar (Figura 2A) (1).

3- *Processo palatino medial da pré-maxila.* A porção palatina da pré-maxila pode apresentar dois processos, um medial e outro lateral. O processo medial pode estar ausente (0); ou presente (Figura 2E, F e G) (1).

4- *Processo palatino medial da pré-maxila2.* Com extremidade afilada (Figura 2E, G, F) (0),

¹ A descrição e discussão sobre cada análise é longa e profunda. Para compreender melhor os mecanismos de busca será necessário a leitura das referências: Goloboff, 1999; Goloboff e Farris 2001, Goloboff *et al.* 2008.

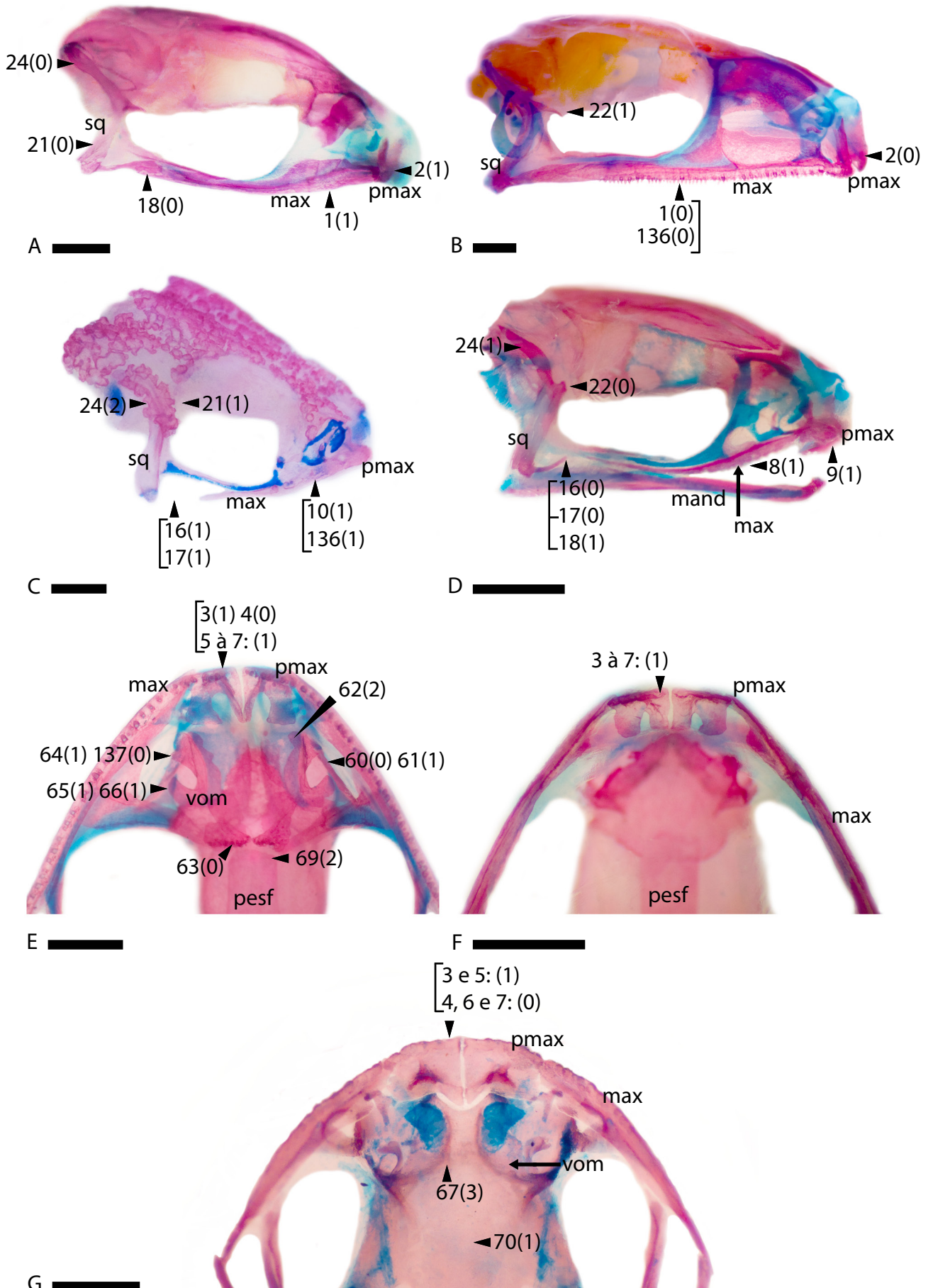


Figura 2. Vistas laterais (A-D) e ventrais (E-G) do crânio e arco maxilar. A- *Adelophryne* sp.; B- *Ischnocnema juipoca*; C- *Brachycephalus toby*; D- *Brachycephalus hermogenesi*; E- *I. ramagi*; F- *I. parva*; G- *B. pernix*. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado (setas). max= maxila; pmax= premaxila; mand= arco mandibular; pesf= parasfenóide; sq= esquamosal e vom= vomer. Barras equivalem a 1 milímetro.

com extremidade dilatada (Figura 2F) (1).

5- *Processo palatino lateral da pré-maxila*. Ausente (0); presente (Figura 2E, F e G) (1).

6- *Processo palatino lateral da pré-maxila*. Com extremidade afilada (Figura 2G) (0); com extremidade dilatada (Figura 2E e F) (1).

7- *Sulco entre processo medial e lateral da pré-maxila*². Entre os processos palatinos lateral e medial da maxila existe um sulco que pode ser raso (Figura 2G) (0); profundo (Figura 2E, G) (1).

Alguns trabalhos de descrição de espécies de *Brachycephalus* levam em conta a presença de odontóides no arco maxilar (Pombal, 2010, Alves *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2005). Diferente da série de transformação que trata da ausência de dentes (caractere 1), constatamos independência na ocorrência dessas expansões ósseas entre os elementos do arco maxilar, de forma semelhante ao que foi descrito para Bufonidae (Mendelson e Pramuk, 1997). Portanto, para esse atributo consideramos séries independentes a presença de odontóides na pré-maxila e na maxila.

8- *Odontóides na pré-maxila*: ausentes (0); presentes (Figura 9D) (1).

9- *Odontóides na maxila*: ausentes (0); presentes (Figura 9D) (1).

10- *Ornamentações no pars facialis da maxila*: Na maxila podemos ou não encontrar projeções ósseas no *pars facialis*. Codificamos esse atributo como ausente (0); presente (Figura 2C) (1).

11- *Extremidade posterior da maxila*. A maioria das espécies apresenta a extremidade posterior da maxila afilada (0). *Brachycephalus pernix* no entanto, apresenta uma dilatação na extremidade posterior do osso maxilar que possui ainda uma retração onde se articula o quadradojugal (1).

12- *Processo pré-orbital da maxila*: sem contato com nasal (0); em contato com processo maxilar do nasal; (1).

13- *Projeção palatal da maxila*. Essa região do osso maxilar pode ser simples sem nenhum processo, como em *Haddadus binotatus* (0); ou apresentar uma dilatação no ponto de articulação do processo anterior do pterigóide e a maxila denominada processo pterigóide, como em *Ischnocnema parva* (1)

14- *Articulação entre pterigóide e maxila*. Ampla (0); curta (1).

Arco mandibular (2 caracteres)

15- *Sínfise mandibular: Pseudodontoide*. Sebben *et al.*, (2007) discutiram a presença desse

caractere em vários grupos de anuros. Pseudodontoide ausente (0); presente (1).

16- *Extremidade posterior do angulosplênial*: a articulação do angulosplênial com o quadradojugal ou esquamosal pode estar projetada posteriormente e se alinhar com as margens posteriores do crânio, como em *Barycholos ternetizi* (Figura 2D) (0); mas em algumas espécies, como *Brachycephalus pernix*, essa articulação se dá num ponto mais anterior do que a linha posterior do crânio (Figura 2C) (1).

Suspensório (10 caracteres)

17- *Quadradojugal*. Presente (0); ausente (1).

18- *Quadradojugal*. Articula-se com extremidade posterior do maxilar (Figura 2A) (0); não atinge a extremidade posterior do maxilar (Figura 2D) (1).

19- *Orientação do pterigóide* (Yeh, 2002). Na maior parte dos anuros os ramos posterior e medial do osso pterigóide se posicionam num plano horizontal ou oblíquo em relação ao plano ventral do crânio, como em *Ischnocnema ramagi* (0); Em espécies do gênero *Brachycephalus*, como em *B. pitanga*, o osso pterigóide se orienta no plano dorsoventral (1).

20- *Extremidade do processo anterior do pterigóide*. Dilatada (0); afilada (1).

21- *Ornamentação no esquamosal*. Trabalhos de descrições fazem diversas menções a cristas ósseas. No entanto a distinção entre estas cristas é confusa. No ápice do osso esquamosal, encontramos ornamentações resultantes de exostose (como em *Brachycephalus pitanga*) que podem ter sido tratadas como algumas das cristas craniais em trabalhos anteriores. Aqui a ornamentação no osso esquamosal foi codificada como: ausente (0); presente (1) (Figura 2A e C respectivamente).

22- *Ramo zigomático do esquamosal*. O ramo zigomático do esquamosal em algumas espécies é tão reduzido que mal se pode determinar se está ausente ou muito reduzido. Por outro lado em outras espécies está bem definido. Codificamos esse atributo com o estado curto ou ausente, quando o ramo zigomático do esquamosal teve a base maior do que seu comprimento (0) (Figura 2D). Quando o r. zigomático do esquamosal apresentou seu comprimento maior que sua base (Figura 2B) codificamos como bem desenvolvido (1).

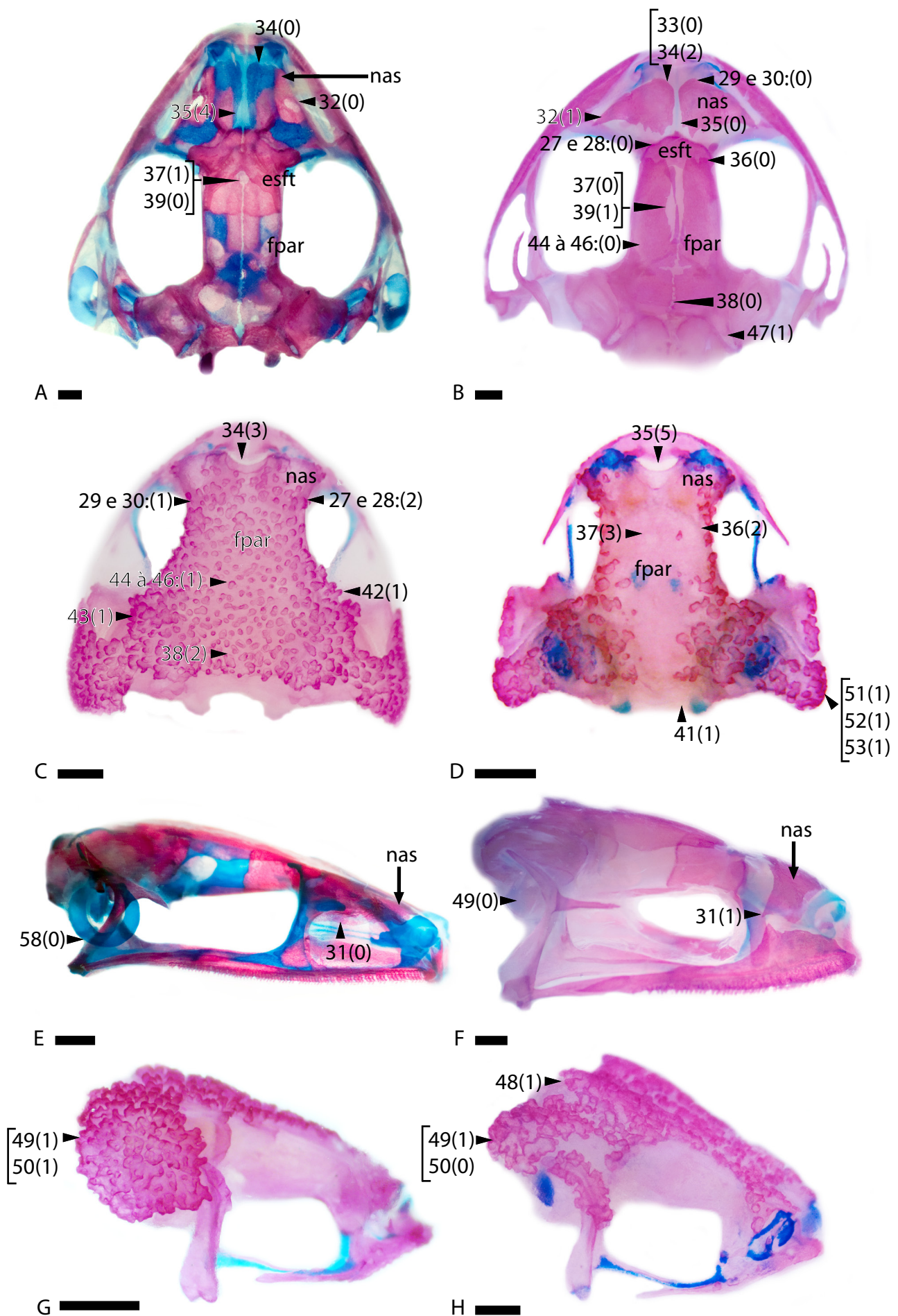


Figura 3. Vistas dorsais e laterais dos crânios. A e E- *Ischnocnema ramagi*; B e F- *Holoaden bradei*; C e G- BTE RJ3; D e H- *Brachycephalus toby*. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. esft= esfenetimóide; fpar= frontoparietal; nas= nasal. Barras equivalem a 1 milímetro.

23- *Ramo zigomático do esquamosal* 2: Pode ser simples sem nenhuma dilatação dorso-ventral (0); com dilatação dorsoventral livre (1); com dilatação dorsoventral que toca a maxila (2).

24- *Ramo ótico do esquamosal*. Existe uma variação na extensão do ramo ótico do esquamosal que pode alcançar toda a extensão da margem lateral da cápsula ótica (0) (Figura 2A); alcança entre a metade ou 2/3 da extensão da margem lateral da cápsula ótica, como em *B. hermogenesi* (1) (Figura 2D); ou ainda atingir menos da metade da extensão da margem lateral da cápsula ótica, como em *B. pitanga* (2) (Figura 2C).

25- *Posição do esquamosal em relação à cápsula ótica e crista parótica* O esquamosal pode se articular dorsalmente à cápsula ótica como em *H. binotatus* (0); lateralmente à margem externa da cápsula ótica como em BMA RJ1 (1); ou articular-se num plano mais ventral à cápsula ótica como em *B. garbeana* (2).

26- *Forma do ramo ótico do esquamosal*. Apresenta-se com forma retangular com um ligeiro afilamento na extremidade posterior, como em *Holoaden bradei* (0); afilado, sem diferença de largura entre a base e a região posterior, como em BMA RJ1 (1); triangular com em *B. garbeana* (2).

Cápsula nasal (10 caracteres)

27- *Ossificação da cápsula nasal+ esfenetimóide (porção nasal)*. Sem ossificação (Figura 3B) (0); parcialmente ossificada (1); totalmente ossificada (Figura 3C) (2).

28- *Contato entre nasais e esfenetimóide*. Em algumas espécies, como em *Haddadus binotatus* não há contato entre os nasais e o esfenetmóide (Figura 3B) (0); já em *I. guenteri* o contato entre nasais e esfenetimóide existe mas não há fusão (1); em *B. garbeana* no entanto os nasais estabelecem um amplo contato e se fusionam ao esfenetimóide (Figura 3C) (2).

29- *Ornamentação na face dorsal do nasal*. A hiperossificação dos ossos nasais dá um aspecto ornamentado ao osso. Ausência de ornamentação (Figura 3B) (0); presença (Figura 3C) (1).

30- *Ornamentação no processo maxilar do nasal*. O mesmo aspecto ornamentado pode ocorrer na face lateral do nasal. Ausência de ornamentação (Figura 3B e E) (0); presença (Figura 3C) (1).

31- *Forma do processo maxilar do nasal*. Triangular como em *H. binotatus* (0); forma retangular

com extremidade dilatada (Figura 3F) (1); ou ainda com forma retangular com extremidade afilada (2).

32- *Maior extensão da face dorsal do nasal*. Para contemplar uma das variações de forma relacionada à face dorsal do nasal codificamos em qual dos eixos o osso tem maior extensão. No eixo vertical (0); no eixo horizontal (Figura 3B) (1); com a mesma largura nos dois planos, que dá um aspecto quadrado ao osso (2).

33- *Borda medial dos nasais*. Reta em sua maior extensão (Figura 3B) (0); curva em sua maior extensão (1); sinuosa (2).

34- *Porção anteromedial dos nasais*. Existe uma série de variações relacionadas à interação entre as margens mediais dos nasais. Depois de muitas reformulações chegamos a este caractere multi-estado. Margens anteromediais justapostas (Figura 3A) (0); próximas, com recuo agudo (1); próximas, com recuo obtuso (Figura 3B) (2); com recuo côncavo (Figura 3C) (3); sem recuo e afastadas (4) .

35- *Porção posteromedial dos nasais*. Justapostas (Figura 3B) (0); com recuo agudo (1); com recuo obtuso (2); com recuo côncavo (3); sem recuo ou afastadas (Figura 3A) (4); fusionadas (Figura 3D) (5).

Teto do crânio (13 caracteres)

36- *Frontoparietais*. Sem contato com nasais (Figura 3B) (0); em contato sem fusão (1); fundidos aos nasais (Figura 3D) (2).

37- *Frontoparietal, porção anterior*. Faivovich (2002) trata do grau de exposição da fenestra frontoparietal em função de diferenças de forma e dimensões das margens mediais do frontoparietal. Em nossa amostra tratamos de forma diferenciada a porção frontal da parietal. Em sua porção frontal, as margens mediais do par de frontoparietais podem estar afastadas entre si (Figura 3B) (0); podem estar justapostas cobrindo a janela frontoparietal (Figura 3A) (1); justapostas, mas deixando uma parte da janela frontoparietal aberta (2); ou ainda podem estar fundidas medialmente (Figura 3D) (3).

38- *Frontoparietal, porção parietal*. Como no caractere anterior, as margens mediais da porção parietal podem estar justapostas com janela aberta (Figura 3B) (0); justapostas com janela

fechada (1); ou podem apresentar as margens mediais fusionadas (Figura 3C) (2).

39- *Margens anteriores do frontoparietal*. São regulares (Figura 3A) (0); ou irregulares, com franjas, invaginações (Figura 3B) (1).

40- *Processo postero-medial*. A margem posterior do frontoparietal poder ser simples, sem processo postero-medial (0); ou apresentar um processo postero-medial (1).

41- *Fusão frontoparietais e exoccipital*. Em alguns casos a fusão é evidente onde não se vê as margens que define os ossos. Entretanto, em alguns casos é difícil determinar se ocorre ou não fusão entre os ossos e por isso esse tipo de caracter gera alguns “missing data”. Ainda assim, nos restringindo aos casos onde se pode diagnosticar de forma precisa codificamos a fusão entre frontoparietais como ausente (0), presente (1).

42- *Abas orbitais laterais do frontoparietal*. Em algumas espécies não se consegue determinar se não ocorre nenhuma aba orbital ou se existe uma aba orbital muito discreta. Assim, codificamos esse caractere como aba orbital ausente ou discreta (0); ou presente e conspícua (1).

43- *Abas orbitais posteriores do frontoparietal*. Ausente (0); presente (Figura 3C) (1).

44- *Ornamentação na região periorbital do frontoparietal*. Ausente (Figura 3B) (0); presente (Figura 3C) (1).

45- *Ornamentação na região parietal do frontoparietal*. Ausente (Figura 3B) (0); presente (Figura 3C) (1).

46- *Ornamentação na região central do frontoparietal*. Ausente (Figura 3B) (0); presente (1).

47- *Processo postero-lateral do frontoparietal*. Ausente (0); presente (Figura 3C) (1).

48- *Crista pós-orbital*. Vários autores mencionam uma crista na região pós-orbital do crânio (Miranda-Ribeiro, 1920; Pombal, 2010). A análise osteológica revela que esta crista se trata de uma expansão do osso frontoparietal na região que cobre artéria occipital. Codificamos como ausente (0); presente (Figura 3B) (1).

Cápsula ótica e região auditiva (11 caracteres)

49- *Placa parótica*. Essa estrutura já foi considerada por alguns autores como uma expansão de ossos já conhecidos do crânio (Clemente-Carvalho *et al.*, 2009; Haddad *et. al.*, 2010; Pombal, 2010). No entanto, da Siva *et al.*, (2007) e Campos *et al.*, (2010) descrevem a ontogenia da

placa parótica e discutem a variação desse atributo dentro de *Brachycephalus*. Para a presente análise a placa parótica foi codificada como ausente (Figura 3F) (0); presente (Figura 3G e H) (1).

50- *Abrangência da placa parótica*. Esse caractere só é aplicável aos táxons que apresentam placa parótica, ao passo que os que não apresentam foram codificados como (?) (missing data). Sem sobreposição com o ápice do esquamosal (Figura 3H) (0); cobrem parcialmente o ápice do esquamosal; cobre o ápice do esquamosal e, lateralmente, a cápsula ótica (Figura 3G) (1).

51- *Projeção lateral da cápsula ótica*. A porção lateral da cápsula ótica pode ser como em *Hadadus binotatus*, onde não encontramos nenhuma projeção (0); ou pode apresentar uma projeção como em BBM SP1 (1).

52- *Tamanho da projeção lateral da cápsula ótica*. Sutil (0); conspícua (1).

53- *Ângulo da projeção lateral da cápsula ótica*. Pode ser lateralmente orientada, como em *B. didatylus* (0); posteriormente orientada como em BBM SP1 (1).

54- *Forma da cápsula ótica*. Pode apresentar a região medial mais larga do que região lateral como em *H. binotatus* (0); ou pode ter as regiões medial e lateral aproximadamente com a mesma largura (1).

55- *Janela oval*. Na maioria dos anuros a janela oval se posiciona lateralmente em relação ao eixo sagital do crânio (0); em espécies de *Brachycephalus* a janela oval orientada posteriormente em relação ao eixo longitudinal do crânio (1) (da Silva *et al.*, 2007).

56- *Ossificação do opérculo*. Pode não apresentar nenhum ponto de ossificação (0); ou ser parcialmente ou totalmente ossificado (1).

57- *Columela*. Presente (0); ausente (1).

58- *Tímpano e anel timpânico*. Presente (Figura 3E) (0); ausente (1).

59- *Exoccipitais*. Não fundidos entre si (0); fundidos entre si (1).

Região ventral do crânio (14 caracteres)

60- *Neopalatino*. Presente (Figura 2E) (0); ausente (1)

61- *Neopalatino*. Sutil como em BTS PR (0); conspícua como em *Ischnocnema parva* (Figura 2E) (1).

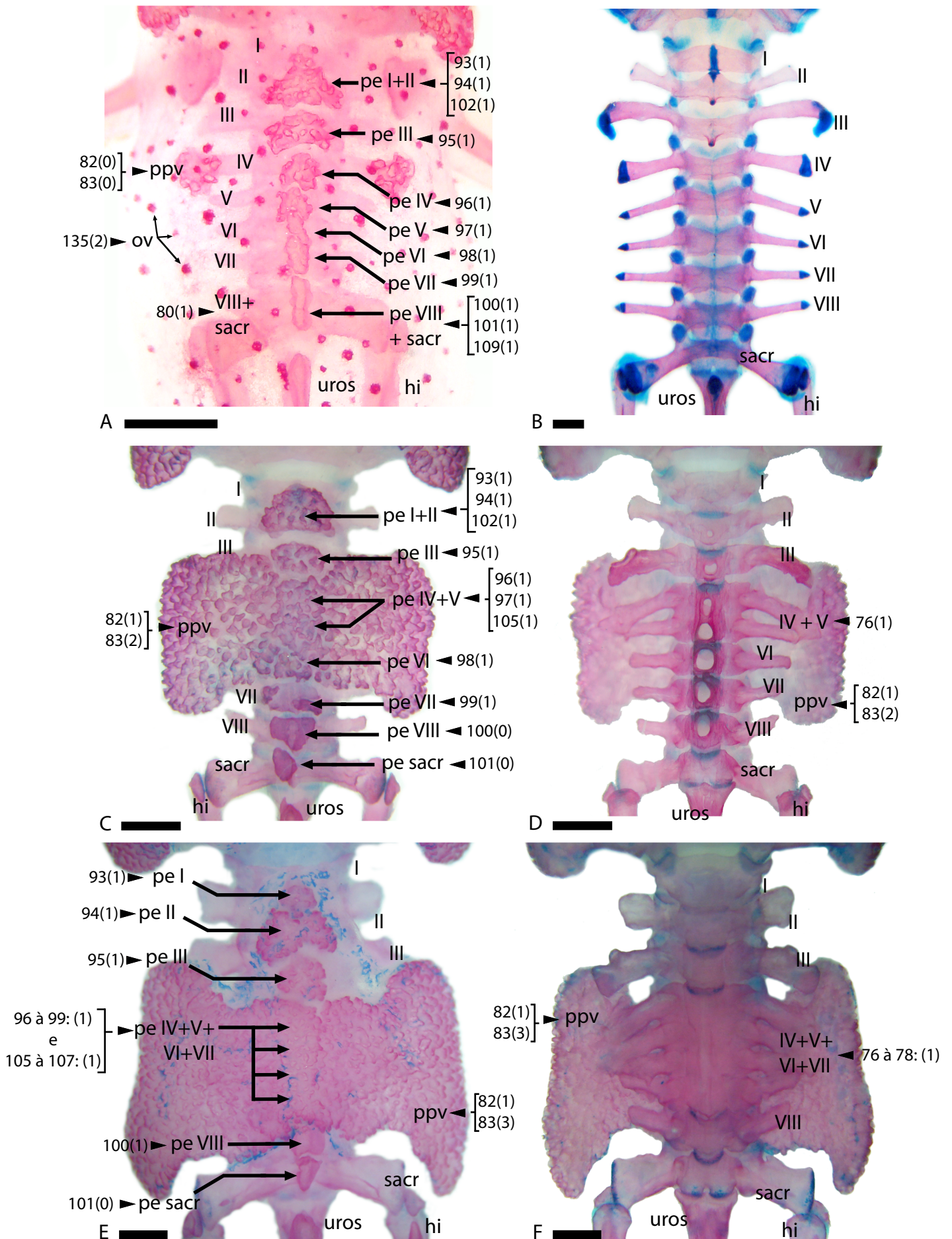


Figura 4. Vistas dorsais e ventrais das vértebras presacrais e sacral. A- *Brachycephalus toby*; B- *Barycholos ternetzi*; C e D- BAT SP3; E e F *B. garbeana*. I a VIII: vértebras presacrais de I a VIII; pe I a VIII: placas espinhais de I a VIII; hi: haste do íleo; ppv: placa paravertebral; sacr: vértebra sacral; uros: uróstilo. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. Barras equivalem a 1 milímetro.

62- *Vômer*. Em algumas amostras o ramo anterior está claramente ausente (0) (Figura 11); em outros casos o ramo anterior está fusionado ao assoalho da cápsula nasal (1); ou ainda pode ser claramente distinto (Figura 2E) (2).

63- *Processo dentífero do vômer*. Não encontramos em nossa amostra um exemplar que apresentasse o processo dentífero sem dentes. Portanto, consideramos nesse caractere somente a presença do processo dentífero (0); e a ausência (1).

64- *Ramo precoanal do vômer*. Ausente ou indiferenciado (0); presente e conspícuo (Figura 2E) (1).

65- *Ramo poscoanal do vômer*. Ausente (0); presente (Figura 2E) (1).

66- *Ramo poscoanal do vômer*. Reduzido (0); conspícuo (Figura 2E) (1).

67- *Margens mediais do vômer*. Paralelas entre si (0); mais próximas na região posterior do que anteriormente (1); mais próximas na região anterior do que na região posterior (2); margens em arco (Figura 2G) (3).

68- *Margem anterior do esfenetimóide*. Regular (0); irregular com franjas e invaginações (1).

69- *Margem anterior do parasfenóide*. Reta (0); aguda (1); obtusa (Figura 2E) (2); côncava (3).

70- *Parasfenóide mais esfenetimóide*. Não fundidos (0); fundidos (Figura 2g) (1).

71- *Extensão das abas laterais do parasfenóide*. Não atingem margem lateral do exoccipitais (0); atingem margem lateral dos exoccipitais (1).

72- *Abas do parasfenóide mais proótico*. Não fundidos (0); parcialmente fundidos (1); totalmente fundidos (2).

73- *Região da junção entre esfenetimóide e proótico*: Cartilaginosa (0); ossificada (1).

ESQUELETO PÓS-CRANIAL (total de 52 caracteres)

Vértebras e placas ósseas pós- craniais (36 caracteres)

74- *Sobreposição das vértebras*. Na maior parte do anuros os processos espinhais são mais desenvolvidos nas vértebras anteriores e gradualmente diminuem de tamanho posteriormente. Dependendo do quão elaborado seja o arco neural as vértebras podem estar não sobrepostas (0); ou sobrepostas (1) (Lynch, 1973; Trueb, 1973).

75- *Fusão das vértebras I-II*. Vários grupos de anuros apresentam fusões de vértebras pré-

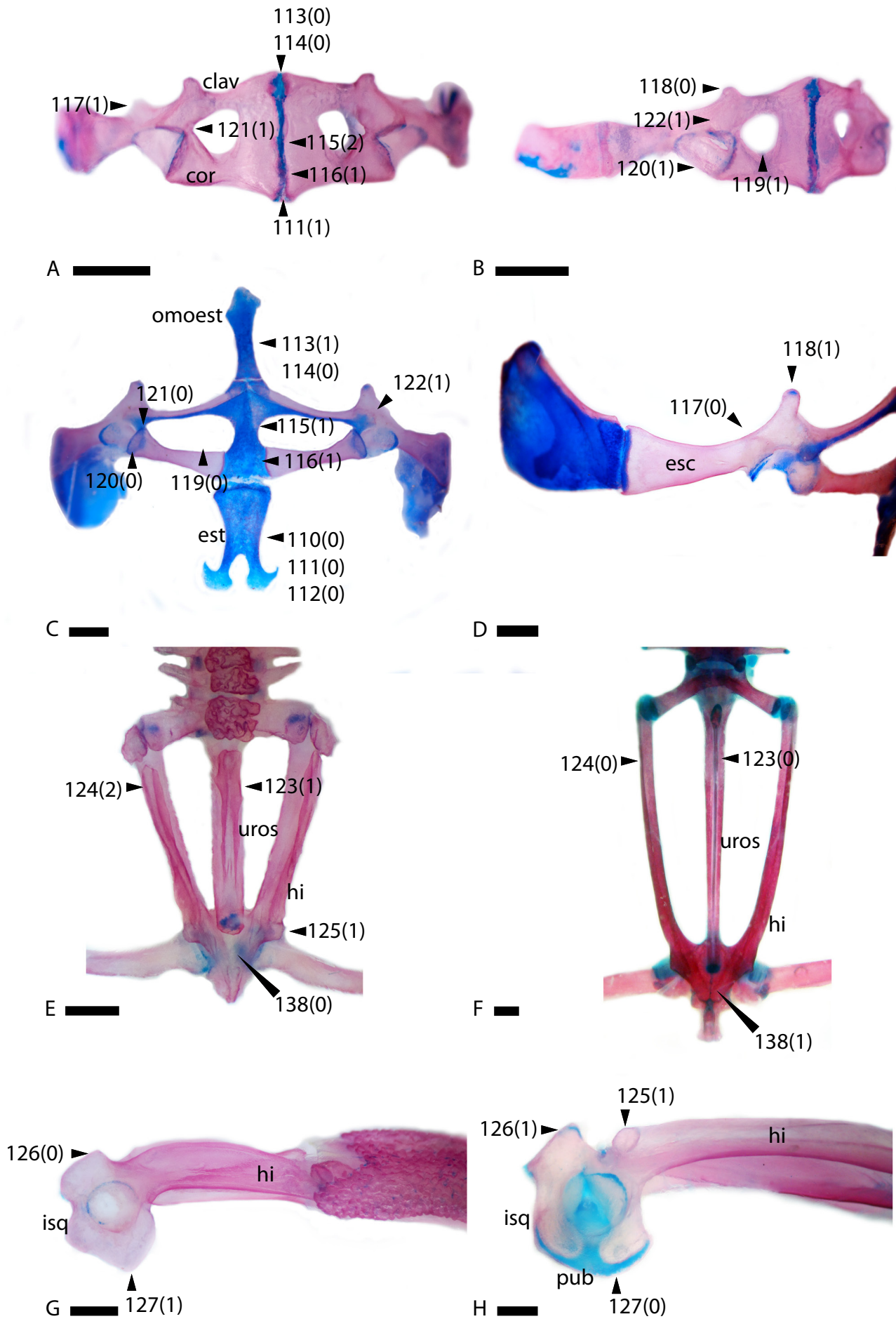


Figura 5. Vistas ventrais e laterais da cintura escapular de *Brachycephalus garbeana* (A e B), *Barycholos ternetzi* C e D) e vistas dorsais e laterais de cinturas pélvicas de *B. toby* (E), *B. ternetzi* (D e H) e *B. garbeana* (G). clav: clavícula; cor: coracóide; esc: escápula; est: esterno; hi: haste do íleo; isq: ísquio; pub: púbis; uros: uróstilo. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. Barras equivalem a 1 milímetro.

sacrais. As pré-sacrais I e II são fusionadas em espécies do gênero *Pipa* (Duellman e Trueb, 1986). Avaliamos esse atributo considerando como fusão de vértebras a união dos centra. Não fundidas (0); fundidas; (1).

76- *Fusão das vértebras IV-V*. Não fundidas (Figura 4B) (0); fundidas (Figura 4D e F) (1).

77- *Fusão das vértebras V-VI*. Não fundidas (0); fundidas (1).

78- *Fusão das vértebras VI-VII*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4F) (1).

79- *Fusão das vértebras VII-VIII*. Não fundidas (0); fundidas (1).

80- *Fusão das vértebras VIII-sacral*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4A) (1).

81- *Placa paravertebral*. Citadas em vários trabalhos como resultado de hiperossificação das vértebras ou como osteodermes (Ruibal e Shoemaker, 1984; Duellman e Trueb, 1986; Clemente-Carvalho *et al.*, 2009), sua descrição como osso pós-cranial independente foi proposta com base em dados ontogenéticos (Campos *et al.*, 2010). Assumimos que sejam independentes e a codificamos como. Ausente (0); presente (1);

Os caracteres 82 e 83, e de 84 a 109 se referem a atributos relativos às placas paravertebrais e placas espinhais. Nos táxons onde as placas não existem codificamos esses caracteres como ** (missing data). Optamos por definir esses caracteres de forma independente para melhorar a resolução entre os táxons com placas.

82- *Placas paravertebrais fusão medial*. As placas paravertebrais que se originam próximas aos processos transversos da vértebra IV podem permanecer isoladas lateralmente (Figura 4A) (0); ou podem ser fusionar medialmente às placas vertebrais (Figura 4C) (1);

83- *Tamanho relativo das placas paravertebrais*. Cobrem somente o processo transversos da vértebra IV (0); anteriormente cobrem o processo transversos da vértebra III e posteriormente o p.t. da vértebra VI (1); III-VII (Figura 4C) (2); III-VIII (Figura 4E) (3); III à sacral (4).

84- 92- *Placas espinhais de I à sacral*. As placas espinhais foram tratadas da mesma forma que as placas paravertebrais e a placa parótica. Aqui temos uma série de caracteres compostos onde avaliamos a presença de cada placa e sua ornamentação. Ausência (0); presença (1).

93- 101- *Ornamentação nas placas espinhais de I a sacral*. Ausente (0); presente (Figura 4A e E) (1).

102- *Fusão placa espinhal I-II*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4A) (1).

- 103- *Fusão placa espinhal II-III*. Não fundidas (0); fundidas (1).
- 104- *Fusão placa espinhal III-IV*. Não fundidas (0); fundidas (1).
- 105- *Fusão placa espinhal IV-V*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4E) (1).
- 106- *Fusão placa espinhal V-VI*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4E) (1).
- 107- *Fusão placa espinhal VI-VII*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4E) (1).
- 108- *Fusão placa espinhal VII-VIII*. Não fundidas (0); fundidas (1).
- 109- *Fusão placa espinhal VIII-sacral*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 4A) (1).

Cintura escapular (13 caracteres)

Os elementos pré e pós-zonais foram avaliados quanto à presença, ao tamanho relativo e ossificação.

- 110- *Esterno*. Presente (0); ausente (1).
- 111- *Esterno*. Conspícuo, como em *H. binotatus* (0); reduzido (1).
- 112- *Ossificação do externo*. Cartilaginoso (0) ossificado (1).
- 113- *Omosterno*. Discreto (Figura 5A) (0); conspícuo (Figura 5C) (1).
- 114- *Ossificação do omosterno*. Cartilaginoso (Figura 5A) (0); ossificado (1).
- 115- *Procoracóide*. Cartilaginosa (0); parcialmente ossificada (Figura 5C) (1); ossificada (Figura 5A) (2) (Izecksonh, 1971).
- 116- *Epicoracóide*. Inteiramente cartilaginosa (0); parcialmente ou totalmente ossificada (Figura 5A e C) (1).
- 117- *Processo acromial medial da escápula*. Encontramos na nossa amostra algumas espécies que apresentam um processo na região medial da escápula. Não encontramos menção desse processo na literatura e o batizamos dessa forma devido a semelhança e proximidade com o processo acromial da clavícula. Ausente (Figura 5D) (0); presente (Figura 5A) (1).
- 118- *Processo acromial da clavícula*. Analisamos a razão entre a largura e o comprimento do processo acromial da clavícula. Quando o processo tem a base maior que o comprimento codificamos como curto (Figura 5B) (0); quando o processo tem comprimento maior do que a base consideramos como longo (Figura 5D) (1).
- 119- *Forma da fossa entre coracóide e clavícula*. Entre a clavícula e a coracóide forma-se uma

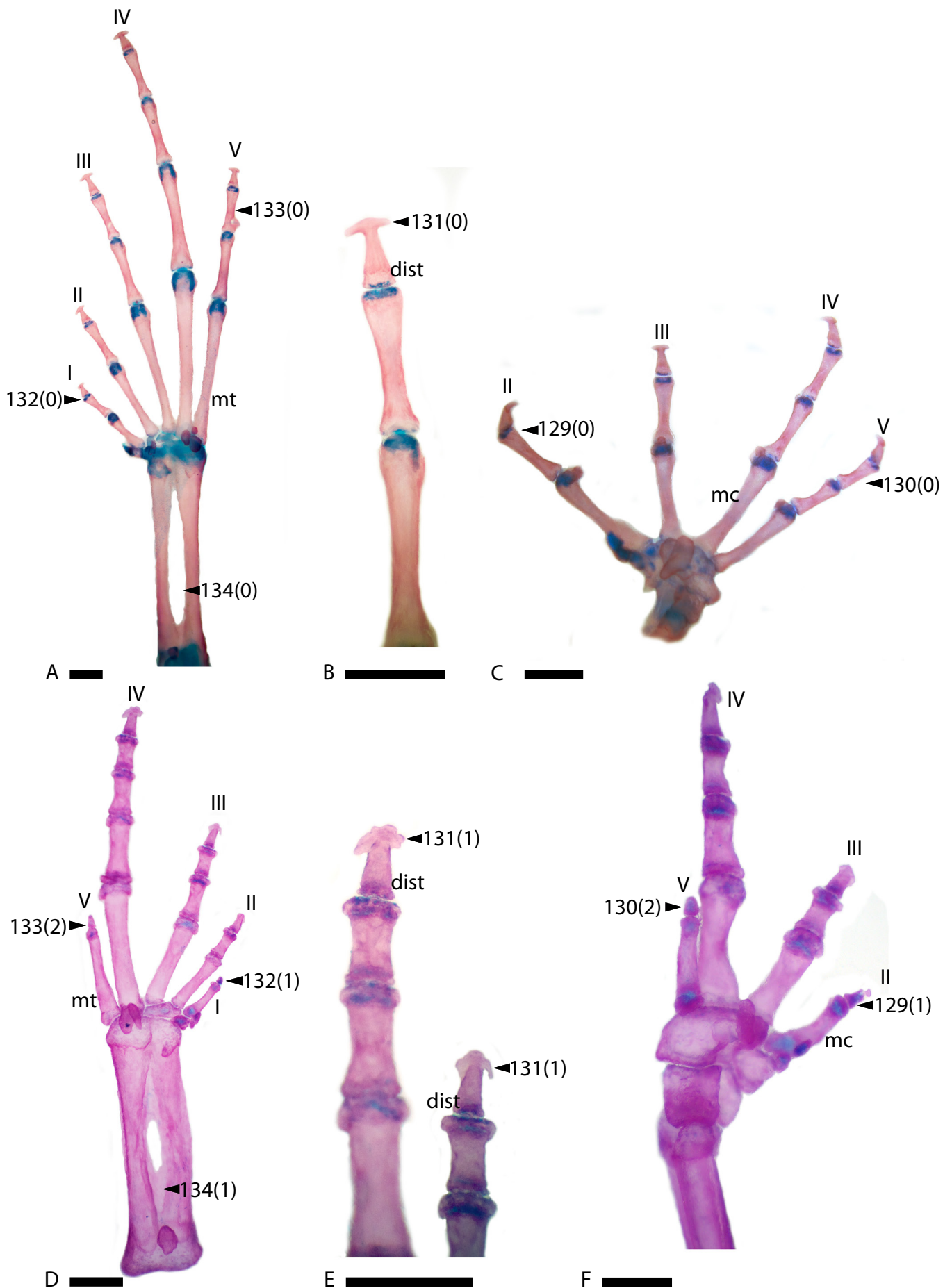


Figura 6. Esqueleto dos membros anteriores e posteriores. A- Vista ventral do membro posterior de *Barycholos ternetzi* e em detalhe do artelho IV. Em D, vista ventral do membro posterior de BMC SP4 e em E detalhe dos artelhos IV e III. Em F, vista ventral do membro anterior de BMC SP4. Números correspondem aos caracteres e números entre parênteses ao estado evidenciado. I- IV número dos dígitos e artelhos; dist: falange distal; mc: metacarpo; mt: metatarso; Barras de A- C equivalem a 1 milímetro. Barras de D a F equivalem a 0,5 milímetros.

lacuna. Essa lacuna ou fossa pode ser alongada e ter maior extensão no plano horizontal (Figura 5C) (0); ou pode ter um formato aproximadamente circular (Figura 5B) (1).

120- *Coracóide e escápula*. Não fundidas (Figura 5C) (0); fundidas (Figura 5B) (1).

121- *Coracóide e clavícula*. Não fundidas (Figura 5C) (0); fundidas (Figura 5A e B) (1).

122- *Escápula e clavícula*. Não fundidas (0); fundidas (Figura 5B) (1).

Cintura pélvica (6 caracteres)

123- *Cóccix*. Em todos os táxons de nossa amostra o cóccix apresenta uma crista espinhal. Essa crista pode ser simples sem nenhum adorno ou processo (Figura 5F) (0); pode apresentar uma expansão horizontal (Figura 5E) (1); ou ainda pode ser hipertrofiada, onde a largura do processo espinhal é igual ou superior ao cóccix (2);

124- *Crista ilial*. Semelhante ao cóccix, a haste do íleo pode apresentar uma crista. Esta crista pode ser ausente (Figura 5E) (0), pode ser simples como descrito para a crista do cóccix (Figura 5F) (1); pode apresentar uma dilatação no plano horizontal (2) a ainda pode ter essa dilatação hipertrofiada sendo mais larga que a própria haste do íleo (3).

125- *Proeminência dorsal do íleo*. Pode ser indiferenciada ou estar discretamente abaixo do nível da haste do íleo (0); ou pode se destacar atingindo um comprimento maior do que a largura da haste do íleo (Figura 5E e H) (1).

126- *Expansão acetabular dorsal*. Na porção proximal do íleo, a região dorsal à fossa acetabular apresenta uma expansão que pode ser discreta, quando não ultrapassa o nível da haste do íleo (Figura 5G) (0); ou conspícua quando esta expansão ultrapassa o nível da haste do íleo como em *I. juipoca* (Figura 5H) (1).

127- *Expansão acetabular ventral* (púbis e ísquio). Quando discreta mantém a forma aproximadamente circular da região acetabular (Figura 5H) (0); quando conspícua, a expansão dá um aspecto elíptico à região acetabular e se projeta anteriormente (Figura 5G) (1)

128- *Ísquio e púbis*. Não fundidos (0); fundidos (1).

Membros anteriores e posteriores (6 caracteres)

O número de falanges foi descrito para várias espécies de *Brachycephalus* (Izecksohn, 1971: 1988; Pombal *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006) para *Euparkerella*

(Izecksohn, 1988) e para *Adelophryne* (da Silva e Meihardt, 1999). O padrão de redução de falanges nesses três gêneros foi reavaliado por da Silva, *et al.* (2007) onde notaram que o número de falanges não é similar entre esses três gêneros, ao passo que, dentre espécies de *Brachycephalus*, os padrões de redução também variam. Aqui analisamos o número de falanges em cada dígito .

129- *Falanges no dígito II*. Anuros perderam o dígito I (Albert e Gale, 1985), portanto o dígito II equivale ao primeiro dedo na mão. Duas falanges (Figura 6C) (0); uma (Figura 6F) (1); nenhuma (2).

130- *Falanges no dígito V*. Três falanges (Figura 6C) (0); duas (1); uma (Figura 6F) (2).

131- *Forma da falange terminal*. Forma de T (Figura 6B) (0); forma de cunha (Figura 6E) (1); arredondada (2).

132- *Falanges no artelho I*. Duas falanges (Figura 6A) (0); uma (Figura 6D) (1); nenhuma (Figura 6F) (2).

133- *Falanges no artelho V*. Três falanges (Figura 6A) (0); duas (1); uma (Figura 6D) (2); nenhuma (3).

134- *Tibial-fibular*. Existe uma lacuna na região medial do osso tibial-fibular que na maioria dos anuros é simples (0). Mas em algumas espécies encontramos uma placa óssea nessa lacuna (Figura 6D) (1).

135- *Osteodermes verdadeiras*. Algumas descrições de espécies de *Brachycephalus* reportam a existência de espículas ou verrugas ossificadas (Miranda-Ribeiro, 1920; Pombal, 2001) ou ainda centros de ossificações encravados no dorso (Heyer *et al.*, 1990). *Phyllomedusa bicolor* apresenta atributo semelhante que foi caracterizado como osteoderme por Ruibal e Shoemaker (1984). No entanto, o termo osteoderme também foi usado para descrever as placas ósseas. A distinção entre as placas ósseas e osteodermes verdadeiras foi discutida em (Campos *et al.*, 2009), onde esse termo foi atribuído à espículas ósseas isoladas incrustadas na derme. Os padrões encontrados são: ausente (0); presentes somente nos flancos e em número reduzido (1); presentes nos flancos e dorso (Figura 4A) (2).

136- *Arco maxilar em vista lateral*: Em vista lateral, o arco maxilar de algumas espécies é plano como em *Ischnocnema juipoca* (Figura 2B) (0). Em outras espécies, como as de

Brachycephalus, configura-se uma curvatura cuja região anterior se encontra mais dorsal do que a posterior (Figura 2C) (1).

137- *Tamanho do ramo preoanal*: Reduzido (0); conspícuo (1).

138- *Fusão medial entre íleos*: Na região posteromedial às hastes dos íleos, pode ocorrer a fusão medial entre os dois íleos. Codificamos essa fusão como presente (Figura 5E) (0); e ausente (Figura 5F) (1).

139- *Fusão entre íleo e isquio* : Presente (0); ausente (1)

Dados de tegumento dos pés e mãos

Heyer *et al.* (1991) descrevem as protuberâncias nas palmas das mãos e planta dos pés como tubérculos e atribui nomes diferenciados de acordo com a posição que esses tubérculos ocupam. A presença ou ausência desses tubérculos é tratada nos artigos de descrição de espécies de *Brachycephalus*. Utilizamos esse caractere usando a nomenclatura original.

140- *Tubérculo metacarpal externo*: presente (0); ausente (1)

141- *Tubérculo metacarpal interno*: presente (0); ausente (1)

142- *Tubérculos falangeais na mão*: presente (0); ausente (1)

143- *Tubérculo metatarsal externo*: presente (0); ausente (1)

144- *Tubérculo metatarsal interno*: presente (0); ausente (1)

145- *Tubérculos falangeais no pé*: presente (0); ausente (1).

Análise realizada com base em dados de exame direto dos espécimes

Nessa análise, a matriz inclui apenas dados extraídos da análise dos espécimes do anexo 2, com exceção de *Ceuthomantis smaragdinus* para o qual se analisou imagens de tomografia. A análise de máxima parcimônia dessa matriz gerou três árvores igualmente mais parcimoniosas de 378 passos, índice de consistência igual a 0,434, índice de homoplasia = 0,566, índice de retenção de 0,805 e índice de retenção re-escalonado de 0,349. Para resumir a consistência entre essas duas hipóteses, geramos uma árvore de consenso estrito (Figura 7). Utilizamos os índices de Bremer e bootstrap como suporte dos ramos. Todos os valores de Bremer estão indicados nos ramos, ao passo que os valores de bootstrap só foram indicados quando maiores

que 50.

Relacionamento entre os grupos externos

Haddadus binotatus é o táxon mais próximo de *Ceuthomantis smaragdinus*, onde a árvore foi enraizada. O ramo entre os nós 56 e 55 formado por (*Ischnocnema juipoca* (*I. ramagi* (*I. lactea* (*I. gentheri* (*Barycholos ternetzi*, *I. parva*))))). Esse ramo tem Bremer igual a dois e quatro sinapomorfias, sendo estas: presença de processo postero lateral do frontoparietal (47), parasfenóide fusionado ao esfenetímóide (70), escápula e clavícula fundidas (122), expansão acetabular dorsal conspícua (126). Essa topologia explicita que o gênero *Ischnocnema* é parafilético, assim como as famílias Brachycephalidae e Strabomantidae (*sensu* Hedges *et al.*, 2008).

Grupo irmão de Brachycephalus

O clado irmão do ramo que contém *Ischnocnema* e *Barycholos* está representado no ramo entre os nós 56 e 50. É formado por (*Holoaden bradei* (*Euparkerella cochrae* (*Adelophryne* sp. (*Brachycephalus* spp.)))). Esse arranjo sustenta *Adelophryne* sp. como grupo irmão de *Brachycephalus*, *Euparkerella cochrae* como grupo irmão de *Adelophryne* mais *Brachycephalus*, e *Holoaden bradei* como grupo irmão de *Euparkerella*, *Adelophryne* e *Brachycephalus*. Esse último ramo, entre os nós 56 e 50, tem Bremer igual a 2 e apresenta 4 sinapomorfias: processo maxilar do nasal retangular com extremidade afilada (31); face dorsal do nasal com a mesma largura nos eixos crânio-caudal e transversal (32); columela ausente (57); falange terminal em forma de cunha (131). O ramo que reúne *Euparkerella cochrae* à *Adelophryne* sp. mais *Brachycephalus* spp. tem Bremer igual a 6, bootstrap igual a 83 e apresenta 9 sinapomorfias: base do processo alar mais próxima à margem posterior do prémaxilar (2); borda medial dos nasais curva em sua maior extensão (33); neopalatino discreto (61); ramo anterior do vômer ausente (62); processo dentífero do vômer presente (63); ramo póscoanal do vômer ausente (65); abas do parasfenóide não atingem margem lateral dos exoccipitais (71); Esterno reduzido (111); arco maxilar em vista lateral curvo na porção anterior (136).

O ramo que reúne *Brachycephalus* e *Adelophryne* tem Bremer de 6 e bootstrap igual a

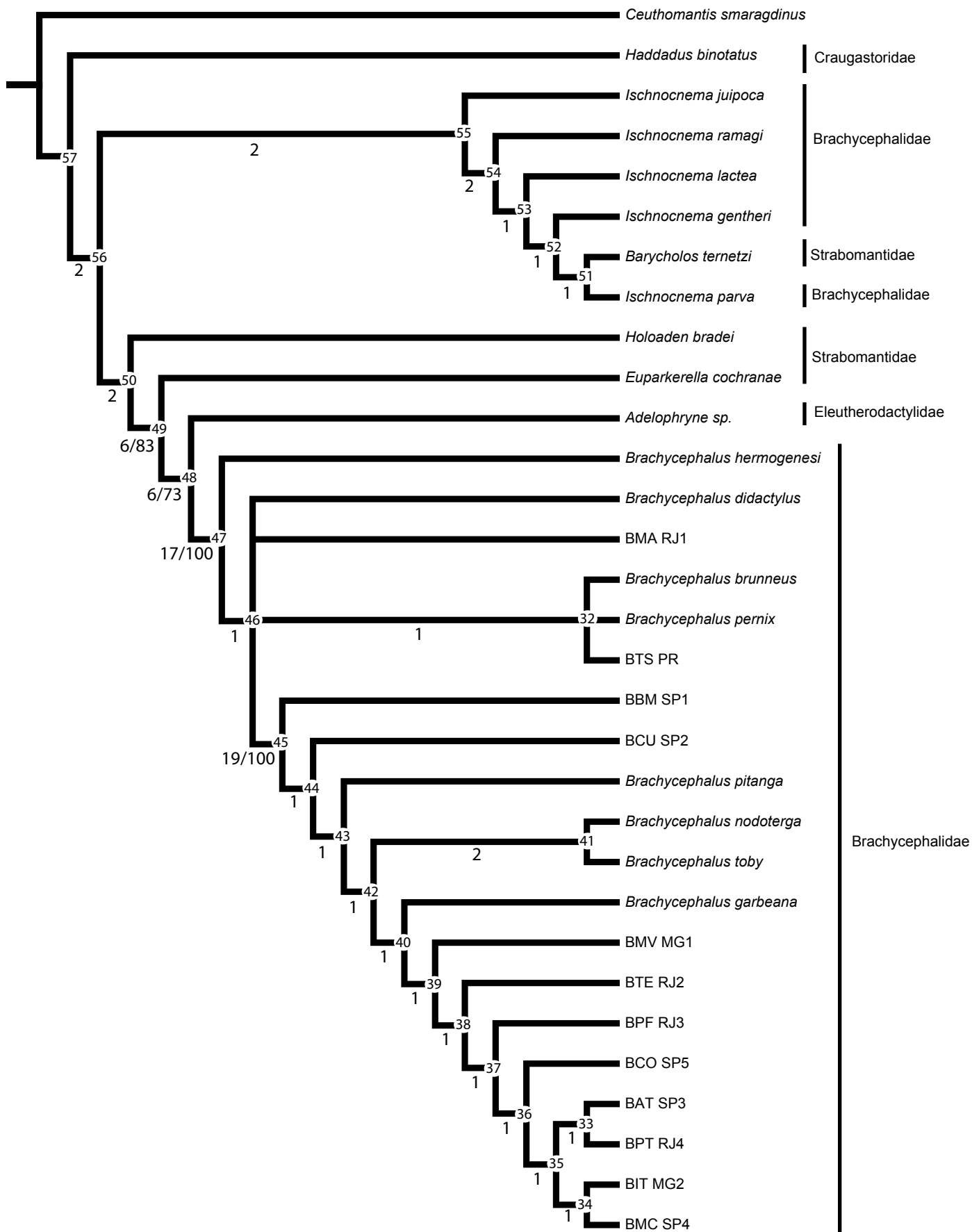


Figura 7. Hipótese filogenética entre espécies de *Brachycephalus* e outros gêneros de desenvolvimento direto do Novo Mundo. Árvore de consenso resumindo as três árvores mais parcimoniosas. À direita a classificação sensu Hedges *et al.* (2008). Números à esquerda da barra ou isolados correspondem aos valores de Bremer, enquanto números à direita da barra aos valores de Bootstrap < 50 (valores menores foram omitidos).

73. Apresenta 10 sinapomorfias, sendo estas: arco maxilar sem dentes (1); projeção palatal da maxila sem processo pterigóide (13); extremidade do processo anterior do pterigóide afilada (20); processo postero-lateral do frontoparietal ausente (47); exoccipitais fundidos (59); neopalatino ausente (60); processo acromial da clavícula curto (118); escápula e clavícula fundidas (120); ísquio e púbis não fundidos (128); íleos fundidos medialmente (138).

Monofiletismo do Gênero Brachycephalus

O gênero *Brachycephalus* aparece como um grupo monofilético. O ramo que sustenta *Brachycephalus* tem suporte de Bremer igual a 17 e de bootstrap no valor de 100. É suportado por 21 sinapomorfias: articulação entre pterigóide e maxilar curta (14); porção medial do pterigóide orientada verticalmente (19); ramo zigomático do esquamosal curto ou indistinto (22); ramo ótico do esquamosal alcança entre a metade e dois terços da extensão da margem lateral da cápsula ótica (24); processo maxilar do nasal em forma de barra vertical com extremidade afilada (31); janela oval orientada lateralmente em relação ao eixo longitudinal do crânio (55); parasfenóide mais esfenetimóide fundidos (70); procoracóide parcialmente ossificada (115); epicoracóide parcialmente ou totalmente ossificada (116); processo acromial medial da escápula presente (117); fossa entre coracóide e clavícula de forma circular (119); coracóide e clavícula fundidas (121); escápula e clavícula fundidas (122); expansão acetabular ventral conspícua (127); uma falange no dígito II (129); uma falange no dígito V (130). nenhuma falange no artelho I (132); tubérculo metacarpal interno ausente (141); tubérculos falangeais da mão ausentes (142); tubérculo metatarsal interno ausente (144); tubérculos falangeais do pé ausentes (145).

Relacionamento entre espécies de Brachycephalus

Brachycephalus hermogenesi é a espécie irmã de todas as demais espécies do gênero *Brachycephalus*. No ramo adjacente temos uma politomia entre (*B. didactylus*, B. MA RJ1 (*B. brunneus*, *B. pernix*, BTS PR) (*Brachycephalus* spp.)). Apesar de não estarem separados em clados diferentes, *B. didactylus* e BMA RJ1 apresentam várias apomorfias que os distinguem entre si e das demais espécies de *Brachycephalus* (Tabela 1). *B. brunneus* e *B. pernix* e BTS PR estão agrupadas como espécies irmãs. O ramo que sustenta esse agrupamento apresenta as

seguintes sinapomorfias: quadradojugal presente (17); ramo zigomático do esquamosal bem desenvolvido (22); ramo zigomático do esquamosal com dilatação dorsoventral livre (23); ramo ótico do esquamosal alcança toda a extensão da cápsula ótica (24); nasais e esfenetmóide em amplo contato e fusionados (28); bordas medias dos nasais reta em sua maior extensão (33); regiões proximais e distais da cápsula ótica com larguras aproximadas (54); cóccix com expansão horizontal (123); tibial-fibular com placa medial (134) tubérculo metatarsal externo ausente (143).

Tabela 1. Apomorfias que sustentam a distinção entre *B. didactylus* e BMA RJ1.

Ramo	Carractere	CI	Transformação
ramo entre o nó 46 e <i>B. didactylus</i>	9	0.200	1 --> 0
	43	0.333	0 ==> 1
	67	0.750	3 ==> 2
	73	0.333	0 ==> 1
	112	0.167	0 ==> 1
	115	0.333	1 ==> 2
ramo entre o nó 46 e BMA RJ1	10	0.333	0 ==> 1
	25	0.667	0 ==> 1
	26	0.667	0 ==> 1
	27	0.333	2 ==> 1
	37	0.429	3 ==> 1
	38	0.286	2 ==> 1
	41	0.250	1 ==> 0
	59	0.250	1 ==> 0
	68	0.200	0 --> 1
	70	0.250	1 ==> 0
	72	0.250	2 ==> 0
	138	0.200	0 ==> 1
	140	0.500	1 ==> 0

CI: índice de consistência

--> transformação ambígua

==> transformação não ambígua

Brachycephalus com placas ósseas adicionais

Todas as espécies de *Brachycephalus* que apresentam placas formam um grupo monofilético. Esse clado apresenta suporte de Bremer de 19 e de bootstrap igual a 100. Apresenta 31 sinapomorfias apresentadas a seguir: projeção palatal da maxila com processo

pterigóide (13); presença de ornamentação no ramo ótico do esquamosal (21); esquamosal está num plano mais ventral à cápsula ótica (25); ramo ótico do esquamosal triangular (26); nasais e esfenetimóide com amplo contato e fusionados (28); porção antero-medial dos nasais com recuo côncavo (34); porção postero-medial dos nasais fundidas (35); frontoparietais fundidos aos nasais (36); abas orbitais posteriores do frontoparietal presentes (43); porção parietal do frontoparietal ornamentada (45); processo póstero-lateral do frontoparietal presente (47); crista pós-orbital presente (48); placa parótica presente (49); porção ventral do neurocrânio ossificada (73); vértebras sobrepostas (74); vértebras VIII e sacral fundidas (80); placas paravertebrais presentes (81); placas espinhais de I à sacral presentes (84 à 92); procoracóide ossificada (115); processo espinhal do cóccix expandido (123); crista ilial com dilatação no plano horizontal (124); uma falange no artelho I (132); tubérculo metatarsal externo ausente (143).

BBM SP1 é o táxon que representa o grupo irmão de todas as outras espécies com placa ósseas. No ramo adjacente temos o arranjo (BCU SP2 (*B. pitanga* (*B. nodoterga*, *B. toby*) (*Brachycephalus* spp.) uma politomia composta por (*B. pitanga*, BCU SP2 (*B. nodoterga*, *B. toby*) *Brachycephalus* spp.)). O ramo que reúne *B. nodoterga* e *B. toby* tem suporte de bremer igual a 2 e apresenta cinco sinapomorfias: projeção lateral da cápsula ótica discreta (52); esterno ossificado (112); expansão acetabular dorsal conspícua (126); nenhuma falange no artelho I (132); tibial-fibular sem placa medial (134).

Espécies com grandes placas ósseas

Brachycephalus garbeana forma um grupo com os táxons BTE RJ4, BMV MG2, BAT SP3, BPT RJ3, BCO SP5, BIT MG1 e BMC SP4, que comumente são identificadas como *B. ephippium* (Alberch e Gale, 1985; Sebben *et al.*, 1986; Pombal *et al.*, 1998 e outros) e com BPF RJ2. Esse grupo é facilmente diagnosticado por apresentar grandes placas ósseas tanto no crânio quanto no dorso. Placas essas notáveis inclusive externamente, tanto *a fresco* quanto em exemplares preservados. O ramo que reúne essas espécies apresenta sete sinapomorfias, sendo estas: abas orbitais laterais do frontoparietal conspícuas (42); placa parótica cobre o ápice do esquamosal e a cápsula ótica lateralmente (50); vértebras IV e V fundidas (76); vértebras VIII e sacral não fundidas (80); placas paravertebrais fusionadas medialmente às placas espinhais (82);

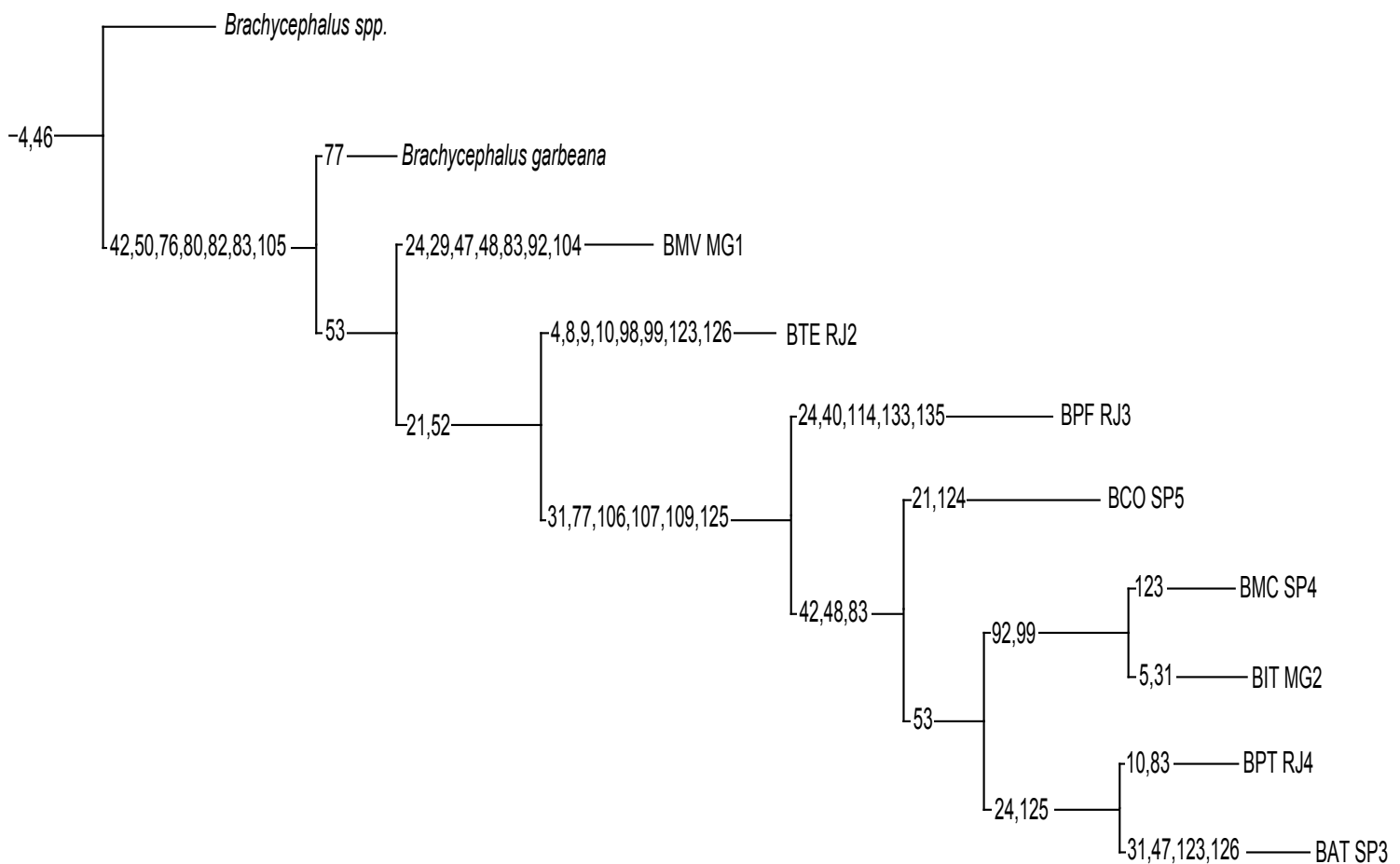


Figura 8. Trecho do cladograma destacando as populações para as quais se atribuiu o nome *Brachycephalus ephippium*. Ramos proporcionais ao número de passos. Números indicam os caracteres que são apomorfias de cada ramo.

cobertura dorsal das placas paravertebrais se estende anteriormente até o processo transversal da vértebra III e posteriormente até o processo transversal da vértebra VII (83); placas espinhais IV e V fundidas (105).

A figura 8 destaca a porção do cladograma relativo a essas populações e mapeia as sinapomorfias de cada ramo terminal e dos ramos internos. Usando o número de apomorfias podemos inferir o grau de diferenciação entre esses táxons. Destacamos na tabela 2 os caracteres diagnósticos de cada táxon terminal e dos ramos intermediários que sustentam esses táxons. Com base nessas informações temos suporte para discutir o status taxonômico dessas populações. Esses táxons formam um grado que pode ser descrito da seguinte forma: (*B. garbeana* (BMV MG2 (BTE RJ4 (BPF RJ2 (BCO SP5 ((BAT SP3 BPT RJ3)(BIT MG1 BMC SP4)))))). Todos os ramos intermediários desse grado tem suporte de Bremer igual de 1.

Tabela 2. Apomofias que sustentam os ramos do trecho do cladograma correspondente as espécies que apresentam grandes placas ósseas.

Ramo	Caractere	C.I.	Transformação
ramo entre os nós 42 e 40	40	0.143	1 --> 0
	42	0.500	0 ==> 1
	50	1.000	0 ==> 1
	76	1.000	0 ==> 1
	80	0.500	1 ==> 0
	82	1.000	0 ==> 1
	83	0.600	0 ==> 3
	105	1	0 ==> 1
ramo entre o nó 40 e <i>B. garbeana</i>	77	0.500	0 ==> 1
	135	0.400	0 --> 1
ramo entre os nós 40 e node39	6	0.167	0 --> 1
	53	0.250	1 ==> 0
	100	0.333	1 --> 0
ramo entre os nós 39 e 38	21	0.333	1 ==> 0
	52	0.200	1 ==> 0
	102	0.333	1 --> 0
	112	0.167	0 --> 1
ramo entre o nó 38 e BTE RJ2	4	0.200	1 ==> 0
	8	0.250	0 ==> 1
	9	0.200	0 ==> 1
	10	0.333	0 ==> 1
	98	0.500	1 ==> 0
	99	0.333	1 ==> 0
	123	0.333	1 ==> 2
	126	0.250	1 ==> 0
ramo entre os nós 38 e 37	31	0.250	2 ==> 1
	77	0.500	0 ==> 1
	106	1.000	0 ==> 1
	107	0.500	0 ==> 1
	109	0.500	1 ==> 0
	125	0.111	0 ==> 1
ramo entre os nós 37 e 36	42	0.500	1 ==> 0
	48	0.250	1 ==> 0
	78	0.500	0 --> 1
	83	0.600	3 ==> 2
	102	0.333	0 --> 1
ramo entre os nós 36 e 35	104	0.500	0 --> 1
	52	0.200	0 --> 1
ramo entre os nós 35 e 33	53	0.250	0 ==> 1
	24	0.250	2 ==> 1

Tabela 2. Continuação

Ramo	Caractere	C.I.	Transformação
ramo entre os nós 35 e 33	125	0.111	1 ==> 0
ramo entre o nó 33 e BAT SP3	31	0.250	1 ==> 2
	47	0.167	1 ==> 0
	123	0.333	1 ==> 2
	126	0.250	1 ==> 0
ramo entre o nó 33 e BPT RJ4	10	0.333	0 ==> 1
	83	0.600	2 ==> 3
ramo entre os nós 35 e 34	92	0.333	1 ==> 0
	99	0.333	1 ==> 0
	5	0.500	1 ==> 0
ramo entre o nó 34 e BIT MG2	31	0.250	1 ==> 2
	52	0.200	1 --> 0
ramo entre o nó 34 e BMC SP4	123	0.333	1 ==> 0
ramo entre o nó 36 e BCO SP5	21	0.333	0 ==> 1
	124	0.667	1 ==> 0
ramo entre o nó 37 e BPF RJ3	24	0.250	2 ==> 1
	40	0.143	0 ==> 1
	114	0.250	0 ==> 1
	133	0.667	2 ==> 1
	135	0.400	0 ==> 2
ramo entre o nó 39 e BMV MG1	24	0.250	2 ==> 1
	29	0.500	1 ==> 0
	47	0.167	1 ==> 0
	48	0.250	1 ==> 0
	83	0.600	3 ==> 2
	92	0.333	1 ==> 0
	104	0.500	0 ==> 1

CI: índice de consistência

--> transformação ambígua

==> transformação não ambígua

Análise incluindo dados de reinterpretação da literatura

Uma segunda matriz contendo três táxons adicionais em relação à anterior (*Brachycephalus ferruginus*, *B. izecksohni* e *B. pombali*) foi construída e analisada de forma semelhante à matriz anterior. Esta nova análise resultou em 3 árvores igualmente parcimoniosas com 404 passos, índice de consistência de 0,413; índice de homoplasia de 0,587; índice de retenção de 0,797 e índice de retenção re-escalonado de 0,329. Para resumir os pontos de concordância dessas duas árvores, geramos uma árvore de consenso estrito apresentada na figura 9.

As duas árvores de consenso apresentam hipóteses muito semelhantes. As diferenças mais significativas dizem respeito às espécies de *Brachycephalus* sem placas. Na árvore da figura 9 o gênero *Brachycephalus* é monofilético, onde *B. hermogenesi* é a espécie mais próxima do grupo irmão de *Brachycephalus*, o táxon *Adelophryne* sp. A seguir temos dois grupos dentro do gênero *Brachycephalus*. Um contendo uma politomia entre os táxons BTS PR, *B. izecksohni*, *B. pernix*, *B. brunneus*, *B. ferruginus*, e *B. pombali*, e outro contendo (BMA RJ1 (*B. didactylus* (*Brachycephalus* spp. com placas))). As relações entre as espécies de *Brachycephalus* a partir do táxon BMA RJ1 se mantêm como na árvore da figura 7.

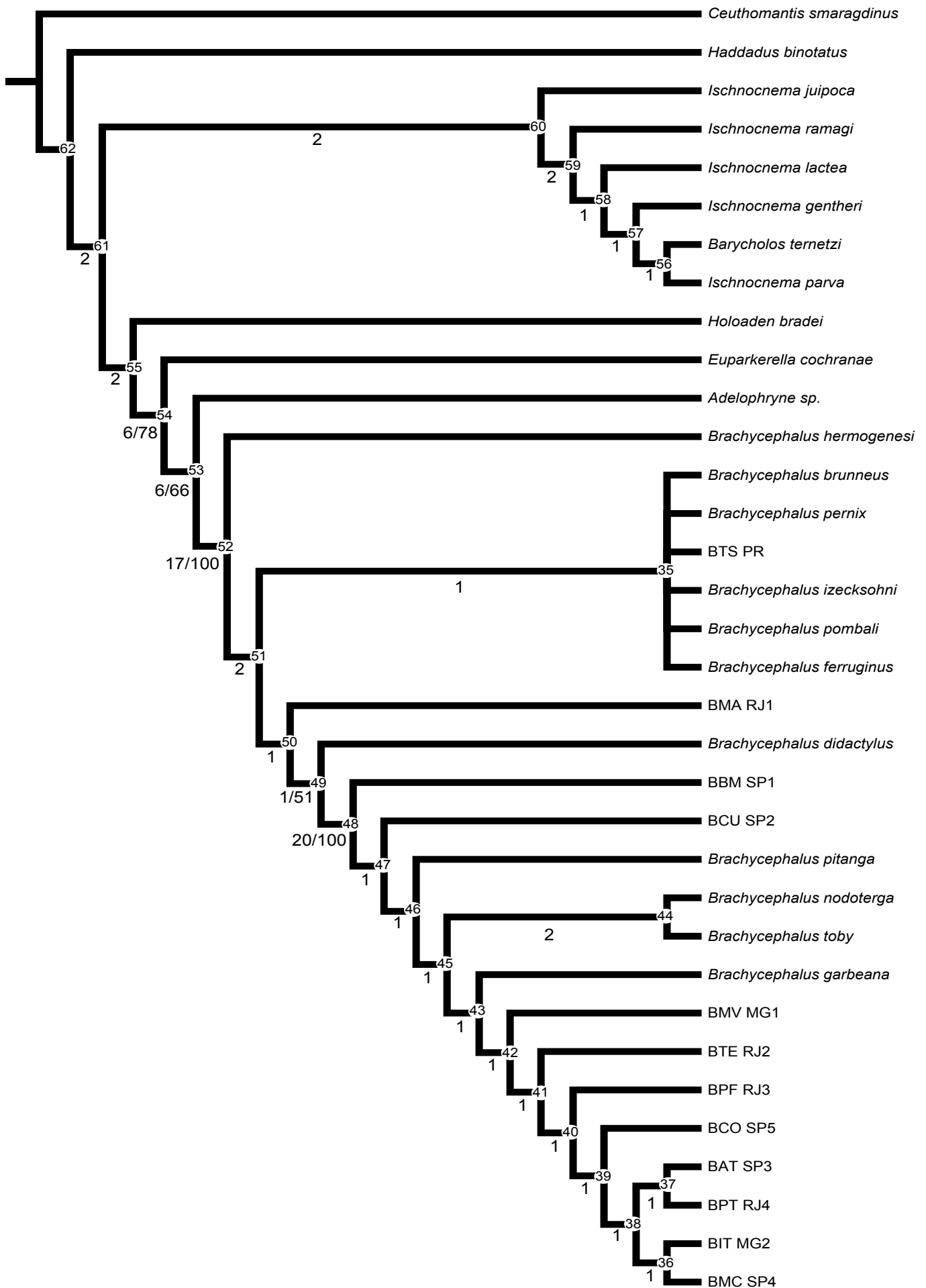


Figura 9. Cladograma de consenso resumindo as duas árvores mais parcimoniosas da análise que inclui dados da literatura. Números à esquerda da barra ou isolados correspondem aos valores de Bremer, enquanto números à direita da barra aos valores de Bootstrap < 50 (valores menores foram omitidos)

Discussão

Monofiletismo do gênero *Brachycephalus*

Embora não existissem dúvidas a respeito do monofiletismo do gênero *Brachycephalus*, poucos dados sobre variação morfológica de *B. ephippium* (Clemente-Carvalho *et al.*, 2008) ou de amostras de DNA extraídas de tecidos de exemplares desta espécie (Darst e Cannatella, 2004, Frost *et al.*, 2005, Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008) foram utilizados. Com exceção dos trabalhos de da Silva *et al.* (2007), Campos *et al.* (2010) e Clemente-Carvalho (2009), a espécie tipo do gênero era a única conhecida e analisada. Nossos esforços (da Silva *et al.* 2007 e Campos *et al.*, 2010) de coleta e análise morfológica de populações de *B. ephippium* e de algumas outras espécies do gênero descritas mais recentemente, apresentaram as primeiras descrições da diversidade no grupo, que hoje é representado por 17 espécies, das quais 12 foram amostradas naqueles trabalhos. Com base nestas análises, sugerimos que a orientação posterior da janela oval; a perda de uma falange nos dígitos II e V e perda de uma ou duas falanges nos artelhos I e V representem sinapomorfias para o gênero *Brachycephalus*. Entretanto, um teste explícito desta hipótese, que avaliasse ao mesmo tempo, várias fontes de evidencia, não havia sido explorado ainda. Aqui, corroboramos a hipótese de que o gênero *Brachycephalus* é monofilético e reunimos evidências morfológicas suficientes para propor uma hipótese de relacionamento entre as espécies do gênero. Nossos esforços geraram 145 caracteres, dos quais em torno de 100 representam novos caracteres enquanto os outros 45 são caracteres já utilizados na literatura, mas não necessariamente num contexto filogenético.

Com base na ausência de órgão de Bidder em *Brachycephalus ephippium*, a família Brachycephalidae havia sido recém revalidada por McDiarmid (1971) contendo apenas o gênero *Brachycephalus*, quando o gênero *Psyllophryne* é descrito por Izecksonh (1971). Este autor propõe então a existência de duas linhagens distintas dentro de Brachycephalidae, diagnosticáveis pela redução do número de dedos em *Psyllophryne* e pela ausência de omosterno em *Brachycephalus*. A descrição de uma segunda espécie de *Psyllophryne* (Giaretta e Sawaya, 1998) corrobora essa subdivisão, mas reduz os caracteres diagnósticos ao reportarem que *P. hermogenesi* apresentava o artelho V distinto. Pombal *et al.*(1998) descrevem *Brachycephalus*

pernix e também corroboram a divisão em dois gêneros, mas alertam para o fato de que o único atributo que distingue esses gêneros seria ausência de omosterno em *Brachycephalus*. Kaplan (2002) analisa a estrutura histológica da cintura pélvica de *B. ephippium* e conclui que o omosterno está presente nessa espécie, embora drasticamente reduzido, e que, portanto, não restaria nenhum atributo que sustentasse a separação desses gêneros. Desde então *Psyllophryne* é considerado sinônimo de *Brachycephalus*.

Nossa amostragem do gênero incluiu espécies de dois grupos *a priori* distintos, um contendo placas ósseas no esqueleto pós-craniano, outro sem essas placas, que também agrupa espécies menores, que apresentam colorido distinto dos primeiros. A espécie tipo do gênero *Psyllophryne* (*Brachycephalus didactylus*) também foi analisada. Quando incluímos os dados provenientes da reinterpretação dos dados da literatura, encontramos evidências de suporte de linhagens distintas entre *Brachycephalus* (Figura 9). De um modo geral os resultados se mantêm semelhantes, entretanto, em parte os *Brachycephalus* sem placa, particularmente as espécies do sul do Brasil (BTS PR, *B. izecksohni*, *B. pernix*, *B. bruneus*, *B. ferruginus* e *B. pombali*) formam um grupo monofilético que é irmão de BMA RJ1, que é irmão de *B. didactylus*, que é irmão das espécies com placas. Aqui também, *B. hermogenesi* aparece como grupo irmão de todos os outros *Brachycephalus*. Em nenhuma dessas hipóteses o gênero *Psyllophryne* é recuperado como monofilético.

Conduzimos mais um conjunto de análises onde forçamos o monofiletismo das espécies de *Brachycephalus* sem placa, como o objetivo de testar, com base na amostragem taxonômica e de caracteres aqui investigada, quantos passos adicionais seriam necessários para que uma hipótese que incluísse o monofiletismo de *Psyllophryne* fosse recuperada. Para tal, construímos uma topologia que forçasse dois clados dentro de *Brachycephalus*, um incluindo as espécies com placa, o outro as sem placa. Submetemos, então, essa árvore a um processo de busca heurística semelhante aos apresentados para as outras análises aqui apresentadas. Para possibilitar comparações com as análises anteriores, onde temos diferentes composições de táxons, realizamos duas análises forçadas, uma incluindo somente dados de análise direta dos exemplares e outra incluindo os dados de reinterpretação da literatura. Os cladogramas resultantes estão nas figuras 10 e 11. A primeira análise com topologia imposta (constrained

analysis) resultou em duas árvores, 9 passos mais longa que a análise anterior com os mesmos táxons. A segunda análise, que inclui os táxons *Brachycephalus ferruginus*, *B. izecksohni* e *B. pombali*, resultou em uma árvore com 8 passos adicionais em relação à árvore da análise anterior com os mesmos táxons.

Enquanto nas análises sem topologias impostas as espécies sem placas da região Sul formaram uma politomia, nas análises forçadas essas espécies formaram um grado. Na primeira análise forçada, o trecho da árvore que apresenta estas espécies tem a seguinte topologia (*B. didactylus* (BMA RJ1 (*B. hermogenesi* (BTS PR (*B. brunneus* e *B. pernix*))))). Na segunda análise forçada, a topologia do trecho da árvore que contém essas espécies foi: (*B. didactylus* (BMA RJ1 (*B. hermogenesi* (BTS PR (*B. brunneus* e *B. pernix*)))(*B. pombali* e *B. izeckshoni*)). Guardada as diferenças no número de táxons, as duas análises forçadas apresentaram topologia similares. Provavelmente a aproximação de *B. didactylus* e BMA RJ1 de *B. hermogenesi* e demais espécies sem placas foi responsável pelo maior custo dessas reconstruções. As topologias dos demais trechos das árvores resultantes das análises forçadas são idênticas entre si e idênticas às topologias das análises não forçadas.

A diversidade de espécies entre os *Brachycephalus* sem placas também é subestimada. Externamente, BMA RJ1 assemelha-se à *B. didactylus*, mas em nossas análises formam linhagens distintas (Figuras 7, 9, 10, 11). *B. hermogenesi* é a espécie sem placas com maior distribuição geográfica, com ocorrência registrada nos municípios de Paraty, no Rio de Janeiro, e Picinguaba, Ubatuba, Salesópolis e Cotia no estado de São Paulo (Pimenta *et al.*, 2006, Verdade *et al.*, 2008). Salesópolis está à 110 km de Picinguaba e à 105 km de Cotia em linha reta. A investigação de áreas similares entre essas localidades poderá revelar novas populações de *Brachycephalus* sem placas. A inclusão de exemplares de *Brachycephalus* sem placas em nossas análises poderá não só alterar a topologia da árvore como revelar novos caracteres que sustentem os grupos monofiléticos dentro de *Brachycephalus* além do grupo com placas.

Algumas espécies recém-descritas ou revalidadas não tiveram sua estrutura óssea avaliada como *B. atelopoide*, *B. bufonoide* e *B. pulex*. Com base nas fotografias publicadas do lectótipo de *B. bufonoide* em Pombal (2010, fig. 4) podemos notar indícios da presença de placas espinhais, paravertebrais e da placa parótica. O holótipo de *B. atelopoide* provavelmente

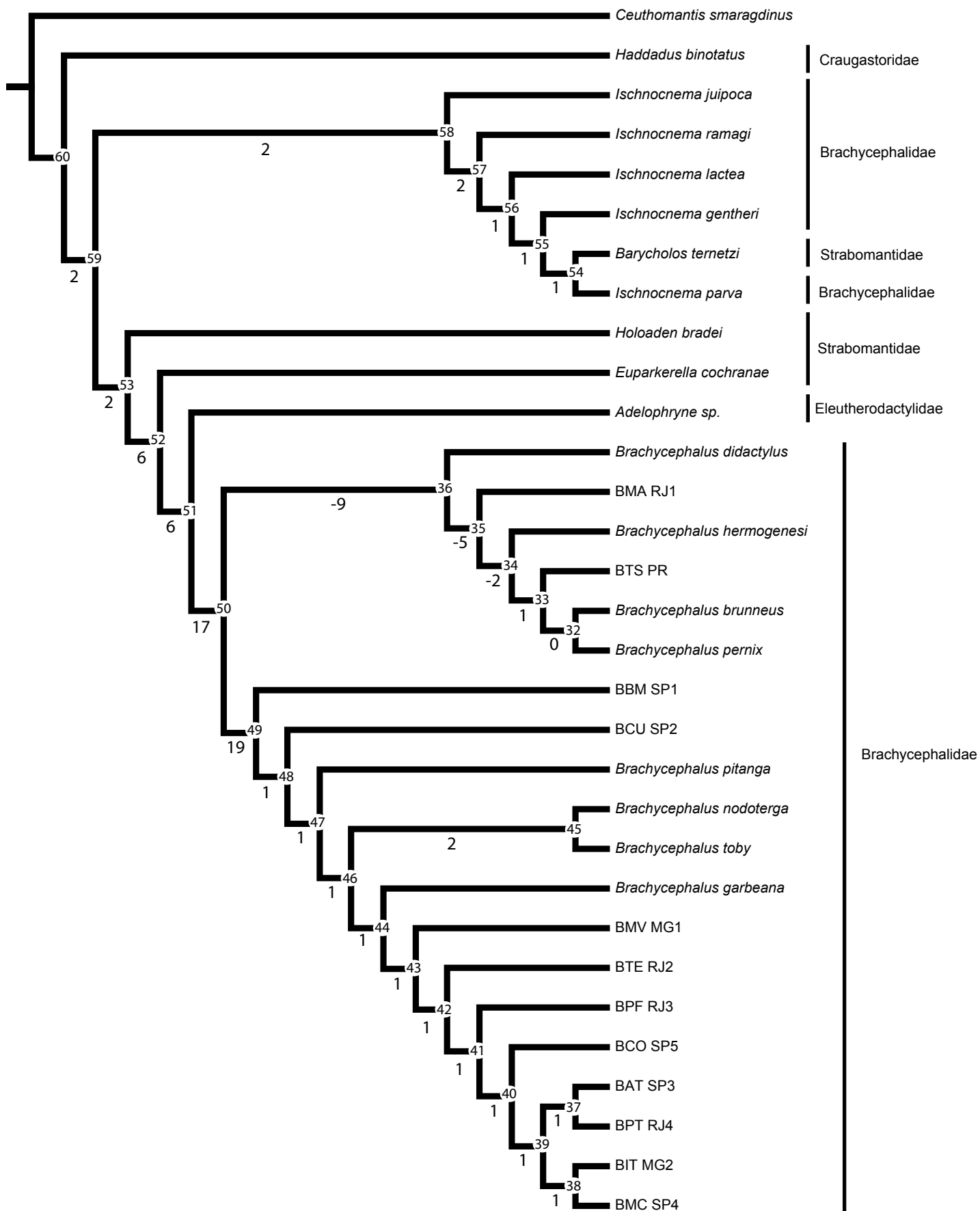


Figura10. Árvore de consenso da análise onde forçamos o monofiletismo das espécies sem placas do gênero *Brachycephalus*. Árvore com 391 passos.



Figura 11. Árvore de consenso da análise onde forçamos o monofiletismo das espécies sem placas do gênero *Brachycephalus* e incluímos dados da literatura. Árvore com 412 passos.

está perdido (Pombal, 2010), mas a descrição original reporta a ausência de evidências externas de placas ósseas. Em *B. pulex* também não foram encontradas evidências externas de ossificação no crânio ou nas vértebras (Napoli *et al.*, 2011). Mas a confirmação da presença de placas nessas espécies deve permanecer por esclarecer mesmo com indícios externos de ausência, ao passo que as placas ósseas podem estar presentes mesmo não sendo perceptíveis externamente como em *B. alipioi* (Pombal e Gasparini, 2006; Clemente-Carvalho *et al.*, 2010).

Miniaturização e redução de dígitos

A perda de elementos ósseos nos dedos dos pés e das mãos (artelhos e falanges) pode estar associada à miniaturização, como é sugerido por diferentes autores (Albert e Gale, 1985; Trueb e Alberch, 1985). Na tabela 3 destacamos as fórmulas de falanges de espécies de *Brachycephalus*, *Euparkerella* e *Adelophryne*. Como notado anteriormente por da Silva *et al.* (2007), *Euparkerella* e *Adelophryne* não apresentam redução na fórmula das falanges. Aqui, acrescentamos dados de mais uma espécie de *Adelophryne* e confirmamos essa informação. *Euparkerella tridactyla* apresenta uma falange a menos no quinto dedo. Em alguns casos, a ausência de uma falange (ou artelho) pode não ser percebida externamente. Um mesmo padrão externo pode representar diferentes morfologias, tais como redução no número de falanges, redução do tamanho das falanges ou, ainda, redução no tamanho dos metatarsos. Todos esses atributos representam eventos distintos e possivelmente independentes, que podem ocasionar na redução do tamanho e distinção de um dedo ou artelho. Em quase todos os trabalhos de descrição de espécies do gênero a distinção de dedos e artelhos são usadas na diagnose (Pombal *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2005; Pombal e Gasparini, 2006). Para diferenciar táxons, a distinção entre os dois tipos de fenótipo – redução de tamanho e perda - é menos importante. Contudo, em nossas análises optamos por considerar o número de falanges em cada dedo (pés e mãos) como eventos diferentes e independentes.

Tabela 3. Fórmulas falangeais dos membros anteriores e posteriores dos gêneros onde se reporta redução nos dedos (*Adelophryne*, *Brachycephalus* e *Euparkerella*)

Espécie	Fórmulas		Referências
	Falanges	Artelhos	
<i>Euparkerella robusta</i>	2-2-3-2	2-2-3-4-3	(Izecksohn, 1988)
<i>Euparkerella tridactyla</i>	2-2-3-2	2-2-3-4-2	(Izecksohn, 1988)
<i>Euparkerella cochranæ</i>	2-2-3-2	2-2-3-4-3	(Izecksohn, 1988)
<i>Adelophryne adiaastola</i>	2-2-3-2	2-2-3-4-3	(da Silva e Meihardt, 1999)
<i>Adelophryne sp.</i>	2-2-3-2	2-2-3-4-3	Nossas observações
<i>Brachycephalus alipioi</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-1	(Pombal e Gasparini, 2006)
<i>B. atelopoide</i>	?	?	-
<i>B. brunneus</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-0	(Ribeiro <i>et al.</i> 2005)
<i>B. bufonoides</i>	?	?	-
<i>B. didatylus</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-1	(Albert e Gale, 1985)
BMA RJ1	1-2-3-1	0-2-3-4-1	Presente trabalho
“ <i>B. ephippium</i> ”			
BAT SP3	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BCO SP5	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BIT MG1	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BMC SP4	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BMV MG2	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BPT RJ3	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BTE RJ4	1-2-3-1	1-2-3-4-1	(Albert e Gale, 1985)*
BPF RJ2	1-2-3-1	1-2-3-4-2	Presente trabalho
<i>B. ferruginus</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-1	(Alves <i>et al.</i> 2006)
<i>B. garbeana</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
<i>B. hermogenesi</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-2	Presente trabalho
<i>B. izecksohni</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-0	(Ribeiro <i>et al.</i> 2005)
<i>B. nodoterga</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-1	Presente trabalho
<i>B. pernix</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-0	(Pombal <i>et al.</i> 1998)
<i>B. pitanga</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
<i>B. pombali</i>	1-2-3-1	1-2-3-4-1	(Alves <i>et al.</i> 2006)
<i>B. pulex</i>	?	?	-
<i>B. toby</i>	1-2-3-1	0-2-3-4-1	(da Silva <i>et al.</i> 2007)**
<i>B. vertebralis</i>	?	?	-
BBM SP1	1-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho
BCU SP2	0-2-3-1	1-2-3-4-1	Presente trabalho

*Albert e Gale mencionam no trabalho um espécime do MCZ identificado como *Brachycephalus ephippium*, no entanto não mencionam o número de tombo. Analisando os registros de espécimes disponíveis na data do trabalho supomos que a maior probabilidade é que seja um exemplar de Teresopolis.

** Em da Silva *et al.* (2007) identificamos os espécimes de Ubatuba, Morro do Corcovado como *B. vertebralis*.

As evidências aqui analisadas indicam que a perda de uma falange do dedo II; uma falange no dedo V e a perda de uma falange no artelho I são condições sinapomórficas no gênero *Brachycephalus*. Entretanto, no táxon BCU SP2 ocorreu ainda perda de duas falanges no dedo II. Um evento de perda de falanges no artelho V ocorreu no ramo que reúne todas

as espécies de *Brachycephalus*. Entretanto, a análise não determinou de forma inequívoca se houve a perda de uma ou duas falanges no artelho V. No ramo irmão de *B. hermogenesi* o estado uma falange no artelho V é inequívoco. *B. hermogenesi* e BPF RJ2 apresentam novamente duas falanges no artelho V, mas de forma independente. Dessa forma, a condição similar encontrada em *Euparkerella tridactyla* e *B. hermogenesi* e BPF RJ2, onde os três táxons apresentam duas falanges no artelho V, trata-se de uma convergência.

A relação proposta entre miniaturização e redução de dedos foi concebida em um contexto amplo, onde se comparou grupos miniaturizados (comprimento rostro-cloacal < 20 mm) e grupos não miniaturizados (Albert e Gale, 1985; Trueb e Alberch, 1985). Entretanto, quando comparamos os dígitos entre espécies de *Brachycephalus*, *Euparkerella* e *Adelophryne*, estamos lidando apenas com anuros miniaturizados. Analisando as diferenças de tamanho entre espécies de *Brachycephalus* não observamos uma relação evidente entre tamanho e redução de dígitos no grupo.

Brachycephalus com placas

As espécies de *Brachycephalus* que apresentam placas se diferenciam muito das demais por compartilharem uma série de características derivadas associadas a esses elementos. O ramo que reúne as espécies com placas apresenta a maior quantidade de apomorfias não ambíguas e os maiores índices de suporte. Da Silva *et al.* (2007) e Campos *et al.* (2010) propuseram que a placa parótica, a placa paravertebral e as placas espinhais seriam sinapomorfias de um grupo de espécies dentro do gênero *Brachycephalus*. Nossas análises indicam que essas estruturas são caracteres homólogos que surgiram apenas uma vez no gênero *Brachycephalus*. Dados de ontogenia indicam que as placas paravertebrais surgem primeiramente sobre os processos transversos da quarta vértebra e, ao longo do desenvolvimento, crescem tanto no eixo crânio-caudal quanto medialmente, até se fundirem às placas espinhais (Campos *et al.*, 2010). A distribuição dos caracteres relativos às placas paravertebrais na presente análise são evidências de que, para este conjunto de caracteres, os estados mais plesiomórficos correspondem aos estágios mais iniciais da ontogenia. O mesmo padrão ocorre com a placa parótica.

A miniaturização frequentemente é associada à simplificação morfológica (Hanken e

Wake, 1993; Yeh, 2002). Entretanto, Campos *et al.* (2010) alertaram que a presença das placas ósseas poderia significar que em *Brachycephalus* a miniaturização poderia não estar relacionada à simplificação. O mapeamento das placas ósseas em nossas análises sugere uma tendência ao aumento em complexidade entre os *Brachycephalus* com placas. Adicionalmente, podemos inferir que a pedomorfose não é o processo heterocrônico que explica toda a diversificação osteológica em *Brachycephalus*. Alberth *et al.* (1979) usam o termo peramorfose quando o descendente apresenta uma forma exagerada/acrescida em relação ao ancestral. Na literatura só existem dados de tempo de desenvolvimento para *Brachycephalus ephippium* (Pombal, 1998). Mas esse padrão de peramorfose poderia ser consequência de hiperamorfose, um aumento no tempo de desenvolvimento em relação ao ancestral. Para avaliar essa hipótese, devem-se obter dados sobre tempo e taxa de desenvolvimento das demais espécies de *Brachycephalus*.

Um padrão semelhante, porém não homólogo, é apontando em Bufonidae, onde na origem da família ocorre um processo de miniaturização (Yeh, 2002). No entanto, ao longo dos eventos de cladogênese dentro de Bufonidae surgiram vários grupos com espécies maiores, como as do gênero *Rhinella* spp. Esse clado sofreu peramorfose, no entanto, mantém proporções entre ossos do crânio típicos de anuros miniaturizados (ver análise morfométrica de Yeh, 2002).

BBM SP1 é o táxon com placas mais próximo de *Brachycephalus* sem placa. Externamente, seria bastante semelhante à foto publicada por Heyer *et al.* (1990) do exemplar de *B. nodoterga* da reserva biológica de Boracéia. Entretanto, *B. nodoterga* não formou um clado com BBM SP1 que, por sua vez, possui caracteres diagnósticos que o sustentam como espécie. *B. pitanga* e BCU SP2 formaram uma politomia com o ramo que sustenta as demais espécies com placas, mas também apresentam várias apomorfias que conferem a posição de espécie para BCU SP2.

Brachycephalus toby e *B. nodoterga* se agruparam em um ramo sustentado por sete sinapomorfias, Bremer igual à 5 e bootstrap 76. Apesar de compartilharem várias características derivadas, cada um apresenta algumas apomorfias osteológicas e externamente são bem distintos (ver descrições de Miranda-Ribeiro, 1920, Heyer *et al.*, 1990 e Pombal, 2010 para *B. nodoterga* e Haddad *et al.*, 2010 para *B. toby*). À medida que novas espécies semelhantes a *B. nodoterga* e *B. toby* sejam descobertas poderemos observar se esse clado se mantém como um grupo distinto

entre os *Brachycephalus* com placas.

Populações com a atribuição do nome *Brachycephalus ephippium*

Um clado que pode ser facilmente reconhecido pela fusão medial das placas paravertebrais e hipertrofia da placa parótica, dentre outras características, reúne as populações para as quais foram atribuídos o nome *Brachycephalus ephippium* (Alberch e Gale, 1985; Sebben *et al.*, 1986; Pombal *et al.*, 1998 e outros), BPF RJ3 e *B. garbeana*. O agrupamento das amostras de diferentes populações de *B. ephippium* com BPF RJ3 nos dá a opção de confirmar esses clados todos como pertencentes à espécie *B. ephippium*, desde que BPF RJ3 seja alocado em *B. ephippium*. No entanto, os exemplares de BPF RJ3 se diferenciam muito das demais populações quanto a sua anatomia externa e podem ser facilmente diferenciados de *B. ephippium*. As outras amostras, mesmo que semelhantes externamente, apresentam características diagnósticas que poderiam distingui-las como espécies. Uma vez que temos evidências de distinção entre essas amostras, não temos motivos para subestimar a diversidade de espécies de *Brachycephalus*, como já aconteceu por várias décadas.

Grupos irmãos de *Brachycephalus* e posição de Brachycephalidae

A proximidade filogenética entre os gêneros *Euparkerella*, *Adelophryne* e *Brachycephalus* foi proposta com base na redução de dígitos (Izecksohn, 1971; Giaretta e Sawaya, 1998). Em da Silva *et al.* (2007), observamos que em *Euparkerella* e *Adelophryne* ocorre redução no tamanho dos tarsos e falanges enquanto em *Brachycephalus* observamos redução no número de falanges (Figura 6). Logo, a redução na distinção dos dedos observada externamente nesses grupos se trata de fenótipos não similares e não devem ser usados como argumento para propor proximidade filogenética. Hedges *et al.* (2008) encontraram evidências moleculares de que *Adelophryne* e *Holoaden* não são aparentadas. O gênero *Euparkerella* foi alocado em Strabomantidae devido às semelhanças na morfologia do crânio (Hedges *et al.*, 2007), embora *Euparkerella* não tenha sido amostrado na análise molecular. No que diz respeito aos grupos irmãos de *Brachycephalus*, nossas análises sustentam que *Holoden bradei*, *Euparkerella cochranæ* e *Adelophryne* sp. estão mais próximos de *Brachycephalus*

do que *Ischnocnema*. Contudo essa proximidade filogenética entre esses grupos não se deu por similaridades na redução de dígitos. A posição de *Adelophryne* sp. como grupo irmão de *Brachycephalus*, por exemplo, é sustentado por atributos do crânio (arco maxilar sem dentes (1); projeção palatal da maxila sem processo pterigóide (13); extremidade do processo anterior do pterigóide afilada (20); processo postero-lateral do frontoparietal ausente (47); exoccipitais fundidos (59); neopalatino ausente (60)); e da cintura escapular (processo acromial da clavícula curto (118); escápula e clavícula fundidas (120)).

Nossas análises geraram hipóteses que implicam no polifiletismo das famílias Strabomantidae e Brachycephalidae *sensu* Hedges *et al.* (2008). Como nossas amostras incluíram táxons que não foram investigados por eles, ou qualquer das outras análises anteriores (Frost *et al.*, 2005, Hedges *et al.*, 2008; Heineke *et al.*, 2009), nossos resultados, embora derivados de um número menor de táxons, são derivados de uma amostragem mais intensa entre os táxons chave para compreensão deste problema. (*Holoaden*, *Euparkerella*, *Adelophryne*, e vinte espécies de *Brachycephalus*). Outros autores já discutiram o efeito de amostragem taxonômica no resultado das análises (Wiens 2003). É possível que a discordância entre as hipóteses apresentadas por Darst & Cannatella (2004), Frost *et al.* (2005), Hedges *et al.* (2008) e aquela aqui apresentada, seja derivada da diferença na amostragem taxonômica entre esses trabalhos. Uma re-análise dos dados moleculares daqueles trabalhos, com a inclusão dos táxons aqui amostrados, deve gerar hipóteses mais estáveis em torno desses táxons.

Durante grande parte do século XX, as relações filogenéticas entre os anfíbios anuros eram pouco resolvidas. A versão apresentada em Duellman e Trueb (1986), onde as relações entre os Neobatrachia formavam uma grande politomia, incluindo todas as famílias, representava nossa ignorância sobre o assunto. A possibilidade de análise de dados de seqüência de DNA somada a melhoramentos nos algoritmos para análise de dados no computador reacendeu o interesse por questões filogenéticas antes consideradas intratáveis. As novas hipóteses geradas no início do Século XXI, como aquela proposta por Frost *et al.* (2005), revelaram uma gama de relacionamentos novos entre táxons, jamais cogitados anteriormente. Como resultado deste reacendimento do interesse por filogenias e principalmente de suas implicações para taxonomia, produziu-se, em curto intervalo de tempo, vários esquemas taxonômicos que tentam acomodar

os novos padrões de relacionamento descobertos. Os conflitos entre essas hipóteses geram diferentes opiniões sobre como produzir taxonomias compatíveis com a informação disponível.

Em menos de 5 anos, o conceito de Brachycephalidae sofreu 3 alterações (Dubois, 2005; Frost *et al.*, 2006; Hedges *et al.*, 2008). Como resultado do padrão de relacionamento aqui descoberto, propomos uma nova composição para a família Brachycephalidae contendo *Adelophryne* Hoogmoed e Lescure, 1984; *Brachycephalus* Fitzinger, 1843; *Euparkerella* Griffiths, 1959; *Holoaden* Miranda-Ribeiro, 1920; *Ischnocnema* Reinhardt and Lütken, 1862, Miranda-Ribeiro, 1937.

Propomos o uso da nova combinação: *Ischnocnema ternetzi* para re-estabelecer a monofilia do gênero *Ischnocnema*. Dados de cariótipo de Campos, *et al.* (2007) suportam a hipótese de que *I. juipoca* estaria mais proximamente relacionado com *B. ternetzi* do que com outros *Ischnocnema*. Adicionalmente, novos dados de cariótipo de Siqueira, *et al.* (2010) mostram mais semelhanças entre *Barycholos ternetzi* e *Ischnocnema* do que entre *Barycholos* e *Pristimantis*. A classificação de outras espécies de *Barycholos* permanece por ser avaliada em um contexto filogenético.

Atribuímos também uma nova definição para o gênero *Brachycephalus* com sinapomorfias morfológicas baseadas em nossas análises filogenéticas

Gênero *Brachycephalus* Fitzinger, 1826

Brachycephalus Fitzinger, 1826, Neue Class. Rept.: 39. Espécie tipo: *Bufo ephippium* Spix, 1824, por monotipia

Ephippipher Cocteau, 1835, Mag. Zool., Guérin, 5: 12. Substituição do nome *Brachycephalus* Fitzinger, 1826.

Ephippifer — Agassiz, 1845, Nomencl. Zool., Fasc. 7 & 8: 17. Grafia incorreta de *Ephippipher* Cocteau, 1835.

Psyllophryne Izecksohn, 1971, Bol. Mus. Nac., Rio de Janeiro, N.S., Zool., 280: 2. Espécie tipo: *Psyllophryne didactyla* Izecksohn, 1971, designação original. Sinonimizado por Kaplan, 2002, Amphibia-Reptilia, 23: 227.

Espécies válidas:

- Brachycephalus alipioi* Pombal and Gasparini, 2006
Brachycephalus atelopoide Miranda-Ribeiro, 1920
Brachycephalus brunneus Ribeiro, Alves, Haddad, e Reis, 2005
Brachycephalus bufonoides Miranda-Ribeiro, 1920
Brachycephalus didactylus (Izecksohn, 1971)
Brachycephalus ephippium (Spix, 1824)
Brachycephalus ferruginus Alves, Ribeiro, Haddad, e Reis, 2006
Brachycephalus garbeana Miranda-Ribeiro, 1920
Brachycephalus hermogenesi (Giaretta 3 Sawaya, 1998)
Brachycephalus izecksohni Ribeiro, Alves, Haddad, e Reis, 2005
Brachycephalus nodoterga Miranda-Ribeiro, 1920
Brachycephalus pernix Pombal, Wistuba, e Bornschein, 1998
Brachycephalus pitanga Alves, Sawaya, Reis, e Haddad, 2009
Brachycephalus pombali Alves, Ribeiro, Haddad, e Reis, 2006
Brachycephalus pulex Napoli, Caramaschi, Cruz, e Dias, 2011
Brachycephalus toby Haddad, Alves, Clemente-Carvalho, e Reis, 2010
Brachycephalus vertebralis Pombal, 2001

Além das espécies válidas acima, propomos que as populações de Tijucas do Sul (BTS PR) no estado do Paraná, Biritiba-Mirim (BBM SP1), Cunha (BCU SP2), Atibaia (BAT SP3), Mogi das Cruzes (BMC SP4), Cotia (BCO SP5) no estado de São Paulo, Mangaratiba (BMA RJ1), Engenheiro Paulo Frontin (BPF RJ2), Petrópolis (BPT RJ3) e Teresopolis (BTE RJ4) no Rio de Janeiro, Itamonte (BIT MG1) e Santa Bárbara do Monte Verde (BMV MG2) recebam todas o *status* de espécie. Outros pesquisadores já estão redigindo a descrição dos exemplares de Tijucas do Sul, PR. As demais descrições permanecem pendentes.

Sinapomorias do gênero *Brachycephalus*:

Aqui apresentamos as sinapomorfias geradas pela nossa análise. Sublinhamos as sinapomorfias que não apresentaram mudanças subseqüentes e que, portanto, podem ser usadas como caracteres diagnósticos para o gênero *Brachycephalus*: Articulação entre pterigóide e

maxilar curta (14); porção medial do pterigóide orientada verticalmente (19); ramo zigomático do esquamosal curto ou indistinto (22); ramo ótico do esquamosal alcança entre a metade e dois terços da extensão da margem lateral da cápsula ótica (24); processo maxilar do nasal em forma de barra vertical com extremidade afilada (31); janela oval orientada lateralmente em relação ao eixo longitudinal do crânio (55); parasfenóide mais esfenetimóide fundidos (70); procoracóide parcialmente ossificada (115); epicoracóide parcialmente ou totalmente ossificada (116); processo acromial medial da escápula presente (117); fossa entre coracóide e clavícula de forma circular (119); coracóide e clavícula fundidas (121); escápula e clavícula fundidas (122); expansão acetabular ventral conspícua (127); uma falange no dígito II (129); uma falange no dígito V (130); nenhuma falange no artelho I (132); tubérculo metacarpal interno ausente (141); tubérculos falangeais da mão ausentes (142); tubérculo metatarsal interno ausente(144); tubérculos falangeais do pé ausentes (145).

Conclusão

O presente trabalho apresenta uma amostragem geográfica e taxonômica robusta, além de uma análise anatômica que praticamente esgotou toda a variação osteológica existente entre as espécies coletadas. Com base nos resultados encontrados estabelecemos: 1- Uma nova composição para a família Brachycephalidae, contendo os gêneros (*Ischnocnema* (*Holoaden* (*Euparkerella* (*Adelophryne* (*Brachycephalus*))))); 2- o monofiletismo de *Brachycephalus* com várias sinapomorfias e caracteres diagnósticos; 3- uma proposta de relacionamento entre as espécies de *Brachycephalus*, onde os táxons que apresentam placas ósseas se agruparam, mas um grupo de espécies sem placas não se formou; 5- um padrão de evolução dos caracteres relativos às placas ósseas onde os estados ontogenéticos mais iniciais correspondem aos estados mais plesiomórficos.

Evidências mais robustas surgirão ao adicionarmos mais representantes dos táxons *Adelophryne*, *Euparkerella* e *Holoaden*, assim como mais espécies de *Brachycephalus* sem placas tanto da região Sul quanto das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. Além da adição de táxons, pode-se incorporar dados anatômicos de outros sistemas (viscerais, muscular esquelético, tegumento, etc), comportamento, perfil de toxinas, dados moleculares, etc. No entanto, estas novas demandas são extremamente custosas e exigem muito tempo de dedicação por parte dos pesquisadores. Com uma equipe composta por herpetólogos de diferentes formações (anatomistas, bioquímicos, ecólogos entre outros) podemos nos aventurar num projeto onde seja possível ampliar substancialmente a natureza dos dados e a representatividade de táxons. Apresentamos aqui parte de nossa contribuição para a compreensão da sistemática filogenética do gênero *Brachycephalus* com base principalmente em dados osteológicos. Mesmo com o avanço e vantagens óbvias nas técnicas de uso de sequências de DNA para a reconstrução da filogenia de vários organismos, deixar de usar esses dados morfológicos e propor hipóteses sobre a evolução dos mesmos seria desperdiçar um grande volume de informação biológica relevante.

Referências bibliográficas

- Alberch, P., Gale, E. A. 1985. A developmental analysis of an evolutionary trend: digital reduction in amphibians. *Evolution*, 39(1): 8–23.
- Alberch P., Gould, S.J., Oster, G.F. & Wake, D.B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 5(3): 296–317.
- Almeida, F. F. M., Carneiro, C. D. R. 1998. Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências*, 28: 135–150.
- Alves, A. C. R., Ribeiro, L. F., Haddad, C. F. B., Reis, S. F. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Rainforest in Paraná State, Southern Brazil. *Herpetologica*, 62(2): 221–223.
- Alves, A. C. R., Sawaya, R. J., dos Reis, S. F., Haddad, C. F. B. 2009. New species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Rain Forest in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*, 43 (2): 212–119.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295–304.
- Campos, L. A., Silva, H. R., Sebben, A. 2010. Morphology and development of additional bony elements in the genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 752–767.
- Carpenter, J. 1996. Forum: Uninformative bootstrapping. *Cladistics*, 12(2): 171–181.
- Clemente-Carvalho, R. B. G., Antoniazzi, M. M., Jared, C. Haddad, C. F. B. Alves, A. C. R., Rocha, H. S., Pereira, G. R., Oliveira, D. F., Lopes, R. T., dos Reis, S. F. 2009. Hyperossification in miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic structure and macroscopic patterns of variation. *Journal of Morphology*, 270 (11): 1285–1295.
- Cochran, D. M. 1955. Frogs of southeastern Brasil. *Bulletin of U.S Natural Museum*, 206: 1–423.
- Darst, C. R., Cannatella, D. C. 2004. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 462–475.

- da Silva, H. R. 1998. Phylogenetics relationships of the family Hylidae with emphasis in the subfamily Hylinae (Amphibia: Anura). Ph. D. Dissertation, University of Kansas.
- da Silva, H.R. & Meinhardt D.J. 1999. The generic status of *Adelophryne tridactyla*: osteology, synonymy, and comments on the genus *Syncope* (Anura: Microhylidae). *Journal of Herpetology*, 33(1): 159–164.
- da Silva, H. R., Campos, L., Sebben, A. 2010. The auditory region of *Brachycephalus* and its bearing on the monophyly of the genus (Anura: Brachycephalidae). *Zootaxa*, 1422: 59–68.
- de Queiroz, K., Gauthier, J. 1990. Phylogeny as a central principle in taxonomy: Phylogenetic definitions of taxon names. *Systematic Zoology*, 39: 307–322.
- Dubois, A. 2005. Amphibia mundi. 1.1. An ergotaxonomy of recent amphibians. *Alytes*, 23: 1–24.
- Duellman, W. E., Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. MacGraw-Hill. New York. 670pp.
- Efron, B., Halloran, E., Holmes, S. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 785–790.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura : Hylidae). *Cladistics*, 18: 367–393.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenetics: An approach using the bootstrap. *Evolution*, (39)4: 783–781.
- Ford, L. S., Cannatella, D. 1993. The major clades of frogs. *Herpetological Monographs*, 7: 94–117.
- Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D., T. Grant, J. Faivovich, R. Bain, A. Haas, C. B. Haddad, R. O. De Sá, A. Channing, M. Wilkinson, S. C. Donnellan, C. J. Raxworthy, J. A. Campbell, B. L. Blotto, P. Moler, R. C. Drewes, R. A. Nussbaum, J. D Lynch, D. M. Green, and W. C. Wheeler. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1-370.
- Giarretta, A.A. Sawaya, R.J., 1998. Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae).

- Copeia*, 1998: 985–987.
- Goloboff, P. A. 1999. Analyzing Large Data Sets in Reasonable Times: Solutions for Composite Optima. *Cladistics*, 15: 415–428.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S. 2001. Methods for Quick Consensus Estimation. *Cladistics*, 17: 26–34.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S., Nixon, K. C. 2008. Cladistics TNT , a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774–786.
- Haddad, C. F. B., Alves, A. C. R., Clemente-Carvalho, R. B. G., dos Reis, S. F. 2010. A new species of *Brachycephalus* from the Atlantic Rain Forest in São Paulo state, southeastern Brazil (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Copeia*, 3: 410–420.
- Hanken, J., Wake, D. B. 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 501–519.
- Hass, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters. *Cladistics*, 19: 23–89.
- Hedges, S. B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 9(2): 366–369.
- Hedges, S. B., Duellman, W. E., Heinicke, M. P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737: 1–132.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., Hedges, S. B. 2007. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *PNAS*, 24 (12): 10092–10097.
- Heinicke, M. P., Duellman, W. E., Trueb, L., Means, D. B., Macculloch, R. D., Hedges, S. B. 2009. A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*, 2211: 1–35.
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*, University of Illinois Press.
- Heyer, W. R., Rand, A.S., Cruz, C. A. G. Peixoto, O.L. Nelson, C.E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*, 31: 231–410.
- Hills, D. M., Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2): 182–182.

- 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.
- Izecksohn, E. 1998. Algumas considerações sobre o gênero *Euparkerella*, com a descrição de três novas espécies (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 48(1): 59–74.
- 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 *Psyllopryne* (Brachycephalidae). *Amphibia-Reptilia*, 23: 225–227.
- Kitching, I. J., Forey, C. J. H., Williams, D. M. 1998. *Cladistics: The theory and practice of parcimony analysis*. New York. Oxford University Press.
- Lynch, J.D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptoctyloid frogs. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History. Miscellaneous Publication*, 53: 1–238.
- Lynch, J. D. 1973. The transition from archaic to advanced frogs. In: Vidal, J. L. (ed.), *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. Columbia: University Missouri Press, 133–182pp.
- Maddison, W. P., Maddison, D. R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73 <http://mesquiteproject.org>.
- McDiarmid, R. W. 1971. Comparative morphology and evolution of frogs of the neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History Science*, 1: 1–66.
- Mendelson, J. R. III, Pramuk, J. 1997. Neopalatine odontoids in *Bufo alvarius* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 4: 586–588.
- Miranda-Ribeiro, A. 1920. Os brachycephalídeos do Museu Paulista. *Revista do Museu Paulista*, 12: 306–318.
- Napoli, M., Caramaschi, U., Cruz, C. A. G., Dias, I. R. 2011. A new species of fleatoad, genus *Brachycephalus*, Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 40: 33–40.
- Noble, G. K. 1926. The pectoral girdle of brachycephalid frogs. *American Museum Novitates*,

- 230: 1–14.
- Pimenta, B. V. S., Bérnils, R. S., Pombal, J. P., Jr. 2007. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Brachycephalus hermogenesi*: filling gap and geographic distribution map. *Check List*, 3: 277–279.
- Pombal, J. P. Jr. 2001. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 22: 179–185.
- Pombal, Jr. 2010. A posição taxonomica das “variedades” de *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) descritas por Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional*, 526: 1–12.
- Pombal, J. P. Jr., Sazima, I. Haddad, C. F. B. 1994. Breeding Behaviour of Pumpikin Toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, 28 (4): 516–519.
- Pombal, J. P. Jr., Wistuba, E.M., Bornschein, M. R. 1998. A new species of brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology*, 32:70–74.
- Pombal, J. P. Jr., Gasparini, J. L. 2006. A new *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Rainforest of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 1(2): 87–93.
- Pramuk, J. 2006. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 146: 407–452.
- Ribeiro, L. F., Alves, A. C. R., Haddad, C. F. B., Reis, S. F. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, 519: 1–18.
- Sebben, A., Schwartz, C. A., Valente, D., Mendes. 1986. Tetrodotoxin-like substance found in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon*, 24: 799–806.
- Sebben, A. 2007. Microdissecção fisiológica a fresco: uma nova visão sobre anatomia de anfíbios e répteis. In: L.B. Nascimento and M. E. Oliveira (eds.) *Herpetologia no Brasil II*, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 311–325pp.
- Sanderson, M. J. 1989. Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revisited. *Cladistics*, 5: 113–129.
- Swoford, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony, Version 4.0b10, Sinauer

- Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, W. R. and Van Dyke, G. C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9: 107–119.
- Trueb, L. 1973. Bones, frogs and evolution. In: Vidal, J. L. (ed.), *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. Columbia: University Missouri Press, 65–132pp.
- Trueb, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: Hanken, J., Hall, B. K. (ed), *The Skull: 2- Patterns of structural and systematic diversity*. Chicago: The University of Chicago Press, 255–343pp.
- Trueb, L., Alberch, P. 1985. Miniaturization and the anuran skull: a case study of heterochrony. In: Duncker H R, Fleischer G, eds. *Functional Morphology of the Vertebrates*. New York: Gustav Fischer Verlag, 113–121pp.
- Verdade, V. K., Rodrigues, M. T., Cassimiro, J., Pavan, D., Liou, N., & Lange, M. C. (2008). Advertisement Call, Vocal Activity, and geographic distribution of *Brachycephalus hermogenesi* (Giaretta and Sawaya, 1998) (Anura, Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*, 42 (3): 542–549
- Wiens, J. J. 2003. Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. *Systematic Biology*, 53 (4): 528–538.
- Yeh, J. 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution*, 56: 628–641.

Anexos

Anexo1 Lista de material examinado

BTS PR – Tijucas do Sul, Paraná, Brasil: AS2833–2834.

BBM SP1 – Biritiba Mirim, São Paulo, Brasil: CHUNB 37672–37676.

BCU SP2 – Cunha, São Paulo, Brasil: AS 02891 e 02892

BAT SP3 – Atibaia, São Paulo, Brasil: AS00455, AS00447, AS00468, AS00474, AS00509–00511.

BMC SP4 – Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil AS02451–02458.

BCO SP5: – Cotia, São Paulo, Brasil: AS00466, AS00484, AS00485, AS00491, AS00492, AS00502, AS00517, AS00521, AS00524, AS00599, AS00602, AS00603, AS01513.

BIT MG1 – Itamonte, Minas Gerais, Brasil: AS02428–02437.

BMV MG2 – Serra Negra, Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais, Brasil: AS 2776–2801.

BMA RJ1 – Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: AS 2837, 2916–2918

BPF RJ2 – Morro Azul, Engenheiro Paulo Frontin, Rio de Janeiro, Brasil: AS 2911; 2912.

BPT RJ3 – Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil: AS 2930.

BTE RJ4 – Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil: AS02439–02450.

Brachycephalus didactylus – Sacra Família do Tinguá, Engenheiro Paulo Frontin AS 2919-2926.

Brachycephalus garbeana – Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil AS02417–02438.

Brachycephalus hermogenesi – Ubatuba, São Paulo, Brasil: AS 02460.

Brachycephalus pitanga – Fazenda Capricórnio, Ubatuba, São Paulo Brasil: AAG 001693, 001788, 001791, 001942 e 001952. ZUEC 12066–12070

Brachycephalus toby – Ubatuba, São Paulo, Brasil: AAG 000841, 001572, 001616, 001620, 001918.

Brachycephalus vertebralis – Parati, Rio de Janeiro, Brasil: MNRJ 11102–11105.

Brachycephalus pernix – Quatro Barras, Paraná, Brasil: AS2399, AS 2401, AS 2459.

Brachycephalus brunneus – Campina Grande do Sul, Paraná, Brasil: AS 02462, 2913–2915.

Grupo externo:

Adelophryne sp. – CHUFMG 2647, 2648, 2648.

Ischnocnema guentheri – ZUEC 1160–1164

Ischnocnema lactea – ZUEC 701–705

Ischnocnema parva ZUEC 12130, 12132, 12142, 12149.

Ischnocnema ramagi – ZUEC 0042, 3553, AS 2928, 2929.

Ischnocnema juipoca – ZUEC 4270, 5257.

Euparkerella cochranæ – ZUEC 6527, 6534, AS 2831, 2832.

Holoaden bradei – ZUEC 0712, 0714, 8145.

Barycholos ternetzi – AS 1519, 2150; 2461.

Haddadus binotatus – AS 2927.

Anexo 2 Matriz

	C1	c2	c3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
<i>C maradignus</i>	0	0	1	0	1	0	1	?	?	0	?	0	?	0	?	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0
<i>Adelophryne</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
<i>H binotatus</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>H bradei</i>	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>E cochranæ</i>	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B ternetzi</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>I gentheri</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>I lactea</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>I parva</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0/1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>I ramagi</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>I juipoca</i>	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B brunneus</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B didactylus</i>	1	1	0/1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1	0
BMA RJ1	1	1	0/1	0	1	0/1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1	1
<i>B hermogenesi</i>	1	1	1	0	1	0/1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
<i>B pernix</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B pitanga</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	2	2
BTS PR	1	1	1	1	1	0/1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	2	0	0	0
<i>B garbeana</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	2	2
BTE RJ2	1	1	1	0	1	0/1	0	1	1	1	?	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	2	2
BBM SP1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	1	2
BCU SP2	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	1	2
BMV MG1	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	1	2
BAT SP3	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1	2
BPF RJ3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1	2
BPT RJ4	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	1	2
BIT MG2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	2	2
BMC SP4	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	0	0	0	2	2
BCO SP5	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	2	2
<i>B nodoterga</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	1	2
<i>B toby</i>	1	1	1	1	0/1	0	?	0	0	0/1	0	0	1	1	1	1	1	?	1	1	1	0	0	2	2

	C26	c27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50
<i>C maradignus</i>	0	0	0	1	0	0	?	?	?	?	0	0	?	?	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	?
<i>Adelophryne</i>	0	0	1	0	0	1	1	1	4	4	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>H binotatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	?	1	0
<i>H bradei</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	?
<i>E cochranæ</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	4	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	?
<i>B ternetzi</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	2	4	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	?	0	0	?
<i>I genterii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0/1	2	4	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	?
<i>I lactea</i>	0	1	1	0	0	0/1	1	1	2	4	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>I parva</i>	0	1	1	0	0	2	0	1	4	4	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	?
<i>I ramagi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>I juipoca</i>	0	0	1	0	0	2	0	0	1/2	4	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B brunneus</i>	0	2	1	0	0	2	1	0	4	4	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B didactylus</i>	0	2	0	0	0	2	1	1	4	4	0	3	2	?	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	?
BMA RJ1	1	1	0	0	0	2	1	1	4	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B hermogenesi</i>	1	1	0	0	0	2	1	2	4	4	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B pernix</i>	0	2	2	0	0	2	0	0	4	4	2	3	2	?	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	?
<i>B pitanga</i>	2	2	2	1	1	2	0	?	3	?	2	3	2	2	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
BTS PR	0	1	2	0	0	2	0	0	3	1	2	3	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B garbeana</i>	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTE RJ2	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BBM SP1	2	2	2	0	0	2	1	?	3	5	2	3	2	?	?	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
BCU SP2	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	?	?	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
BMV MG1	2	2	2	0	1	2	1	?	3	5	2	3	2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
BAT SP3	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
BPF RJ3	2	2	2	1	1	1	1	?	3	5	2	3	2	?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BPT RJ4	2	2	2	1	1	1	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	0	1	1	1	1	1	0/1	1	1
BIT MG2	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
BMC SP4	2	2	2	1	1	1	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
BCO SP5	2	2	2	1	1	1	1	?	3	5	2	3	2	?	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
<i>B nodoterga</i>	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	?	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
<i>B toby</i>	2	2	2	1	1	2	1	?	3	5	2	3	2	?	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0

	c51	c52	c53	C54	c55	c56	c57	c58	c59	c60	c61	c62	c63	c64	c65	c66	c67	c68	c69	c70	c71	c72	c73	c74	c75
<i>C maradignus</i>	?	?	?	?	0	0	?	?	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	?	?	0	1	0	0	0
<i>Adelophryne</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?
<i>H binotatus</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	?	1	0	0	0	0	0	0
<i>H bradei</i>	0	?	?	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	0	0
<i>E cochranae</i>	0	?	?	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	?	0	0	0	0	0	0	0
<i>B ternetzi</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>I genterhi</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	0/1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>I lactea</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	?	2	0	1	0
<i>I parva</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	?	2	0	0	2	0	0	0
<i>I ramagi</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0
<i>I juipoca</i>	0	?	?	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
<i>B brunneus</i>	0	?	?	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	3	1	?	1	0	1	0	0	0
<i>B didactylus</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	2	0	0	1	0	2	1	0	0
BMA RJ1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	?	0	1	0	0	?	3	1	?	0	0	0	0	0	0
<i>B hermogenesi</i>	0	?	?	1	1	0	1	1	1	1	?	0	1	1	0	?	3	1	?	1	1	1	0	0	0
<i>B pernix</i>	0	?	?	1	1	1	1	1	1	1	?	0	1	1	0	?	3	0	3	1	?	2	1	0	0
<i>B pitanga</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	1	0	1	?	2	1	1	0
BTS PR	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	?	3	?	0	1	0	2	0	0	0
<i>B garbeana</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
BTE RJ2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	0	2	1	1	0
BBM SP1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	1	0	?	3	0	0	1	0	2	1	1	0
BCU SP2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	0	2	1	1	0
BMV MG1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
BAT SP3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	0	?	1	0	2	1	1	0
BPF RJ3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
BPT RJ4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
BIT MG2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	0	1	?	2	1	0
BMC SP4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0/1	0	?	3	?	?	?	?	2	1	1	0
BCO SP5	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
<i>B nodoterga</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	1	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0
<i>B toby</i>	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	?	0	1	0	0	?	3	?	?	1	?	2	1	1	0

	c76	c77	c78	c79	c80	c81	c82	c83	c84	c85	c86	c87	c88	c89	c90	c91	c92	c93	c94	c95	c96	c97	c98	c99	c100
<i>C maradignus</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Adelophryne</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	0	0	0	0	0
<i>H binotatus</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>H bradei</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>E cochranae</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B ternetzi</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>I gentheri</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>I lactea</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>I parva</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>I ramagi</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>I juipoca</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B brunneus</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B didactylus</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
BMA RJ1	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B hermogenesi</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B pernix</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B pitanga</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTS PR	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>B gar-beana</i>	1	1	0/1	0/1	0	1	1	3/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BTE RJ2	1	0	0	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
BBM SPI	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
BCU SP2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
BMV MG1	1	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
BAT SP3	1	0/1	0/1	0/1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
BPF RJ3	1	1	0	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
BPT RJ4	1	1	1	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
BIT MG2	0/1	0/1	0/1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
BMC SP4	0/1	0/1	0/1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
BCO SP5	1	0/1	0/1	0/1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0/1	0/1	0/1	0	1
<i>B nodoterga</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>B toby</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
<i>C maradignus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Adelophryne</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>H binotatus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H bradei</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>E cochranae</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>B ternetzi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>I genitheri</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>I lactea</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>I parva</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
<i>I ramagi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>I juipoca</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
<i>B brunneus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>B didactylus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
BMA RJ1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>B hermogenesi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	?	?	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>B pernix</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>B pitanga</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	?	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BTS PR	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0/1
<i>B garbeana</i>	0	0/1	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
BTE RJ2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	?	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	2	1	0
BBM SP1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
BCU SP2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BMV MG1	?	1	0	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
BAT SP3	0	0/1	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	2	1	0
BPF RJ3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BPT RJ4	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
BIT MG2	?	1	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BMC SP4	?	0/1	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
BCO SP5	0	0/1	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>B nodoterga</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>B toby</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1

	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145
<i>C maradignus</i>	?	?	1	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Adelophryne</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	?	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H binotatus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H bradei</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>E cochranæ</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>B temetzi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>I gentheri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>I lactea</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>I parva</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>I ramagi</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>I juipoca</i>	1	0	1	?	?	0	?	?	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>B brunneus</i>	0	0	0	1	2	1	1	2	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>B didactylus</i>	0	1	0	1	2	1	2	2	?	0	1	?	0	0	1	1	1	0	1	1
BMA RJ1	0	1	0	1	2	1	2	2	0	0	1	?	1	0	0	1	1	0	1	1
<i>B hermogenesi</i>	0	1	0	1	2	1	2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
<i>B pernix</i>	0	1	0	1	2	1	2	2	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>B pitanga</i>	1	1	0	1	2	1	1	2	1	2	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BTS PR	0	1	1	1	2	1	1	2	?	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
<i>B garbeana</i>	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BTE RJ2	0	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BBM SP1	0	1	0	1	2	1	1	2	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
BCU SP2	0	1	0	2	2	1	1	2	1	2	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BMV MG1	1	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BAT SP3	0	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BPF RJ3	1	1	0	1	2	1	1	1	1	2	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BPT RJ4	1	1	0	1	2	1	1	2	1	?	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BIT MG2	1	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
BMC SP4	1	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
BCO SP5	1	1	0	1	2	1	1	2	1	0	1	?	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>B nodoterga</i>	1	2	0	1	2	1	2	2	0	2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>B toby</i>	1	2	0	1	2	1	2	2	0	0	1	?	0	1	1	1	1	1	1	1

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
<i>B. izecksohni</i>	1	1	1	1	1	0	0	?	1	0	0	0	1	?	?	1	0	1	1	?	0	1	1	0	?
<i>B. pombali</i>	1	1	1	?	1	0	?	1	1	0	1	1	0	1	?	1	0	1	1	?	0	1	1	0	?
<i>B. ferruginus</i>	1	1	1	1	1	0	?	1	1	0	1	?	1	0	?	1	0	0	1	0	0	1	1	0	?
<i>B. izecksohni</i>	C26	c27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50
<i>B. izecksohni</i>	0	?	1/2	0	0	0	1	0/1	4	4	0	1	1	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B. pombali</i>	0	?	1/2	0	0	1	2	0	4	4	0	1	1	0	1	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B. ferruginus</i>	0	?	1/2	0	0	1	2	0	4	4	1	1	1	0	1	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?
<i>B. izecksohni</i>	c51	c52	c53	C54	c55	c56	c57	c58	c59	c60	c61	c62	c63	c64	c65	c66	c67	c68	c69	c70	c71	c72	c73	c74	c75
<i>B. izecksohni</i>	1	0	0	0	1	?	1	1	1	1	0	0	1	?	?	0	?	?	0	?	?	?	?	0	
<i>B. pombali</i>	?	?	?	0	1	?	1	1	1	1	?	0	1	1	1	0	?	?	3	?	?	?	?	?	
<i>B. ferruginus</i>	1	0	0	1	1	?	1	1	?	1	?	0	1	1	1	1	?	?	1	?	?	?	?	?	
<i>B. izecksohni</i>	c76	c77	c78	c79	c80	c81	c82	c83	c84	c85	c86	c87	c88	c89	c90	c91	c92	c93	c94	c95	c96	c97	c98	c99	c100
<i>B. izecksohni</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	
<i>B. pombali</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	
<i>B. ferruginus</i>	0	0	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	
<i>B. izecksohni</i>	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
<i>B. izecksohni</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	?	?	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>B. pombali</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	?	?	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	?	?	?
<i>B. ferruginus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	?	?	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	?	?	?
<i>B. izecksohni</i>	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145					
<i>B. izecksohni</i>	?	?	0	1	2	1	2	3	?	?	1	?	?	?	1	1	1	0	1	1					
<i>B. pombali</i>	?	?	?	1	2	1	1	2	?	?	1	0	?	0	1	1	1	0	1	1					
<i>B. ferruginus</i>	?	?	?	1	2	1	1	2	?	?	1	1	?	0	1	1	1	0	1	1					



Morphology and development of additional bony elements in the genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae)

LEANDRO AMBRÓSIO CAMPOS^{1,2*}, HÉLIO RICARDO DA SILVA³ and ANTONIO SEBEN²

¹Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, UnB 70910-900, Brasília, DF, Brazil

²Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados, Departamento de Ciências Fisiológicas, CFS-IB, UnB 70910-900, Brasília, DF, Brazil

³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Caixa Postal 74524, Cep 23.851-970, Rio de Janeiro, Brazil

Received 24 June 2009; accepted for publication 22 October 2009

We describe the extra bony elements, plates, and osteoderms present in species of the genus *Brachycephalus*. Samples of eight species of *Brachycephalus*, including seven populations of *Brachycephalus ephippium*, were examined. The large additional elements associated with the skull (parotic plate) and vertebrae (vertebral and paravertebral plates) all comprise intramembranous bone, similar to that of the frontoparietal or nasal bones of the skull of most of frogs. Additionally, in the dermis of one unnamed species, we discovered and described true osteoderms. We discuss the morphological nature and diversity of these elements and their importance as evidence of phylogenetic relationship within *Brachycephalus*. In summary, three distinct conditions of extra bony elements occur in the genus *Brachycephalus*: (1) bony plates may be present or absent in species of the genus; (2) a few, small bony plates may be developed and these may be represented by (a) paravertebral plates small and restricted to the distal ends of the transverse processes of the presacral IV, (b) parotic plates small and not covering the tops of the squamosals, and (c) ornamented spinal plates on all vertebrae; and (3) well-developed bony plates may be present as (a) paravertebral plates forming a 'bone-shield' on the dorsal surface of the trunk, ornamented, and visible through the integument, (b) parotic plates covering the tops of the squamosals, and (c) spinal plates associated with all vertebrae, and ornamented on vertebrae I–VI. Although the phenomenon of miniaturization may be associated with the appearance of new elements in at least some of the species in the genus, the traditional rule may not be universally applicable. © 2010 The Linnean Society of London, *Biological Journal of the Linnean Society*, 2010, 99, 752–767.

ADDITIONAL KEYWORDS: plates – *Brachycephalus ephippium* – miniaturization – osteoderm – osteology.

INTRODUCTION

Frogs of the genus *Brachycephalus* are often cited as examples of the effects of miniaturization in anurans (Trueb & Alberch, 1985; Hanken & Wake, 1993; Yeh, 2002). Their morphological characteristics appear to result from the relationship between developmental truncation, small size, and the origin of new features

(Hanken & Wake, 1993; Yeh, 2002). Among the innovations present in *Brachycephalus* is the pattern of loss of digital phalanges in the hands of all known species, along with other traits that are presumed to characterize groups within the genus. Included among the latter are digital reduction in the toes, the appearance of bony plates on the skull and bony plates associated with the vertebrae, and osteological simplification of the auditory apparatus (Da Silva, Campos & Sebben, 2007).

*Corresponding author. E-mail: leandro.ambrosio@gmail.com

The presence or absence of bony plates is usually report on species descriptions and, although this feature has proven useful in species diagnose, the morphology and development of these bony plates has not been investigated comparatively probably because only one species was known for the genus throughout most of the 20th Century. Most of the other species of *Brachycephalus* have only recently been discovered as a result of the efforts of a series of Brazilian researchers exploring the remains of the Atlantic Rain Forest. A historical synthesis of the taxonomic history of the genus may be found in Frost (2007) and Alves *et al.* (2006). The sole morphological study of bony plates or osteoderms is that by Ruibal & Shoemaker (1984), who considered the vertebral plates of *Brachycephalus ephippium* to be osteoderms, although they provide no discussion and their conclusion stands uncontested.

Our morphological analysis of the genus *Brachycephalus* has revealed a variety of plates, including new elements, and different associations and fusion between plates and vertebrae, in addition to true osteoderms (*sensu* Vickaryous & Hall, 2006). The availability of specimens in different stages of development has enabled us to investigate the development of some of these plates and, in the present study, we reinterpret the morphological nature and origin of these elements.

MATERIAL AND METHODS

Samples of *B. ephippium* ($N=102$) were collected from several localities of the Atlantic Rain Forest from Brazil (Appendix 1 and 2). The specimens used for comparisons included: *Brachycephalus brunneus* (from, State of Paraná, $N=1$), *Brachycephalus didactylus* (from, State of Rio de Janeiro, $N=1$), *Brachycephalus hermogenesi* (from Ubatuba (State of São Paulo, $N=1$), and *Brachycephalus cf. vertebralis* (from Ubatuba, State of São Paulo, $N=6$). We also included samples of three new species not yet formally described, which are referred as *Brachycephalus* sp. 1 (from Biritiba-Mirim, State of São Paulo, $N=1$), *Brachycephalus* sp. 2 (collected in Faz. Capricônio, Ubatuba SP, $N=5$), and *Brachycephalus* sp. 3 (from Cunha SP, $N=2$). The voucher numbers of all specimens analysed are provided in Appendix 1. All material analysed has been deposited in Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil (AS = Coleção de Anfíbios do Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados; CHUNB = Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília).

Osteological observations and descriptions are based on three types of preparations: (1) scanning electron microscopy preparations: specimens were macerated and the bones were cleaned with water, sodium hypochlorite, and peroxide (ten volumes), and

dehydrated by baths of increasing concentrations of ethanol. The dried bones were sputter-coated with gold before being viewed under a JEOL JEM 840 A scanning electron microscope; (2) light microscopy: specimens were decalcified using nitric acid (5%), sectioned, and stained with hematoxylin and eosin, and trichromes of Gomori and Manson; and (3) whole-mount specimens: individuals of different sizes were cleared and double-stained with Alizarin red and Alcian blue to distinguish bone and cartilage in accordance with the technique described by Taylor & Van Dyke (1985). All juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium* analyzed with corresponding snout vent length are in Appendix 2.

RESULTS

ADULT SPECIMENS OF *B. EPHIPPIUM*

Skull plates

McLachlan (1943) originally described these plates; subsequently, Da Silva *et al.* (2007) gathered ontogenetic evidence that these were independent bone elements and named them parotic plates (Fig. 1).

Post-cranial plates

There are two additional types of bony elements associated with the vertebral column. One group of small bones (spinal plates) lies dorsal to the vertebra (i.e. all presacrals and the sacral vertebrae), and a larger pair of plates (paravertebral plates) is associated with the transverse processes of vertebrae IV and V (Fig. 2).

Spinal plates

These small plates develop dorsal to the vertebral centrum along the vertebral column (Fig. 2). They are relatively small and associated with each presacral vertebra and the sacrum. The surfaces of spinal plates I–VI are always ornamented, with a pattern of bony crests similar to the one described for the skull bones and parotic plates. Fusion may occur between spinal plates, between spinal plates and the vertebra, and between some of the spinal plates and the paravertebral plates, as described below.

Paravertebral plates

These trapezoidal plates, located at each side of the main axis of the vertebral column, form a shield that covers a large portion of the dorsum (Fig. 2). The ventral surfaces of the paravertebral plates are ornamented similarly to the parotic and spinal plates. In adults, the paravertebral plates are fused ventrally to the spinal plates IV and V; however, some variation exists in some of the populations investigated, as described below.

AMONG POPULATIONS OF *B. EPHIPPIUM*

Within the genus *Brachycephalus*, *B. ephippium* has the largest geographic distribution (Clemente-

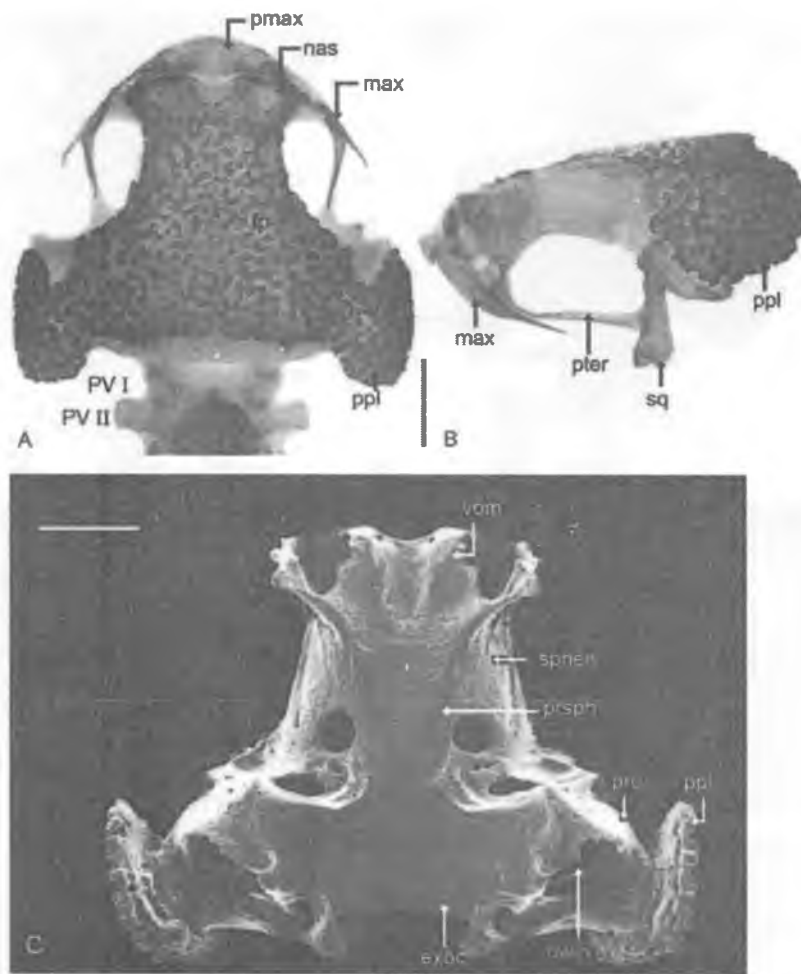


Figure 1. Skulls of adult specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B dorsal and lateral views of the skull of a cleared and stained specimen from Atibaia. C, scanning electron microscopy in ventral view of the skull of a specimen from Cotia. exoc, exoccipital; fp, frontoparietal; max, maxilla; nas, nasal; owin, oval window; prsph, parasphenoid; ppl, parotic plate; pmax, premaxilla; pro, prootic; ptr, ptergoid; spnen, sphenethmoid; PS I and PS II, presacrals vertebrae I and II, respectively; sq, squamosal; vom, vomer. Scale bars = 1 mm.

carvalho *et al.*, 2008), with several apparently isolated populations occurring in the 'serras' (isolated or continuous hills along the coastal Serra do Mar and the inland Serra da Mantiqueira) in the States of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo, Brazil. The morphology of the shields described below is presented by geographic locality (Tables 1, 2). Variation is compared to the description provide above for *B. ephippium* from Cotia and Atibaia, both in the State of São Paulo.

Mogi das Cruzes (São Paulo) and Itamonte (Minas Gerais)

Most of the specimens examined show little morphological variation and consistent with the above descrip-

tion. However, they differ in the frequency of fusions between vertebrae and bony plates (Tables 1, 2).

Petrópolis and Nova Friburgo, State of Rio de Janeiro

These individuals have parotic plates resembling those of the general description; however, details of the lateral surface differ. The ventral margin is slightly less rounded and the plate covers a smaller portion of the otic ramus of the squamosal (Fig. 3A, B). Spinal plate I may or may not be fused to spinal plate II; moreover, spinal plates V–VIII are variably fused.

The paravertebral plates are well developed. Dorsally, they completely conceal the transverse processes of vertebra IV–VIII and partially cover the

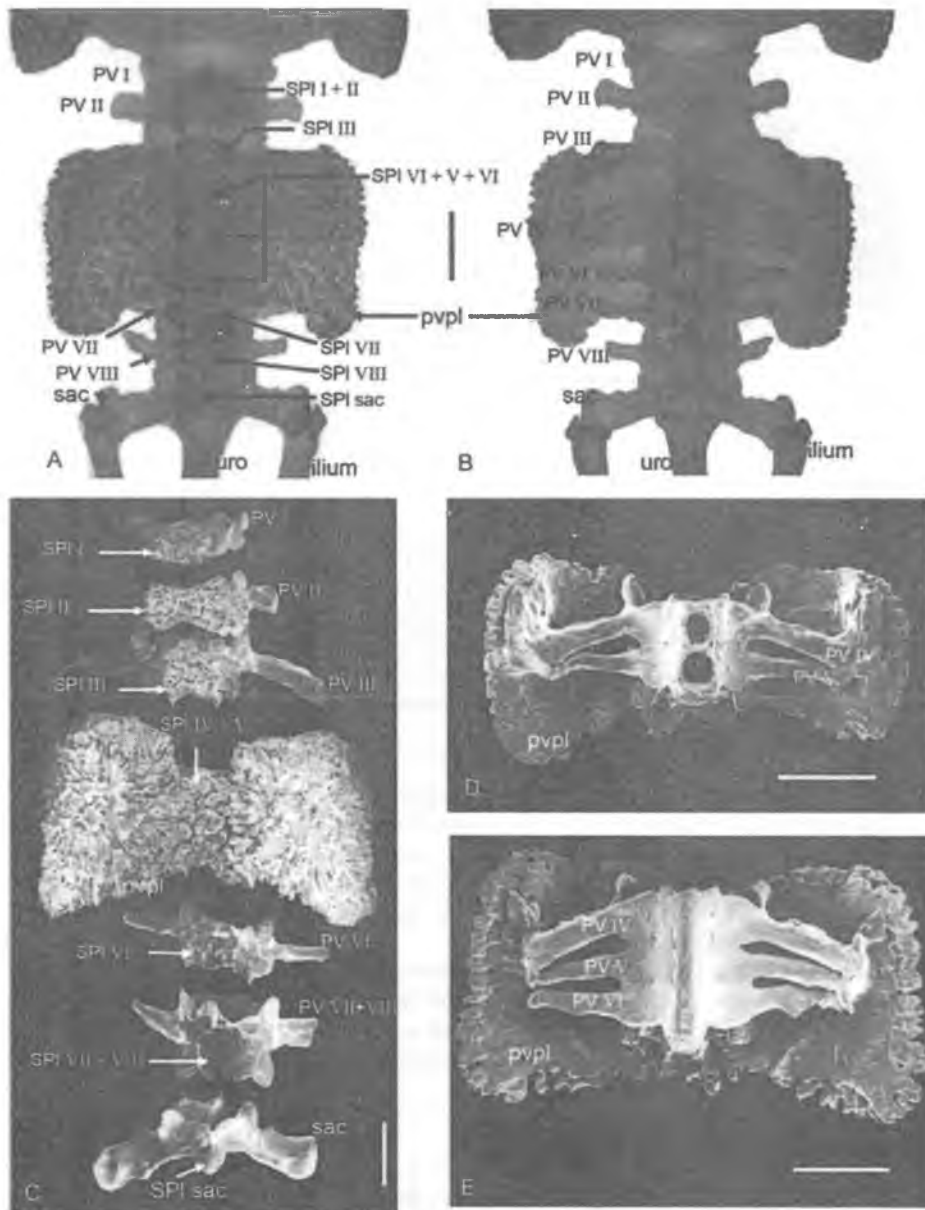


Figure 2. Vertebrae and para-axial bony plates of *Brachycephalus ephippium*. A, B, dorsal and ventral views of a cleared and double-stained specimen from Atibaia. C, D, scans of dorsal and ventral views of specimens from Cotia. E, ventral view of specimen from Itatiaia. PV I–VIII, presacral vertebrae I–VIII; pvpl, paravertebral plate; sac, sacrum; SP I–SP VIII, spinal plates I–VIII; uro, urostyle. Scale bars = 1 mm.

transverse processes of vertebra III. In large individuals, the lateral edge of the paravertebral plates are elongated anteriorly and posteriorly with the anterolateral corner of the each plates reaching the level of the transverse process of vertebra II, and the posterolateral corner nearly reaching the sacral diapophysis. Dorsal and proximally, the paravertebral plates are fused medially to the block consisting of the fusion of spinal plates IV–VIII. Ventrally, the trans-

verse processes of vertebrae IV and V are fused to the paravertebral plates. In addition, the centra and the transverse processes of vertebrae IV–VIII may be fused to one another, forming a unique element (Fig. 3C, D).

PLATES IN OTHER SPECIES OF *BRACHYCEPHALUS*

None of the following species of *Brachycephalus* possesses any bony plates: *Brachycephalus alipioi*, *B.*

Table 1. Frequency of fusions between spinal plates in four populations of *Brachycephalus ephippium*

Localities	Fused spinal plates*					
	I + II	III + IV	IV + V	V + VI	VI + VII	VII + VIII
Atibaia (São Paulo) (<i>N</i> = 19)	0.57	0.31	0.89	0.31	0.15	0.00
Cotia (São Paulo) (<i>N</i> = 20)	0.95	0.70	1.00	0.80	0.40	0.05
Mogi das Cruzes (São Paulo) (<i>N</i> = 20)	0.55	0.25	1.00	0.55	0.10	0.00
Itamonte (Minas Gerais) (<i>N</i> = 20)	1.00	0.35	1.00	0.65	0.20	0.00

*None of the samples showed fusion between spinal plates II and III.

Table 2. Frequency of fusions between vertebrae in four populations of *Brachycephalus ephippium*

Localities	Fusions between vertebrae*			
	IV + V	V + VI	VI + VII	VII + VIII
Atibaia (São Paulo) (<i>N</i> = 20)	1.00	0.15	0.15	0.05
Cotia (São Paulo) (<i>N</i> = 21)	1.00	0.09	0.27	0.09
Mogi das Cruzes (São Paulo) (<i>N</i> = 20)	0.95	0.10	0.15	0.00
Itamonte (Minas Gerais) (<i>N</i> = 20)	0.95	0.35	0.05	0.00

*None of the samples showed fusion between vertebrae I and II or II and III.

brunneus, *B. didactylus*, *B. ferruginus*, *B. hermogenesi*, *B. izecksohni*, *B. pernix*, and *B. pombali*. However, in *B. pernix*, part of the dorsal surface of the frontoparietal, the orbital margin of the nasal, and the dorsal surface of the crista parotica are ornamented.

The other four species included in the present study, *Brachycephalus vertebralis*, *B. cf. vertebralis*, *B. sp.1*, *B. sp. 2*, and *B. sp. 3* possess bony plates that differ from those found in *B. ephippium* as described below.

Parotic plates

In *B. vertebralis*, *B. cf. vertebralis* *Brachycephalus* sp. 1, *Brachycephalus* sp. 2 and *Brachycephalus* sp. 3, the parotic plates are relatively small compared to *B. ephippium* and do not cover the articulation between squamosal and prootic (Fig. 4). The parotic plate is connected and fused medially to the frontoparietal and has a more diagonal orientation related to the main axis of the skull. Dorsally, the plate is overall trapezoidal with the medial edge longer than the lateral ones. The parotic plate is rounded laterally and forms the posterior most limit of the skull. Laterally, the parotic plate covers a small portion of auditory capsule without covering the squamosal. The lateral and dorsal surfaces of the parotic plate are highly ornamented, as are the dorsal and lateral surfaces of the otic ramus of the squamosal.

Spinal and paravertebral plates

The spinal plates of *Brachycephalus* sp. 1, *B. vertebralis*, *Brachycephalus* sp. 2, and *Brachycephalus* sp. 3 are associated with the spinal processes of all presacral and sacral vertebrae; their ornamentation is more extensively developed than that of *B. ephippium*. The spinal plates of presacral I and II are fused. The first three spinal plates are less developed than in *B. ephippium* but of similar shape and size as the spinal processes of the vertebrae, whereas the other spinal plates are rectangular. The paravertebral plates of these species are heavily ornamented and are fused only to ventrally the transverse process of presacral IV (Fig. 5).

Osteoderms

In *Brachycephalus* sp. 2 and *B. sp. 3*, we found isolated bony structures, smaller than 0.15 mm scattered though the integument of the body, predominantly on the dorsal surface but also on the skull and parts of the palpebrae (Fig. 5). These bony structures are not associated with any part of the skeleton, except some fusion to the skull bones (frontoparietal, nasal, and parotic plate).

DEVELOPMENT IN *B. EPHIPPIUM*

Parotic plates

In the smallest cleared and double-stained specimen [snout-vent length (SVL) = 8.08 mm], the parotic plates are a pair of small, convex discs, lying on top of

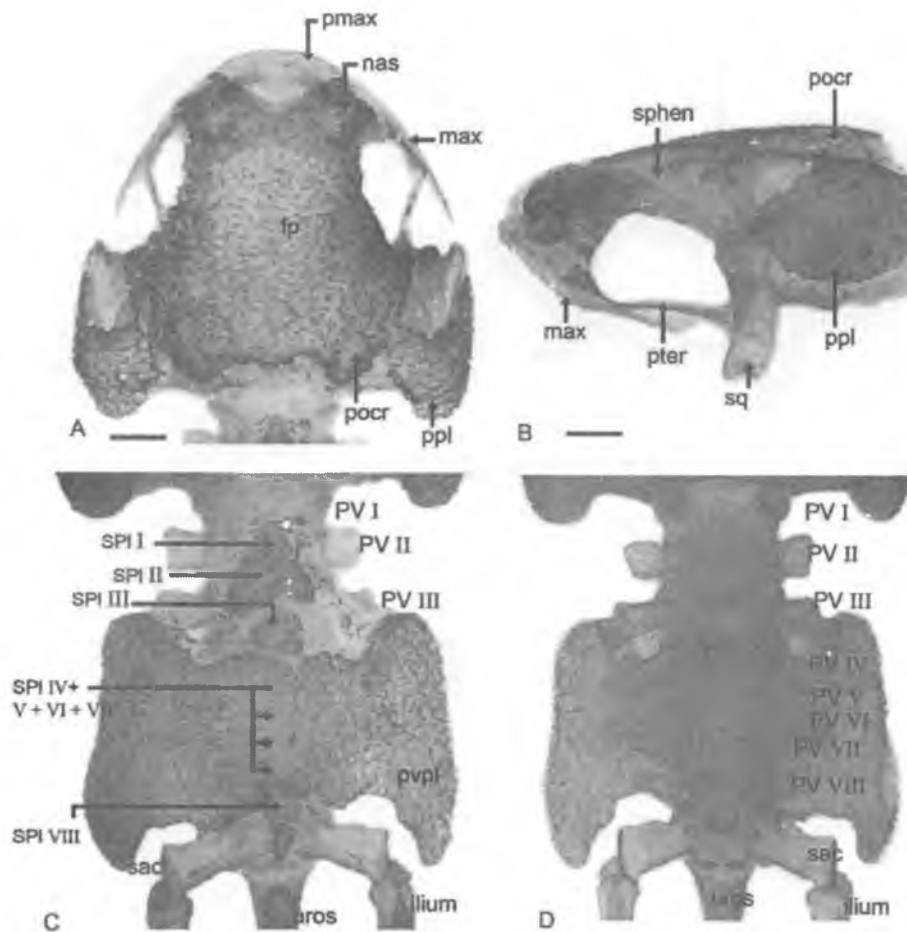


Figure 3. Cleared and double-stained specimen of *Brachycephalus ephippium* from Nova Friburgo. A, B, dorsal and lateral views of skull. C, D, dorsal and ventral views of vertebral column and para-axial plates. PV I–VIII, presacral vertebrae I–VIII; exo, exoccipital; fp, frontoparietal; max, maxilla; pmax, premaxilla; ppl, parotic plate; pvpl, paravertebral plate; sac, sacrum; SP I–VIII, spinal plates I–VIII; sphe, sphenethmoid; sq, squamosal; uros, urostyle. Scale bars = 1 mm.

the otic ramus of the squamosal (Fig. 6). In early stages, the plates lack ornamentation. In later stages (SVL = 10.02 mm and 10.58 mm), the parotic plate has discernable dorsal and lateral planes. The dorsal plane grows medially toward the frontoparietal, whereas the lateral plane enlarges craniocaudally and expands along the ventral process of the squamosal (Fig. 6). Ornamentation is present in later stages (SVL = 11.37 mm) and appears to develop directly from the surface of the plate as spine-shaped processes that in later stages will cover the entire surface of the plate, in a manner similar to the ornamentation of the frontoparietal and nasal (Fig. 7). As the plate develops, it continues to grow toward the frontoparietal and later fuses to it; laterally, it grows to conceal the squamosal with the exception of the articular facet of the ventral ramus.

Paravertebral plates

In the specimens having SVL of 8.08 mm and 10.52 mm, the paravertebral plates are isolated from the vertebrae and vertebral processes (Fig. 8). In specimens with a SVL of 11.37 mm, the plates are in contact with the vertebral body of vertebrae IV and V, covering their transverse processes. At this stage, there is some scattered ornamentation in the form of small ridges. In specimens with SVL of 12.21 mm and 12.85 mm (Fig. 9), the plates appear larger anteroposteriorly, completely covering the transverse processes of vertebrae IV–VI, and partially covering the transverse processes of presacral III.

In specimens with SVL of 12.21 mm and 12.85 mm, the paravertebral plates reaches the vertebral body and spinal plates IV and V, but is not fused to them. In the specimen that is 13.58 mm long, the ornamen-

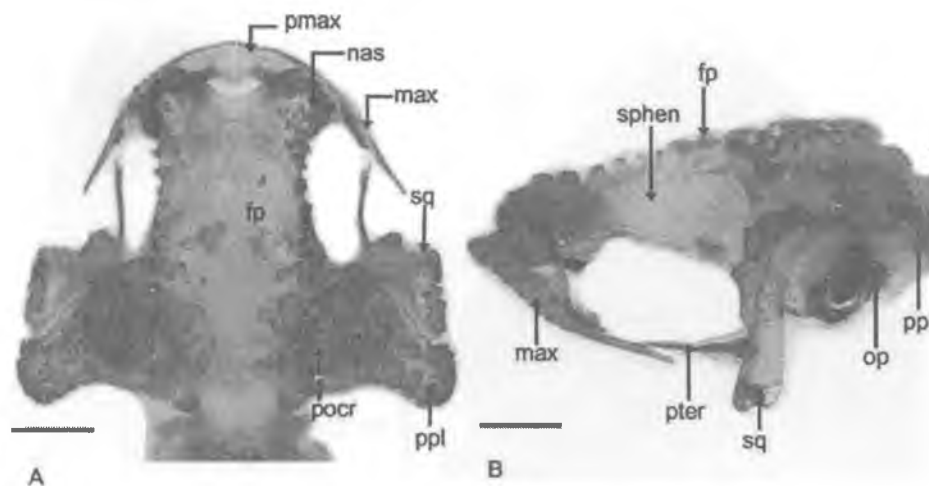


Figure 4. Cleared and double-stained specimen of *Brachycephalus vertebralis* in dorsal (A) and lateral (B) views. fp, frontoparietal; max, maxilla; nas, nasal; op, operculum; pmax, premaxilla; pocr, pos orbital crest; ppl, parotic plate; pter, pterygoid; sq, squamosal; sphen, sphenethmoid. Scale bars = 1 mm.

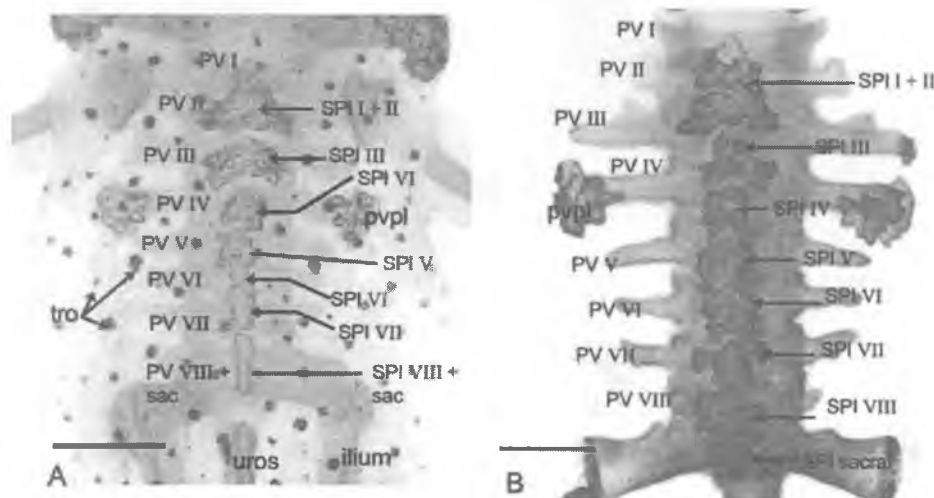


Figure 5. Cleared and double-stained vertebral columns of specimens of *Brachycephalus* sp. 1 (A), and *Brachycephalus vertebralis* (B). PV I–VIII, presacral vertebrae I–VIII; scr, sacrum; SP I–VIII, spinal plates I–VIII; pvpl, paravertebral plate; tro, true osteoderm; uro, urostyle. Scale bars = 1 mm.

tation forms grooves and crests that resembles the ornamentation of adults. By this stage, spinal plates I and II are fused to one another and are laterally expanded. The paravertebral plates are juxtaposed to spinal plates IV and V, but not fused. The paravertebral plates also cover the transverse processes of presacrals IV and V completely and those of vertebrae III and VI partially (Fig. 9).

Spinal plates

In a specimen having an SVL of 11.12 mm, spinal plates are visible on vertebrae IV, V, and VI. At this stage, the spinal plates have no ornamentation and

spinal plates IV and V are fused. In individuals having SVL of 12.21 and 12.85 mm, spinal plates I–VI are present (Fig. 9) and so are I–V. In the 13.58 mm long specimen, the bony spines have grown horizontally, forming grooves and crests to produce ornamentation resembling that of the adults. At this stage, spinal plates I and II are fused to each other.

HISTOLOGY OF JUVENILES

Parotic plates

The histological sections reveal that the parotic plates in juveniles are composed of bony tissue in the

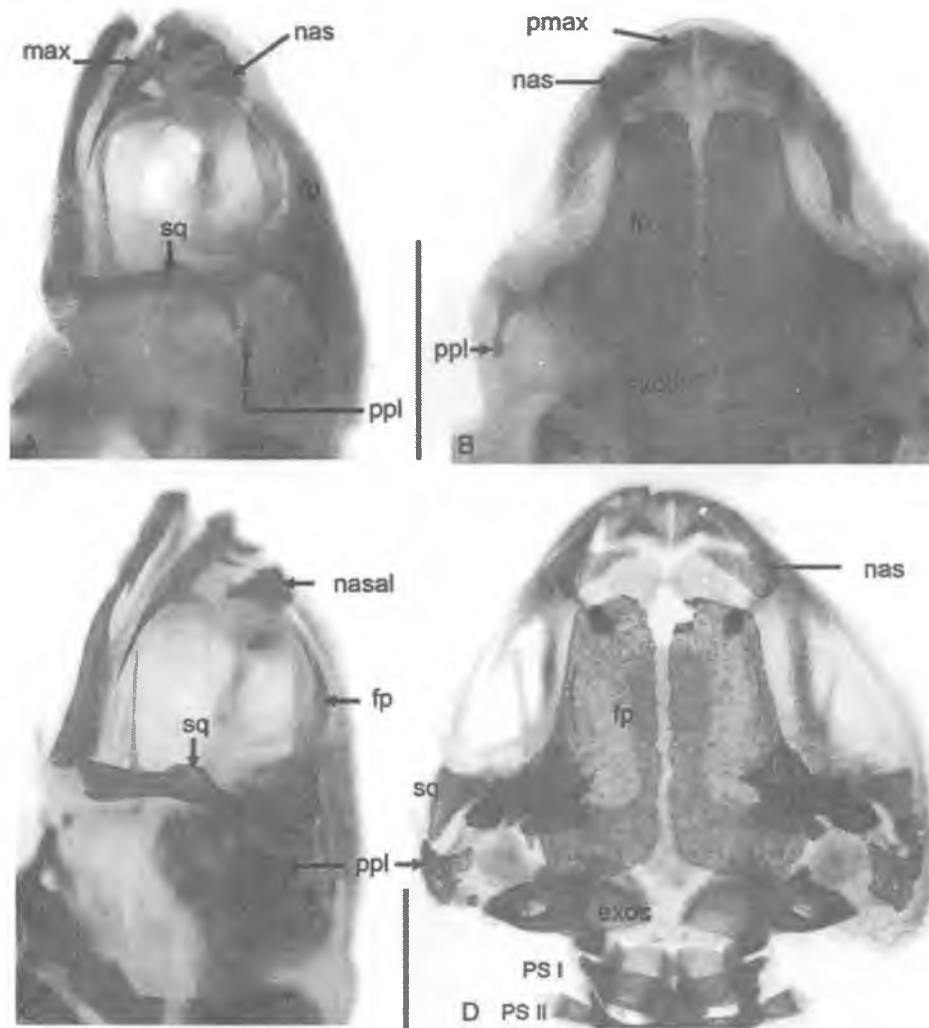


Figure 6. Skulls of juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B, lateral and dorsal views of a specimen with snout-vent length (SVL) = 8.08 mm. C, D, lateral and dorsal views of a specimen with SVL = 10.58 mm. exoc, exoccipital; fp, frontoparietal; max, maxilla; pmax, premaxilla; ppl, parotic plate; PS I–II, presacral vertebrae I and II; sq, squamosal. Scale bars = 1 mm.

process of mineralization distinguished by light red-coloured matrix with some osteocytes included, and surrounded by conjunctive tissue with flat nuclei osteoblasts (endosteal). Ventrally, the endosteal is indistinct of the perichondrium of the crista parotica. The mineralizing matrix of the parotic plate lies beneath the dermis and has no contact with the stratum compactum of the dermis (Fig. 10A, B).

Spinal and paravertebral plates

Histological sections show that spinal and paravertebral plates are formed by mineralized bone tissue. Inside the mineralized bone matrix, there are some

isolated osteocytes. Around the mineralized bone matrix lies an endosteum having flattened nuclei osteoblasts and cube-like nuclei osteoblasts, which may be indicative of intense ossification activity. In juvenile specimens, the endochondral ossification of transverse processes is not fully completed. We found a continuum of cells binding the perichondrium of vertebra IV and periosteum of paravertebral plates, forming an osteochondrogenic tissue. The mineralized matrix of spinal and paravertebral plates lies beneath the dermis and has no relationship with the stratum compactum of the dermis, except in the bony spines of ornamentation which are fused to tegument (Fig. 10C, D).

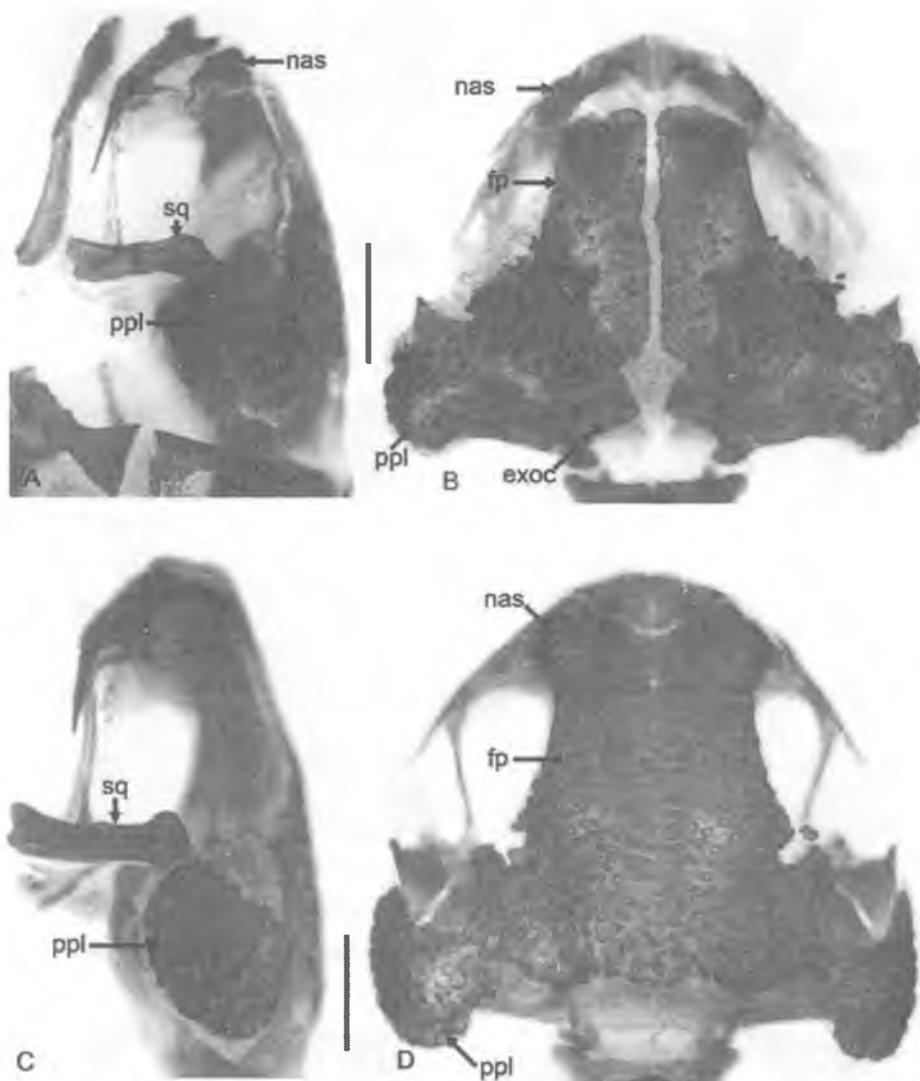


Figure 7. Skulls of juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B, lateral and dorsal views of specimen with snout–vent length (SVL) = 12.85 mm. C, D, lateral and dorsal views of a specimen with SVL = 13.52 mm. exoc, exoccipital; fp, frontoparietal; nas, nasal; ppl, parotic plate; sq, squamosal. Scale bars = 1 mm.

DISCUSSION

PAROTIC PLATES

The existence of parotic plates in *B. ephippium* was reported by (McLachlan, 1943); however, Da Silva *et al.* (2007) were the first to recognize that these plates are independent skull bones, and such a hypothesis is supported by the histological and developmental data obtained in the present study. The ossification process of parotic plates is intramembranous; no chondrocytes were observed in the mineralizing matrix. Perhaps the embryogenesis of the parotic plates is similar to that described for some dermal skull bones (e.g. frontoparietal, nasal), with a

contribution from cells of the paraxial mesoderm (Thomson, 1993; Gilbert, 2006) and neural crest (Hanken & Thorogood, 1993; Gilbert, 2006).

It is possible that the chondrocytes of the otic capsule induce the development of parotic plates. As demonstrated by Leibel (1976), the otic capsule constrains and, at the same time, induces the ossification of dermal bones around it. In the case of the plates found in species of *Brachycephalus*, additional studies addressing development at the histological level are necessary to elucidate this point. However, the data obtained in the present study clearly indicate that the parotic plate is an independent dermal skull bone unique to all populations of *B. ephippium* and

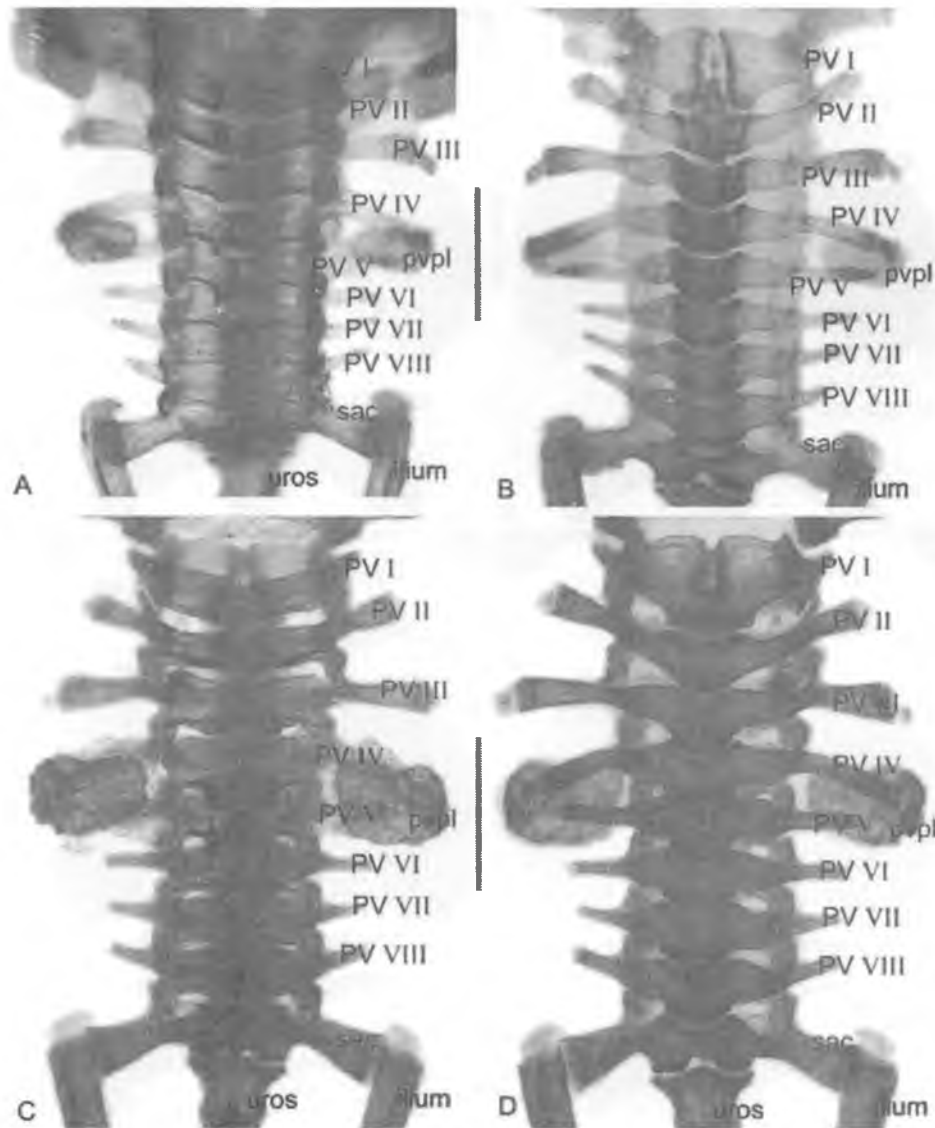


Figure 8. Vertebrae of juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B, dorsal and ventral views of a specimen with 8.08 mm. C, D, dorsal and ventral views of a specimen with 10.58 mm. PV I–VIII, presacral vertebrae I–VIII; pvpl, paravertebral plate; uros, urostyle. Scale bars = 1 mm.

B. vertebralis, *Brachycephalus* sp. 1, and *Brachycephalus* sp. 2, as previously suggested by Da Silva *et al.* (2007). The histological and developmental data obtained in the present study are clearly sufficient to distinguish the parotic plates from casquing (Trueb, 1993) because this is a new independent bone and not an expansion of known dermal roofing bones (e.g. squamosal). As such, the parotic plate resembles neomorphic dermal elements (Trueb, 1993) present in the skull of some hylids; for example, the interfrontal, prenasal, dermal sphenethmoid, and internasal (Trueb, 1970; Trueb, 1993), and the prenasal in

species of the *Rhynella granulosa* group (Pramuk, 2006).

SPINAL AND PARAVERTEBRAL PLATES

Previously, the paravertebral and spinal plates of *B. ephippium* were classified as osteoderms by Ruibal & Shoemaker (1984). In that study, the authors noted the possibility that the primary ossification centers of the plates might lie in the dermal ground substance layer, localized in the estratum spongiosum. However, in the present study, we demonstrate that the spinal

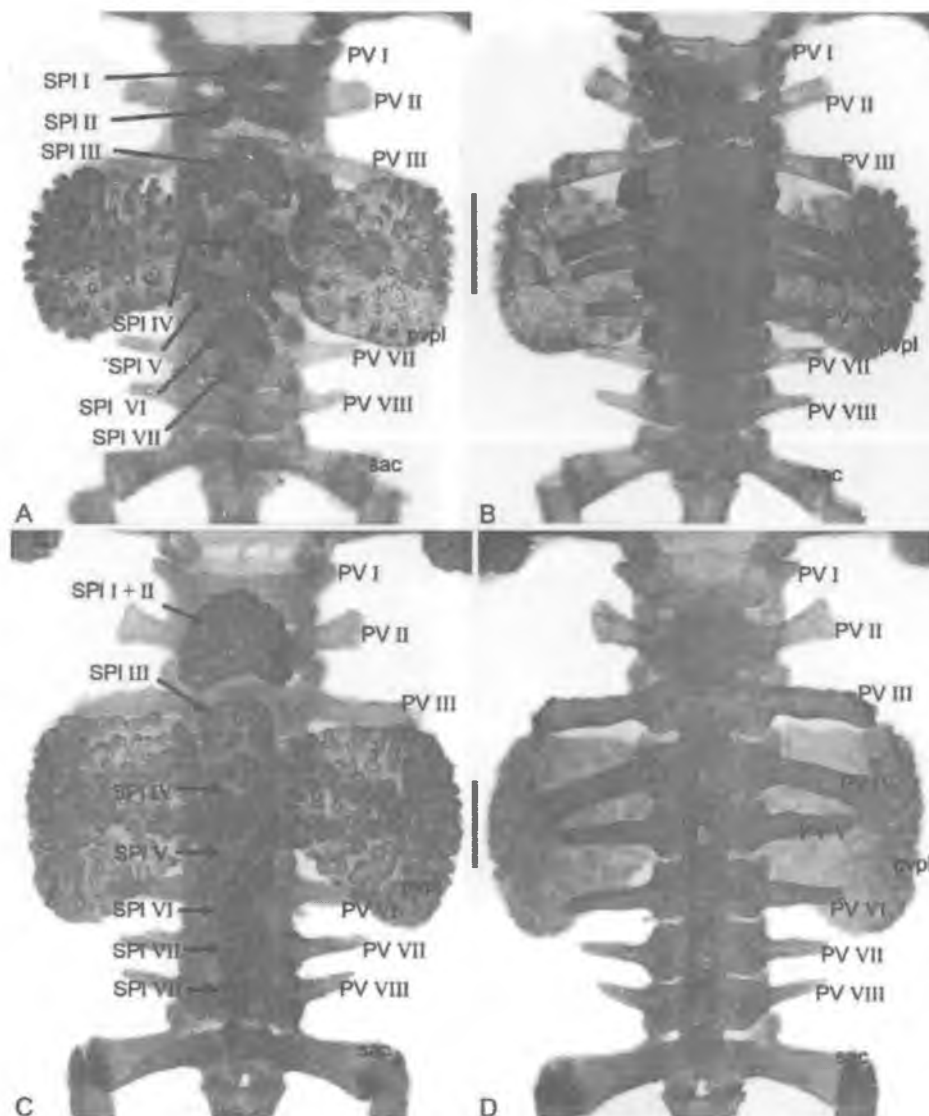


Figure 9. Vertebrae of juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B, dorsal and ventral views of a specimen of 12.85 mm. C, D, dorsal and ventral views of a specimen of 13.58 mm. PV I–VIII, presacral vertebrae I–VIII; sac, sacrum; spl I–VIII, spinal plates I–VIII; pvpl, paravertebral plate. Scale bars = 1 mm.

and paravertebral plates do not arise in the dermis, and the association between the dermis and bony plates is one that is established after the plates have begun to develop ornamentation. The interaction between bone and dermis begins with the development of bony spines that grow vertically toward the dermis, and subsequently invade the epidermis.

The spinal plates are intimately associated with spinal processes of vertebrae. However, similar to the paravertebral plates, the spinal plates arise by intramembranous ossification, whereas the vertebrae arise by endochondral ossification. Thus, the data obtained in the present study suggest that the spinal

plates, ornamented or not, are formed by intramembranous bone tissue addition, and not hyperossification of vertebrae, as suggested by Ruibal & Shoemaker (1984). Furthermore, anurans usually lack a spinal process on the atlas, yet the atlases of *B. ephippium*, *B. vertebralis*, *Brachycephalus* sp. 1, *Brachycephalus* sp. 2, and *Brachycephalus* sp. 3 have well-developed spinal plates. All the lines of evidence justify their being named as separate elements.

Specimens of *B. ephippium* hatch at SVL as small as 5.25 mm (Pombal, Sazima & Haddad, 1994). The smallest specimen analysed in the present study was 8.06 mm long, and it already possesses parotic and

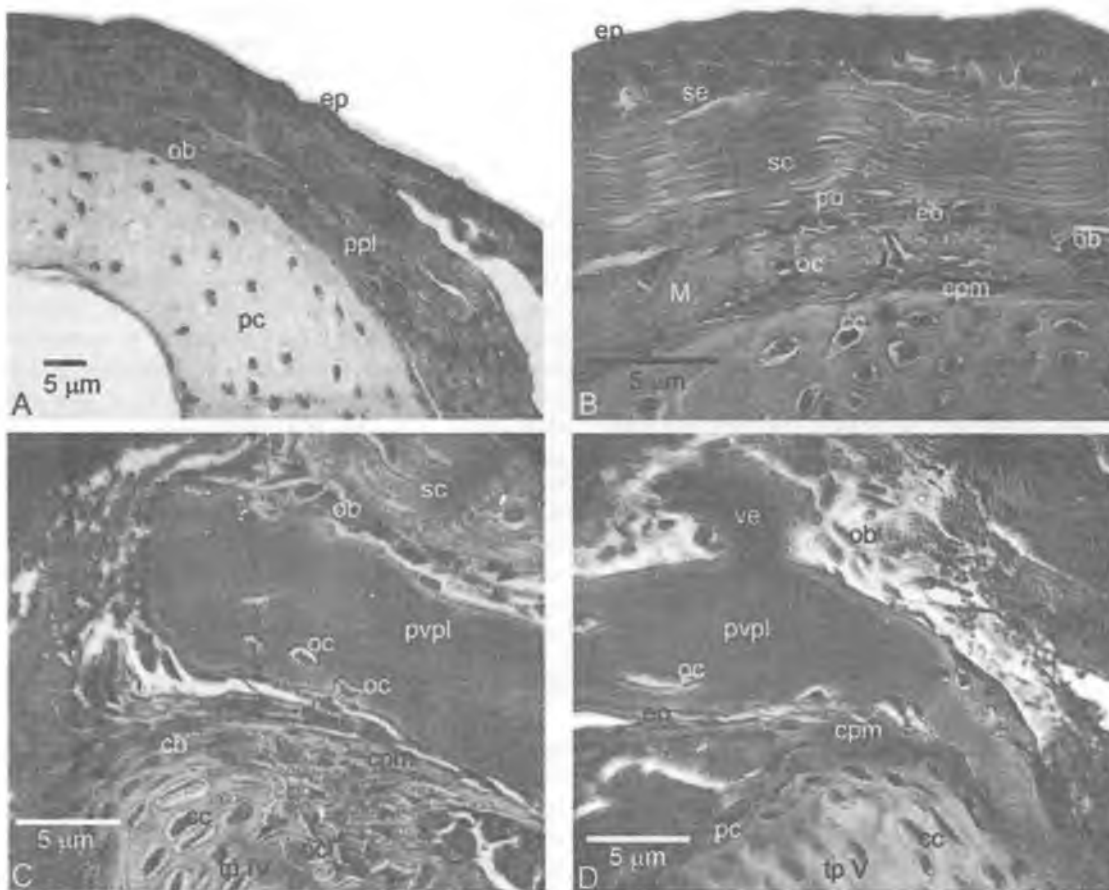


Figure 10. Histological slices of juvenile specimens of *Brachycephalus ephippium*. A, B, parietal region of the skull showing a transversal section of the parotic plate. C, D, vertebral region of presacrals VI and V showing a transverse section of paravertebral plate. cc, condrocyte; cpm, condroperiosteum membrane; eo, endosteum; ep, epidermis; M, bony matrix; ob, osteoblast; oc, osteocyte; pc, parotic crist; po, periosteum; pvpl, paravertebral plate; sc, stratum compactum; se, stratum spongiosum; tp IV–V, transverse process of vertebrae IV and V, respectively; ve, vertical spines. A, specimen from Cotia, with snout–vent length (SVL) = 8.06 mm (Manson's trichrome). B, C, D, specimen from Cotia, with SVL = 9.10 mm (Gomory trichrome).

paravertebral plates. Thus, we infer that the primary ossification centers of these plates arise before the juveniles attain a SVL of 8.00 mm; however, owing to the histological techniques used, the developing bone may not be visible at this stage. The same reasoning may be used for the anlagen of the spinal plates, which might arise before the frogs reach a SVL of 11.00 mm.

There are suggestions that bony plates in other vertebrates may be related to water balance, specially preventing the loss of moisture through the skin (Fabrezi, 2006). Although this interpretation may be appealing in the case of *Brachycephalus*, in which the small size would increase the advantage of diminishing water loss, we do not agree with this interpretation. First, all *Brachycephalus* live in forest litter

where moisture is high, and thus there is little selection to prevent water loss. Second, some species in the genus, including some of the smallest species, have no plates. It appears that the plates are convergent among anurans (Trueb, 1973; Fabrezi, 2006), and yet an understanding of their function is not clear.

OSSIFICATION PROCESS

The bony plates of Testudines are formed by an intramembranous ossification processes wherein the yet cartilaginous ribs invest in a dense conjunctive tissue named periosteochondrogenic membrane, which shows both osteogenic and chondrogenic activity (Gilbert *et al.*, 2001). The capacity of cartilaginous structures to induce the formation of dermal bone

around itself is also exemplified by formation of mandible around the Meckel's cartilage (Chung *et al.*, 1995). Although a similar process may take place in *Brachycephalus*, an experimental approach (with markers that can evidence the cells and extra cellular activities) is necessary to understand the process. However, the results obtained in the present study suggest that the patterns of ossification of spinal and paravertebral plates may resemble the process described in the formation of the shell in turtles. In *B. ephippium*, the perichondral membrane of the transverse process of vertebrae IV and V form a continuum with the periosteal membrane of the paravertebral plates, and it is not possible to differentiate osteoblasts from chondroblasts (Fig. 10C, D). Thus, it is possible that this osteochondrogenic membrane has been responsible for the endochondral ossification of vertebrae and the intramembranous ossification of paravertebral plates. Similarly, the spinal processes of vertebrae may promote the intramembranous ossification of spinal plates.

INTER-POPULATION VARIATION IN BONY PLATES AND VERTEBRAE MORPHOLOGY

Despite homogeneity of external morphology in specimens of *B. ephippium* collected throughout the species broad geographical range, morphological variations among them have been reported, and may be indicative of the existence of cryptic species (Clemente-carvalho *et al.*, 2008). In the present study, we have presented additional evidence of inter-population variation, specifically relating to fusion between spinal plates and vertebrae that may support this hypothesis. However, further investigation using more specimens, a larger set of morphological data, and a more thorough geographical representation are needed before recognition of species in the genus *Brachycephalus*.

BONY PLATES OF *BRACHYCEPHALUS*: OSTEODERM OR ORDINARY DERMAL BONE?

Osteoderm is defined as the presence of bone in the dermis (Hay, 1898; Romer, 1956; Strahm & Schwartz, 1977; Levrat-Calviac & Zylberberg, 1986; Zylberberg & Wake, 1990; O'leary *et al.*, 2004; Scheyer & Sander, 2004). This definition may or may not apply to dermal scales in tetrapods (Smith, 1960; Ruibal & Shoemaker, 1984). Ruibal & Shoemaker (1984) record the presence of osteoderms in Anura, asserting that these structures are morphologically different from scales of Gymnophiona and fishes. According to Zylberberg & Wake (1990) and Zylberberg & Castanet (1985), osteoderms are metaplastic tissues that arise from dermal cells. Metaplasia are mineralizations of fully formed

tissues without the intervention of periosteum and without osteoblasts; therefore, neither osteocytes nor *canaliculi* are present in such structures (Haines & Muhuiddin, 1968). Thus, the osteoderms present in some species of Anura are not metaplastic tissues because they have a periosteum and *canaliculi* (Ruibal & Shoemaker, 1984). The observations made in the present study indicate that the bone plates of *B. ephippium* have periosteum and are not formed in the dermis, although we cannot discard the participation of dermal cells in the formation of these plates.

Because of the diversity of origins, and the nonhomologous nature of these bony elements (Ruibal & Shoemaker, 1984), the identity of osteoderms remains unclear. The only consistent diagnostic feature is the position (i.e. embedded in the adult dermis). In accordance with this criterion, the bony plates (paravertebral and vertebral) in *B. ephippium* are bony elements of the integument, even with points of muscular attachment, supporting the idea of direct involvement in the movements of the organism. In addition, the relationships between the plates and muscles are established early in development. The minute, isolated bony elements imbedded in the skin of *Brachycephalus* sp. 1 and *Brachycephalus* sp. 3 can be considered osteoderms that resemble those described by Ruibal & Shoemaker (1984) in *Phyllomedusa bicolor*.

Table 3 shows the distribution of the morphological patterns relating to bony plates among the species of *Brachycephalus*. The use of these data in reconstructing a phylogeny, aiming to understand the relationship of the species in the genus, is still not possible because of their universality. However, the evidence provided in the present study indicates, at least as primary hypothesis (Pinna, 1991), that these extra bony elements are homologous within the genus and, consequently, evidence of the existence of at least two clades of *Brachycephalus*. One, formed by all *Brachycephalus* with these plates, might be subdivided in groups somehow organized by the degree of development of these plates and of fusion between elements; the other, for which at the moment we have no morphological evidence in support of its monophyly, formed by the diminutive species (*B. didactylus* and *B. hermogenesi*), formerly in the genus *Psyllophryne* (Izecksohn, 1971; Kaplan, 2002) plus all the other *Brachycephalus* without plates, is mainly distributed in the southern region of Brazil, in the State of Paraná. There is a general rule-like statement relating: (1) reduction and (2) structural simplification, (3) increased variability, and (4) the appearance of morphological novelty with miniaturized taxa (Hanken & Wake, 1993). Prior to the proposal of a phylogenetic hypothesis for the genus, it is not yet possible to test such statements properly using *Brachycephalus*.

Table 3. Summary of patterns of bony plates found in the genus *Brachycephalus*

Species	Pattern 2			Pattern 3		
	(a) Small paravertebral plates	(b) Small parotic plates	(c) All spinal plates ornamented	(a) Large bony shield	(b) Large parotic plate	(c) Spinal plates ornamented in vertebrae I–VI
<i>Brachycephalus brunneus</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus didactylus</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus ferruginus</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus hermogenesi</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus izecksohni</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus pernix</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus pombali</i> *	–	–	–	–	–	–
<i>Brachycephalus vertebralis</i>	+	+	+	–	–	–
<i>Brachycephalus</i> sp. 1	+	+	+	–	–	–
<i>Brachycephalus</i> sp. 2	+	+	+	–	–	–
<i>Brachycephalus</i> sp. 3	+	+	+	–	–	–
<i>Brachycephalus ephippium</i> †	–	–	–	+	+	+

*Pattern 1: plates absent. +, occurrence of pattern in taxon; –, not applicable to taxon.

†This profile occurs in all sampled populations of *Brachycephalus ephippium*.

However, prior to the discovery of the majority of the species in the genus, the only known species, *B. ephippium*, was considered as an example of miniaturized taxon (Trueb & Alberch, 1985). The possibility of existing at least two distinctive sister taxa within the genus, creates a single important opportunity for testing whether the events (1–4) described by the rule above may be decoupled at least within this genus, indicating that miniaturization would have affected these close-related taxa differently.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a fellowship provided to L.A.C. H.R.S. received a Grant from FAPERJ (FAPERJ – E-26/170.976-1996) that helped with some of the field trips. Thanks are extended to the administration of the Prefeitura of Atibaia, São Paulo, for permission to visit the Grota Funda Municipal Park. Rafael Camilo Laia and Darlan Aragão helped L.A.C. in the field. Osmino Rodrigues Pires Júnior allowed L.A.C. to join his team on an expedition in search of *Brachycephalus*. We are indebted to Mariana Zatz, Adriana Christina da Silva Pinto and Adriene Fernandes for helping with the gathering of some of the preliminary data. Luiz Fernando Ribeiro donated the specimens of *B. brunneus* used in this study. Dr Ariovaldo Giaretta donated specimens of an unnamed species of *Brachycephalus*. Drs Maria Julia Martins Silva and Sonia Nair Bao graciously allowed us the use of the Stereomicroscope

Zeiss SV11 and scanning electronic microscopes under their care. Linda Trueb read an early version of the manuscript and made extensive comments, grammatical and stylistic corrections, which helped us improve the general readability and sharpen the usage of some concepts. During the process of revision, three referees made valuable contributions that helped with the style and improved the readability of the manuscript; we are thankful to them.

REFERENCES

- Alves ACR, Ribeiro LF, Haddad CFB, Reis SF. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná state, Southern Brazil. *Herpetologica* 62: 221–233.
- Chung KS, Park HH, Ting K, Takitta H, Apte SS, Kuboki Y, Nishimura I. 1995. Modulated expression of type X collagen in the Meckel's cartilage with different developmental fates. *Developmental Biology* 170: 387–396.
- Clemente-Carvalho RBG, Monteiro LR, Bonato V, Rocha HS, Pereira GR, Oliveira DF, Lopes RT, Haddad CFB, Martins EG, Dos Reis SF. 2008. Geographic variation in cranial shape in the pumpkin toadlet (*Brachycephalus ephippium*): a geometric analysis. *Journal of Herpetology* 1: 176–185.
- Da Silva HR, Campos LA, Sebben A. 2007. The auditory region of *Brachycephalus* and its bearing on the monophyly of the genus (Anura: Brachycephalidae). *Zootaxa* 1422: 59–68.
- Dilkes D, Brown LE. 2006. Biomechanics of the vertebrae and associated osteoderms of the Early Permian amphibian *Cacops aspidephorus*. *Journal of Zoology* 2006: 1–12.

- Fabrezi M.** 2006. Morphological evolution of Ceratophryinae (Anura, Neobatrachia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **44**: 153–166.
- Frost DR.** 2007. Amphibian Species of the World: an Online Reference, Version 5.1 (10 October, 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, NY.
- Gilbert SF.** 2006. *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Gilbert SF, Loredo GA, Brukman A, Burke AC.** 2001. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evolution & Development* **3**: 47–58.
- Haines RW, Muhuiddin A.** 1968. Metaplastic bone. *Journal of Anatomy* **103**: 527–538.
- Hanken J, Thorogood P.** 1993. Evolution and development of the vertebrate skull: the role of pattern formation. *Trends Ecology and Evolution* **8**: 9–15.
- Hanken J, Wake DB.** 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 501–519.
- Hay OP.** 1898. On protostega, the systematic position of dermochelys, and the morphogeny of the chelonian carapace and plastron. *American Naturalist* **32**: 929–948.
- Izecksohn E.** 1971. Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia, Anura). *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro* **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.
- Leibel W.** 1976. The influence of the otic capsule in ambystomid skull formation. *Journal of Experimental Zoology* **47**: 85–103.
- Levrat-Calviac V, Zylberberg L.** 1986. The structure of the osteoderms in the gekko: *Taren tola Mauritanica*. *American Journal of Anatomy* **176**: 437–446.
- McLachlan P.** 1943. The cranial and visceral osteology of the Neotropical Anuran *Brachycephalus ephippium* Spix. *South African Journal of Science* **49**: 164–195.
- O'Leary MA, Roberts EM, Head JJ, Sissoko F, Bouaré ML.** 2004. Titanosaurian (Dinosauria: Sauropoda) remains from the 'continental interclaire' of Mali. *Journal of Vertebrate Paleontology* **24**: 923–930.
- Pinna MCC.** 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* **7**: 367–394.
- Pombal JP Jr, Sazima I, Haddad CFB.** 1994. Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* **28**: 516–519.
- Pramuk J.** 2006. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* **146**: 407–452.
- Romer AS.** 1956. *Osteology of Reptiles*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Ruibal R, Shoemaker V.** 1984. Osteoderms in anurans. *Journal of Herpetology* **18**: 313–328.
- Scheyer TM, Sander PM.** 2004. Histology of ankylosaur osteoderms: implications for systematics and function. *Journal of Vertebrate Paleontology* **24**: 874–893.
- Smith HM.** 1960. *Evolution of chordate structure*. New York, NY: Holt, Rinehart, and Winston.
- Strahm MH, Schwartz A.** 1977. Osteoderms in the anguillid lizard subfamily Displaglossinae and their taxonomic importance. *Biotropica* **9**: 58–72.
- Taylor WR, Van Dyke GC.** 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* **9**: 107–119.
- Thomson KS.** 1993. Segmentation, the adult skull, and the problem of homology. In: Hanken J, Hall BK, eds. *The skull. Volume 2: patterns of structural and systematic diversity*. Chicago, IL: University of Chicago Press, 36–68.
- Trueb L.** 1970. Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with coossified skulls (family Hylidae). *University of Kansas Publications of the Museum of Natural History* **18**: 547–716.
- Trueb L.** 1973. Bones, frogs and evolution. In: Vial JL, ed. *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems*. Columbia, MO: University of Missouri Press, 64–132.
- Trueb L.** 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: Hanken J, Hall BK, eds. *The skull. Volume 2: patterns of structural and systematic diversity*. Chicago, IL: University of Chicago Press, 255–343.
- Trueb L, Alberch P.** 1985. Miniaturization and the anuran skull: a case study of heterochrony. In: Duncker HR, Fleischer G, eds. *Functional morphology of the vertebrates*. New York, NY: Gustav Fischer Verlag, 113–121.
- Vickaryous MK, Hall BK.** 2006. Osteoderm morphology and development in the Nine-Banded Armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Mammalia, Xenarthra, Cingulata). *Journal of Morphology* **267**: 1273–1283.
- Yeh J.** 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution* **56**: 628–641.
- Zylberberg L, Castanet J.** 1985. New data on the structure and growth of the osteoderms in the reptile *Anguis fragilis* L. (Anguillidae, Squamata). *Journal of Morphology* **186**: 327–342.
- Zylberberg L, Wake MH.** 1990. Structure of the scales of *Dermophis* and *Microcaecilia* (Amphibia: Gymnophiona), and a comparison to dermal ossifications of other vertebrates. *Journal of Morphology* **206**: 25–43.

APPENDIX 1

MATERIAL EXAMINED

Brachycephalus ephippium: AS00466, AS00484, AS00485, AS00491, AS00492, AS00502, AS00517, AS00521, AS00524, AS00599, AS00602, AS00603, AS01513 from Cotia, São Paulo, Brazil. AS00455, AS00447, AS00468, AS00474, AS00509–00511 from Atibaia, São Paulo, Brazil. AS02428–02437 from Itamonte, Minas Gerais, Brazil. AS02439–02450 from

Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. AS02451–02458 from Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil and AS02417–02438 from Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil.

Brachycephalus hermogenesi: Ubatuba, São Paulo, Brazil: AS 02460.

Brachycephalus sp. 1: Biritiba Mirim, São Paulo, Brazil: CHUNB 37676.

Brachycephalus sp. 2: Fazenda Capricórnio, Ubatuba, São Paulo Brazil: AAG 001693, 001788, 001791, 001942 and 001952.

Brachycephalus sp. 3: Cunha, São Paulo, Brazil: AS 02891 and 02892.

Brachycephalus cf. *vertebralis*: Ubatuba, São Paulo, Brazil: AAG 000841, 001572, 001616, 001620, 001918.

Brachycephalus vertebralis: Parati, Rio de Janeiro, Brazil: MNRJ 11102–11105.

Brachycephalus pernix: Quatro Barras, Paraná, Brazil: AS2399, AS 2401, AS 2459.

Brachycephalus brunneus: Campina Grande do Sul, Paraná, Brazil: AS 02462.

APPENDIX 2

JUVENILE SPECIMENS OF *BRACHYCEPHALUS**EPHIPPIUM* WITH CORRESPONDING

SNOUT–VENT LENGTH

Cotia, São Paulo, Brazil: AS00441 (8.06 mm), AS00440 (8.71 mm), AS00440 (8.71 mm), AS02543 (9.10 mm), AS00448 (10.02 mm), AS00447 (10.58 mm), AS02542 (10.85 mm), AS00495 (12.21 mm), AS00494 (12.85 mm). Atibaia, São Paulo, Brazil: AS02502 (8.08 mm), AS02505 (11.07 mm), AS02503 (11.48 mm), AS2504 (12.11 mm), AS00509 (13.70 mm), AS00502 (13.72 mm), AS0468 (13.82 mm), AS02496 (11.37 mm), AS02428 (13.52 mm). Itamonte, Minas Gerais, Brazil: AS02496 (11.37 mm) AS02428 (13.52 mm). Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil: AS02499 (10.71 mm), AS02500 (13.03 mm).