
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**DISTRIBUIÇÃO E TAXONOMIA DE *BRACHYCEPHALUS* SP. (AFF. *PERNIX*)
(ANURA: BRACHYCEPHALIDAE)**

JULIANE PETRY DE CARLI MONTEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Maio - 2017

JULIANE PETRY DE CARLI MONTEIRO

Distribuição e taxonomia de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) (Anura: Brachycephalidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Dr Célio Fernando Baptista Haddad

Coorientadora: Dra Thais Helena Condez

Rio Claro
2017

591 Monteiro, Juliane Petry De Carli
M775d Distribuição e taxonomia de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) (Anura: Brachycephalidae) / Juliane Petry De Carli Monteiro. - Rio Claro, 2017
114 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad
Coorientador: Thais Helena Condez

1. Animais - Classificação. 2. Taxonomia de grupos recentes. 3. Mata Atlântica. 4. Diversidade. 5. Miniaturização. 6. Altitude. 7. Sapinho-pingo-de-ouro. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DISTRIBUIÇÃO E TAXONOMIA DE BRACHYCEPHALUS SP. (AFF. PERNIX) (ANURA: BRACHYCEPALIDAE)

AUTORA: JULIANE PETRY DE CARLI MONTEIRO
ORIENTADOR: CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
COORIENTADORA: THAIS HELENA CONDEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
Departamento de Zoologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. PAULO CHRISTIANO DE ANCHIETTA GARCIA
Departamento de Zoologia - Instituto de Ciências Biológicas / UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - MG



Prof. Dr. TARAN GRANT
Departamento de Zoologia / USP - Universidade de São Paulo - São Paulo - SP

Rio Claro, 09 de maio de 2017

À Mata Atlântica, por fornecer
o material de estudo para este trabalho.

E, aos meus avós Edithe de Carli Monteiro &
Celso de Barros Monteiro, pelo exemplo, pela
luta e por todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata aos meus orientadores Célio F. B. Haddad e Thais H. Condez pela oportunidade, pelo acolhimento, por todo aprendizado e amadurecimento, pelas experiências e pela amizade. Também agradeço por serem esses gigantes parceiros junto aos minúsculos *Brachycephalus*. Célio, muito obrigada pelo aporte e toda a infraestrutura do seu laboratório. Thais, obrigada por todo seu incentivo sempre e sua valiosa ajuda.

Agradeço também ao Paulo C. A. Garcia e ao Ivan B. Amaral que me apoiaram num momento onde não tive orientação alguma na herpetologia, todavia não me deixaram desistir, pelo contrário, me incentivaram. Então, todo este trabalho acabou sendo uma ideia decorrente dos resultados do Plano de Ação Nacional para Conservação dos Anfíbios e Répteis Ameaçados da Região Sul do Brasil (PORTARIA Nº 22, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2012), do qual vocês me convidaram para participar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida (#131947/2015-0). À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento para a maior parte das expedições a campo (#2013/50741-7).

A Seção Técnica de Pós-Graduação (Zoologia) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, pelos esclarecimentos e ajuda durante este período.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro) por fornecer as instalações laboratoriais para os procedimentos moleculares. Mariana Lyra muito obrigada pela sua ajuda no CEIS.

A Universidade da Região de Joinville pela hospedagem na Vila da Glória nas épocas de coleta de dados. Obrigada ao Sidnei Dornelles e Cláudio Tureck por sempre estarem dispostos a facilitar as burocracias. E também, a todos os moradores locais que permitiram o acesso em suas terras para explorarmos a Serra do Saí e a Serra da Palha.

A minha amiga Yara de Mello por me confirmar que já havia visto um sapinho-pingo-de-ouro na Serra do Saí, o que me levou a sua procura neste local. E ao Reginaldo Carvalho, por me dar muitas dicas de montanha e me fornecer trilhas precisas da região de Joinville. Obrigada queridos geógrafos.

Anna K. Krassota, Renan Paitach e Pedro Balieiro, obrigada pela amizade, alegrias e por todo apoio em épocas muito difíceis dos últimos dez anos. Renan e Pedro, obrigada pelo alojamento durante alguns campos e as boas conversas.

Aos amigos e colegas que sempre fizeram do laboratório um ambiente agradável: Ariadne Sabbag, Amanda Lantyer, Ana Carolina Calijorne, Ana Paula Motta, Anyelet Valencia, Bianca Berneck, Boris Blotto, Carla Lopes, Danilo Delgado, Délio Baêta, Fábio de Sá, Leo Malagoli, Marcus Thadeu Santos, Mariana Lyra, Nadya Pupin, Natalia Salles, Paulo Pinheiro, Pedro Taucce, Priscila Lemes, Thais Condez e Tereza Thomé.

Obrigada também a Bianca Berneck, Délio Baêta, Mariana Lyra e Tereza Thomé pelas avaliações deste trabalho ao longo desses dois anos. E a todos que de alguma forma me deram dicas e ideias para eu desenvolver essa dissertação, muito obrigada!

Aos amigos que pude compartilhar nesse tempo a paixão por caçar sapos no mato: Anyelet Valencia, Eli de Nardin, Leo Malagoli, Marcus Thadeu Santos e Thais Condez.

Aos meus pais, Nidia Petry C. M. e Jaime C. Monteiro pelo apoio e por compreender que tive que trocar a presença pela saudade. Aos meus queridos avós Celso Monteiro e Edithe De Carli, por lutarem até hoje pela família e apoiarem meu pai em momentos muito difíceis. A energia guerreira já vem desta geração!

Ao meu companheiro de aventuras, Eli de Nardin, que participou de todo esse amadurecimento de forma profunda, não medindo esforços para me manter sempre de cabeça erguida. Obrigada por estar ao meu lado.

RESUMO

Os sapos miniaturizados do gênero *Brachycephalus*, popularmente chamados de sapos-pulga e sapinhos-pingo-de-ouro, são endêmicos da Mata Atlântica do Brasil, ocorrendo nas regiões nordeste, sudeste e sul. A alta diversidade deste grupo, conforme verificado nos últimos anos, vem demonstrando uma interessante história evolutiva ainda não bem compreendida. As informações atuais nos direcionam, sobretudo, a dois cenários com relação a sua distribuição e taxonomia: o primeiro, representado pelos sapos-pulga que possuem ampla distribuição geográfica e altitudinal, representados por quatro espécies; e o segundo, representado pelos sapinhos-pingo-de-ouro que são restritos às encostas e aos topos de montanhas, majoritariamente microendêmicos, contendo a maior riqueza do gênero com 27 espécies. Recentemente, foi descoberto um significativo número de espécies de *Brachycephalus* para a região sul do Brasil, aumentando a atenção para esse gênero. Através de expedições a campo no nordeste de Santa Catarina, como resultado do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada de Extinção da Região Sul do Brasil, uma iniciativa do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Ministério do Meio Ambiente, foram obtidos registros para *Brachycephalus* em locais não amostrados anteriormente. Dessa forma, esse estudo amostrou nove localidades no nordeste de Santa Catarina, especialmente, em duas regiões de serra localizadas entre os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul junto ao Complexo Estuarino Baía Babitonga: Serra do Saí e Serra da Palha. Como resultado foi descoberta uma nova espécie de sapinho-pingo-de-ouro, sendo o primeiro registro deste grupo para áreas de baixada litorânea. Além disso, foram evidenciadas variabilidade morfológica e similaridades moleculares entre as populações encontradas, o que sugere tratar-se do primeiro registro de uma espécie *Brachycephalus* com populações claramente diferenciadas fenotipicamente, mas com alta homogeneidade em suas sequências de DNA analisadas.

ABSTRACT

The miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus*, popularly known as flea-toads and pumpkin toadlets, are endemic species of the Atlantic Forest, occurring in northeast, southeast, and south of Brazil. The high diversity of this group of species, as verified in recent years, highlights one attractive evolutionary history that is not completely understood. The current information suggests two distinct scenarios related to this species distribution and taxonomy: first, represented by the flea-toads, which have wide geographical and altitudinal distribution and comprises four species; and second, represented by the pumpkin toadlets, which are mostly microendemic (with geographic distribution restricted to the slopes and mountain tops) and comprises the greatest species richness of the genus, with 27 species. Recently, a significant number of *Brachycephalus* species were discovered from southern Brazil, increasing the general interest in this genus. During field expeditions to the northeastern of Santa Catarina state, organized by the Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada de Extinção da Região Sul do Brasil, one initiative of the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Ministério do Meio Ambiente, records of *Brachycephalus* were obtained for new localities, never explored before. Thus, in this study we surveyed nine localities from northeastern Santa Catarina state, in two mountainous regions near the Babitonga Bay at the municipalities of Garuva, Itapoá and São Francisco do Sul: the Serra do Saí and the Serra da Palha. As a result from the expeditions we discovered a new species of pumpkin toadlet, which represents the first record for this group of species in lowland areas. In addition, we found morphological variability and molecular similarities within populations, suggesting that this could be the first record of a *Brachycephalus* species with populations clearly differentiated phenotypically, but with high homogeneity in their analyzed DNA sequences.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
Área de estudo	12
Objetivos e organização da dissertação	13
Referências.....	14
CAPÍTULO I.....	18
A new species of <i>Brachycephalus</i> (Anura, Brachycephalidae): the first record for a montane group of species in the Atlantic Forest lowlands of Brazil.....	18
Abstract.....	19
Resumo	19
Keywords	20
Introduction.....	20
Material and methods.....	21
Results.....	23
Discussion.....	32
Acknowledgements.....	33
References.....	33
Figures	39
Appendix.....	45
CAPÍTULO II.....	46
Distribuição geográfica, variação morfológica e molecular de uma nova espécie de <i>Brachycephalus</i> (Anura: Brachycephalidae) no nordeste do estado de Santa Catarina.....	46
Resumo	47
Abstract.....	47
Palavras-chave	48
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
3 RESULTADOS	58
4 DISCUSSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	85
Apêndice 1.	94
Apêndice 2.	96

Apêndice 3	97
Apêndice 4.....	98
CONCLUSÕES	102
ANEXO I.....	103
Comments on the current taxonomy of <i>Brachycephalus</i> (Anura: Brachycephalidae)	103
Acknowledgments	110
References.....	110
Figure 1	113

INTRODUÇÃO GERAL

As frequentes descrições de novas espécies de anfíbios vêm contribuindo com a ciência básica e conseqüentemente para estratégias e práticas de conservação (PADIAL & DE LA RIVA, 2006). Devido à alta devastação antrópica nos ambientes naturais no mundo todo, muitas vezes as espécies são descobertas já em risco de extinção (WHITTAKER *et al.*, 2013). Todavia, apesar da provável subestimação recorrente da riqueza de anfíbios (*e.g.* VIEITES *et al.*, 2009), é possível que em alguns grupos haja inflação taxonômica, principalmente naqueles compostos por espécies “carismáticas” (PADIAL & DE LA RIVA, 2006), fato conhecido nos dendrobatídeos (GRANT *et al.*, 2006), por exemplo. Assim, em muitos casos, para a determinação adequada de uma espécie é necessária uma taxonomia baseada em diferentes linhas de evidências (DAYRAT, 2005; PADIAL & DE LA RIVA, 2006; VIEITES *et al.*, 2009).

O Brasil possui uma extensa área territorial abarcando diferentes domínios morfoclimáticos na Região Neotropical (AB’SÁBER, 2003). Por este motivo, o país é responsável por abrigar a mais rica biodiversidade da fauna de anfíbios anuros se comparado aos outros países (AMPHIBIAWEB, 2017). O Domínio da Mata Atlântica revela um elevado número de endemismos proporcionado pela heterogeneidade de ambientes, majoritariamente, ao longo da região costeira (MORELLATO & HADDAD, 2000; CRUZ & FEIO, 2007; TOLEDO & BATISTA, 2012; HADDAD *et al.*, 2013). O rápido avanço da fragmentação e a descaracterização do hábitat natural estão dentre os principais impactos agravantes para o declínio populacional e extinções locais desse grupo de organismos, enquadrando a Mata Atlântica como área prioritária para preservação dentre os *hotspots* mundiais (MYERS *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a família Brachycephalidae, endêmica da Mata Atlântica, é composta por dois gêneros: *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 e *Ischnocnema* Reinhardt & Lütken, 1862. O gênero *Brachycephalus* é conhecido principalmente por apresentar essencialmente espécies miniaturizadas (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009) e, geralmente, exibir colorações vibrantes que podem estar associadas ao aposematismo (PIRES *et al.*, 2005; POMBAL JR & IZECKSOHN, 2011). A maioria das espécies de *Brachycephalus* tem ocorrência nos complexos de montanhas na Serra do Mar, mas ocorrem também na Serra da Mantiqueira, na Serra de Paranapiacaba, nas Serras do Leste Catarinense e na Serra do Rio de Contas (IBGE, 2010; CONDEZ, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015). O gênero é conhecido para os estados da

Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (NAPOLI *et al.*, 2011; HADDAD *et al.*, 2013; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a).

Atualmente, existem 31 espécies descritas de *Brachycephalus*, sendo que a maioria foi reconhecida apenas a partir do século XXI (FROST, 2016). Com base em similaridades morfológicas podemos distinguir dois principais grupos entre as espécies de *Brachycephalus*: os sapos-pulga e os sapinhos-pingo-de-ouro (NAPOLI *et al.*, 2011). Além disso, com base em caracteres morfológicos e moleculares (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; PADIAL *et al.*, 2014), as espécies de *Brachycephalus* podem ser divididas em dois grupos: espécies de distribuição associada ao norte da Mata Atlântica (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e sul da Mata Atlântica (Paraná e Santa Catarina).

Até o início da década passada era reconhecido o gênero *Psyllophryne*, ao qual pertenciam as espécies até então descritas de sapos-pulga (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA & SAWAYA, 1998). Esse gênero se diferenciava de *Brachycephalus* devido à presença de *omosternum* na cintura peitoral (IZECKSOHN, 1971). Todavia, essa estrutura foi posteriormente encontrada em espécies pertencentes aos dois gêneros, tornando *Psyllophryne* um sinônimo junior de *Brachycephalus* (KAPLAN, 2002). Mais recentemente, essa informação foi corroborada por Clemente-Carvalho *et al.* (2011) e Padial *et al.* (2014) através de filogenias moleculares, nas quais os sapos-pulga não constituem um grupo monofilético, encontrando-se aninhados com as demais espécies do gênero *Brachycephalus*. Atualmente, os sapos-pulga são representados por quatro espécies [*B. didactylus* (Izecksohn, 1971); *B. hermogenesi* (Giaretta & Sawaya, 1998); *B. pulex* Napoli, Caramaschi, Cruz & Dias, 2011 e *B. sulfuratus* Condez, Monteiro, Comitti, Garcia, Amaral & Haddad, 2016 (SEGALLA *et al.*, 2016; FROST, 2016)]. Essas espécies apresentam coloração críptica, corpo “leptodactyliforme”, ausência de hiperossificação do esqueleto e ampla distribuição altitudinal e geográfica (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA & SAWAYA, 1998; NAPOLI *et al.*, 2011; CONDEZ *et al.*, 2016). A amplitude latitudinal dos sapos-pulga abrange desde o estado da Bahia (*B. pulex*; NAPOLI *et al.*, 2011) até o estado de Santa Catarina (*B. sulfuratus*; CONDEZ *et al.*, 2016).

Os sapinhos-pingo-de-ouro são mais diversificados, com 27 espécies reconhecidas. Essas espécies encontram-se distribuídas desde o norte da Mata Atlântica, no Espírito Santo (*Brachycephalus alipioi*; POMBAL JR & GASPARINI, 2006), até o extremo sul da distribuição do gênero, em Santa Catarina (*B. fuscolineatus*; RIBEIRO *et al.*, 2015). As espécies de sapinhos-pingo-de-ouro com distribuição associada ao norte da Mata Atlântica [*B. alipioi* Pombal Jr & Gasparini, 2006; *B. atelopoide* Miranda-Ribeiro, 1920; *B. bufonoides*

Miranda-Ribeiro, 1920; *B. crispus* Condez, Clemente-Carvalho, Haddad & Reis, 2014; *B. ephippium* (Spix, 1824); *B. garbeanus* Miranda-Ribeiro, 1920; *B. guarani* Clemente-Carvalho, Giaretta, Condez, Haddad & Reis, 2012; *B. margaritatus* Pombal Jr & Izecksohn, 2011; *B. nodoterga* Miranda-Ribeiro, 1920; *B. pitanga* Alves, Sawaya, Reis & Haddad, 2009; *B. toby* Haddad, Alves, Clemente-Carvalho & Reis, 2010 e *B. vertebralis* Pombal Jr, 2001 (SEGALLA *et al.*, 2016; FROST, 2016)] apresentam colorações geralmente vibrantes, corpo “bufoniforme”, presença de diferentes graus de hiperossificação do esqueleto e distribuição geográfica restrita a regiões de encosta e topos de morros em altitudes elevadas (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009; CONDEZ *et al.*, 2014; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a). Já, as espécies de sapinhos-pingo-de-ouro com distribuição associada ao sul da Mata Atlântica [*B. albolineatus* Bornschein, Ribeiro, Blackburn, Stanley & Pie, 2016; *B. auroguttatus*, Ribeiro, Firkowski, Bornschein & Pie, 2015; *B. boticario*, Pie, Bornschein, Firkowski, Belmonte-Lopes & Ribeiro, 2015; *B. brunneus* Ribeiro, Alves, Haddad & Reis, 2005; *B. ferruginus* Alves, Ribeiro, Haddad & Reis, 2006; *B. fuscolineatus*, Pie, Bornschein, Firkowski, Belmonte-Lopes & Ribeiro, 2015; *B. izecksohni* Ribeiro, Alves, Haddad & Reis, 2005; *B. leopardus*, Ribeiro, Firkowski & Pie, 2015; *B. mariaeterezae*, Bornschein, Morato, Firkowski, Ribeiro & Pie, 2015; *B. olivaceus*, Bornschein, Morato, Firkowski, Ribeiro & Pie, 2015; *B. pernix* Pombal Jr, Wistuba & Bornschein, 1998; *B. pombali* Alves, Ribeiro, Haddad & Reis, 2006; *B. quiririensis* Pie & Ribeiro, 2015; *B. tridactylus* Garey, Lima, Hartmann & Haddad, 2012 e *B. verrucosus*, Ribeiro, Firkowski, Bornschein & Pie, 2015 (SEGALLA *et al.*, 2016; FROST, 2016)], apresentam colorações geralmente vibrantes, corpo “bufoniforme”, ausência de hiperossificação do esqueleto e distribuição geográfica restrita a regiões de encosta em altitudes elevadas e topos de morros (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009; PIE *et al.*, 2013; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a).

A recente descoberta de nove espécies de sapinhos-pingo-de-ouro para a região sul da Serra do Mar e Vale do Itajaí (RIBEIRO *et al.*, 2015; PIE & RIBEIRO, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016b), nos estados de Paraná e Santa Catarina, vem aumentando a atenção para esse grupo de espécies. Isso também ficou evidente com a descrição do primeiro sapo-pulga nessa região, *Brachycephalus sulfuratus* Condez, Monteiro, Comitti, Garcia, Amaral & Haddad, 2016, com amplitude geográfica desde o sul de São Paulo até Santa Catarina. Dessa forma, explorar áreas desconhecidas para preencher lacunas de ocorrência de *Brachycephalus* é crucial para o entendimento da distribuição e taxonomia desses organismos.

ÁREA DE ESTUDO

Através de esforços de campo em colaboração com o Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada de Extinção da Região Sul do Brasil, uma iniciativa do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Ministério do Meio Ambiente, foram encontradas populações de *Brachycephalus* na região nordeste de Santa Catarina. Esta descoberta foi fundamental para a determinação da área de estudo. Uma região pouco estudada compreendida no complexo estuarino da Baía Babitonga apresentou a ocorrência do sapo-pulga (CONDEZ *et al.*, 2016) e, assim, estimulou a busca pela ocorrência de sapinhos-pingo-de-ouro. A região explorada abrangeu a Serra do Saí, municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul e na Serra da Palha, localizada na Ilha de São Francisco do Sul.

A região de estudo no estado de Santa Catarina compreende o final da Serra do Mar, que constitui um pequeno prolongamento da serra paranaense, limitando-se ao norte do vale do Rio Itajaí, representada por cordões de serras paralelas e montanhas isoladas que drenam em direção ao mar (ALMEIDA & CARNEIRO, 1998; GONTIJO-PASCUTTI *et al.*, 2012). Nessa fração da Serra do Mar é sugerida uma compartimentação do relevo em cinco blocos sustentados por rochas granitoides, sendo um destes São Francisco do Sul onde o relevo residual esculpido sobre granitoides e ortognaisses, sustenta localmente o divisor entre o vale encaixado do Rio Palmital/Cubatão, que é parte da Baía Babitonga, e o litoral Atlântico (GONTIJO-PASCUTTI *et al.*, 2012). Ao norte da Ilha de São Francisco do Sul o relevo é marcado por cristas alinhadas nas direções preferenciais N e NNE com altitudes médias entre 200 e 600 metros (GONTIJO-PASCUTTI *et al.*, 2012), onde é observada a Serra do Saí, que abrange os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul. Já na Ilha de São Francisco do Sul, ocorrem pequenos morros e colinas residuais com altitudes médias entre 20 e 80 metros (GONTIJO-PASCUTTI *et al.*, 2012) e, adicionalmente, é possível observar a Serra da Palha, no bairro Laranjeiras, com altitude máxima de 300 metros. Toda essa região é banhada pelo Complexo Estuarino Baía Babitonga e pelo Oceano Atlântico a leste.

Segundo a classificação climática de Köppen, os municípios mencionados acima se situam na zona subtropical úmida, clima oceânico sem estação seca, com verão quente (classificação Cfa) e a temperatura média anual varia entre 20 – 22°C (ALVARES *et al.*, 2013, 2014). A precipitação anual varia entre 1827,3 – 2568,1 mm (MELLO *et al.*, 2015). A vegetação na área amostrada é representada pela Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (nível do mar < 30 metros de altitude), Floresta Ombrófila Densa Submontana (30 < 500

metros de altitude) e Floresta Ombrófila Densa Montana (acima de 500 metros de altitude) (LINGNER *et al.*, 2013). No ambiente insular, bem como no ambiente continental, pode ser observado em suas paisagens de baixada um mosaico de ambientes preenchidos pela especulação imobiliária e portuária (Porto de Itapoá e Porto de São Francisco do Sul), aquicultura, agricultura (principalmente cultivo de arroz), pecuária e silvicultura (*Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp.). Esta última cultura também adentra inúmeras áreas montanhosas nesses municípios (obs. pessoal).

As excursões ao campo foram realizadas de maio de 2015 a setembro de 2016, totalizando 35 dias, com 568 horas/homem de esforço de amostragem. A procura por espécimes foi visual e auditiva (adaptado de CRUMP & SCOTT, 1994 e ZIMMERMAN, 1994). As permissões de coleta foram concedidas pelo ICMBio (SISBIO 6873-1, 23501-6, 45665-2 e 49587-1).

OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi obter informações sobre a ocorrência e distribuição de sapinhos-pingo-de-ouro na Serra do Saí (municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul) e na Serra da Palha (Ilha de São Francisco do Sul), visando preencher uma lacuna de distribuição do gênero *Brachycephalus* nesta região. No primeiro capítulo apresento a descrição de uma nova espécie de *Brachycephalus*, que se refere também ao primeiro registro de um sapinho-pingo-de-ouro para região de baixada litorânea, até então com ocorrência conhecida apenas para áreas de encosta e topos de morro em altitudes elevadas. Esta espécie foi coletada em áreas pouco exploradas entre os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, onde não há registro de coleta anterior a este trabalho, e parece ser endêmica do sul da Serra do Mar. O artigo foi submetido para publicação na revista científica Zookeys. O segundo capítulo apresenta uma complexidade de problemas taxonômicos envolvendo novos registros de ocorrência e variabilidade das populações de *Brachycephalus* encontradas na área de estudo. Nossos resultados evidenciam o primeiro registro de uma espécie de *Brachycephalus* com populações claramente diferenciadas fenotipicamente, mas com alta homogeneidade em suas sequências de DNA analisadas. Adicionalmente, apresento em anexo um trabalho submetido para a publicação na revista científica Zootaxa, onde realizamos uma análise crítica minuciosa das descrições recentes de espécies de *Brachycephalus* para o sul da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

- AB’SÁBER, A. N. 2003. Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. São Paulo: Ateliê Editorial. p. 159.
- ALMEIDA, F. F. M. & CARNEIRO, C. D. R. 1998. Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências* 28 (2): 135–150.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M. 2013. Modeling monthly mean air temperature for Brazil. *Theoretical Applied Climatology* 113: 407–427.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. 2014. Köppen’s climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22 (6): 711–728.
- AMPHIBIAWEB. 2017. <<http://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Acesso em: 15 jan. 2017.
- BORNSCHEIN, M. R.; FIRKOWSKI, C. R.; BELMONTE-LOPES, R.; CORRÊA, L.; RIBEIRO, L. F.; MORATO, S. A. A.; ANTONIAZZI-JR, R. L.; REINERT, B. L.; MEYER, A. L. S.; CINI, F. A.; PIE, M. R. 2016a. Geographical and altitudinal distribution of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) endemic to the Brazilian Atlantic Rainforest. *PeerJ* 4 (e2490): 1–41.
- BORNSCHEIN, M. R.; RIBEIRO, L. F.; BLACKBURN, D. C.; STANLEY, E. L.; PIE, M. R. 2016b. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Santa Catarina, southern Brazil. *PeerJ* 4 (e2629): 1–19.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; HADDAD, C. F. B.; ALVES, A. C. R.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, G. R.; OLIVEIRA, D. F.; LOPES, R. T.; REIS, S. F. 2009. Hyperossification in miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic structure and macroscopic patterns of variation. *Journal of Morphology* 270 (11): 1285–1295.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; KLACZO, J.; PEREZ, I.; ALVES, A. C. R.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2011. Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 79–89.
- CONDEZ, T. H. 2014. Diversidade, distribuição e diversificação do gênero *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 (Anura: Brachycephalidae). 163 f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- CONDEZ, T. H.; CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2014. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the highlands of the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Herpetologica* 70 (1): 89–99.

- CONDEZ, T. H.; MONTEIRO, J. P. C.; COMITTI, E. J.; GARCIA, P. C. A.; AMARAL, I. B.; HADDAD, C. F. B. 2016. A new species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa* 4083: 40–56.
- CRUMP, M. L. & SCOTT JR, N. J. 1994. Visual encounter surveys. In: HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W.; HAYEK, L. C.; FOSTER, M. S. (Ed.). *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 84–92.
- CRUZ, A. G. & FEIO, R. N. 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudoeste do Brasil. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. (Eds). *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. p. 117–126.
- DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- FROST, D. R. 2016. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 02 dez. 2016.
- GIARETTA, A. A. & SAWAYA, R. J. 1998 Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 4: 985 – 987.
- GONTIJO-PASCUTTI, A. H. F.; HASUI, Y.; DOS SANTOS, M.; SOARES JR, A. V.; DE SOUZA, I. A. 2012. Serras do Mar e da Mantiqueira. In: HASUI, Y.; CARNEIRO, C. D. R.; ALMEIDA, F. F. M.; BARTORELLI, A. (Eds). *Geologia do Brasil*. São Paulo: Ed. Beca. p. 549–571.
- GRANT, T.; FROST, D. R.; CALDWELL, J. G.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C. F. B.; KOK, P. J. R.; MEANS, D. B.; NOONAN, B. P.; SCHARGEL, W. E.; WHEELER, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299: 1–262.
- HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. 2013. Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia. São Paulo, Anolisbooks. p. 544.
- IBGE, 2010. Atlas Nacional do Brasil Milton Santos. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, Rio de Janeiro, Brasil.
- IZECKSOHN, E. 1971. Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro, Nova Série, Zoologia*, 280:1-12.
- KAPLAN, M. 2002. Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus *Psyllophryne* (Brachycephalidae). *Amphibia-Reptilia* 23 (2): 225–227.

- LINGNER, D. V.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L. de; VIBRANS, A. C. 2013. Grupos forísticos estruturais da Floresta Ombrófila Densa em Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPEER, A. L. de; LINGNER, D. V. (Eds). Inventário florístico florestal de Santa Catarina. Volume IV, Floresta Ombrófila Densa. Blumenau: Ed. Edifurb. p. 576.
- MELLO, Y. R.; OLIVEIRA, T. M. N.; KOENTOPP, P. I. 2015. Distribuição pluviométrica na região de Joinville (SC). *Estudos Geográficos (UNESP)* 13 (1): 78–93.
- MORELLATO, L. P. C. & HADDAD, C. F. B. 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32 (4b): 786-792.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- NAPOLI, M. F.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; DIAS, I. R. 2011. A new species of flea-toad, genus *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2739: 33–40.
- PADIAL, J. M. & DE LA RIVA, I. 2006. Taxonomic inflation and the stability of species lists: the perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology* 55 (5): 859–867.
- PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825 (1): 1–132.
- PIE, M. R.; MEYER, A. L. S.; FIRKOWSKI, C. R.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. 2013. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecological Modelling* 250: 165–176.
- PIE, M. R. & RIBEIRO, L. F. 2015. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Quiriri mountain range of southern Brazil. *PeerJ* 3 (e1179): 1–9.
- PIRES JR, O. R.; SEBBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; MORALES, R. A. V.; BLOCH JR, C.; SCHWARTZ, C. A. 2005. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the anuran family Brachycephalidae. *Toxicon* 45: 73–79.
- POMBAL JR, J. P. & 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.
- POMBAL JR, J. P. & IZECKSOHN, E. 2011. Uma nova espécie de *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) do estado do Rio de Janeiro. *Papéis Avulsos de Zoologia* 51 (28): 443–451.
- RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R.; BELMONTE-LOPES, R.; FIRKOWSKI, C. R.; MORATO, S. A. A.; PIE, M. R. 2015. Seven new microendemic species of

Brachycephalus (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. PeerJ 3 (e1011): 1–36.

- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B. V. M.; LANGONE, J. A. 2016. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira* 5 (2): 34–46.
- TOLEDO, L. F. & BATISTA, R. F. 2012. Integrative study of Brazilian Anurans: geographic distribution, size, environment, taxonomy, and conservation. *Biotropica* 44 (6): 785–792.
- VIEITES, D. R.; WOLLENBERG, K. C.; ANDREONE, F.; KÖHLER, J.; GLAW, F.; VENCES, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *PNAS* 106 (20): 8267–8272.
- WHITTAKER, K.; KOO, M. S.; WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. 2013. Global declines of amphibians. In: LEVIN S.A. (Ed.). *Encyclopedia of biodiversity*. Second edition, Volume 3, Waltham, MA: Academic Press. p. 691–699.
- ZIMMERMAN, B. L. 1994. Audio strip transects. In: HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W.; HAYEK, L. C.; FOSTER, M. S. (Eds). *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 92–97.

CAPÍTULO I

A new species of *Brachycephalus* (Anura, Brachycephalidae): the first record for a montane group of species in the Atlantic Forest lowlands of Brazil

Artigo submetido para revista Zookeys em setembro de 2016

1 A new species of *Brachycephalus* (Anura, Brachycephalidae): the first record for a montane
2 group of species in the Atlantic Forest lowlands of Brazil.

3
4 Juliane Petry De Carli Monteiro¹, Thais Helena Condez¹, Estevão Jasper Comitti², Paulo
5 Christiano de Anchieta Garcia², Ivan Borel Amaral³, Célio Fernando Baptista Haddad¹

6
7 ¹*Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio*
8 *de Mesquita Filho, Av. 24-A, 1515, caixa postal 199, 13506–900 Rio Claro, SP, Brazil*

9 ²*Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas,*
10 *Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270–910 Belo*
11 *Horizonte, MG, Brazil*

12 ³*Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN), Instituto Chico*
13 *Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Rua 229, 95, 74605–090 Goiânia, GO,*
14 *Brazil*

15
16 Corresponding author. *Juliane P.C. Monteiro* (julianepmonteiro@gmail.com)

17
18 **Abstract**

19
20 We describe a new species of *Brachycephalus* that is closely related to the *B. pernix* lineage
21 and represents the first record of a montane pumpkin toadlet species in Atlantic Forest
22 lowlands. The new species occurs from near sea level up to 250 meters and is known from
23 five localities in Município de São Francisco do Sul and Município de Itapoá, northeastern
24 Santa Catarina State, Brazil. It is distinguished from all congeners by the combination of the
25 following characters: (1) “bufoniform” body; (2) no hyperossification of the skull and
26 skeleton; (3) small body size (snout-vent length of adults: 9.19–10.81 mm for males and
27 11.29–12.58 mm for females); (4) head length 20–25% of snout-vent length and eye diameter
28 45–60% of head length; (5) anterior zygomatic ramus and posterior otic ramus of squamosal
29 elongated and about equal in length; (6) pectoral girdle arciferal and robust, with small, ovoid
30 fenestrae distant from epicoracoid; (7) radius and ulna fused; (8) finger IV greatly reduced,
31 almost not visible externally; (9) toe I and V externally absent, toe II reduced, toe III short and
32 distinct, and toe IV larger and robust; (10) pes phalangeal formula 1–2–3–4–0, with distal
33 tarsal element I and one prepollical element present; (11) skin on dorsum rough; (12) general
34 dorsal body color dark green with dark brown vertebral stripe, orange background evident in
35 ventral view; and (13) advertisement call short (0.02–0.03 seconds), composed of one high-
36 frequency note (dominant frequency 6.6–7.3 kHz) with two pulses. Despite of its widespread
37 distribution, the new species is not known to occur inside any protected areas and is severely
38 threatened by habitat loss and modification.

39
40 **Resumo**

41
42 Descrevemos uma nova espécie de *Brachycephalus* relacionada à linhagem de *B. pernix*, que
43 constitui o primeiro registro de uma espécie de montanha nas terras baixas da Mata Atlântica.
44 A nova espécie ocorre próximo ao nível do mar até 250 metros de altitude, em cinco
45 localidades nos municípios de São Francisco do Sul e Itapoá, nordeste do estado de Santa
46 Catarina, Brasil, e distingue-se das espécies relacionadas pela combinação dos seguintes
47 caracteres: (1) corpo “bufoniforme”; (2) ausência de hiperossificação do crânio e esqueleto;
48 (3) pequeno tamanho do corpo (comprimento rostro-cloacal dos adultos: 9.19–10.81 mm para
49 machos e 11.29–12.58 mm para fêmeas); (4) comprimento da cabeça 20–25% do
50 comprimento do corpo, e diâmetro do olho 45–60% do comprimento da cabeça; (5) ramo

51 zigomático anterior e ramo ótico posterior do esquamosal alongados e aproximadamente do
52 mesmo comprimento; (6) cintura peitoral arcífera e robusta, com fenestra pequena e ovóide,
53 distante do epicoracóide; (7) rádio e ulna fundidos; (8) dedo IV muito reduzido, quase não
54 visível externamente; (9) artelhos I e V externamente ausentes, artelho II reduzido, artelho III
55 curto e distinto, e artelho IV maior e robusto; (10) fórmula falangeal dos artelhos 1–2–3–4–0,
56 com elemento distal tarsal I presente e apenas um elemento prepóico; (11) textura da pele
57 rugosa no dorso; (12) coloração dorsal verde escura com uma faixa vertebral marrom, em
58 vista ventral coloração laranja; e (13) canto de anúncio curto (0.02–0.03 segundos), composto
59 por uma nota de alta frequência (frequência dominante 6.6–7.3 kHz) com dois pulsos. Apesar
60 de sua ampla distribuição, a nova espécie não ocorre em áreas protegidas e está severamente
61 ameaçada pela perda e modificação de habitats.

62

63 **Keywords**

64

65 Amphibia, Brachycephaloidea, pumpkin toadlet, miniaturization, taxonomy.

66

67 **Introduction**

68

69 The clade of New World direct-developing frogs commonly referred to as terraranas
70 (Superfamily Brachycephaloidea) is monophyletic and currently comprises the frog families
71 Brachycephalidae, Craugastoridae, and Eleutherodactylidae (Padial et al. 2014, Frost 2016).
72 The Brachycephalidae includes the genera *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 and *Ischnocnema*
73 Reinhardt and Lütken, 1862, which share morphological and molecular characters (Hedges et
74 al. 2008, Heinicke et al. 2009, Clemente-Carvalho et al. 2011, Canedo and Haddad 2012,
75 Padial et al. 2014). The genus *Brachycephalus* comprises 30 species, all of which are endemic
76 to the Atlantic Forest of northeastern, southeastern, and southern Brazil (Napoli et al. 2011,
77 Ribeiro et al. 2015, Frost 2016). Species in this genus are essentially leaf-litter dwellers that
78 are diurnally active and are characterized by miniaturization (Hanken and Wake 1993,
79 Clemente-Carvalho et al. 2009). The evolutionary process of miniaturization, evidenced by
80 the diminutive body size of these species, has resulted in structural modifications including
81 the reduction and loss of functional fingers, toes, and phalangeal elements (Yeh 2002, Hedges
82 et al. 2008, Clemente-Carvalho et al. 2011), as well as mineralization and hyperossification of
83 bones in the skull and skeleton (Clemente-Carvalho et al. 2009).

84

85 The genus *Brachycephalus* is known to harbor an extraordinary diversity of species associated
86 with mountain slopes (Condez et al. 2014, Ribeiro et al. 2015). The flea-toads, the four
87 cryptic species with wide elevational ranges within *Brachycephalus*, are distributed in the
88 main mountain ranges along the Atlantic Forest Domain (Izecksohn 1971, Giaretta and
89 Sawaya 1998, Napoli et al. 2011, Condez et al. 2016). These flea-toads are known to occur
90 from sea level up to 1000 meters in areas with complex topography, and sometimes in
91 sympatry with other species of *Brachycephalus* with distributions restricted to high elevation
92 sites (Condez et al. 2016, Pie et al. 2013). Most species of *Brachycephalus* are known to have
93 restricted distributions that are associated with high elevation sites, most frequently between
94 elevations of 600–1800 meters above sea level (Condez et al. 2014). Within this group of
95 species, the lowest record of occurrence to date is 455 meters (Ribeiro et al. 2015). Species
96 associated with high elevation sites, conversely to flea-toads, generally exhibit conspicuous
97 orange coloration (Pombal and Izecksohn 2011), for which these species received their
98 popular name of pumpkin toadlets. The bright coloration of the skin in *Brachycephalus* has
99 stimulated several studies that have revealed the presence of tetrodotoxin and its analogues in

100 the skin (Sebben et al. 1986, Pires et al. 2002, 2005, Hanifin 2010), in addition to the recent
 101 discovery of a new exclusive peptide (Arcanjo et al. 2015).

102

103 Molecular studies are congruent in recovering two major sister clades within *Brachycephalus*;
 104 a southern clade, composed of species occurring in the states of Paraná and Santa Catarina,
 105 and a northern clade, composed of species occurring in the states of São Paulo, Rio de
 106 Janeiro, and Espírito Santo (Clemente-Carvalho et al. 2011, Padial et al. 2014). The flea-toads
 107 are generally nested among other high-elevation species of *Brachycephalus*, in accordance
 108 with their geographic distribution (Clemente-Carvalho et al. 2011, Padial et al. 2014, Condez
 109 et al. 2016). The southern clade, referred to here as the *B. pernix* lineage (Clemente-Carvalho
 110 et al. 2011), currently comprises 14 species associated with high elevation sites: *B.*
 111 *aurouguttatus*, Ribeiro, Firkowski, Bornschein and Pie, 2015; *B. boticario*, Pie, Bornschein,
 112 Firkowski, Belmonte-Lopes and Ribeiro, 2015; *B. brunneus* Ribeiro, Alves, Haddad and dos
 113 Reis, 2005; *B. ferruginus* Alves, Ribeiro, Haddad and Reis, 2006; *B. fuscolineatus*, Pie,
 114 Bornschein, Firkowski, Belmonte-Lopes and Ribeiro, 2015; *B. izecksohni* Ribeiro, Alves,
 115 Haddad and Reis, 2005; *B. leopardus*, Ribeiro, Firkowski and Pie, 2015; *B. mariaeterezae*,
 116 Bornschein, Morato, Firkowski, Ribeiro and Pie, 2015; *B. olivaceus*, Bornschein, Morato,
 117 Firkowski, Ribeiro and Pie, 2015; *B. pernix* Pombal, Wistuba and Bornschein, 1998; *B.*
 118 *pombali* Alves, Ribeiro, Haddad and Reis, 2006; *B. quiririensis*, Pie and Ribeiro, 2015; *B.*
 119 *tridactylus* Garey, Lima, Hartmann and Haddad, 2012; and *B. verrucosus*, Ribeiro, Firkowski,
 120 Bornschein and Pie, 2015. In addition to being distributed among higher latitudes, these
 121 species are distinct from those of the northern clade by completely lacking any
 122 hyperossification of the skull and skeleton (Clemente-Carvalho et al. 2009).

123

124 Herein, we describe a new species of *Brachycephalus* from the state of Santa Catarina related
 125 to the *B. pernix* lineage, and which represents the first record of a pumpkin toadlet in Atlantic
 126 Forest lowlands. Our findings challenge the current hypothesis that pumpkin toadlets are
 127 always associated with the top of mountains, with the new species exhibiting an
 128 unprecedented elevational distribution for this group of species. The diagnosis of the new
 129 species is based on external morphology and osteology of adults, the advertisement call of
 130 males, and molecular evidence.

131

132 **Material and methods**

133

134 Specimens were collected, euthanized in 5% lidocaine, fixed in 10% formalin, and preserved
 135 in 70% ethyl alcohol. Muscle tissue was extracted and stored in absolute ethyl alcohol.
 136 Collecting permits were provided by ICMBio (SISBIO 45665-2, 49587-1, and 6873-1). Bone
 137 and cartilage were cleared and double-stained with alizarin red and alcian blue following
 138 procedures based on Taylor and Van Dyke (1985). Specimens used in the description are
 139 deposited in the Célio F. B. Haddad (CFBH) amphibian collection, Departamento de
 140 Zoologia, I.B., Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil and the
 141 amphibian collection of Centro de Coleções Taxonômicas do Instituto de Ciências Biológicas
 142 da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

143

144 *Morphology*

145

146 A Zeiss Stemi SV 11 stereomicroscope with an ocular micrometer was used by a single
 147 person (T.H. Condez) to take 14 morphometric measurements of all available preserved
 148 specimens of the new species. Measurements follow Duellman (1970), Cei (1980), Heyer et
 149 al. (1990), and Condez et al. (2016). The abbreviations for the measurements are: SVL (snout-

150 vent length); HL (head length; from tip of snout to angle of jaw); HW (head width; greatest
 151 width of head located between angle of jaw); ND (nostril diameter); IND (internostril
 152 distance; between inner margins of nostrils); ED (eye diameter); IOD (interorbital distance;
 153 between anterior corners of eyes); END (eye-nostril distance; from anterior corner of the eye
 154 to posterior margin of nostril); AL (arm length); FAL (forearm length); HAL (hand length;
 155 between the centrale and the longest finger); THL (thigh length); TBL (tibia length); and FL
 156 (foot length; between the centrale and the longest toe). Sex was determined by the presence of
 157 secondary sexual traits in males, including vocal slits and externally expanded vocal sacs. The
 158 sex of some females was verified by the presence of mature oocytes. Differences in body size
 159 between males and females were tested using the Welch's T-test in the R environment (R
 160 Development Core Team 2015). Specimens examined are presented in the Appendix.

161

162 *Bioacoustics*

163

164 We recorded and analyzed four calling males from different populations of the new species:
 165 (1) Vila da Glória, Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina (two calling
 166 males); (2) Serra da Palha, Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina; and
 167 (3) Braço do Norte, Município de Itapoá, state of Santa Catarina.

168 Recordings were made with a Marantz PMD-660 digital recorder coupled to an external
 169 unidirectional Sennheiser ME-66 microphone, except for the call of the collected voucher,
 170 which was recorded with a Tascam DR-07MKII digital recorder coupled to an external
 171 unidirectional Audio-technica ATR6550 microphone. We analyzed 10–15 calls per individual
 172 using a sampling frequency rate of 44.1 kHz and 16-bit resolution in the mono pattern.

173 Bioacoustic analyses were performed using the program RAVEN PRO 1.4 (Bioacoustics
 174 Research Program 2011). Audiospectrograms were produced with a fast Fourier transform of
 175 256 points, overlap 50%, and hamming window type. Eleven advertisement call parameters
 176 were obtained: (1) call duration (s), defined as the time from the beginning to the end of one
 177 call; (2) duration of the interval between calls (s), defined as the time from the end of call to
 178 the beginning of the next call; (3) number of notes per call (notes/call); (4) note repetition rate
 179 (notes/s); (5) note duration (ms), defined as the time from the beginning to the end of one
 180 note; (6) number of pulses per note (pulses/note); (7) pulse repetition rate (pulses/s); (8) pulse
 181 duration (ms), defined as the time from the beginning to the end of one pulse; (9) minimum,
 182 (10) maximum, and (11) dominant frequencies (kHz), the last defined as the band of
 183 frequency in which the energy of the note is concentrated. Frequencies (parameters 9-11)
 184 were measured on spectrograms, while all other parameters were measured on oscillograms.

185

186 *Molecular analysis*

187

188 We extracted total genomic DNA from samples of muscle conserved in absolute ethanol
 189 following a standard salt extraction protocol adapted from Maniatis et al. (1982). We obtained
 190 a fragment of the 16S ribosomal RNA gene (585 bp), using polymerase chain reactions (PCR)
 191 with PCR Master Mix (MBI Fermentas, USA) and the primers 16SA
 192 (CGCCTGTTTATCAAAAACAT) and 16SB (CCGTCTGAACTCAGATCACGT) (Palumbi
 193 et al. 1991). Thermocycling conditions for DNA amplification began with a denaturation at
 194 94°C (3 min), followed by 37 cycles consisting of denaturation at 94°C (20 sec), annealing at
 195 50°C (20 sec), extension at 68°C (45 sec), and a final step at 68°C following the final cycle (5
 196 min). PCR products were visualized in 1% agarose gels and purified using Exonuclease and
 197 Shrimp Alkaline Phosphatase (Affimetrix/USB, Cleveland, OH). Sequencing (forward and
 198 reverse) was performed by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Consensus sequences were
 199 assembled with CodonCode Aligner 3.5 (Codon Code Corporation) and aligned in MEGA 6

200 (Tamura et al. 2013) using MUSCLE (Edgar 2004). We used the available sequences of 15
 201 other *Brachycephalus* species (Firkowski et al. 2016), along with five sequences coming from
 202 distinct populations of the new species, in a phylogenetic analysis. Following recent
 203 molecular studies, *Ischnocnema guentheri* (Steindachner, 1864) was used to root trees
 204 (Hedges et al. 2008, Firkowski et al. 2016). Our dataset comprises 21 DNA sequences,
 205 including five specimens of the new species (GenBank accession numbers CFBH 39846,
 206 CFBH 39850, CFBH 39859, CFBH 39862, from Município de São Francisco do Sul, state of
 207 Santa Catarina, and CFBH 39867, from Município de Itapoá, state of Santa Catarina) and 16
 208 sequences of related species previously presented in Firkowski et al. (2016) (GenBank
 209 accession numbers *Brachycephalus auroguttatus* KX025354, *B. boticario* KX025377, *B.*
 210 *brunneus* KX025293, *B. ephippium* KX025517, *B. fuscolineatus* KX025342, *B. ferruginus*
 211 KX025238, *B. izecksohni* KX025264, *B. leopardus* KX025249, *B. mariaeterezae* KX 025353,
 212 *B. pernix* KX025384, *B. pombali* KX025315, *B. olivaceus* KX025325, *B. quiririensis*
 213 KX025322, *B. tridactylus* KX025391, *B. verrucosus* KX025324, and *Ischnocnema guentheri*
 214 KX025518).

215
 216 Phylogenetic trees were obtained using maximum likelihood (ML) and maximum parsimony
 217 (MP). For the ML analysis we used the general time-reversible nucleotide substitution model
 218 and gamma heterogeneity rates (GTR+G), according to the results from the model selection in
 219 JMODELTEST (Posada 2008). The main analysis was performed in RAXML (Stamatakis,
 220 2006) with 120 runs and 1000 thorough bootstrap replicates. For the MP analysis we used
 221 implicit numeration option and 1000 bootstrap replicates in TNT 1.1 (Goloboff et al. 2008).
 222 The consensus topology was edited in WINCLADA (Nixon 1999–2002). We also calculated
 223 the uncorrected pairwise genetic distances (p-distance) among individuals of the new species
 224 and morphologically related species. The number of base differences between sequences was
 225 calculated considering the complete deletion of gaps and missing data using MEGA 6
 226 (Tamura et al. 2013).

227

228 **Results**

229

230 *Description of the new species*

231

232 ***Brachycephalus* sp. n.**

233 Figures 1, 2, 4, 5 and 8

234

235 *Holotype*

236

237 CFBH 39850, adult male, collected at Serra da Palha, Laranjeiras, Ilha de São Francisco do
 238 Sul, Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina, Brazil (26°17'50"S;
 239 48°40'28"W, Datum WGS 84, ca 60 meters above sea level), on 19 May 2015, by C.F.B.
 240 Haddad, J.P.C. Monteiro, and E.C. Nardin.

241

242 *Paratopotypes*

243

244 CFBH 39851, adult female, collected with the holotype; CFBH 39872, 39873, and UFMG
 245 18973, adult males, collected on 25 November 2015, by J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and
 246 E.C. Nardin; CFBH 39876, adult male, and CFBH 39877, adult female, collected on 02
 247 December 2015, by J.P.C. Monteiro and E.C. Nardin.

248

249 *Paratypes*

250

251 CFBH 39846, adult male, cleared and double-stained, collected at Fazenda Morro Grande,
 252 Morro Grande, Ilha de São Francisco do Sul, Município de São Francisco do Sul, state of
 253 Santa Catarina, Brazil (26°17'47"S; 48°37'10"W, Datum WGS 84, ca 60 meters above sea
 254 level), on 14 November 2015, by E.J. Comitti. UFMG 18970, adult female, collected on 15
 255 November 2014, by J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and E.J. Comitti; CFBH 39849, sub-adult
 256 female, collected on 21 November 2014, by J.P.C. Monteiro and E.C. Nardin; CFBH 39848,
 257 adult male, cleared and double-stained, collected on 21 January 2015, by C.F.B. Haddad,
 258 J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and E.J. Comitti; UFMG 18971, adult male, collected on 01
 259 August 2015, by J.P.C. Monteiro and E.C. Nardin; CFBH 39855–39858 and 39861, adult
 260 males, CFBH 39860, adult female, CFBH 39859, juvenile, collected on 23 November 2015,
 261 by J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and E.C. Nardin; all collected at Centro de Estudos e
 262 Pesquisas Ambientais da Univille (CEPA), Vila da Glória, Distrito do Saí, Município de São
 263 Francisco do Sul, state of Santa Catarina, Brazil (26°13'39"S; 48°41'31"W, Datum WGS 84,
 264 ca 120 meters above sea level). CFBH 39853 and 39854, adult males, collected on 27 August
 265 2015, by J.P.C. Monteiro and E.C. Nardin; CFBH 39862, adult female, collected on 23
 266 November 2015, by J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and E.C. Nardin; at Estrada do Saí,
 267 Distrito do Saí, Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina, Brazil
 268 (26°12'06"S; 48°41'37"W, Datum WGS 84, ca 80 meters above sea level). CFBH 39863,
 269 39864, 39867, 39868, and UFMG 18972 adult females, CFBH 39865 and 39870, adult males,
 270 collected on 24 November 2015, by J.P.C. Monteiro, T.H. Condez, and E.C. Nardin; CFBH
 271 39875, adult female, collected on 30 November 2015, by J.P.C. Monteiro and E.C. Nardin; at
 272 Braço do Norte, Município de Itapoá, state of Santa Catarina, Brazil (26°07'29"S;
 273 48°43'48"W, Datum WGS 84, ca 220 meters above sea level).

274

275 *Diagnosis*

276

277 *Brachycephalus* sp. n. is a new species of the *B. pernix* lineage, distinguished from all its
 278 congeners by the following combination of characters: (1) “bufoniform” body; (2) no
 279 hyperossification of the skull and skeleton; (3) body size (SVL of adults: 9.19–10.81 mm for
 280 males and 11.29–12.58 mm for females); (4) proportional measurements HL/SVL 20–25%
 281 and ED/HL 45–60%; (5) anterior zygomatic ramus and posterior otic ramus of squamosal
 282 elongated and about equal in length; (6) pectoral girdle arciferal and robust, with small, ovoid
 283 fenestrae, distant from epicoracoid; (7) radius and ulna fused; (8) finger IV greatly reduced,
 284 almost not visible externally; (9) toe I and V externally absent, toe II reduced, toe III short and
 285 distinct, and toe IV larger and robust; (10) pes phalangeal formula 1–2–3–4–0, with distal
 286 tarsal element I and one prepollical element present; (11) texture of the skin on dorsum is
 287 rough; (12) general dorsal body color dark green with dark brown vertebral stripe, orange
 288 background evident in ventral view; and (13) advertisement call short (0.02–0.03 seconds),
 289 composed of one high-frequency note (dominant frequency 6.6–7.3 kHz) with two pulses
 290 with decreasing amplitude.

291

292 *Description of holotype*

293

294 Body robust; bufoniform; head wider than long; head length 23% of SVL; snout short,
 295 rounded in lateral and dorsal views (Figure 1A and 1B); nostrils protuberant; canthus rostralis
 296 indistinct; loreal region slightly concave; eyes slightly protruding laterally and dorsally, eye
 297 diameter 52% of head length; tympanum absent; lips nearly sigmoid; vocal sac not expanded
 298 externally; vocal slits present; tongue longer than wide, with the posterior half not adherent to
 299 floor of mouth; vomerine teeth absent; choanae small and ovoid, anterior to eyes. Arm and

300 forearm moderately slender; hands with fingers I and IV reduced; finger II short but distinct;
 301 finger III large and robust; finger tips I, II, and IV rounded, finger tip III pointed; finger
 302 lengths $IV < I < II < III$; subarticular tubercles absent; inner and outer metacarpal tubercles absent
 303 (Figure 1C). Legs relatively short, moderately robust; THL 41% of SVL, TBL 84% of THL;
 304 foot with toes I and V not visible externally; toe II reduced; toe III short and distinct; toe IV
 305 large and robust; toe lengths $II < III < IV$; toe tips II and III rounded, toe tip IV pointed;
 306 subarticular tubercles absent; inner and outer metatarsal tubercles absent (Figure 1D). Skin on
 307 top of the head smooth; dorsal body slightly rough and without dermal co-ossification. Skin
 308 on dorsolateral surfaces and dorsal surfaces of legs rough and granular; dorsal surface of arms
 309 smooth. Skin on ventral surfaces of arms, and in pectoral and gular regions smooth; skin on
 310 belly and ventral surfaces of legs granular; area around the cloacal opening rough and
 311 granular (Figure 2).

312

313 *Measurements of holotype (in mm)*

314

315 SVL 9.2; HL 2.1; HW 2.8; ND 0.2; IND 1.0; ED 1.1; IOD 2.0; END 0.7; THL 3.8; TBL 3.2;
 316 FL 4.7; AL 1.8; FAL 2.4; HAL 1.6.

317

318 *Color in life*

319

320 Iris black. General body color orange, dorsal surface of body covered by dark green blotches;
 321 in dorsal view, a poorly defined dark brown stripe extends from the interorbital region to the
 322 posterior end of the vertebral column; arms, legs, and external fingers (III and IV) and toe IV
 323 dark green, other fingers and toes orange. In lateral view, eye contour, snout tip, lower lip,
 324 and corner of the mouth orange. In ventral view, background color orange; dark brown
 325 blotches are present on throat, cloacal region, and side of the body, extending toward the
 326 dorsum; irregular brownish spots are distributed on belly, arms, legs, fingers, and toes.

327

328 *Color in preservative*

329

330 General dorsal body color brown; arms, legs, external fingers (III and IV), and toe IV brown,
 331 other fingers and toes white (Figure 2A). In lateral view, eye contour, snout tip, lower lip, and
 332 corner of the mouth white. In ventral view, general background color is white; brown blotches
 333 are present on throat, cloacal region, and side of the body, extending toward the dorsum;
 334 irregular brown spots are distributed on belly, legs, fingers, and toes (Figure 2B).

335

336 *Osteology*

337

338 No hyperossification in the skull and skeleton; skull slightly wider than long in dorsal view.
 339 Nasals, sphenethmoid, frontoparietals, prootics, and exoccipitals fused; premaxillae broad, not
 340 fused medially, odontoids present; alary process of premaxillae distinct and slightly separated
 341 from the nasal; maxillae arched in ventral view, odontoids present; vomers not fused
 342 medially, vomerine odontophores absent; palatine absent; parasphenoid and sphenethmoid
 343 fused and robust; quadratojugal and pterygoid present; squamosal T-shaped in lateral view,
 344 anterior zygomatic and posterior otic ramus elongated and about equal in length; zygomatic
 345 ramus oriented to articulate with maxillae; mandible edentate; tympanic annulus absent.
 346 Pectoral girdle arciferal and robust; coracoid, clavicle, and scapula fused and completely
 347 ossified, except for the epicoracoid region which is cartilaginous; procoracoid and epicoracoid
 348 fused with coracoid but separated from the clavicle by a fenestrae; fenestrae small and ovoid,
 349 distant from the epicoracoid; scapula, cleithrum, and suprascapula fused and elongated;

350 suprascapula not expanded; omosternum developed, with distal portion circular and
 351 cartilaginous; sternum absent. Vertebral column composed of eight presacral, non-imbricate
 352 vertebrae; hyperossification absent in the spinal processes of the vertebrae; transverse
 353 processes of the first presacral vertebrae distinguishable but smaller in comparison to all other
 354 presacral vertebrae; all presacral vertebrae with un-ornamented transverse processes; lengths
 355 of transverse processes of presacrals: $I < II \cong VI \cong VII \cong VIII < V < IV < III$; sacral diapophyses
 356 moderately expanded; urostyle length slightly larger than presacral region. Humerus and
 357 forearm of approximately equal length; radius and ulna completely fused; distal carpals of
 358 manus (I–IV) fused with centrale; radiale and ulnare about the same size; one prepollical
 359 element; phalangeal formula 1–2–3–1; tips of terminal phalangeal elements of fingers I and
 360 IV rounded and tips of fingers II and III arrow-shaped. Hindlimbs with tibia and fibula fused
 361 forming the tibiofibula; femur and tibiofibula of approximately equal length; fibulare and
 362 tibiale fused, but distinguishable; pes with distal tarsal elements I–III present and IV and V
 363 absent; centrale present; one very reduced prehallical element; phalangeal formula 1–2–3–4–
 364 0; tips of terminal phalangeal elements of toes I, II, and V pointed, and III and IV arrow-
 365 shaped.

366
 367 *Advertisement call*

368
 369 The advertisement call of *Brachycephalus* sp. n. is short, composed of one high-frequency
 370 note and repeated in a rate of 0.1–0.3 calls/second ($\bar{x} = 0.2 \pm 0.1$; $n = 51$; Figure 3A). The call
 371 lasts 0.02–0.03 seconds ($\bar{x} = 0.03 \pm 0.00$; $n = 51$; Figure 3B) and the interval between calls is
 372 3.5–7.7 seconds ($\bar{x} = 5.0 \pm 1.9$; $n = 47$; Figure 3A). Notes are composed of two pulses (Figure
 373 3B), repeated in a rate of 0.3–0.6 pulses/second ($\bar{x} = 0.5 \pm 0.1$; $n = 102$). The minimum
 374 frequency is 6.0–7.0 kHz ($\bar{x} = 6.5 \pm 0.4$; $n = 51$), the maximum frequency is 7.3–7.7 kHz ($\bar{x} =$
 375 7.5 ± 0.2 ; $n = 51$), and the dominant frequency is 6.6–7.3 kHz ($\bar{x} = 6.9 \pm 0.3$; $n = 51$).

376
 377 *Variation in the type series*

378
 379 Measurements of 28 adult specimens of the type series are given in Table 1. The sub-adult
 380 female (SVL = 10.97 mm) and juvenile (SVL = 5.00 mm) were not included in analysis of
 381 morphometric variation. The larger SVL of females (average = 11.88 mm; range 11.29–12.58
 382 mm) compared to males (average = 10.26 mm; range 9.19–10.81 mm) revealed sexual
 383 dimorphism in size in the new species (Welch's t-test $T = 10.29$, $DF = 25.09$, $P < 0.01$). The
 384 color in life varies mainly in the coverage of green on the dorsum (Figure 4). The green can
 385 comprise blotches over the orange background (Figure 4A, 4C, and 4E) or completely cover
 386 the entire dorsum (Figure 4G). The dark brown vertebral stripe can be well defined and wide,
 387 covering almost all of the dorsum (Figure 4A and 4C) or represented by blotches distributed
 388 on the vertebral column and head (Figure 4E and 4G). In lateral view, the eye contour can be
 389 well defined in orange, resembling a mask; the snout tip is also orange in most individuals
 390 (Figure 4A, 4C, and 4G). Some individuals possess a dorsolateral line of evident glands
 391 extending from the posterior end of the head until the flanks (Figure 4A). In ventral view,
 392 irregular dark brown blotches are distributed on the bright orange background; some
 393 individuals have the dark blotches only in the cloacal region (Figure 4B), whereas others have
 394 them concentrated on the throat, belly, cloacal region, and side of the body extending toward
 395 the dorsum (Figure 4D, 4F, and 4H); mandible contour orange and clearly distinguishable
 396 (Figure 4D and 4F), with orange color extending through the gular region in some individuals
 397 (Figure 4H). The juvenile is mainly colored brown, lacking the orange background of the
 398 adults (Figure 5). The dorsum is covered by dark brown and red spots; in lateral view, a dark
 399 brown stripe is present (Figure 5A). The ventral surface of the body is slightly transparent,

400 belly mainly white with a dark brown large blotch (Figure 5B). Dorsal pattern, lateral stripe,
 401 and the inverted v-shape mark on the chest observed in the juvenile of *B. sp. n.* are similar to
 402 the markings on the sympatric species of flea-toad *B. sulfuratus*. In preservative, the orange
 403 color varies from pale cream to white; brown and green are replaced by dark brown.

405 Table 1. Measurements (in millimeters) of 28 adults of the type series of *Brachycephalus sp.*
 406 *n.* The abbreviations for the measurements are listed in the material and methods section.

	Males (n=16)			Females (n=12)		
	\bar{x}	SD	Range	\bar{x}	SD	Range
SVL	10.26	0.44	9.19–10.81	11.88	0.39	11.29–12.58
HL	2.26	0.10	2.06–2.33	2.59	0.19	2.33–2.91
HW	3.11	0.11	2.83–3.27	3.61	0.19	3.42–3.90
ND	0.27	0.02	0.23–0.30	0.29	0.02	0.26–0.31
IND	1.16	0.08	1.02–1.26	1.30	0.05	1.21–1.38
ED	1.22	0.06	1.11–1.32	1.34	0.07	1.22–1.45
IOD	2.12	0.10	1.90–2.33	2.34	0.09	2.25–2.60
END	0.75	0.04	0.68–0.80	0.83	0.04	0.78–0.89
THL	4.13	0.22	3.79–4.47	4.53	0.21	4.17–4.93
TBL	3.35	0.18	3.03–3.71	3.74	0.18	3.41–4.09
FL	4.98	0.25	4.62–5.31	5.59	0.29	5.08–5.91
AL	2.01	0.14	1.83–2.23	2.19	0.14	1.89–2.35
FAL	2.22	0.14	1.94–2.52	2.47	0.16	2.17–2.72
HAL	1.77	0.09	1.56–1.86	2.01	0.06	1.95–2.17

408

409 *Comparisons with other species*

410

411 The absence of hyperossification in the skull and skeleton distinguishes the new species from
 412 *B. ephippium*, *B. garbeanus*, and *B. margaritatus*, which exhibit the most extreme condition
 413 of hyperossification within *Brachycephalus*, including a dorsal bony shield (Clemente-
 414 Carvalho et al. 2009). Also, it distinguishes the new species from *B. alipioi*, *B. atelopoide*, *B.*
 415 *bufonoides*, *B. crispus*, *B. guarani*, *B. nodoterga*, *B. pitanga*, *B. toby*, and *B. vertebralis*,
 416 which exhibit the intermediate condition of hyperossification in the skull and skeleton
 417 (Clemente-Carvalho et al. 2009, Haddad et al. 2010, Pombal 2010, Clemente-Carvalho et al.
 418 2011, Condez et al. 2014, Condez et al. 2016).

419

420 The new species shares the absence of hyperossification in the skull and skeleton with *B.*
 421 *brunneus*, *B. ferruginus*, *B. izecksohni*, *B. pernix*, and *B. pombali*, all of which are included in
 422 *B. pernix* lineage, according to Clemente-Carvalho et al. (2011). This condition is also shared
 423 with the eight related and recently described species, *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B.*
 424 *fuscolineatus*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. quiririensis*, and *B. verrucosus*
 425 (Ribeiro et al. 2015, Pie and Ribeiro 2015) and the flea-toads *B. didactylus*, *B. hermogenesi*,
 426 *B. pulex*, and *B. sulfuratus* (Izecksohn 1971, Giaretta and Sawaya 1998, Napoli et al. 2011,
 427 Condez et al. 2016).

428

429 The new species exhibits a “bufoniform” body and an orange background color, both
 430 characteristics that clearly differentiate it from *B. didactylus*, *B. hermogenesi*, *B. pulex*, and *B.*
 431 *sulfuratus* (Izecksohn 1971, Giaretta and Sawaya 1998, Napoli et al. 2011, Condez et al.
 432 2016). The flea-toads have “leptodactyliform” body and a brown background color (Napoli et
 433 al. 2011, Condez et al. 2016).

434

435 Osteology, external morphology, body color, and general aspect of skin distinguish the new
 436 species from the nearest taxonomic species (*Brachycephalus pernix* lineage). *Brachycephalus*
 437 *brunneus*, *B. ferruginus*, *B. izecksohni*, and *B. pombali* all have a T-shaped squamosal in
 438 lateral view, with a short anterior zygomatic ramus that is approximately half of the length of
 439 posterior otic ramus; a pectoral girdle with large fenestrae and close epicoracoid; radius and
 440 ulna not fused; pes with distal tarsal element I absent; and toe V reduced (Ribeiro et al. 2005,
 441 Alves et al. 2006). Also, *B. brunneus*, *B. izecksohni*, and *B. pombali* have a phalangeal
 442 formula for the pes of 0–2–3–4–0, with no prepollical elements in *B. izecksohni* and two in *B.*
 443 *brunneus* (Ribeiro et al. 2005, Alves et al. 2006). In comparison with these species,
 444 *Brachycephalus* sp. n. also has a T-shaped squamosal in lateral view, but the anterior
 445 zygomatic ramus and posterior otic ramus are elongate and about equal in length; a pectoral
 446 girdle with a small fenestrae and a distant epicoracoid; radius and ulna fused; pes with distal
 447 tarsal element I present; toe V absent; phalangeal formula of the pes 1–2–3–4–0; and one
 448 prepollical element. Of the other related species we were only able to compare the osteology
 449 with *B. pernix*, which is quite similar to the new species (Pombal et al. 1998).

450
 451 The body size (males SVL = 9.19–10.81 mm; females SVL = 11.29–12.58 mm) distinguishes
 452 the new species from *B. ferruginus* (males SVL = 11.6–12.5 mm; females SVL = 13.0–14.5
 453 mm; Alves et al. 2006), *B. pernix* (males SVL = 12.0–13.3 mm; females SVL = 14.1–15.8
 454 mm; Pombal et al. 1998), and *B. pombali* (males SVL = 12.6–13.9 mm; females SVL = 14.6–
 455 15.3 mm; Alves et al. 2006). Also, in *B. izecksohni* (males SVL = 10.3–12.1 mm; females
 456 SVL = 12.5–13.1 mm; Ribeiro et al. 2005) and *B. tridactylus* (males SVL = 10.6–11.6;
 457 females SVL = 13.5–13.8 mm; Garey et al. 2012) males and females are slightly larger than
 458 the new species. Body size of the new species is quite similar to that described for *B.*
 459 *brunneus* (males SVL = 9.3–11.3 mm; females SVL = 10.9–12.0 mm; Ribeiro et al. 2005).
 460 The original descriptions of the other eight related species (*B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B.*
 461 *fuscolineatus*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. quiririensis*, and *B.*
 462 *verrucosus*; Ribeiro et al. 2015, Pie and Ribeiro 2015) simply indicated that they lack
 463 differences in SVL measurements between the sexes, which made comparisons with the new
 464 species unfeasible. However, *B. sp. n.* is distinguishable from these species by the
 465 proportionally smaller head length relative to body size (HL/SVL) and, consequently, by the
 466 proportionally larger eye diameter related to head length (ED/HL). In *B. sp. n.* HL/ SVL is
 467 20–25% (\bar{x} = 22, SD = 1) and ED/HL is 45–60% (\bar{x} = 53, SD = 3), for the 28 adult specimens
 468 of the type series, without sexual distinction. In *B. auroguttatus*, HL/ SVL is 29–38% (\bar{x} = 33,
 469 SD = 2) and ED/HL is 30–44% (\bar{x} = 33, SD = 3); in *B. boticario*, HL/ SVL is 31–36% (\bar{x} =
 470 34, SD = 2) and ED/HL is 30–34% (\bar{x} = 32, SD = 1); in *B. fuscolineatus*, HL/ SVL is 29–34%
 471 (\bar{x} = 31, SD = 1) and ED/HL is 36–41% (\bar{x} = 39, SD = 1); in *B. leopardus*, HL/ SVL is 31–
 472 35% (\bar{x} = 33, SD = 1) and ED/HL is 34–43% (\bar{x} = 38, SD = 3); in *B. mariaeterezae*, HL/ SVL
 473 is 29–36% (\bar{x} = 33, SD = 2) and ED/HL is 36–42% (\bar{x} = 39, SD = 2); in *B. olivaceus*, HL/
 474 SVL is 32–36% (\bar{x} = 34, SD = 1) and ED/HL is 26–36% (\bar{x} = 32, SD = 3); in *B. quiririensis*,
 475 HL/ SVL is 31–36% (\bar{x} = 34, SD = 1) and ED/HL is 28–34% (\bar{x} = 32, SD = 2); and in *B.*
 476 *verrucosus*, HL/ SVL is 30–36% (\bar{x} = 33, SD = 2) and ED/HL is 30–40% (\bar{x} = 34, SD = 3)
 477 (Pie and Ribeiro 2015, Ribeiro et al. 2015). The proportion of head width to head length also
 478 distinguishes the new species (HW/HL = 126–155%, \bar{x} = 139, SD = 8) from *B. boticario*
 479 (HW/HL = 108–119%, \bar{x} = 113, SD = 4), *B. leopardus* (HW/HL = 107–123%, \bar{x} = 113, SD =
 480 5), and *B. olivaceus* (HW/HL = 106–124%, \bar{x} = 112, SD = 6) (Ribeiro et al. 2015).

481
 482 Additionally, *Brachycephalus* sp. n. exhibits a rounded snout in dorsal and ventral views,
 483 which distinguishes it from *B. brunneus*, which has a slightly mucronate snout in dorsal view
 484 (Ribeiro et al. 2005); from *B. leopardus*, which has a slightly truncate snout in dorsal and

485 lateral views (Ribeiro et al. 2015); and from *B. quiririensis*, which has a mucronate snout in
 486 dorsal view (Pie and Ribeiro 2015). Nostrils are not protuberant in *B. auroguttatus*, *B. pernix*,
 487 and *B. fuscolineatus* (Pombal et al. 1998, Ribeiro et al. 2015), which differ from the
 488 protuberant nostrils of the new species. Females of *B. sp. n.* do not possess vocal slits, which
 489 differs from *B. olivaceus*, *B. quiririensis* and *B. verrucosus*, according to the original
 490 description of the holotypes of these three species (Ribeiro et al. 2015, Pie and Ribeiro 2015).
 491

492 In *B. tridactylus*, finger IV is externally absent (Garey et al. 2012), while it is reduced but
 493 distinct in the new species. In *B. sp. n.* the tips of fingers I, II, and IV are rounded, which
 494 differ from *B. brunneus*, *B. izecksohni*, and *B. leopardus*, which have the tip of finger II
 495 pointed (Ribeiro et al. 2005, Ribeiro et al. 2015); and from *B. pernix* which has the tips of
 496 fingers I, II, and IV pointed (Pombal et al. 1998). All *B. pernix* related species and *B. sp. n.*
 497 exhibit externally absent toes I and V, reduced toe II, short and distinct toe III, and large and
 498 robust toe IV. We analyzed preserved specimens, original figures, and species descriptions
 499 and found several instances of confusion over the meaning of the terms “externally absent”,
 500 “vestigial or very reduced”, and “relatively distinct”. According to the original descriptions,
 501 toe V is “very reduced” in *B. brunneus* (Ribeiro et al. 2005) and *B. pombali* (Alves et al.
 502 2006), “reduced or vestigial” in *B. leopardus* (Ribeiro et al. 2015), and “vestigial” in *B.*
 503 *quiririensis* (Pie and Ribeiro 2015). Since this toe is not clearly distinct (see plates in the
 504 original articles), we considered toe V to be externally absent in these species, and thus
 505 similar to the condition in the new species. The same situation was found for *B. boticario*, in
 506 which toe I is externally absent but described as “very reduced” by Ribeiro et al. (2015). In *B.*
 507 *auroguttatus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, and *B. verrucosus* (Ribeiro et al. 2015) the main
 508 confusion is with the “relatively distinct” description of toe II, which undoubtedly has the
 509 same meaning as being reduced, as in the new species. Moreover, the external metatarsal
 510 tubercle, mentioned as a diagnostic trait for *B. pernix* related species (Ribeiro et al. 2015),
 511 should be avoided in species comparisons because the joint between the metatarsal elements
 512 and the fibulare and tibiale, depending on the foot position when preserved, can obscure its
 513 identification.
 514

515 The texture of the skin on the dorsum of *B. sp. n.* is rough, similar to *B. auroguttatus*, *B.*
 516 *boticario*, *B. fuscolineatus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. verrucosus* (Ribeiro et al.
 517 2015), and *B. quiririensis* (Pie and Ribeiro 2015). This characteristic distinguishes the new
 518 species from *B. brunneus* (Ribeiro et al. 2005), *B. ferruginus* (Alves et al. 2006), *B. izecksohni*
 519 (Ribeiro et al. 2005), *B. leopardus* (Ribeiro et al. 2015), *B. pernix* (Pombal et al. 1998), *B.*
 520 *pombali* (Alves et al. 2006), and *B. tridactylus* (Garey et al. 2012), which have a smooth
 521 dorsum. However, Ribeiro et al. (2015) described the dorsal skin of *B. auroguttatus*, *B.*
 522 *boticario*, *B. fuscolineatus*, and *B. verrucosus*, in a dubious way by mixing up the terms
 523 “granular”, “rough”, “rugose” and “very rough”. To be useful, descriptions of skin texture
 524 need to be done carefully in species descriptions and comparisons.
 525

526 The general color of *Brachycephalus sp. n.* in life is very distinct from *B. auroguttatus*, *B.*
 527 *boticario*, *B. ferruginus*, *B. fuscolineatus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B.*
 528 *quiririensis*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. tridactylus*, and *B. verrucosus*, which exhibit a bright
 529 yellow or orange main dorsal body color (Pombal et al. 1998, Ribeiro et al. 2005, Alves et al.
 530 2006, Garey et al. 2012, Pie and Ribeiro 2015, Ribeiro et al. 2015). The cryptic body color of
 531 the new species is similar to *B. brunneus*, predominantly brown (Ribeiro et al. 2005), and *B.*
 532 *olivaceus*, dark green to brown (Ribeiro et al. 2015). Even so, the combination of the orange
 533 background, green coverage of the dorsum, and the dark brown vertebral stripe clearly
 534 distinguishes the new species from *B. brunneus* and *B. olivaceus*.

535

536 The advertisement call of *Brachycephalus* sp. n. differs in structure and frequency from all
 537 known advertisement calls within *Brachycephalus*. It is clearly distinct from *B. crispus*, *B.*
 538 *ephippium*, and *B. pitanga* by having higher frequencies together with a different call
 539 structure (Pombal et al. 1994, Araújo et al. 2012, Condez et al. 2014). In these species, the
 540 advertisement call is characterized by the regular repetition of one low-frequency note with
 541 several pulses, while in *B. sp. n.* the high-frequency notes are composed of just two pulses. In
 542 *B. crispus*, generally the notes last 0.28 seconds and are composed of 10 pulses; the frequency
 543 range is 3.5–5.7 kHz, while the dominant frequency is 4.6 kHz (Condez et al. 2014). In *B.*
 544 *ephippium*, notes typically last in 0.12 seconds and are also composed of 10 pulses; the
 545 minimum and maximum frequencies are 3.4–5.3 kHz (Pombal et al. 1994). In *B. pitanga*,
 546 notes last 0.17 seconds and are composed of 11 pulses; the dominant frequency is 4.9 kHz
 547 (Araújo et al. 2012). When compared to the advertisement calls of the most closely related
 548 species, *B. pernix* and *B. tridactylus*, the new species call has shorter notes and higher
 549 frequencies. In *B. pernix*, notes last 0.06 seconds and are composed of three pulses; the
 550 frequency range is 4.5 kHz–6.7 kHz (Wistuba 1998). In *B. tridactylus*, notes last 0.11 seconds
 551 and also seem to be composed of three pulses, although the authors did not mention this
 552 information in original call description (Garey et al. 2012). For this species, the frequency
 553 range is 3.2–6.4 kHz, and dominant frequency is 4.8 kHz (Garey et al. 2012). The high
 554 frequency of the advertisement call of the new species is comparable to that described for two
 555 species of flea-toads, *B. hermogenesi* and *B. sulfuratus*, the latter having the highest dominant
 556 frequency known for the genus (Condez et al. 2016). Nevertheless, the advertisement call of
 557 flea-toads differs from the new species by the general structure of the call, which is long and
 558 composed of a set of high-frequency notes. In *B. hermogenesi*, the call is composed of 2–7
 559 notes, each one lasting 0.2 seconds, with 1–3 pulses (Verdade et al. 2008, T.H. Condez pers.
 560 obs.). The dominant frequency in *B. hermogenesi* is 6.8 kHz (Verdade et al. 2008). In *B.*
 561 *sulfuratus*, the call is composed of 4–7 notes, each one lasting 0.19 seconds, with 9 pulses
 562 (Condez et al. 2016). The frequency range is 4.9–9.3 kHz, and the dominant frequency is 6.7
 563 kHz (Condez et al. 2016).

564

565 *Molecular analyses*

566

567 Phylogenetic trees resulting from MP (Figure 6) and ML analyses (not shown) are congruent
 568 and recovered the populations of *B. sp. n.* as a clade. *Brachycephalus* sp. n. is clustered along
 569 with *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. brunneus*, *B. fuscolineatus*, *B. ferruginus*, *B. izecksohni*,
 570 *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. olivaceus*, *B. quiririensis*, *B.*
 571 *tridactylus*, and *B. verrucosus*, representing the South Atlantic Forest lineage of pumpkin
 572 toadlets. The relationships within this lineage were not clearly resolved and several species
 573 were poorly supported. The genetic distance between the new species and its congeners are:
 574 0.02 to *B. auroguttatus*, *B. quiririensis*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. ferruginus*, *B.*
 575 *mariaeterezae*, *B. olivaceus*, and *B. verrucosus*, 0.03 to *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, and
 576 0.05 to *B. brunneus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, and *B. tridactylus*. Despite the high support
 577 values in the trees differentiating the individuals of distinct populations of the new species,
 578 we found low genetic divergence within the populations (0.00–0.01), thereby corroborating
 579 the morphological and acoustic evidence in supporting them as belonging to a single species.

580

581 *Etymology*

582

583 The specific name used in this manuscript is a fantasy name to prevent the new species name
 584 being used before the formal description, what would render the specific name as a *nomen*
 585 *nudum*, according to the zoological nomenclature rules.

586

587 *Distribution*

588

589 *Brachycephalus* sp. n. is known from five coastal localities in northeastern Santa Catarina
 590 State, Brazil (Figure 7). The new species occurs at two localities on Ilha de São Francisco do
 591 Sul (Serra da Palha in Laranjeiras, and Fazenda Morro Grande in Morro Grande), and at two
 592 mainland localities in Distrito do Saí (Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Univille,
 593 Vila da Glória, and Estrada do Saí), all located in the Município de São Francisco do Sul. On
 594 the mainland, the new species also occurs at Braço do Norte, Município de Itapoá, along the
 595 Saí Mountain Range. The distribution of the new species seems to be restricted to this coastal
 596 region, including lowlands near the sea level and up coastal mountains to 250 meters. Its
 597 occurrence in lowlands is restricted to the foothills of the coastal mountains and it is not
 598 associated with the flat relief of the coastal plains.

599

600 *Natural history, ecology, and conservation*

601

602 The new species is associated with leaf-litter and lives inside ombrophilous dense sub-
 603 montane and/or lowland remnants of Atlantic Forest. These forest remnants are well
 604 preserved, and are represented by primary or secondary forests in medium to advanced stages
 605 of regeneration. Unlike most species of species of *Brachycephalus*, individuals of
 606 *Brachycephalus* sp. n. were generally found amidst a thin layer of leaf-litter. It is cryptic,
 607 locally abundant, and commonly exhibits behavior of thanatosis when caught. This species is
 608 active during the day and its reproduction period appears to be annual because males were
 609 found calling from January to December at temperatures between 10°C–26°C. Calling males
 610 were always found under leaves and females were rarely found exposed. In November of
 611 2015, at Vila da Glória, we captured a male and a female that were kept in a plastic bag.
 612 Minutes after the capture the pair amplexed in an axillary position. When we started the
 613 laboratory procedure, two large, yellow eggs were found amidst the leaves (Figure 8A and
 614 8B); however, we did not observed the duration of amplexus duration or the moment of eggs
 615 deposition. The eggs were covered with a transparent gelatinous layer and measured 3.3 mm
 616 and 3.1 mm in diameter, respectively (Figure 8B). They were deposited in a leaf fold, and
 617 visited several times by one or both individuals (Figure 8A). We did not observed any
 618 physical contact between the parents and the eggs. In its mainland distribution,
 619 *Brachycephalus* sp. n. occurs in syntopy with the flea-toad *Brachycephalus sulfuratus*
 620 (Condez et al. 2016). Calling males of both species were found together and the advertisement
 621 calls are easily distinguishable from by their distinct structures, despite the similarities in their
 622 dominant frequency.

623

624 The main threats faced by *Brachycephalus* sp. n. are habitat loss and modification associated
 625 with the intense rapid urban expansion and seaport construction in the coastal region of
 626 northeastern Santa Catarina. These changes in land use are particularly detrimental for the
 627 new species, which is exclusive to dwelling in the forest leaf-litter, with a limited area of
 628 occurrence. Despite the occurrence of *Brachycephalus* sp. n. at five localities, the distribution
 629 of the new species is restricted to this coastal region that does not have any established
 630 conservation units. The Parque Estadual Acaraí is the only legal protected area close to places
 631 where the new species occurs; even so this protected area includes only formations of flat

632 relief, such as sandy coastal plains and lowland forests, where populations of *Brachycephalus*
 633 sp. n. are not thought to occur.

634

635 Discussion

636

637 Most species in the genus *Brachycephalus* are currently considered microendemic, occurring
 638 in one or a few high elevation sites along the mountains of the Atlantic Forest (Pie et al.
 639 2013). In contrast to this pattern, the expanding knowledge of this group of species is
 640 revealing that even with small geographic ranges, species of *Brachycephalus* could be found
 641 beyond their type localities. At least six species of *Brachycephalus* are known to occur in
 642 distinct localities, including the exclusive montane species *B. brunneus* (Pie et al. 2013), *B.*
 643 *ephippium* (Clemente-Carvalho et al. 2008), *B. nodoterga* (Clemente-Carvalho et al. 2015,
 644 Abegg et al. 2015), and the elevationally widespread species of flea-toads *B. didactylus*
 645 (Oliveira et al. 2012), *B. hermogenesi* (Pimenta et al. 2007, Verdade et al. 2008), and *B.*
 646 *sulfuratus* (Condez et al. 2016). We provide here the first record of a species of pumpkin-
 647 toadlet from the lowlands, a group of species that to date have been considered to be restricted
 648 to mountains (Clemente-Carvalho et al. 2011, Condez et al. 2014, Ribeiro et al. 2015). It
 649 seems probable that the current conditions of lowlands and sub-montane forests in the
 650 southern Atlantic Forest harbor similar environmental requirements for the persistence of
 651 *Brachycephalus* as does the highlands along the southeastern part of the Atlantic Forest
 652 Domain. Furthermore, the development of suitable climatic conditions on the emerged
 653 continental shelf during the Quaternary is a plausible explanation for the expansion and
 654 colonization of coastal lowlands by *Brachycephalus* (Leite et al. 2015).

655

656 Recently, eight new species have been described for the *B. pernix* lineage (Clemente-
 657 Carvalho et al. 2011, Pie and Ribeiro 2015, Ribeiro et al. 2015). The descriptions of these
 658 species, unlike those of *B. pernix* (Pombal et al. 1998), *B. brunneus* and *B. izecksohni*
 659 (Ribeiro et al. 2005), *B. ferruginus* and *B. pombali* (Alves et al. 2006), and *B. tridactylus*
 660 (Garey et al. 2012), are full of inconsistencies and lack the fundamental characters necessary
 661 for properly diagnosing species. The pattern of hyperossification of skull, skeleton, and skin
 662 are unique to some species, and for some entire groups of species within the genus
 663 *Brachycephalus* (Clemente-Carvalho et al. 2009, 2011). Details of osteology, such as
 664 reduction of digits and phalanges, and modification of bones of the skull and pectoral girdle,
 665 are very important characters to analyze in these miniaturized amphibians (Duellman and
 666 Trueb 1986, Kaplan 2002, Campos et al. 2010). Secondary sexual traits are not easily
 667 observed in most species of *Brachycephalus*; however, along with vocal slits in males, body
 668 size dimorphism is evident and females are larger than males (Nali et al. 2014). According to
 669 Ribeiro et al. (2015) and the findings of the present study, body measurements (i.e., body size
 670 and head proportion) are potential diagnostic characters for species within *B. pernix* lineage.
 671 This notwithstanding, in the recently described species (Ribeiro et al. 2015, Pie and Ribeiro
 672 2015), measurements of body size were provided but without any sexual distinction, which
 673 resulted in wide ranges of SVL per species and made comparisons among species
 674 meaningless. Several other significant faults of these descriptions include reporting the
 675 presence of vocal slits in females, the use of inappropriate characteristics to diagnose species
 676 in the genus *Brachycephalus*, such as the presence/absence of toes based only on external
 677 observations, the presence and appearance of the metacarpal tubercle (see comments about
 678 this in species comparisons above), and the oversimplified description of skin texture and
 679 body color. As a consequence, the majority of the species within the *B. pernix* lineage are not
 680 properly distinguished, except for their geographic distributions. Molecular evidence was
 681 supposed to be useful in diagnosing species, as mentioned in some original descriptions

682 (Ribeiro et al. 2015, Pie and Ribeiro 2015), but a topology including the new taxa has only
 683 just recently been published (Firkowski et al. 2016), and revealed that several species within
 684 this lineage are not phylogenetically supported (Firkowski et al. 2016), as confirmed by our
 685 analyses. This kind of taxonomic contribution is not helpful and should be avoided, and a
 686 thorough revision of the specific status of *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, *B.*
 687 *mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. leopardus*, *B. verrucosus* (Ribeiro et al. 2015), and *B.*
 688 *quiririensis* (Pie and Ribeiro 2015) remains needed.

689

690 **Acknowledgements**

691

692 We are grateful to E.C. Nardin for valuable help during field surveys; A.F. Sabbag, F.A.
 693 Brusquetti, F.P. de Sá, M. Lyra, P.D. Pinheiro, and P.G. Taucce for assistance in the
 694 laboratory; and J. Somera for crafting the line drawings. We thank the Ministério do Meio
 695 Ambiente (MMA/SISBIO) for the collecting permits. We are thankful to private landowners
 696 and the Universidade da Região de Joinville (Univille) for providing lodging at CEPA Vila da
 697 Glória and for allowing access to the study area. We thank Centro de Estudos de Insetos
 698 Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro) for providing molecular laboratory facilities. We also thank
 699 H. Zaher and J.P. Pombal Jr. for allowing access to preserved specimens under their care.
 700 Fieldwork was partially funded by Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Anfíbios
 701 e Répteis Ameaçados da Região Sul do Brasil (RAN/ICMBio). J.P.C. Monteiro was
 702 supported by scholarship #131947/2015-0 from Conselho Nacional de Desenvolvimento
 703 Científico e Tecnológico (CNPq) and T.H. Condez was supported by scholarships
 704 #141716/10-0 and #201033/2012-7 from CNPq and #2015/00461-1 from São Paulo
 705 Research Foundation (FAPESP). C.F.B. Haddad thanks grants #2013/50741-7 and
 706 #2014/50342-8 from FAPESP, and also CNPq and Fundação Grupo Boticário de Proteção à
 707 Natureza for financial support.

708

709 **References**

710

711 Abegg AD, Ortiz FR, Rocha B, Condez TH (2015) A new record for *Brachycephalus*
 712 *nodoterga* (Amphibia, Anura, Brachycephalidae) in the state of São Paulo, Brazil. Check List
 713 11 (1769): 1–3. doi: 10.15560/11.5.1769.

714

715 Alves ACR, Ribeiro LF, Haddad CFB, Reis SF (2006) Two new species of *Brachycephalus*
 716 (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná state, southern Brazil. BioOne
 717 62 (2): 221–233. doi: 10.1655/05-41.1.

718

719 Araújo CB, Guerra TJ, Amatzuzi MCO, Campos LA (2012) Advertisement and territorial
 720 calls of *Brachycephalus pitanga* (Anura: Brachycephalidae). Zootaxa 3302: 66–67.

721

722 Arcanjo DDR, Vasconcelos AG, Comerma-Steffensen SG, Jesus JR, Silva LP, Pires Jr OR,
 723 Costa-Neto CM, Oliveira EB, Migliolo L, Franco OL, Restini CBA, Paulo M, Bendhack LM,
 724 Bemquerer MP, Oliveira AP, Simonsen U, Leite JRSA (2015) A novel vasoactive proline-
 725 rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*. Plos One 10
 726 (12): 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0145071.

727

728 Bioacoustics Research Program (2011) Raven Pro: interactive sound analysis software,
 729 Version 1.4. The Cornell Lab of Ornithology, New York, USA.

730 <http://www.birds.cornell.edu/raven> [accessed 08 December 2015]

731

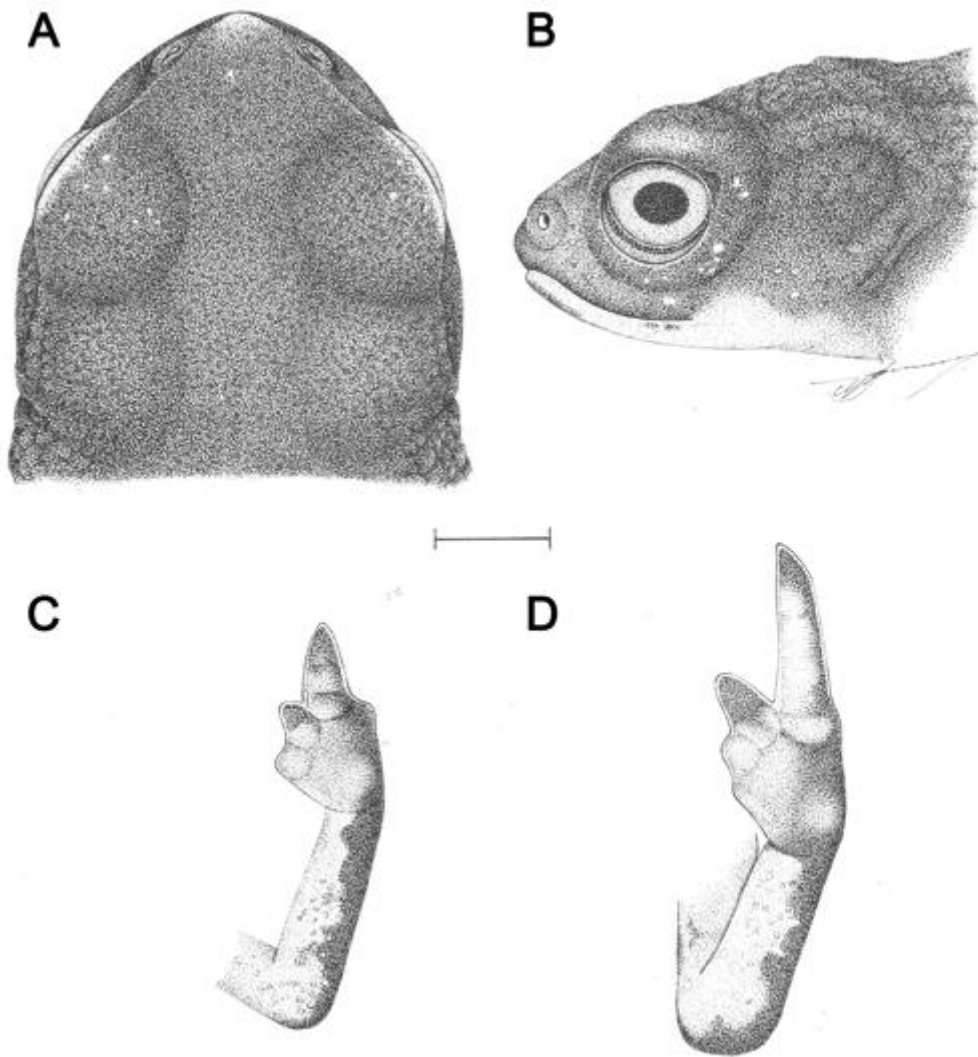
- 732 Campos LA, Silva HR, Sebben A (2010) Morphology and development of additional bony
733 elements in the genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae). *Biological Journal of the*
734 *Linnean Society* 99 (4): 752–767. doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01375.
735
- 736 Canedo C, Haddad CFB (2012) Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana,
737 with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema*
738 (Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65 (2): 610–620. doi:
739 10.1016/j.ympev.2012.07.016.
740
- 741 Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie)*
742 *Monographs* 2: 1–609.
743
- 744 Clemente-Carvalho RBG, Monteiro L, Bonato V, Rocha H, Pereira G, Oliveira D, Lopes R,
745 Haddad CFB, Martins E, Reis SF (2008) Geographic variation in cranial shape in the
746 pumpkin toadlet (*Brachycephalus ephippium*): a geometric analysis. *Journal of Herpetology*
747 42 (1): 176–185.
748
- 749 Clemente-Carvalho RBG, Antoniazzi MM, Jared C, Haddad CFB, Alves ACR, Rocha HS,
750 Pereira GR, Oliveira DF, Lopes RT, Reis SF (2009) Hyperossification in miniaturized
751 toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic
752 structure and macroscopic patterns of variation. *Journal of Morphology* 270 (11): 1285–1295.
753 doi: 10.1002/jmor.10755.
754
- 755 Clemente-Carvalho RBG, Klaczo J, Perez I, Alves ACR, Haddad CFB, Reis SF (2011)
756 Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus
757 *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and*
758 *Evolution* 61: 79–89. doi: 10.1016/j.ympev.2011.05.017.
759
- 760 Clemente-Carvalho RBG, Perez SI, Tonhati CH, Condez TH, Sawaya RJ, Haddad CFB, Reis
761 SF (2015) Boundaries of morphological and molecular variation and the distribution range of
762 a miniaturized froglet, *Brachycephalus nodoterga* (Anura: Brachycephalidae). *Journal of*
763 *Herpetology* 50 (1):169–178. doi: 10.1670/14-119.
764
- 765 Condez TH, Clemente-Carvalho RBG, Haddad CFB, Reis SF (2014) A new species of
766 *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the highlands of the Atlantic Forest,
767 southeastern Brazil. *Herpetologica* 70 (1): 89–99. doi: 10.1655/HERPETOLOGICA-D-13-
768 00044.
769
- 770 Condez TH, Monteiro JPC, Comitti EJ, Garcia PCA, Amaral IB, Haddad CFB (2016) A new
771 species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa*
772 4083: 40–56. doi: 10.11646/zootaxa.4083.1.2.
773
- 774 Duellman WE (1970) Hylid frogs of Middle America. *Monograph of the Museum of Natural*
775 *History, The University of Kansas*, 753pp.
776
- 777 Duellman WE, Trueb L (1986) *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York, 670 pp.
778
- 779 Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
780 throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
781

- 782 Firkowski CR, Bornschein MR, Ribeiro LF, Pie MR (2016) Species delimitation, phylogeny
783 and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian
784 Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 100: 345–60. doi:
785 10.1016/j.ympev.2016.04.023.
786
- 787 Frost DR (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American
788 Museum of Natural History, New York, USA.
789 <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> [accessed 02 March 2016]
790
- 791 Garey MV, Lima AMX, Hartmann MT, Haddad CFB (2012) A new species of miniaturized
792 toadlet, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae), from southern Brazil.
793 *Herpetologica* 68 (2): 266–271. doi: 10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00074.1.
794
- 795 Giaretta AA, Sawaya RJ (1998) Second species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae).
796 *Copeia* 1998: 985–987. doi: 10.2307/1447345.
797
- 798 Goloboff P, Farris J, Nixon K (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis.
799 *Cladistics* 24: 774–786. doi: 10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x.
800
- 801 Haddad CFB, Alves ACR, Clemente-Carvalho RBG, Reis SF (2010) A new species of
802 *Brachycephalus* from the Atlantic Rain Forest in São Paulo state, southeastern Brazil
803 (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 2010: 410–420. doi: 10.1643/CH-09-102.
804
- 805 Hanifin CT (2010) The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX): toxicity in
806 terrestrial vertebrates. *Marine Drugs* 8: 577–593. doi: 10.3390/md8030577.
807
- 808 Hanken J, Wake DB (1993) Miniaturization of body size: organismal consequences and
809 evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 501–519.
810
- 811 Hedges SB, Duellman WE, Heinicke MP (2008) New World direct-developing frogs (Anura:
812 Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*
813 1737: 1–182.
814
- 815 Heinicke MP, Duellman W, Trueb L, Means DB, MacCulloch RD, Hedges SB (2009) A new
816 frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade
817 revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa* 2211: 1–35.
818
- 819 Heyer WR, Rand AS, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson CE (1990) Frogs of Boracéia.
820 *Arquivos de Zoologia* 31: 231–410.
821
- 822 Izecksohn E (1971) Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do estado do Rio de
823 Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia* 280: 1–12.
824
- 825 Kaplan M (2002) Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of
826 *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus
827 *Psyllophryne* (Brachycephalidae). *Amphibia-Reptilia* 23 (2): 225–227.
828
- 829 Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS,
830 Fagundes V, Paresque R, Passamani M, Pardini R (2015) Neotropical forest expansion during

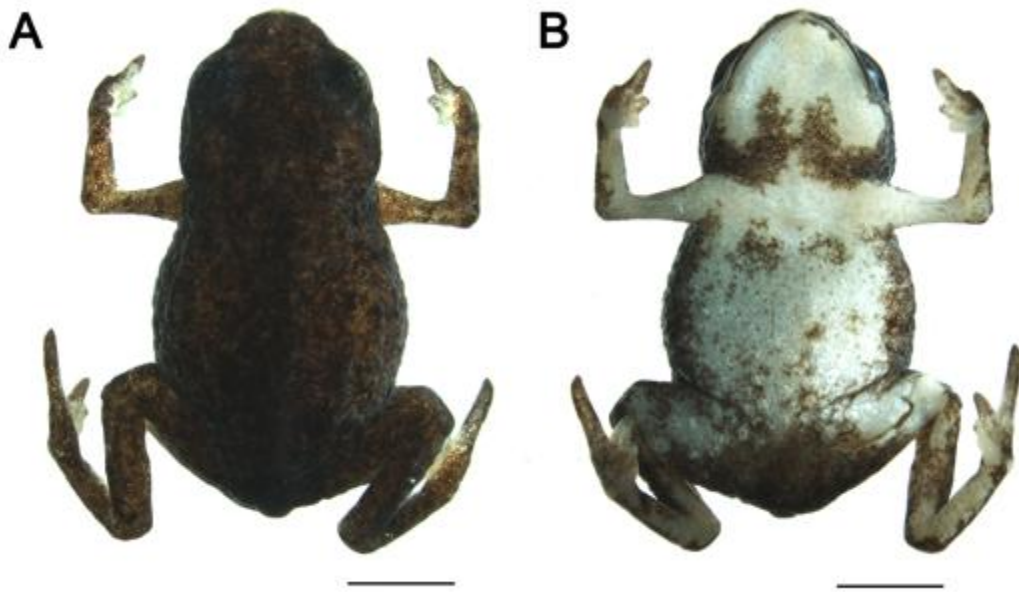
- 831 the last glacial period challenges refuge hypothesis. PNAS 113 (4): 1008–1013. doi:
832 10.1073/pnas.1513062113.
833
- 834 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold
835 Spring Harbor Laboratory Press, USA, 585 pp.
836
- 837 Nali RC, Zamudio KR, Haddad CFB, Prado CPA (2014) Size-Dependent Selective
838 Mechanisms on Males and Females and the Evolution of Sexual Size Dimorphism in Frogs.
839 The American Naturalist 184 (6): 727–740. doi: 10.1086/678455.
840
- 841 Napoli MF, Caramaschi U, Cruz CAG, and Dias IR (2011) A new species of flea-toad, genus
842 *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest
843 of southern Bahia, Brazil. Zootaxa 2739: 33–40.
844
- 845 Nixon KC (1999–2002) WinClada, v. 1.00.08. Ithaca, New York, USA.
846 <http://www.cladistics.com/wincDownload.htm> [accessed 10 January 2016].
847
- 848 Oliveira JCF, Coco L, Pagotto RV, Pralon E, Vrcibradic D, Pombal Jr JP, Rocha CFD (2012)
849 Amphibia, Anura, *Brachycephalus didactylus* (Izecksohn, 1971) and *Zachaenus parvulus*
850 (Girard, 1853): Distribution extension. Checklist 8 (2): 242–244.
851
- 852 Padiá JM, Grant T, Frost DR (2014) Molecular systematics of terraranas (Anura:
853 Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria.
854 Zootaxa 3825 (1): 1–132. doi: 10.11646/zootaxa.3825.1.1.
855
- 856 Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) The Simple
857 Fool’s Guide to PCR. Version 2. Honolulu, HI.
858
- 859 Pie MR, Meyer ALS, Firkowski CR, Ribeiro LF, Bornschein MR (2013) Understanding the
860 mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus*
861 spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. Ecological Modelling
862 250: 165–176. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2012.10.019.
863
- 864 Pie MR, Ribeiro LF (2015) A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae)
865 from the Quiriri mountain range of southern Brazil. PeerJ 3 (e1179): 1–9. doi:
866 10.7717/peerj.1179.
867
- 868 Pimenta BVS, Bérnils RS, Pombal Jr JP (2007) Amphibia, Anura, Brachycephalidae,
869 *Brachycephalus hermogenesi*: filling gap and geographic distribution map. Checklist 3 (3):
870 277–279.
871
- 872 Pires Jr OR, Sebben A, Schwartz EF, Largura SWR, Bloch Jr C, Morales RAV, Schwartz CA
873 (2002) Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus*
874 *ephippium* (Anura: Brachycephalidae). Toxicon 40: 761–766. doi: 10.1016/S0041-
875 0101(01)00279-3.
876
- 877 Pires Jr OR, Sebben A, Schwartz EF, Morales RAV, Bloch Jr C, Schwartz CA (2005) Further
878 report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the anuran family
879 Brachycephalidae. Toxicon 45: 73–79. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.09.016.
880

- 881 Pombal Jr JP, Sazima I, Haddad CFB (1994) Breeding behavior of the pumpkin toadlet,
882 *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). Journal of Herpetology 28: 516–519. doi:
883 10.2307/1564972.
- 884
885 Pombal Jr JP, Wistuba EM, Bornschein MR (1998) A new species of brachycephalid (Anura)
886 from the Atlantic Rain Forest of Brazil. Journal of Herpetology 32 (1): 70–74. doi:
887 10.2307/1565481.
- 888
889 Pombal Jr JP (2010) A posição taxonômica das "variedades" de *Brachycephalus ephippium*
890 (Spix, 1824) descritas por Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae).
891 Boletim do Museu Nacional, Zoologia 526: 1–12.
- 892
893 Pombal Jr JP, Izecksohn E (2011) Uma nova espécie de *Brachycephalus* (Anura:
894 Brachycephalidae) do estado do Rio de Janeiro. Papéis Avulsos de Zoologia 51 (28): 443–
895 451.
- 896
897 Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and
898 Evolution 25 (7): 1253–1256. doi: 10.1093/molbev/msn083.
- 899
900 Pyron RA, Wiens JJ (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800
901 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Molecular
902 Phylogenetic and Evolution 61 (2): 543–583. doi: 10.1016/j.ympev.2011.06.012.
- 903
904 R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing.
905 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org> [accessed
906 08 December 2015]
- 907
908 Ribeiro LF, Alves ACR, Haddad CFB, Reis SF (2005) Two new species of *Brachycephalus*
909 Günther, 1985 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia, Anura,
910 Brachycephalidae). Boletim do Museu Nacional, Zoologia 519: 1–18.
- 911
912 Ribeiro LF, Bornschein MR, Belmonte-Lopes R, Firkowski CR, Morato SAA, Pie MR (2015)
913 Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from
914 southern Brazil. PeerJ 3 (e1011): 1–36. doi: 10.7717/peerj.1011.
- 915
916 Sebben A, Schwartz CA, Valente D, Mendes EGA (1986) Tetrodotoxin-like substance found
917 in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. Toxicon 24: 799–806. doi: 10.1016/0041-
918 0101(86)90105-4.
- 919
920 Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses
921 with thousands of taxa and mixed models. Phylogenetics 22 (21): 2688–2690. doi:
922 10.1093/bioinformatics/btl446.
- 923
924 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular
925 evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.
926 doi: 10.1093/molbev/mst197.
- 927
928 Taylor WR, Van Dyke GC (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes
929 and other vertebrates for bone and cartilage study. Cybium 9: 107–119.
- 930

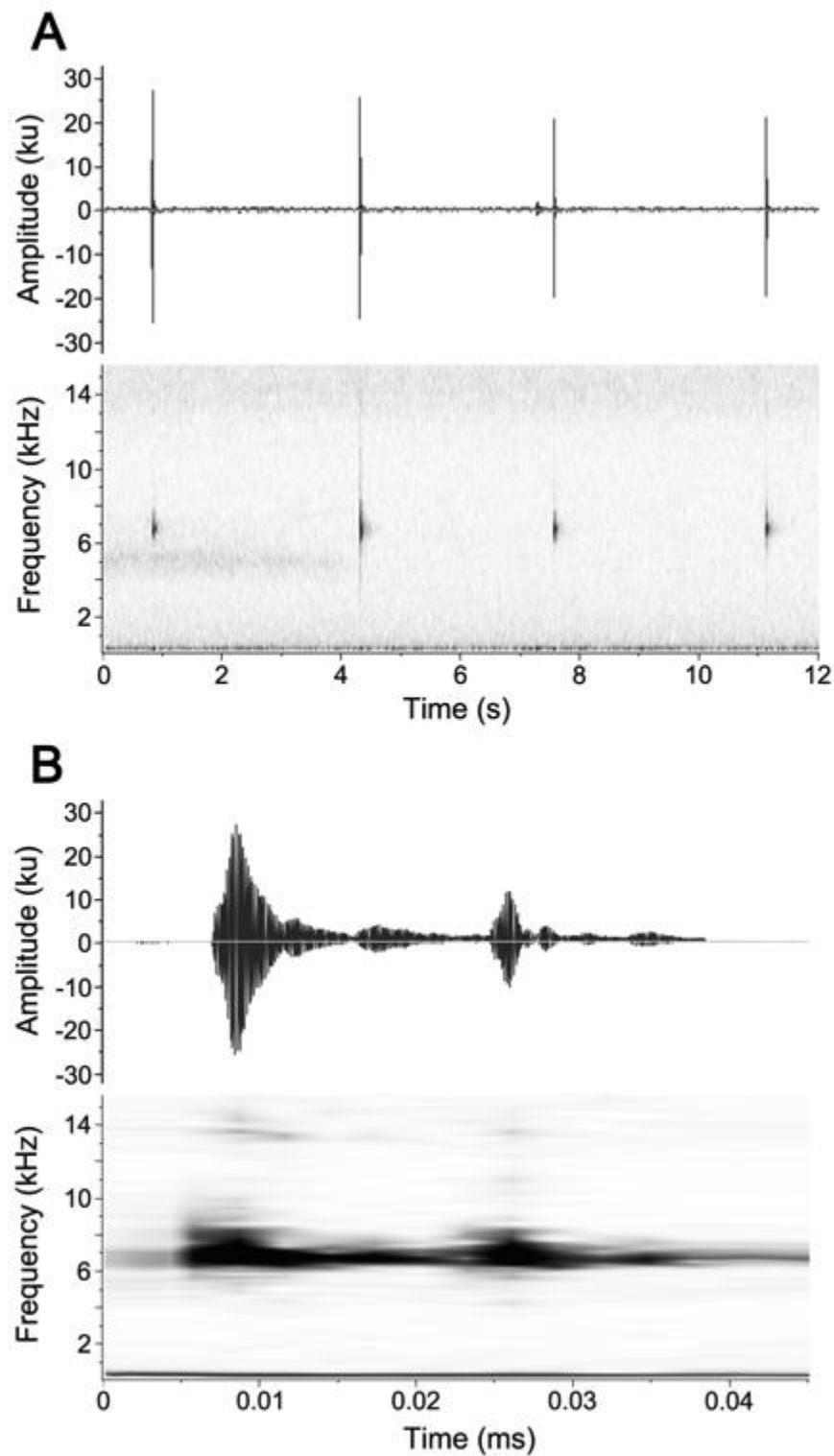
- 931 Verdade VK, Rodrigues MT, Cassimiro J, Pavan D, Liou N, Lange M (2008) Advertisement
932 call, vocal activity, and geographic distribution of *Brachycephalus hermogenesi* (Giaretta and
933 Sawaya, 1998) (Anura, Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 42 (3): 542–549. doi:
934 10.1670/07-287.1.
- 935
- 936 Wistuba EM (1998) História natural de *Brachycephalus pernix* Pombal, Wistuba and
937 Borschein, 1998 (Anura) no Morro Anhangava, Município de Quatro Barras, Estado do
938 Paraná. Master Thesis, Paraná, Brazil: Federal University of Paraná.
- 939
- 940 Yeh J (2002) The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution*
941 56: 628–641. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01372.x.

942 **Figures**

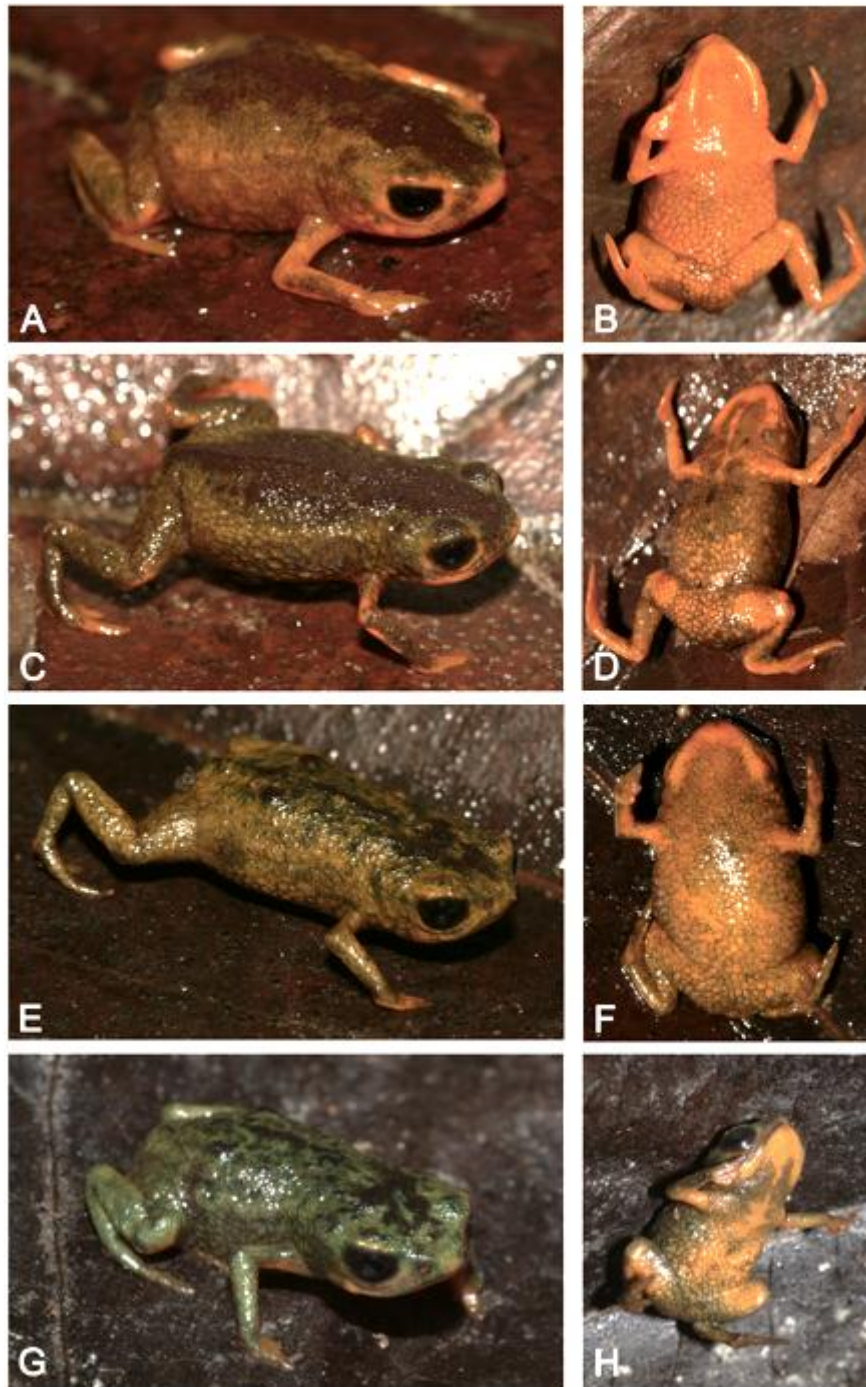
943
944 Figure 1. *Brachycephalus* sp. n. CFBH 39850 (holotype), adult male. (A) Dorsal and (B)
945 lateral views of head, (C) ventral view of left hand, and (D) ventral view of left foot. Scale bar
946 1mm.



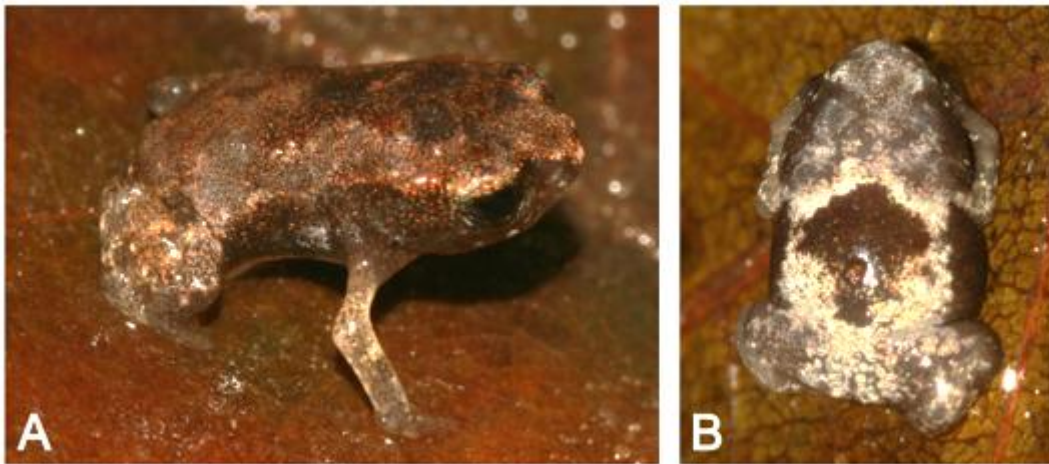
947
948 Figure 2. *Brachycephalus* sp. n. CFBH 39850 (holotype), adult male. (A) Dorsal and (B)
949 ventral views. Scale bar 2mm.



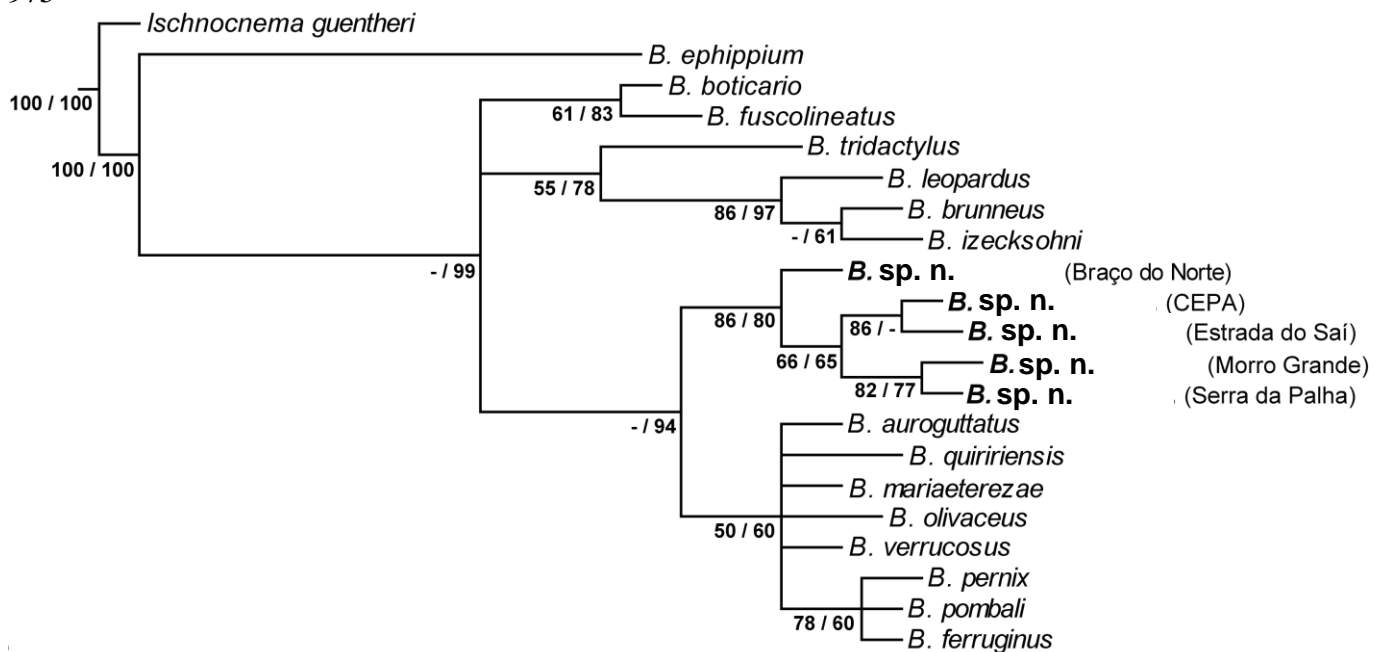
950
 951 Figure 3. Advertisement call of *Brachycephalus* sp. n., voucher specimen CFBH 39848
 952 (paratype), recorded at Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Univille, Vila da Glória,
 953 Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina, Brazil, on 21 January 2015, 10:50
 954 a.m., air temperature 25°C, air relative humidity 100%. (A) Oscillogram (above) and
 955 spectrogram (below) of four consecutive calls, and (B) oscillogram (above) and spectrogram
 956 (below) of one call.



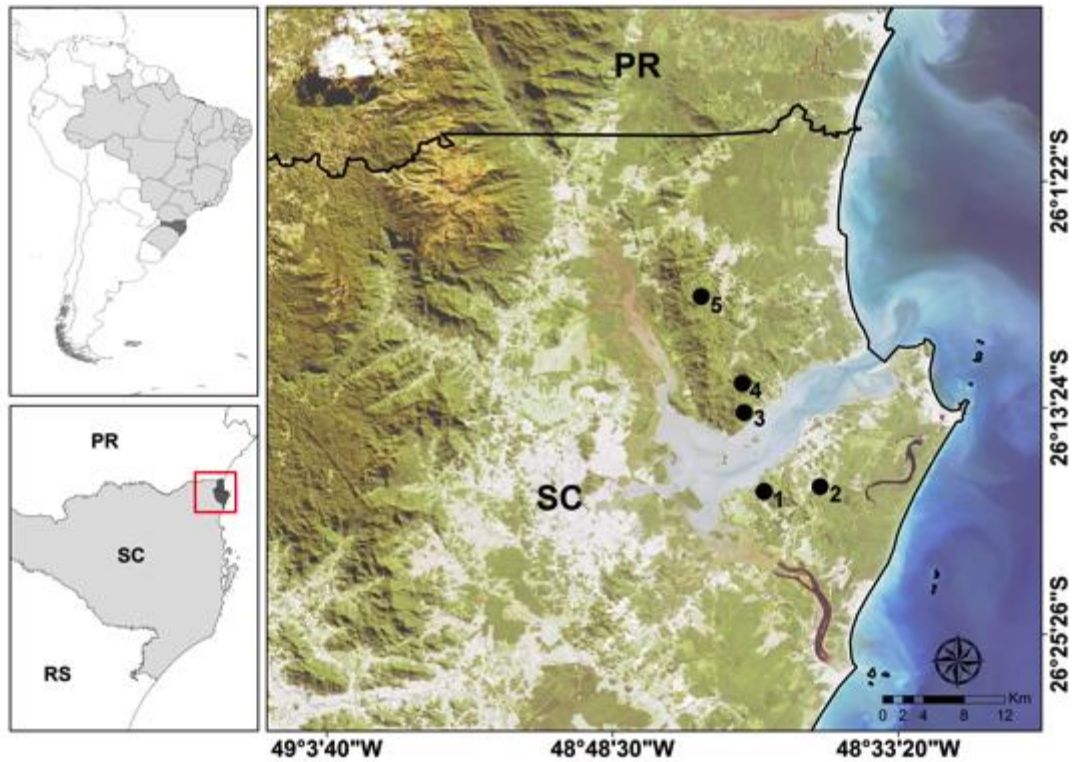
957
 958 Figure 4. Color variation in *Brachycephalus* sp. n. (A) Dorsolateral and (B) ventral views of
 959 CFBH 39864 (paratype), adult female, from Município de Itapoá, state of Santa Catarina. (C)
 960 Dorsolateral and (D) ventral views of CFBH 39863 (paratype), adult female, from Município
 961 de Itapoá, state of Santa Catarina. (E) Dorsolateral and (F) ventral views of CFBH 39876
 962 (paratopotype), adult male, from Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina.
 963 (G) Dorsolateral and (H) ventral views of CFBH 39846 (paratype), adult male, from
 964 Município de São Francisco do Sul, state of Santa Catarina, Brazil.



965 Figure 5. Juvenile of *Brachycephalus* sp. n. in life (SVL = 5.00 mm). (A) Dorsolateral and (B)
 966 ventral views of the specimen CFBH 39859 (paratype), from Centro de Estudos e Pesquisas
 967 Ambientais da Univille, Vila da Glória, Distrito do Saí, Município de São Francisco do Sul,
 968 state of Santa Catarina, Brazil.
 969
 970
 971
 972
 973
 974
 975



977 Figure 6. Topology for the *Brachycephalus pernix* lineage. The tree represents the strict
 978 consensus of the eight most parsimonious trees (of 199 steps). Branch lengths correspond to
 979 the number of unambiguous parsimony transformations. Numbers above nodes indicate
 980 maximum likelihood/maximum parsimony support values. See text for sequences included in
 981 this analysis.



982
983
984
985
986
987

Figure 7. Distribution of *Brachycephalus* sp. n. in northeastern state of Santa Catarina, Brazil. (1) Serra da Palha, Laranjeiras and (2) Fazenda Morro Grande, Morro Grande, both at Ilha de São Francisco do Sul, Município de São Francisco do Sul; (3) Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Univille, Vila da Glória and (4) Estrada do Saí, both at mainland, Distrito do Saí, Município de São Francisco do Sul; and (5) Braço do Norte, Município de Itapoá.



988
989
990
991

Figure 8. Eggs of *Brachycephalus* sp. n. (A) Male left, CFBH 39861 (paratype) and female right, CFBH 39860 (paratype), after oviposition. (B) Detail of the eggs of *Brachycephalus* sp. n.

992 **Appendix**

993

994 **Specimens examined**

995

996 *Brachycephalus brunneus* (6 specimens): BRAZIL: Paraná: Campina Grande do Sul, CFBH
997 7880, 7893, 7894, MNRJ 40289–91.

998 *Brachycephalus ferruginus* (7 specimens): BRAZIL: Paraná: Morretes, CFBH 8028, 8030,
999 8032, 40436–40438, MZUSP 15787.

1000 *Brachycephalus fuscolineatus* (1 specimen): BRAZIL: Santa Catarina: Ilhota, CFBH 40448.

1001 *Brachycephalus izecksohni* (9 specimens): BRAZIL: Paraná: between Guaratuba e Paranaguá,
1002 MNRJ 7381, 7382, 7384, (paratopotypes) CFBH 7375, 7384, 7386, 7387, MZUSP 132892,
1003 132893.

1004 *Brachycephalus leopardus* (15 specimens): BRAZIL: Paraná: Tijucas do Sul, CFBH 20940,
1005 20941, 20943–55.

1006 *Brachycephalus olivaceus* (9 specimens): BRAZIL: Santa Catarina: Joinville, CFBH 40439–
1007 40447.

1008 *Brachycephalus pernix* (5 specimens): BRAZIL: Paraná: Quatro Barras, CFBH 28888–91,
1009 MNRJ 17343 (holotype).

1010 *Brachycephalus pombali* (2 specimens): BRAZIL: Paraná: Guaratuba, CFBH 8048, 8051.

1011 *Brachycephalus quiririensis* (62 specimens): BRAZIL: Santa Catarina: Garuva, MZUSP
1012 132902, 132904–07, 132910, 132912–14, 132916, 132918, 132920, 132921, 132925–29,
1013 CFBH 40392–40435.

1014 *Brachycephalus sulfuratus* (6 specimens): BRAZIL: Santa Catarina: São Francisco do Sul,
1015 CFBH 39137 (holotype), 39138–40 (paratypes), 39330–32 (paratypes).

1016 *Brachycephalus tridactylus* (9 specimens): BRAZIL: Paraná: Guaraqueçaba, MZUSP 137957
1017 (holotype), 137952–56 (paratopotypes), MNRJ 67312–14.

CAPÍTULO II

Distribuição geográfica, variação morfológica e molecular de uma nova espécie de *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) no nordeste do estado de Santa Catarina

RESUMO

O encontro de uma nova espécie de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* para áreas de baixa altitude direcionou esforços para a ampliação do conhecimento da distribuição geográfica e altitudinal do gênero. No total foram amostradas nove localidades nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, localizados no litoral nordeste do estado de Santa Catarina. Nossos resultados demonstraram uma complexidade de problemas taxonômicos envolvendo novos registros de ocorrência e variabilidade das populações de *Brachycephalus*. Foram evidenciadas divergências morfológicas e similaridades moleculares entre as populações, o que sugere tratar-se do primeiro registro de uma espécie de *Brachycephalus* com populações claramente diferenciadas fenotipicamente, mas com alta homogeneidade em suas sequências de DNA analisadas. No entanto, há necessidade de mais informações para a compreensão do cenário evolutivo que envolve não somente a diversidade dessas populações, mas também problemas relacionados a delimitação de espécies, suas distribuições e status de conservação.

ABSTRACT

The discovery of a new species of *Brachycephalus* from the *B. pernix* group in lowlands directed efforts towards the increase of knowledge for the genus *Brachycephalus* and its distribution. We collected specimens from nine localities in Garuva, Itapoá, and São Francisco do Sul municipalities, Santa Catarina state. Our results revealed a complexity of taxonomic problems involving new occurrence records and variability of *Brachycephalus* populations. We evidenced morphological divergences and molecular similarities among populations, suggesting that this might be the first record of a species of *Brachycephalus* with populations clearly differentiated phenotypically, but with high homogeneity in their analyzed DNA sequences. However, more information is required to understand this evolutionary scenario, which involves not only the diversity among these populations, but also problems related to species delimitation, their distribution, and conservation status.

PALAVRAS-CHAVE: Brachycephaloidea; sapinhos-pingo-de-ouro; diversidade; taxonomia

1 INTRODUÇÃO

Os gêneros *Brachycephalus* Fitzinger, 1826 e *Ischnocnema* Reinhardt e Lütken, 1862, compõem a família Brachycephalidae, endêmica da Floresta Atlântica (FROST *et al.*, 2006; HEDGES *et al.*, 2008; PADIAL *et al.*, 2014). O monofiletismo da família é reconhecido especialmente por evidências moleculares, sendo pouco exploradas as características morfológicas que aninham esta família no mesmo clado (FROST *et al.*, 2006; HEDGES *et al.*, 2008; TABOADA *et al.*, 2013; PADIAL *et al.*, 2014). Em relação ao modo de vida, compartilham o hábito principalmente terrestre, sendo habitantes da serrapilheira, e também o desenvolvimento direto dos embriões (HEDGES *et al.*, 2008; POMBAL *et al.*, 1994; CONDEZ *et al.*, 2014).

Espécies de *Brachycephalus* se caracterizam pela miniaturização (HANKEN & WAKE, 1993; YEH, 2002), o que evolutivamente desencadeou diversos processos adaptativos como a redução, perda e/ou fusão de ossos na região cefálica, corporal e dos membros (HANKEN & WAKE, 1993; YEH, 2002; HEDGES *et al.*, 2008). Cabe ressaltar o peculiar gradiente de hiperossificação do esqueleto, onde há um aumento da mineralização e da ossificação de determinados elementos esqueléticos, que varia entre as espécies do gênero (TRUEB & ALBERCH, 1985; HANKEN, 1993; CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009; CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011b). Também apresentam colorações geralmente vibrantes que podem estar associadas ao aposematismo (SEBBEN *et al.*, 1986; PIRES *et al.*, 2002, 2005; HANIFIN, 2010; POMBAL & IZECKSOHN, 2011).

O recente aprofundamento dos estudos relacionados ao gênero *Brachycephalus* tem permitido uma melhor compreensão da taxonomia (POMBAL, 2010), distribuição geográfica (*e.g.* DAYRELL *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PIE *et al.*, 2013; ABEGG *et al.*, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a), história natural (*e.g.* POMBAL *et al.*, 1994; POMBAL, 1999; LIMA *et al.*, 2013; OLIVEIRA & HADDAD, 2015), relações filogenéticas (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; PADIAL *et al.*, 2014), composição química da pele (*e.g.* SEBBEN *et al.*, 1986; PIRES *et al.*, 2002, 2005; HANIFIN, 2010; ARCANJO *et al.*, 2015) e status de conservação (HADDAD *et al.*, 2008; PIE *et al.*, 2013; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a).

O gênero *Brachycephalus* possui uma amplitude geográfica que abrange o Nordeste, o Sudeste e o Sul do Brasil (NAPOLI *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015; FROST, 2016) e é representado por 31 espécies, das quais 11 foram descritas nos últimos quatro anos (CONDEZ

et al., 2014; PIE & RIBEIRO, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2015; CONDEZ *et al.*, 2016; BORNSCHEIN *et al.*, 2016b). Entre essas espécies estão os popularmente conhecidos sapos-pulga (*flea-toads*), representados pelo antigo gênero *Psyllophryne* (IZECKSOHN, 1971; GIARETTA & SAWAYA, 1998; KAPLAN, 2002) e espécies descritas recentemente (NAPOLI *et al.*, 2011; CONDEZ *et al.*, 2016), caracterizados pela coloração críptica e ampla distribuição geográfica e altitudinal (VERDADE *et al.*, 2008; CONDEZ *et al.*, 2016); e também os popularmente conhecidos sapinhos-pingo-de-ouro (*pumpkin toadlets*), majoritariamente de coloração conspícua, associados a microendemismo e essencialmente restritos às encostas e aos topos de morro (CONDEZ *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a).

Análises filogenéticas recentes não apresentam um claro posicionamento dos sapos-pulga (aqui tratados como pertencentes ao grupo de *B. didactylus*, em alusão a espécie mais antiga descrita para este grupo morfológico de espécies; CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; PADIAL *et al.*, 2014). Entretanto, entre os sapinhos-pingo-de-ouro, estes estudos recuperam dois principais clados: o primeiro composto por espécies com distribuição ao norte da Mata Atlântica (aqui tratado como grupo de *B. ephippium*, também em alusão a espécie mais antiga descrita para o grupo) e o segundo composto por espécies com distribuição ao sul da Mata Atlântica (aqui tratado como grupo de *B. pernix*, pela mesma razão exposta acima). O grupo *ephippium* abriga as espécies que ocorrem nos estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; PADIAL *et al.*, 2014), enquanto que o grupo de *B. pernix* contempla as espécies com distribuição conhecida para os estados do Paraná e Santa Catarina (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; PADIAL *et al.*, 2014; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a), sendo o registro de menor ocorrência altitudinal encontrado neste último grupo (455 metros; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Dentre os representantes do grupo de *B. pernix* podemos encontrar 15 espécies associadas às encostas e aos topos de montanhas: *B. albolineatus* Bornschein, Ribeiro, Blackburn, Stanley & Pie 2016; *B. auroguttatus* Ribeiro, Firkowski, Bornschein & Pie, 2015; *B. boticario* Pie, Bornschein, Firkowski, Belmonte-Lopes & Ribeiro, 2015; *B. brunneus* Ribeiro, Alves, Haddad & Reis, 2005; *B. ferruginus* Alves, Ribeiro, Haddad & Reis, 2006; *B. fuscolineatus* Pie, Bornschein, Firkowski, Belmonte-Lopes & Ribeiro, 2015; *B. izecksohni* Ribeiro, Alves, Haddad & Reis, 2005; *B. leopardus* Ribeiro, Firkowski & Pie, 2015; *B. mariaeterezae* Bornschein, Morato, Firkowski, Ribeiro & Pie, 2015; *B. olivaceus* Bornschein, Morato, Firkowski, Ribeiro & Pie, 2015; *B. pernix* Pombal, Wistuba & Bornschein, 1998; *B. pombali* Alves, Ribeiro, Haddad & Reis, 2006; *B. quiririensis* Pie & Ribeiro, 2015; *B.*

tridactylus Garey, Lima, Hartmann & Haddad, 2012; e *B. verrucosus* Ribeiro, Firkowski, Bornschein & Pie, 2015 (SEGALLA *et al.*, 2016; FROST, 2016). Essas espécies são distintas do grupo de *B. ephippium*, principalmente, pela completa ausência de hiperossificação do crânio e esqueleto, além da distribuição geográfica em latitudes elevadas (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009).

Devido a lacunas de amostragens, a descoberta de novas espécies de *Brachycephalus* têm sido constantes na região Sul (RIBEIRO *et al.*, 2015; PIE & RIBEIRO, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016; CONDEZ *et al.*, 2016). Fato este, corroborado também pelo registro inédito para o gênero em baixas altitudes (MONTEIRO *et al.*, dados não publicados) evidenciando que a ocorrência restrita dos sapinhos-pingo-de-ouro em áreas de encosta e altitudes elevadas não é universal. Considerando o encontro desta nova espécie em uma área não amostrada do nordeste do estado de Santa Catarina e sua distribuição altitudinal, atentou-se para a necessidade da ampliação do conhecimento da ocorrência e distribuição de outras populações de *Brachycephalus* na região. Estas informações são de fundamental importância para a conservação destas populações, uma vez que se tratam de anuros com alta sensibilidade a alterações no ambiente (HADDAD *et al.*, 2008; PIE *et al.*, 2013; BORNSCHEIN *et al.* 2016a), com distribuição restrita em áreas com elevado risco de degradação antrópica, como é o caso das baixadas litorâneas.

O presente estudo teve como objetivo principal investigar a ocorrência de populações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Conseqüentemente, apresentamos uma análise de sua distribuição geográfica e altitudinal na região e analisamos a variação entre as populações com base em dados morfológicos, bioacústicos e moleculares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A área de estudo abrange os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, localizados no litoral nordeste do estado de Santa Catarina (entre 26°03' – 26°21'S e 48°36' – 48°48'O). Foi despendido maior esforço de amostragem no município de São Francisco do Sul, que possui uma área insular envolvendo a maior parte de seu território e uma área continental formada por uma península, conhecida como Distrito do Saí. É situado junto ao complexo estuarino da Baía Babitonga, sendo também banhado pelo Oceano Atlântico na sua porção leste. Dois complexos montanhosos foram amostrados, sendo um na ilha, denominado

Serra da Palha, localizada próxima ao bairro Laranjeiras e o outro no continente, conhecido como Serra do Saí, que ocupa quase todo o território do Distrito do Saí. A Serra do Saí em sua face norte encontra-se em área territorial de dois municípios adicionais, Garuva e Itapoá. Por este motivo, estes municípios também foram incorporados às expedições na busca por populações de *Brachycephalus* (Figura 1).

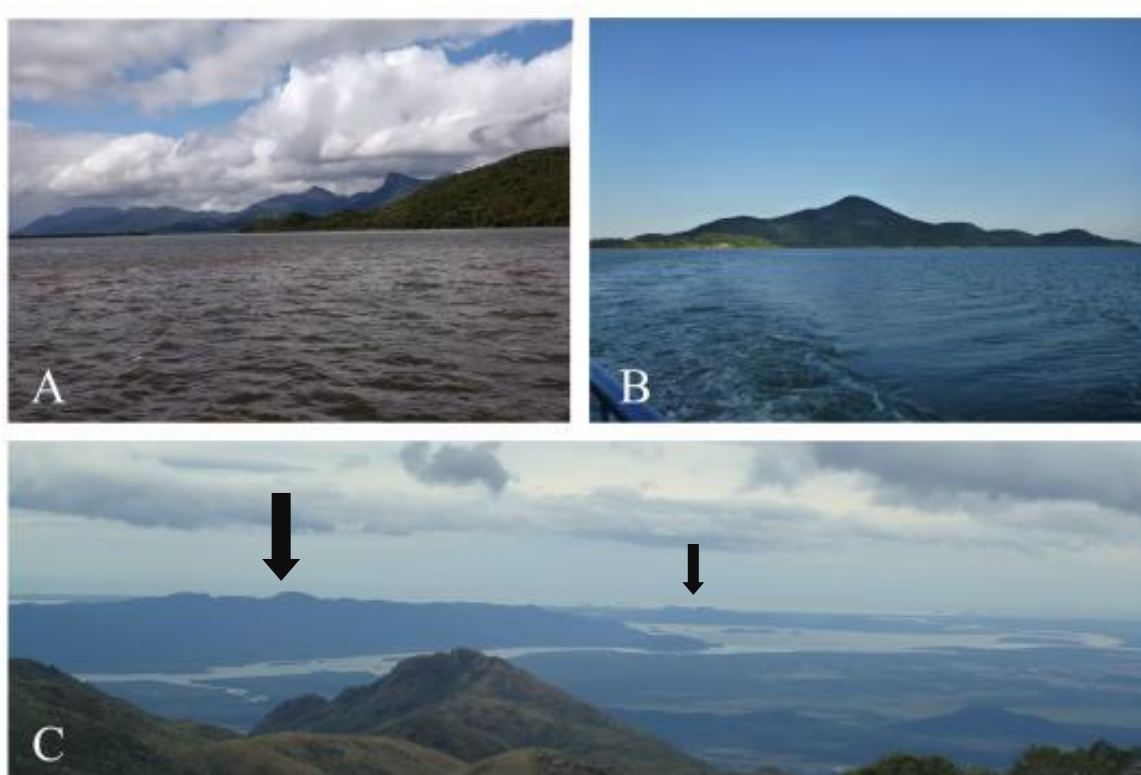


Figura 1 – Área de estudo entre os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. (A) Serra do Saí, vista da Baía da Babitonga; (B) Serra da Palha, vista da Baía da Babitonga; (C) Serra do Saí (representada pela seta à esquerda) e Serra da Palha (representada pela seta à direita), vistas da região continental nos Campos do Quiriri.

No total foram amostradas nove localidades: Bom Futuro, município de Garuva (BF); Braço do Norte, município de Itapoá (BN); Casarão, face leste do Morro do Cantagalo (CAS); Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Universidade da Região de Joinville, Vila da Glória (CEPA); Estrada do Saí (ES); face oeste do Morro do Cantagalo (CTG); Fazenda Morro Grande, Morro Grande, Ilha de São Francisco do Sul (FMG); Palmito Juriti, Serra do Saí (PJ); e Serra da Palha, Ilha de São Francisco do Sul (SP), sendo estas últimas sete localidades pertencentes ao município de São Francisco do Sul (Figura 2).

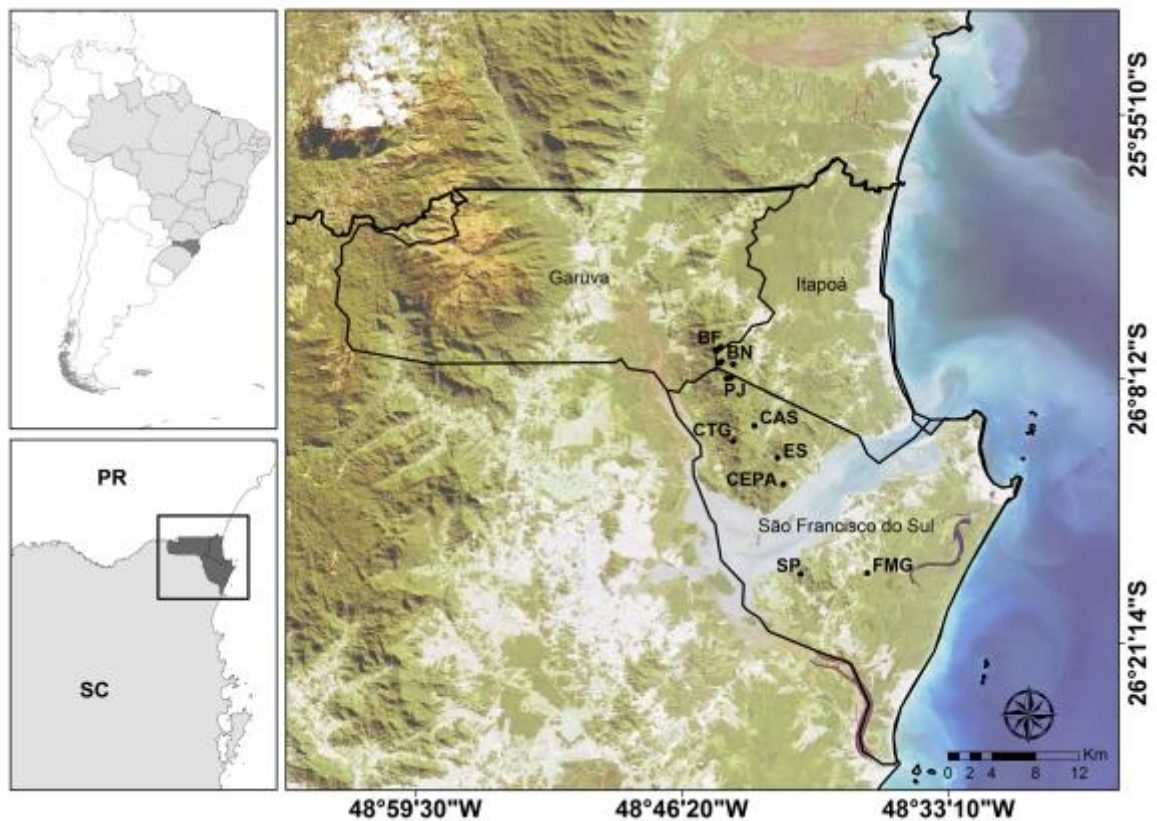


Figura 2 – Área de amostragem entre os municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Os limites dos três municípios amostrados encontram-se delimitados. Acrônimos referentes às localidades: Bom Futuro (BF), Braço do Norte (BN), Palmito Juriti (PJ), Casarão (CAS), Morro do Cantagalo (CTG), Estrada da Saí (ES), Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais (CEPA), Serra da Palha (SP) e Fazenda Morro Grande (FMG). Imagem de satélite evidenciando relevo, vegetação e áreas urbanizadas (manchas brancas). Abreviações dos estados PR = Paraná e SC = Santa Catarina.

Coleta de amostras

A procura por espécimes foi visual e auditiva (adaptado de CRUMP & SCOTT, 1994 e ZIMMERMAN, 1994). Foram realizadas sete expedições a campo, abrangendo o período de maio de 2015 a setembro de 2016, totalizando 35 dias, 568 horas/homem de amostragem. As permissões de coleta foram concedidas pelo ICMBio (SISBIO 6873-1, 23501-6, 45665-2 e 49587-1). Foram coletados 84 espécimes, eutanasiados em lidocaína 5%, fixados em formaldeído 10% e preservados em etanol 70%. Amostras de músculo foram extraídas, individualizadas e armazenadas em etanol para análises de DNA, antes da fixação em formaldeído. Os espécimes coletados foram e/ou serão futuramente depositados na coleção de anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH), Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil e na coleção de anfíbios do Centro de Coleções Taxonômicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Os espécimes ainda não

depositados estão indicados com números de campo, representados pelos acrônimos de Juliane Petry de Carli Monteiro (JPCM) ou Thais Helena Condez (TC) (Apêndice 1).

Adicionalmente, foi analisado todo material depositado na coleção de anfíbios CFBH e Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brasil (MHNCI), incluindo exemplares da área de estudo e espécies filogeneticamente relacionadas (Apêndice 1). Entre o material analisado no MHNCI incluem-se exemplares com etiquetas do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP), que futuramente serão incorporados na coleção MHNCI. Atualmente o material (MHNCI e DZUP) está sob os cuidados do Dr. Luiz Fernando Ribeiro, que gentilmente permitiu a análise dos mesmos para este estudo. Entretanto, não foram disponibilizadas informações detalhadas sobre os espécimes verificados. Essas informações foram solicitadas antes da visita a coleção, na ocasião e posteriormente, mas não foram disponibilizadas até o momento. Alguns espécimes com etiquetas DZUP tiveram a identificação substituída pelo o acrônimo MHNCI, o que impede a correta identificação dos espécimes provenientes das séries-tipo, ao consultar suas descrições originais.

Os espécimes foram analisados, sempre que possível, quanto ao padrão de coloração, osteologia, morfometria, bioacústica e variação molecular. Os indivíduos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) coletados neste estudo foram agrupados em diferentes morfotipos, diferenciados basicamente pelo padrão de coloração, conforme detalhamento apresentado nos resultados. Os indivíduos coletados para este estudo foram, em sua maioria, fotografados em vida com lente macro SIGMA 105 mm F/2.8 EX DG acoplada em uma câmera fotográfica CANON EOS 400D para avaliação do padrão de coloração. Espécimes depositados em coleções não foram considerados para fins comparativos, porque devido ao processo de fixação, perdem a coloração que apresentavam em vida.

Morfometria

Para as análises morfométricas foram considerados os exemplares coletados neste estudo e espécimes depositados em coleções, considerando todas as espécies pertencentes ao grupo de *B. pernix*: *B. albolineatus*, *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. fuscolineatus*, *B. izecksohni*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. quiririensis*, *B. tridactylus*, e *B. verrucosus*. Apesar da ocorrência sintópica, a espécie de sapo-pulga *Brachycephalus sulfuratus* não foi incluída nestas análises por fazer parte do grupo morfológico de *B. didactylus*.

Foram examinados 352 espécimes pertencentes a 15 espécies formalmente descritas e uma espécie ainda não descrita de *Brachycephalus* (*vide* Capítulo I), distribuídos em 26 localidades distintas ao longo da Floresta Ombrófila Densa do Domínio da Mata Atlântica, entre os estados do Paraná e Santa Catarina (Apêndice 2). As mensurações dos espécimes foram obtidas por uma única pessoa (J.P.C. Monteiro), através de lente ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio Zeiss Stemi SV 11 (material analisado na coleção CFBH) e estereomicroscópio Tecnival (material analisado na Universidade Federal do Paraná, proveniente da coleção MHNCI). Estes dados foram utilizados majoritariamente para diferenciação das populações encontradas na área de estudo em relação às demais espécies de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* (MONTEIRO *et al.*, dados não publicados).

Foram coletados 14 caracteres morfométricos, segundo as propostas de Duellman (1970), Cei (1980), Heyer *et al.* (1990) e Condez *et al.* (2016). As medidas tomadas foram: CRC (comprimento rostro-cloacal); CCAB (comprimento da cabeça; da ponta do focinho até o canto da boca); LCAB (largura da cabeça; em vista ventral, maior largura da cabeça em linha reta entre os cantos da boca); DNA (maior diâmetro da narina); DIN (distância internasal; entre as margens internas das narinas); DO (diâmetro do olho); DIO (distância interorbital; entre os cantos anteriores dos olhos); DON (distância olho-narina; do canto anterior do olho para a margem posterior da narina); CBR (comprimento do braço); CABR (comprimento do antebraço); CM (comprimento da mão; entre a dobra do punho até a ponta do dedo mais longo); CCO (comprimento da coxa); CTI (comprimento da tíbia) e CPE (comprimento do pé; medida entre tibiale e fibulare e a ponta artelho mais longo).

Para determinar a existência de dimorfismo sexual, foram verificadas a presença de fenda vocal e saco vocal expandido externamente em machos e a ausência de fendas vocais e a presença de oócitos maduros em fêmeas. Testamos também a diferença de tamanho do corpo entre machos e fêmeas através do teste-T de Welch utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). Foram considerados indivíduos juvenis os que apresentaram $CRC < 5,50$ mm, e subadultos os indivíduos com $CRC < 11,00$ mm em fêmeas e $CRC < 9,00$ mm em machos. O sexo dos indivíduos subadultos foi sempre confirmado pela presença ou ausência de fenda vocal.

Os dados morfométricos foram transformados em valores do tipo z-score para padronização das mensurações (GOTELLI & ELLISON, 2004). Para retirar o efeito do CRC nas demais mensurações, utilizamos regressões lineares de cada caractere morfométrico em relação ao tamanho do corpo (CRC), calculadas no R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). Os padrões de variação populacional na morfometria foram verificados através de

Análise de Variáveis Canônicas (*Canonical Variate Analysis*) (CVA; MANLY, 2004), também elaborados no R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). Nesta análise, foram considerados apenas os espécimes da região de estudo. Indivíduos jovens e subadultos foram desconsiderados. Sendo assim, um juvenil (CFBH 39859), quatro fêmeas subadultas (CFBH 39849, JPCM 349, JPCM 354, TC 280) e dois machos subadultos (JPCM 259, JPCM 341), foram excluídos das análises. Adicionalmente, outros sete indivíduos não foram incluídos nas análises porque não foram passíveis de mensurações, seja por estarem diafanizados (CFBH 39848, CFBH 39846 e TC 261) ou por terem sido utilizados para análise de toxinas e alcaloides (CFBH 39869, CFBH 39871, TC 278 e TC 279). Para a Análise de Variáveis Canônicas, foram agrupados previamente os indivíduos provenientes de localidades com distância geográfica inferior a 6 km do morfotipo 1 e morfotipo 2 (descrito nos resultados abaixo), a saber: as populações da Ilha de São Francisco do Sul e as populações do norte e do sul da Serra do Saí. Os morfotipos 3 e 4 não foram agrupados por terem sido encontrados em apenas uma localidade.

Osteologia

Exemplares foram diafanizados para coloração diferencial de ossos e cartilagens, com vermelho de alizarina e azul de alcian, respectivamente, baseado no procedimento proposto por Taylor & Van Dyke (1985). Um exemplar de cada morfotipo foi analisado, totalizando quatro espécimes. A descrição do esqueleto dos indivíduos foi efetuada através de lente ocular micrométrica acoplada à estereomicroscópio Zeiss Stemi SV 11. A terminologia das estruturas ósseas foi baseada em Trueb (1993) e Duellman & Trueb (1994). O material obtido foi comparado para a verificação de possíveis diferenças osteológicas entre as populações.

Bioacústica

Foram gravados nove machos e analisados os cantos de anúncio das gravações de distintas localidades: duas gravações no município de Itapoá, na localidade Braço do Norte, (uma gravação sem voucher e uma gravação com voucher JPCM 411); e sete no município de São Francisco do Sul, na localidade Casarão (uma gravação sem voucher e uma gravação com voucher TC 262); na localidade Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais (uma gravação sem voucher e uma gravação com voucher CFBH 39848); na localidade face oeste do Morro do Cantagalo (uma gravação com voucher JPCM 345); na localidade Palmito Juriti (uma gravação sem voucher); e na localidade Serra da Palha (uma gravação sem voucher).

As gravações foram obtidas com o gravador digital Marantz PMD-660 acoplado em um microfone unidirecional Sennheiser ME-66, exceto os cantos do voucher CFBH 39848 e gravação sem voucher da localidade Casarão, os quais foram obtidos com um gravador digital Tascam DR-07MKII acoplado em um microfone unidirecional Audio-technica ATR6550. Foram analisados 11–17 cantos por indivíduo utilizando uma frequência de amostragem de 44.1 kHz e 16-bit de resolução no padrão mono. As análises bioacústicas foram realizadas utilizando o programa RAVEN PRO 1.4 (Bioacoustics Research Program, 2011). Os audioespectrogramas foram produzidos por meio de Transformação Rápida de Fourier de 256 pontos, sobreposição 50%, e janela de *hamming*. Foram obtidos 11 parâmetros dos cantos baseados nas definições de Narins *et al.* (2007): (1) duração do canto (s), definido como o tempo desde o início até o final do canto; (2) duração dos intervalos entre os cantos (s), definido como o intervalo entre o final de um canto e o início do próximo canto; (3) número de notas por canto (notas/canto); (4) taxa de repetição de notas (notas/s); (5) duração das notas (ms), definido como o tempo desde o início até o final da nota; (6) número de pulsos por nota (pulsos/nota); (7) taxa de repetição de pulsos (pulsos/s); (8) duração do pulso (ms), definido como o tempo desde o início até o final do pulso; (9) frequência mínima (kHz), (10) frequência máxima e (11) frequência dominante, esta última definida como a banda de frequência em que a energia da nota está concentrada. Exceto para as frequências (parâmetros 9–11), mensuradas nos espectrogramas, todos os outros parâmetros foram mensurados nos oscilogramas.

Análise molecular

O DNA foi extraído através de amostras de músculos conservados em etanol absoluto, seguindo um protocolo padrão de extração de sal adaptado de Maniatis *et al.* (1982). Para a avaliação da variação molecular foi amplificado um fragmento do gene 16S ribossomal RNA (com 505 pares de bases), escolhido por encontrar-se disponível para a maioria das espécies de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* na base de dados do GenBank (FIRKOWSKI *et al.*, 2016). O fragmento foi obtido usando reações em cadeia de polimerase (PCR) com PCR Master Mix (Fermentas), utilizando como oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) as sequências 16Sar-L (CGCCTGTTTATCAAAAACAT) e 16Sbr-H (CCGGTCTGAACTCAGATCACGT), disponíveis em Palumbi *et al.* (1991). Para amplificação de 20µl utilizou-se o Termociclador Multigene Labnet com a desnaturação inicial a 94°C (3 minutos), seguido por 37 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C (20 segundos), anelamento a 50°C (20 segundos), extensão a 68°C (45 segundos), com extensão

final de um ciclo a 68°C (5 minutos). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, evidenciados em GelRed e, *a posteriori*, purificados usando reação enzimática com Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Affimetrix/USB, Cleveland, OH). As amostras foram sequenciadas bidirecionalmente pela MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

As sequências consenso foram criadas com CodonCode Aligner 3.5 (Codon Code Corporation) e o alinhamento estático foi realizado no MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013) utilizando MUSCLE (EDGAR, 2004). Em seguida, as sequências foram alinhadas manualmente buscando maximizar as homologias primárias. As sequências baixadas do GenBank não alinharam-se prontamente às sequências obtidas neste estudo, porque aparentemente foram editadas para a retirada de pares de bases no início, no meio e no final das sequências. Para fins comparativos optamos por excluir, mediante alinhamento, as regiões de *gaps* e as extremidades das sequências aqui obtidas. O arquivo contendo o alinhamento (.fasta) foi importado pelo programa MESQUITE (MADDISON & MADDISON, 2017) e exportados em formato TNT (.tnt).

Para a inferência filogenética foram selecionadas 123 sequências disponíveis no GenBank, representando 14 espécies de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* (Apêndice 3). Além disso, foram incluídas seis sequências de *B. sulfuratus*, espécie sintópica coletada no local de estudo e áreas afins, uma sequência de *B. albolineatus* (espécie do grupo de *B. pernix*) e quatro sequências de representantes não aninhados filogeneticamente no grupo de interesse: *B. didactylus*, *B. ephippium*, *B. hermogenesi* e *B. nodoterga*. Como grupos externos foram utilizadas sequências de *Haddadus binotatus* (1), *Ischnocnema guentheri* (1) e *Ischnocnema parva* (2) (PADIAL *et al.*, 2014). Como representantes das populações de *Brachycephalus* encontradas na área de estudo, foram incorporadas 28 sequências do presente estudo, representando todas as localidades amostradas: BF (1), BN (7), CAS (3), CEPA (4), CTG (4), ES (2), FMG (1), PJ (3) e SP (3) (Apêndice 3).

O critério de otimização escolhido para a reconstrução da hipótese filogenética foi de Máxima Parcimônia (FARRIS, 1983), realizado no programa TNT 1.1 (GOLOBOFF *et al.*, 2008). As estratégias de busca heurística seguiram Berneck *et al.* (2017) onde foram empregadas por meio de *New Technology Search* atingindo a longitude mínima 100 vezes, com nível inicial de 50, incluindo *sectorial searches*, *tree drift* e *tree fusing*. Após, foi realizado o consenso estrito com todas as árvores. Por fim, foram estimadas frequências absolutas de Jackknife (FARRIS *et al.*, 1996) com 1000 réplicas via *New Technology Search* solicitando 10 *hits*. Os resultados dos valores de Jackknife para o suporte foram plotados sobre o consenso estrito.

Adicionalmente, foi estimada a distância genética pareada não corrigida (*uncorrected p-distances*) através das sequências utilizadas para a construção da árvore das localidades amostradas (Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul) e também entre as espécies morfológicamente relacionadas. As diferenças no número de pares de base entre as sequências foram calculadas considerando a deleção completa de *gaps* e *missing data* no programa MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013). As médias da variação entre as sequências obtidas da cada espécie e populações [no caso de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*)], foram obtidas no MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Distribuição geográfica e altitudinal

Não foram encontrados registros anteriores de coleta de *Brachycephalus* para a área de estudo nas coleções científicas consultadas; no entanto, a busca recente em campo por espécimes resultou na coleta de 84 indivíduos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*), provenientes de todas as localidades amostradas.

Os resultados evidenciam a ampla distribuição das populações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) na área de estudo, uma vez que podem ser encontradas por toda a Serra do Saí e Serra da Palha. Além das montanhas de encosta, verificamos a ocorrência na localidade Fazenda Morro Grande, na Ilha de São Francisco do Sul, que se trata de um morro inserido em uma matriz de planície costeira. Foram registrados espécimes em altitudes próximas ao nível do mar (20 metros de altitude acima do nível do mar, 26°17'33"S; 48°40'41"O, Datum WGS 84, registro auditivo), até aproximadamente 500 metros de altitude acima do nível do mar (521 metros de altitude acima do nível do mar, 26°07'43"S; 48°44'30"O, Datum WGS 84, exemplar coletado). A ocorrência de sapinhos-pingo-de-ouro em áreas de baixadas litorâneas é um resultado inédito, pois as espécies com esta morfologia eram conhecidas apenas das encostas e dos topos de montanhas.

3.2 Variação Morfológica

Entre os indivíduos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) coletados, verificamos a existência de quatro morfotipos, diferenciados basicamente pelo padrão de coloração (Figura 3). Estes morfotipos parecem não ocorrer em sintopia ao longo das localidades amostradas.

O morfotipo 1 foi proposto como uma nova espécie, apresentado detalhadamente no Capítulo I deste trabalho (MONTEIRO *et al.*, dados não publicados). Este morfotipo é o

único amplamente distribuído em relação aos outros três, sendo registrado em sete localidades no estado de Santa Catarina: uma no município de Garuva (BF), uma no município de Itapoá (BN) e cinco no município de São Francisco do Sul (CEPA, ES, FMG, PJ e SP). A amplitude altitudinal varia desde próximo ao nível do mar até 282 metros acima do nível do mar. O morfotipo 2 foi descoberto em duas localidades próximas no norte da Serra do Saí desde 339 metros até 521 metros de altitude acima do nível do mar, ambas no estado de Santa Catarina, sendo uma no município de Garuva (BF), e a outra no município de Itapoá (BN). Já, o morfotipo 3 foi encontrado somente no município de São Francisco do Sul, na localidade do Casarão, na face leste do Morro do Cantagalo (CAS), a cerca de 150 metros de altitude acima do nível do mar, apresentando variação de coloração mais acentuada que os demais morfotipos. E, finalmente, o morfotipo 4 foi encontrado somente na localidade da face oeste do Morro do Cantagalo (CTG), a cerca de 265 metros de altitude acima do nível do mar (Figuras 3 e 4).

3.2.1 Coloração em vida e em preservativo

Brachycephalus sp. (aff. *pernix*) morfotipo 1 (n = 38; Apêndice 1), em vida apresenta íris preta; coloração geral do corpo laranja, superfície dorsal coberta por manchas verde-escuro e uma faixa marrom-escuro, que varia entre fracamente até fortemente definida, se estendendo desde a região interorbital até o fim da coluna vertebral; os espécimes coletados na Ilha de São Francisco do Sul sempre apresentaram a faixa dorsal marrom-escuro fracamente definida, sendo que os indivíduos da região continental apresentam variação de fracamente para fortemente definida; a região ventral apresenta manchas irregulares marrons (Figuras 3 A – B e 5 A1 – A3). Em preservativo, a coloração dorsal geral do corpo é marrom; membros anteriores, membros posteriores, dedos das mãos III e IV, e artelho IV, marrons, demais dedos e artelho brancos. Em vista lateral, contorno do olho, ponta do focinho, lábio inferior e canto da boca, brancos. Em vista ventral, coloração geral de fundo branca, com presença de manchas marrons na região gular, região cloacal, nas laterais se estendendo para o dorso e membros anteriores e posteriores; pontuações marrons se distribuem na barriga e pernas (Figura 6 A1 – A4).

Brachycephalus sp. (aff. *pernix*) morfotipo 2 (n = 9; Apêndice 1), em vida apresenta íris preta; coloração geral do corpo laranja com a superfície dorsal do corpo coberta por uma grande mancha marrom; alguns indivíduos apresentam manchas brancas irregulares nas regiões dorsal e lateral do corpo, bem como nos membros posteriores (Figuras 3 C – D e 5 B1 – B3). Em preservativo, a coloração dorsal geral do corpo é creme-pálido, coberto por uma

grande mancha irregular marrom; membros anteriores com poucas manchas, sendo ausentes nas mãos; membros posteriores cobertos por manchas, sendo ausentes nos pés; em vista lateral, a coloração creme-pálido predomina no contorno do olho, na ponta do focinho, nos lábios superior e inferior e no canto da boca. Em vista ventral, coloração geral creme-pálido, com manchas brancas irregulares distribuídas na região gular, barriga, membros anteriores e posteriores; na barriga pontuações irregulares marrons (Figura 6 B1 – B4).

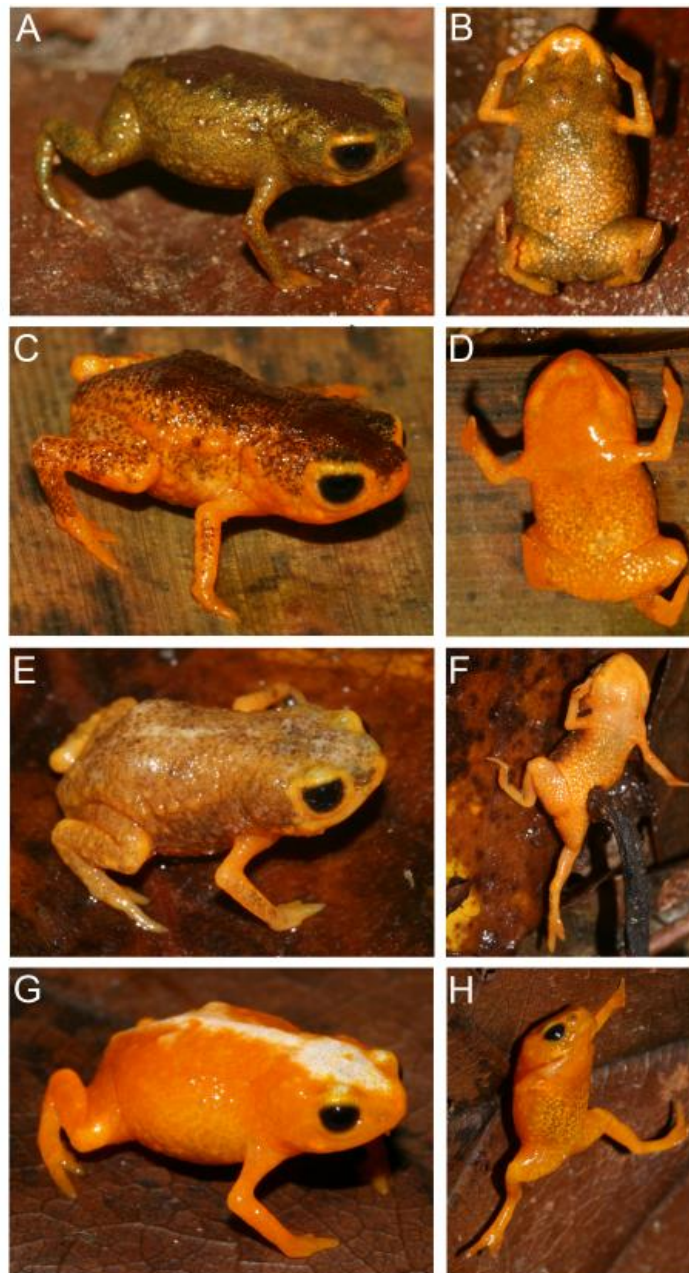


Figura 3 – Vista dorsolateral e ventral em vida dos quatro morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. (A e B) Morfotipo 1, (C e D) morfotipo 2, (E e F) morfotipo 3 e (G e H) morfotipo 4. Fotos: T. H. Condez.

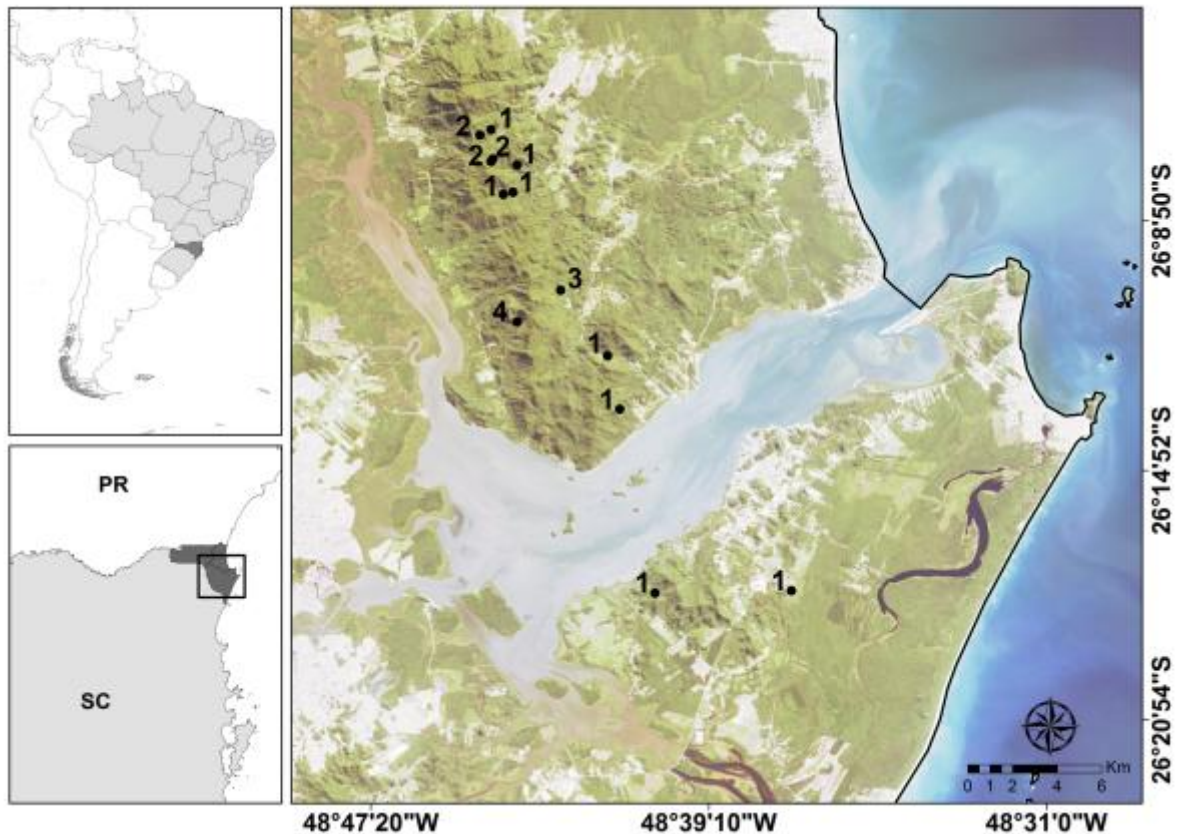


Figura 4 – Distribuição dos morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Os números correspondem aos morfotipos encontrados em cada localidade. Imagem de satélite evidenciando relevo, vegetação e áreas urbanizadas (manchas brancas). Abreviações dos estados PR = Paraná e SC = Santa Catarina.

Brachycephalus sp. (aff. *pernix*) morfotipo 3 (n = 13; Apêndice 1), em vida apresenta íris preta ou dourada (n = 3); a coloração geral do corpo é laranja, sendo coberto na região dorsal por manchas de coloração branca, marrom e/ou marrom-esverdeado (Figuras 3 E – F e 5C1 – C3). Essa população é a mais variável e polimórfica. Em preservativo, a coloração geral do dorso é marrom com presença de manchas creme-pálido irregulares; membros anteriores com coloração de fundo creme-pálido e manchas irregulares marrom, nas mãos apenas dedo III apresenta mancha marrom; membros posteriores principalmente cobertos pela coloração marrom com manchas creme-pálido, nos pés predomina a coloração creme-pálido. Em vista lateral, a coloração creme-pálido predomina no contorno do olho, na ponta do focinho, nos lábios superior e inferior e no canto da boca. Em vista ventral, coloração geral de fundo creme-pálido, com presença de manchas marrons na região gular, região cloacal, nas laterais se estendendo para o dorso, e nos membros anteriores e posteriores; pontuações marrons se distribuem na barriga, pernas, membros anteriores e posteriores (Figura 6 C1–C4).

Brachycephalus sp. (aff. *pernix*) morfotipo 4 (n = 24; Apêndice 1), em vida apresenta íris preta; coloração geral do corpo laranja, apresentando uma faixa dorsal branca fortemente marcada, que se inicia na região interorbital direcionando-se até o final da coluna vertebral, podendo não ser tão evidente em alguns espécimes (Figuras 3 G – H e 5 D1–D3). Em preservativo, a coloração dorsal geral é creme-pálido; presença de faixa dorsolateral delimitada por grânulos marrons; diminutas pontuações se distribuem por todo dorso de cor marrom. Em vista lateral é predominantemente creme-pálido. Em vista ventral, a coloração geral é creme-pálido, com manchas brancas irregulares e manchas amarelas irregulares, sendo esta última também contornando o lábio inferior; diminutas pontuações se distribuem por toda região ventral de cor marrom; barriga com pontuações maiores de cor marrom (Figura 6 D1–D4).

3.2.2 Dimorfismo sexual e morfometria

Foram analisados 70 indivíduos adultos provenientes de todas as localidades amostradas, sendo 30 fêmeas e 40 machos (Tabela 1). O tamanho do corpo é maior em fêmeas (CRC fêmeas: \bar{x} = 11,81 mm, amplitude 11,13 – 13,07) com relação aos machos (CRC machos: \bar{x} = 10,04 mm, amplitude 9,19 – 10,81), o que revela a presença de dimorfismo sexual em CRC nestas populações (Welch's t-test T = 16,63, DF = 52,45, p < 0,01).

Seis conjuntos de dados foram considerados para a análise da variação morfométrica, de acordo com a localização geográfica e morfotipo apresentado: MORFO1_N (n = 3; morfotipo 1, localidades ao norte da Serra do Saí até 300 metros acima do nível do mar; Bom Futuro, Braço do Norte e Palmito Juriti); MORFO1_S (n = 8; morfotipo 1, localidades ao sul da Serra do Saí; CEPA e Estrada do Saí); MORFO1_I (n = 5; morfotipo 1, localidades da Ilha de São Francisco do Sul; Serra da Palha e Morro Grande); MORFO2 (n = 7; morfotipo 2, localidades ao norte da Serra do Saí acima de 300 metros do nível do mar; Braço do Norte e Bom Futuro); MORFO3 (n = 9; morfotipo 3, localidade casarão, face leste do Morro Cantagalo); e MORFO4 (n = 8; morfotipo 4, localidade face oeste do Morro do Cantagalo). Somente machos foram avaliados (n = 40), devido o baixo número amostral de fêmeas nos conjuntos de dados MORFO1_S (n = 3), MORFO1_I (n = 2), MORFO2 (n = 2) e MORFO3 (n = 3).

A análise de variáveis canônicas mostrou que 68,06% da variação morfométrica nos machos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) é explicada nos dois primeiros eixos canônicos (EC1 e EC2). O eixo EC1 explicou 41,67% e está correlacionado negativamente com o comprimento do braço (CBR) e correlacionado positivamente com o diâmetro da narina

(DNA). Já o eixo EC2 explicou 26,39% e está correlacionado positivamente com o comprimento da coxa (CCO) (Tabela 2, Figura 7). Os resultados demonstraram a distinção de três grupos dentre os morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados na região de São Francisco do Sul (Figura 7).



Figura 5 – Variação de coloração em vida dos quatro morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. (A) morfotipo 1: (A1) JPCM 361, (A2) JPCM 366, (A3) JPCM 397. (B) morfotipo 2: (B1) JPCM 392, (B2) JPCM 393, (B3) JPCM 409. (C) morfotipo 3: (C1) TC 260, (C2) TC 255, (C3) TC 258. (D) morfotipo 4: (D1) TC 281, (D2) TC 278, (D3) TC 284. Fotos: T. H. Condez.

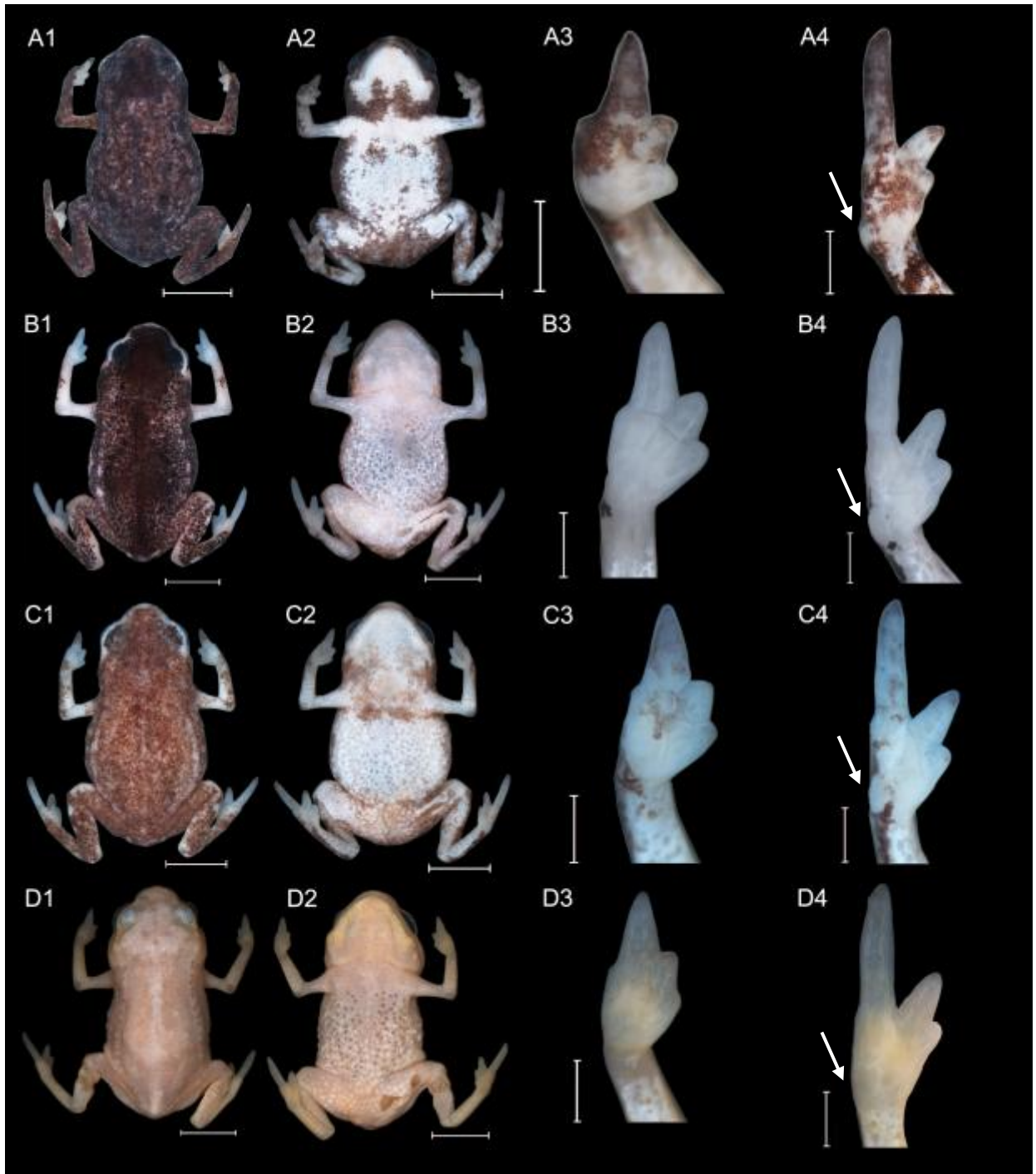


Figura 6 – Variação de coloração em preservativo dos quatro morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. (A) morfotipo 1 (holótipo, CFBH 39850), (B) morfotipo 2 (JPCM 409), (C) morfotipo 3 (TC 260) e (D) morfotipo 4 (JPCM 353). Em colunas apresentamos (1) vista dorsal, (2) vista ventral, (3) vista ventral da mão direita e (4) vista ventral do pé direito. Setas indicam ausência ou presença do tubérculo metatarsal externo. Barra de escala corresponde a 2 mm.

O comprimento do braço (CBR) representou a variável mais significativa para explicar a variação morfométrica entre os morfotipos no EC1. Sendo assim, um maior comprimento

do braço é observado em MORFO1_N ($\bar{x} = 2,16 \pm 0,18$; amplitude 1,98 – 2,35), seguido dos conjuntos MORFO4 ($\bar{x} = 2,07 \pm 0,22$; amplitude 1,83 – 2,35), MORFO1_S ($\bar{x} = 2,07 \pm 0,14$; amplitude 1,86 – 2,29), MORFO2 ($\bar{x} = 2,06 \pm 0,10$; amplitude 1,92 – 2,20), MORFO1_I ($\bar{x} = 2,03 \pm 0,22$; amplitude 1,83 – 2,35) e MORFO3 ($\bar{x} = 1,96 \pm 0,15$; amplitude 1,68 – 2,17). O diâmetro da narina (DNA) também se mostrou significativo no mesmo eixo, a medida que valores positivos representam maior diâmetro da narina. Entretanto, na análise das médias por população não foi possível identificar uma variação significativa nestes valores: MORFO3 ($\bar{x} = 0,36 \pm 0,03$; amplitude 0,33 – 0,43), MORFO1_S ($\bar{x} = 0,36 \pm 0,03$; amplitude 0,33 – 0,43), MORFO1_I ($\bar{x} = 0,34 \pm 0,03$; amplitude 0,28 – 0,37), MORFO4 ($\bar{x} = 0,34 \pm 0,01$; amplitude 0,33 – 0,36), MORFO1_N ($\bar{x} = 0,31 \pm 0,07$; amplitude 0,23 – 0,36), e MORFO2 ($\bar{x} = 0,25 \pm 0,05$; amplitude 0,17 – 0,31). No EC2 a variável mais significativa para explicar a variação morfométrica foi o comprimento da coxa (CCO) sendo que as maiores médias foram encontradas entre as populações MORFO4 ($\bar{x} = 4,24 \pm 0,14$; amplitude 4,09 – 4,47), MORFO1_S ($\bar{x} = 4,06 \pm 0,19$; amplitude 3,79 – 4,32), MORFO3 ($\bar{x} = 4,03 \pm 0,18$; amplitude 3,79 – 4,32), e as menores médias nas populações MORFO1_I ($\bar{x} = 3,99 \pm 0,21$; amplitude 3,79 – 4,24), MORFO1_N ($\bar{x} = 3,94 \pm 0,20$; amplitude 3,79 – 4,17) e MORFO2 ($\bar{x} = 3,91 \pm 0,20$; amplitude 3,71 – 4,17).

Tabela 1 – Medidas (em milímetros) dos adultos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Para cada medida é apresentada a média (\bar{x}), o desvio padrão (DP) e os valores mínimos e máximos (amplitude) em cada sexo. Consultar Material e Métodos para as definições dos acrônimos das medidas.

	Machos (n = 40)			Fêmeas (n = 30)		
	\bar{x}	DP	amplitude	\bar{x}	DP	amplitude
CRC	10,04	0,37	9,19 – 10,81	11,81	0,49	11,13 – 13,07
CCAB	2,03	0,12	1,78 – 2,29	2,28	0,15	2,06 – 2,72
LCAB	3,48	0,22	2,93 – 3,90	3,96	0,24	3,42 – 4,39
DNA	0,33	0,05	0,17 – 0,43	0,35	0,05	0,24 – 0,43
DIN	1,18	0,07	1,06 – 1,33	1,32	0,08	1,14 – 1,55
DO	1,28	0,06	1,17 – 1,39	1,39	0,07	1,22 – 1,62
DIO	2,10	0,10	1,90 – 2,29	2,37	0,16	2,13 – 2,79
DON	0,62	0,05	0,47 – 0,68	0,69	0,06	0,57 – 0,84
CBR	2,05	0,17	1,68 – 2,35	2,32	0,19	1,98 – 2,75
CABR	2,08	0,13	1,78 – 2,29	2,33	0,16	2,06 – 2,72
CM	1,71	0,13	1,37 – 1,92	1,95	0,14	1,53 – 2,20
CCO	4,05	0,21	3,71 – 4,47	4,54	0,21	3,79 – 5,00
CTI	3,40	0,21	3,03 – 4,32	3,81	0,19	3,34 – 4,09
CPE	4,76	0,21	4,24 – 5,15	5,40	0,26	4,93 – 5,84

Tabela 2 – Resultados da Análise de Variáveis Canônicas (CVA) das medidas morfométricas de machos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) pertencentes aos quatro morfotipos encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Valores destacados correspondem aos mais representativos. EC = Eixo Canônico.

Variáveis	EC1	EC2
CCAB	0,24	-1,49
LCAB	0,75	1,19
DNA	-9,11	0,35
DIN	-0,72	-1,55
DO	1,17	-0,91
DIO	-0,49	0,26
DON	0,36	-1,12
CCO	-2,90	5,11
CTI	1,42	-1,01
CPE	-0,09	-0,57
CBR	11,28	1,10
CABR	-1,64	-0,89
CM	-0,02	-0,74
Autovalores	2,53	1,60
Variância %	41,67	26,39
Cumulativo %		68,06

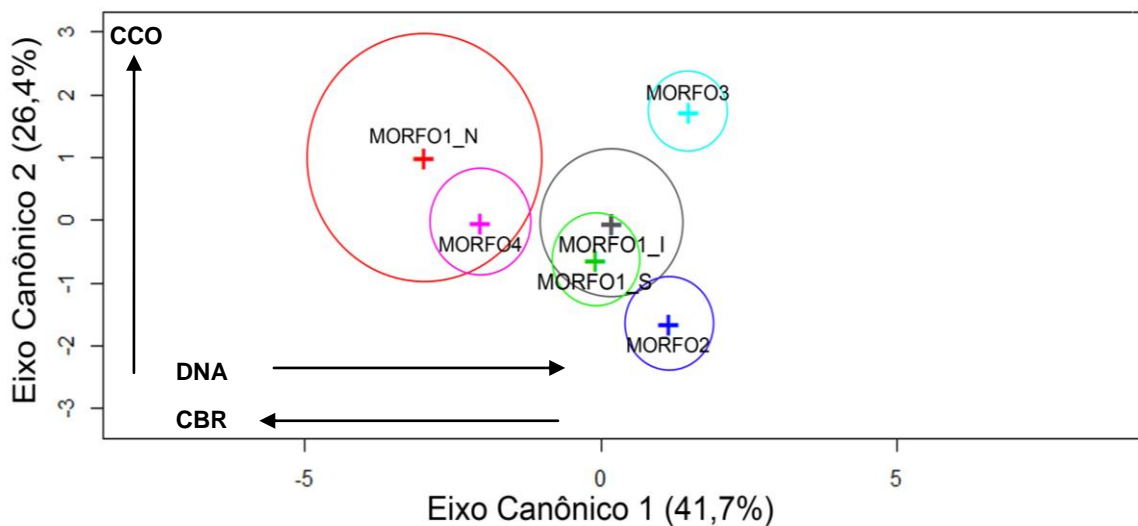


Figura 7 – Análise de Variáveis Canônicas para os machos das populações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. MORFO1_N (n = 3): morfotipo 1, localidades ao norte da Serra do Saí, Braço do Norte e Bom Futuro; MORFO1_S (n = 8): morfotipo 1, localidades ao sul da Serra do Saí, CEPA e Estrada do Saí; MORFO1_I (n = 5): morfotipo 1, localidades da Ilha de São Francisco do Sul, Serra da Palha e Morro Grande; MORFO2 (n = 7): morfotipo 2, localidades Braço do Norte e Bom Futuro; MORFO3 (n = 9): morfotipo 3, localidade Casarão; e MORFO4 (n = 8): morfotipo 4, localidade face oeste do Morro do Cantagalo. Círculos demonstram os intervalos de confiança de 95%. As setas indicam as correlações dos caracteres mais significativos em cada eixo (CBR, DNA e CCO).

3.2.3 Osteologia

O procedimento de diafanização foi realizado em seis indivíduos, dois pertencente ao morfotipo 1 (CFBH 39848 e CFBH 39846), um representando o morfotipo 2 (JPCM 401), dois indivíduos pertencentes ao morfotipo 3 (JPCM 355 e TC261), e, por fim, um indivíduo do morfotipo 4 (TC 285). Todavia, devido ao pequeno tamanho dos exemplares e dificuldade de realização do processo de diafanização sem perda completa do exemplar, somente um exemplar de cada morfotipo encontra-se em condições de análise osteológica (CFBH 39848, JPCM 401, JPCM 355, TC 285). O indivíduo CFBH 39848 foi utilizado para descrição osteológica completa da nova espécie descrita no Capítulo I. Nos demais morfotipos não foi possível a descrição dos ossos da cabeça nem da cintura peitoral, devido a problemas decorrentes do processo de diafanização.

Os quatro morfotipos apresentam coluna vertebral composta por oito vértebras pré-sacrais, não imbricadas; hiperossificação ausente nos processos transversos das vértebras; o processo transversal da primeira vértebra pré-sacral é distinguível, mas muito pequeno quando comparado a todos os outros; os processos transversos pré-sacrais não são ornamentados; comprimento dos processos transversos pré-sacrais: $I < II \cong VI \cong VII \cong VIII < V < IV < III$; diapófise sacral moderadamente expandida; uróstilo com comprimento ligeiramente maior que a região pré-sacral. Húmero e antebraço aproximadamente de mesmo tamanho; rádio e ulna completamente fundidos, carpos distais das mãos (I – IV) fundidos com centrale, radiale e ulnare aproximadamente de mesmo tamanho; um elemento prepóico; fórmula falangeal 1 – 2 – 3 – 1; ponta dos elementos falangeais terminais dos dedos I e IV arredondadas e ponta dos dedos II e III em forma de seta. Membros posteriores com tíbia e fíbula fundidas formando a tibiofíbula; fêmur e tíbiofíbula são aproximadamente de mesmo tamanho; fibulare e tibiale fundidas, mas distinguíveis; pés com elemento tarsal distal I – III presentes e IV e V ausentes; centrale presente; um elemento do pré-hálux muito reduzido presente; fórmula falangeal 1 – 2 – 3 – 4 – 0; ponta dos elementos falangeais terminais dos dedos I, II e V apontados, III e IV em forma de seta.

3.2.4 Caracteres morfológicos adicionais

Adicionalmente aos padrões observados de variação de coloração em *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) foi observada variação na linha de grânulos dorsolateral nos diferentes morfotipos. Esta linha pode ser fracamente definida a bem definida, mas mostrou-se sempre presente. O tubérculo metatarsal externo foi sugerido como caráter diagnóstico utilizado nas descrições de espécies do grupo de *B. pernix* (RIBEIRO *et al.*, 2015). Dessa forma, esse caráter foi analisado em 71 espécimes dentre os quatro morfotipos encontrados. No morfotipo

1 (n = 33) há indivíduos que apresentam essa estrutura (67%) e indivíduos que não apresentam (33%). No morfotipo 2 (n = 8) também houve variação desse caráter estando presente (63%) e ausente (38%), bem como no morfotipo 3 (n = 10), da mesma forma, presente (40%) e ausente (60%). Nesses três morfotipos foi observado que esse caráter varia dentro de uma mesma população e a presença ou ausência não está relacionada com o sexo do exemplar. Já, no morfotipo 4 (n = 20) todos os indivíduos analisados não apresentam tubérculo metatarsal externo (veja setas da Figura 6).

3.3 Variação Bioacústica

A estrutura básica dos cantos de anúncio foi analisada em conjunto para os nove machos gravados e pode ser definida pela presença de uma nota de alta frequência, repetida em uma taxa de 0,1 – 0,3 segundos ($\bar{x} = 0,2 \pm 0,1$; n = 125). O canto possui duração de 0,02 – 0,04 segundos ($\bar{x} = 0,03 \pm 0,01$; n = 125) e o intervalo entre os cantos é de 3,3 – 7,7 ($\bar{x} = 5,0 \pm 1,6$; n = 114). As notas podem ser compostas de 2 – 3 pulsos ($\bar{x} = 2 \pm 0$; n = 125), repetidos em uma taxa de 0,3 – 0,9 pulsos/segundo ($\bar{x} = 0,5 \pm 0,2$; n = 292). A frequência mínima é de 6,0 – 7,0 kHz ($\bar{x} = 6,3 \pm 0,3$; n = 125), a frequência máxima é de 7,0 – 7,7 kHz ($\bar{x} = 7,5 \pm 0,2$; n = 125) e a frequência dominante é de 6,4 – 7,3 kHz ($\bar{x} = 6,7 \pm 0,3$; n = 125).

As análises comparativas entre os morfotipos analisados revelaram variações nos parâmetros duração do canto, pulsos/nota e nas frequências entre os morfotipos analisados, embora o baixo número amostral de cantos por localidade não possibilitou a realização de comparações estatísticas para comprovar se há diferenças significativas entre as populações (Apêndice 3). Os cantos com maior duração (0,04 segundos) foram observados nos morfotipos 3 e 4, sendo muito similares aos cantos dos morfotipos 1 e 2 (0,03 e 0,02 segundos, respectivamente). Os morfotipos 1 e 2 sempre apresentaram dois pulsos. Em contrapartida o morfotipo 3 apresentou de dois a quatro pulsos e o morfotipo 4 de três a quatro pulsos. Essa variação de pulsos ocorreu dentro de uma gravação, ou seja, um indivíduo estava variando os pulsos entre seus cantos. Já, as frequências foram mais elevadas nos morfotipos 1 e 2 em relação aos morfotipos 3 e 4. Cabe observar, que uma gravação de um indivíduo do morfotipo 1 possui frequência mínima (7,0 kHz) igual a frequência máxima do indivíduo gravado do morfotipo 4 (Figura 8; Tabela 3). No entanto, os outros quatro indivíduos gravados do morfotipo 1 apresentaram frequência mínima 6,0 – 6,5 kHz.

Tabela 3 – Análise acústica dos cantos de anúncio dos morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontrados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. n = número de machos analisados.

Parâmetro	Morfotipo 1 (n = 5)	Morfotipo 2 (n = 1)	Morfotipo 3 (n = 2)	Morfotipo 4 (n = 1)
Notas/canto	1	1	1	1
Duração do canto (ms)	0,03 ± 0,00 (0,02 – 0,03)	0,02	0,04 ± 0,01 (0,03 – 0,04)	0,04
Intervalo entre os cantos (s)	5,2 ± 1,7 (3,5 – 7,7)	7,3	4,0 ± 1,1 (3,3 – 4,8)	4,1
Taxa de repetição (cantos/s)	0,2 ± 0,1 (0,1 – 0,3)	0,1	0,3 ± 0,1 (0,2 – 0,3)	0,3
Pulsos/nota	2 ± 0 (2)	2 ± 0 (2)	3 ± 1 (2 – 4)	3 ± 1 (3 – 4)
Duração do pulso/ms	0,01 ± 0,00 (0,01)	0,01	0,02 ± 0,00 (0,01)	0,01
Taxa de repetição (pulsos/s)	0,5 ± 0,1 (0,3 – 0,6)	0,3	0,6 ± 0,0 (0,6)	0,9
Frequência mínima (kHz)	6,4 ± 0,4 (6,0 – 7,0)	6,5	6,0 ± 0,0 (6,0 – 6,1)	6,1
Frequência máxima (kHz)	7,5 ± 0,2 (7,3 – 7,7)	7,7	7,4 ± 0,0 (7,4)	7,0
Frequência dominante (kHz)	6,8 ± 0,3 (6,4 – 7,3)	6,9	6,6 ± 0,1 (6,5 – 6,6)	6,5

3.4 Variação Molecular

As sequências de DNA alinhadas e concatenadas resultaram em 505 pares de bases. A análise filogenética recuperou 273 árvores mais parcimoniosas de 254 passos. Foi utilizado o consenso estrito para representar a árvore, que resultou em uma topologia onde todos os morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) da região de São Francisco do Sul foram recuperados como um grupo monofilético, com 92% de suporte para Jackknife. Dentro do clado de *B.* sp. (aff. *pernix*) é possível observar que as populações da Ilha de São Francisco do Sul (FMG e SP) tendem a ficar aninhadas, assim como as do sul da Serra do Saí (CEPA e ES), da região mais central da Serra do Saí (CAS e CTG), e do norte da Serra do Saí (BF e BN). Todavia, CAS e CEPA também se encontram aninhadas com as populações do norte. A população PJ do norte se encontra aninhada com as populações do norte e também com as populações da Ilha, embora nenhuma dessas considerações apresente suporte.

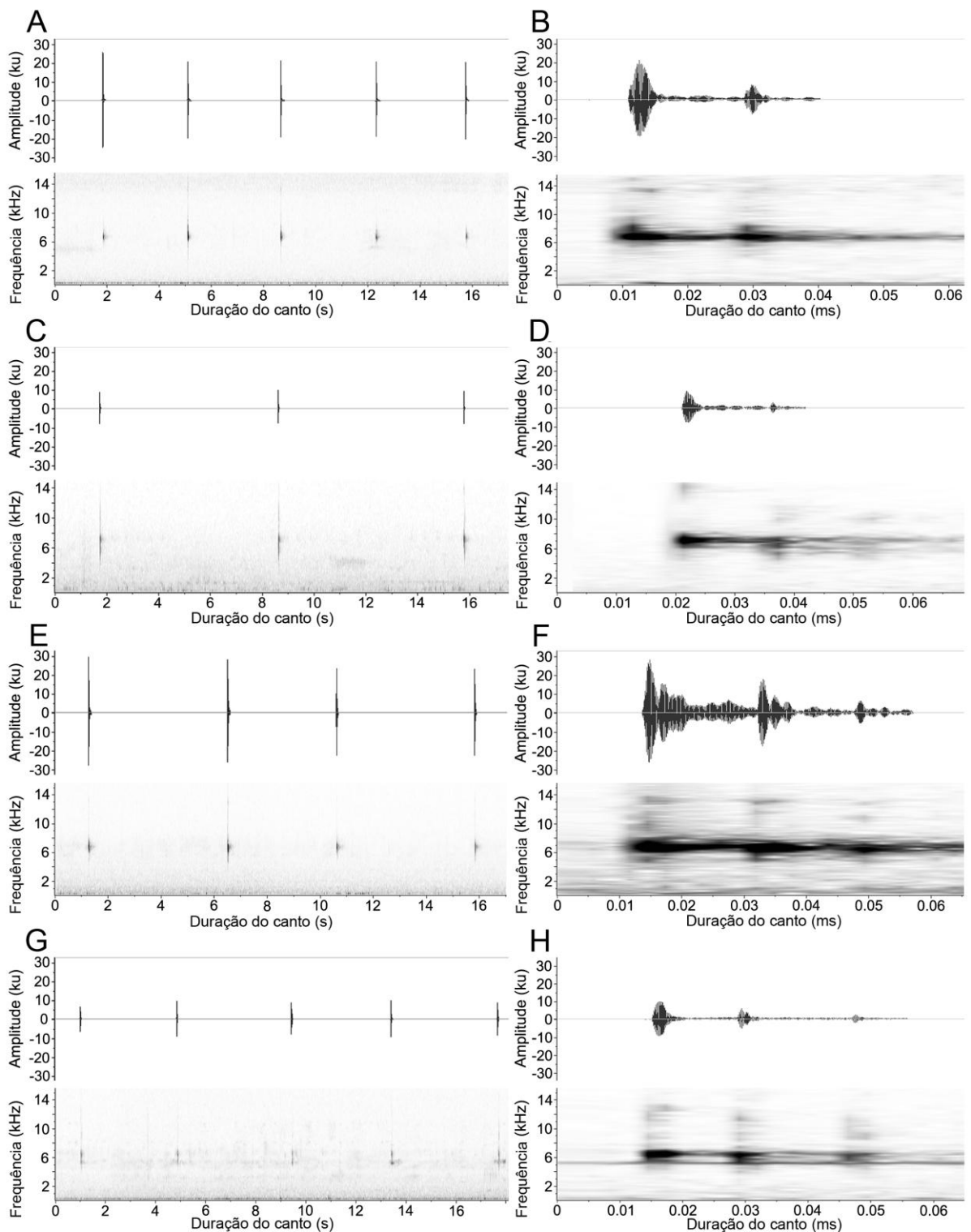


Figura 8 – Oscilogramas (acima) e espectrogramas (abaixo) dos morfotipos de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Gráficos à esquerda representam cantos consecutivos de cada morfotipo em uma mesma escala temporal. Gráficos à direita representam em detalhe um canto. (A e B) morfotipo 1 (CFBH 39848), Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais; (C e D) morfotipo 2 (JPCM 411), Braço do Norte; (E e F) morfotipo 3 (TC 262), Casarão; (G e H) morfotipo 4 (JPCM 345), Morro do Cantagalo.

Brachycephalus ephippium e *B. sulfuratus* foram recuperadas como espécies monofiléticas relacionadas externamente ao clado das espécies do grupo de *B. pernix*. Dentro do grupo de *B. pernix*, *B. tridactylus*, *B. brunneus*, *B. izecksohni* e *B. leopardus* foram recuperadas em um clado. Destes, apenas *B. tridactylus* e *B. leopardus* são espécies monofiléticas. *B. boticario* e *B. fuscolineatus* são recuperados como um clado, mas não há suporte para diferenciar as duas espécies. Outro clado que relaciona as espécies *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*), *B. olivaceus*, *B. mariaeterezae*, *B. auroguttatus*, *B. verrucosus*, *B. quiririensis*, *B. pombali*, *B. ferruginus* e *B. pernix* é suportado; no entanto, apenas *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) e *B. quiririensis* são espécies monofiléticas (Figura 9).

A distância genética de *Brachycephalus sulfuratus* varia de 6,7 – 11,4% em relação aos representantes do grupo de *B. pernix*. A distância genética média entre as espécies grupo de *B. pernix* varia de 0 – 5,8%. Muitas espécies formalmente descritas do grupo *B. pernix* apresentam distâncias genéticas acentuadamente baixas. Por exemplo, *B. brunneus* e *B. izecksohni* possuem uma distância genética de 0,1% e são próximos a *B. leopardus*, diferindo desta espécie em 0,6% e 0,7% respectivamente. Outras espécies associadas são *B. pombali* e *B. pernix*, bem como *B. ferruginus* e *B. pernix*, que apresentam apenas 0,2 e 0,3% de distância genética entre as espécies. Entre *B. ferruginus* e *B. pombali* a distância genética é zero. *B. auroguttatus* e *B. mariaeterezae* possuem distância genética de 0,5%, ao passo que este último diverge de *B. olivaceus* em 0,4%. *B. albolineatus*, *B. fuscolineatus* e *B. boticario* divergem 0,5% (Tabela 4).

A distância genética média de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) em relação aos seus congêneres do grupo de *B. pernix* apresenta uma amplitude de 1,7 – 6,0% (exceto *B. sulfuratus*), sendo as espécies mais próximas *B. auroguttatus* e *B. mariaeterezae* com 1,8% e 1,7% de distância genética respectivamente, e *B. tridactylus* mais distantes com 6,0% (Tabela 4). *B. ferruginus*, *B. olivaceus*, *B. pernix*, *B. pombali*, *B. quiririensis* e *B. verrucosus* também podem ser consideradas mais proximamente relacionadas com *B. sp.* (aff. *pernix*) variando entre 1,9 – 2,4%.

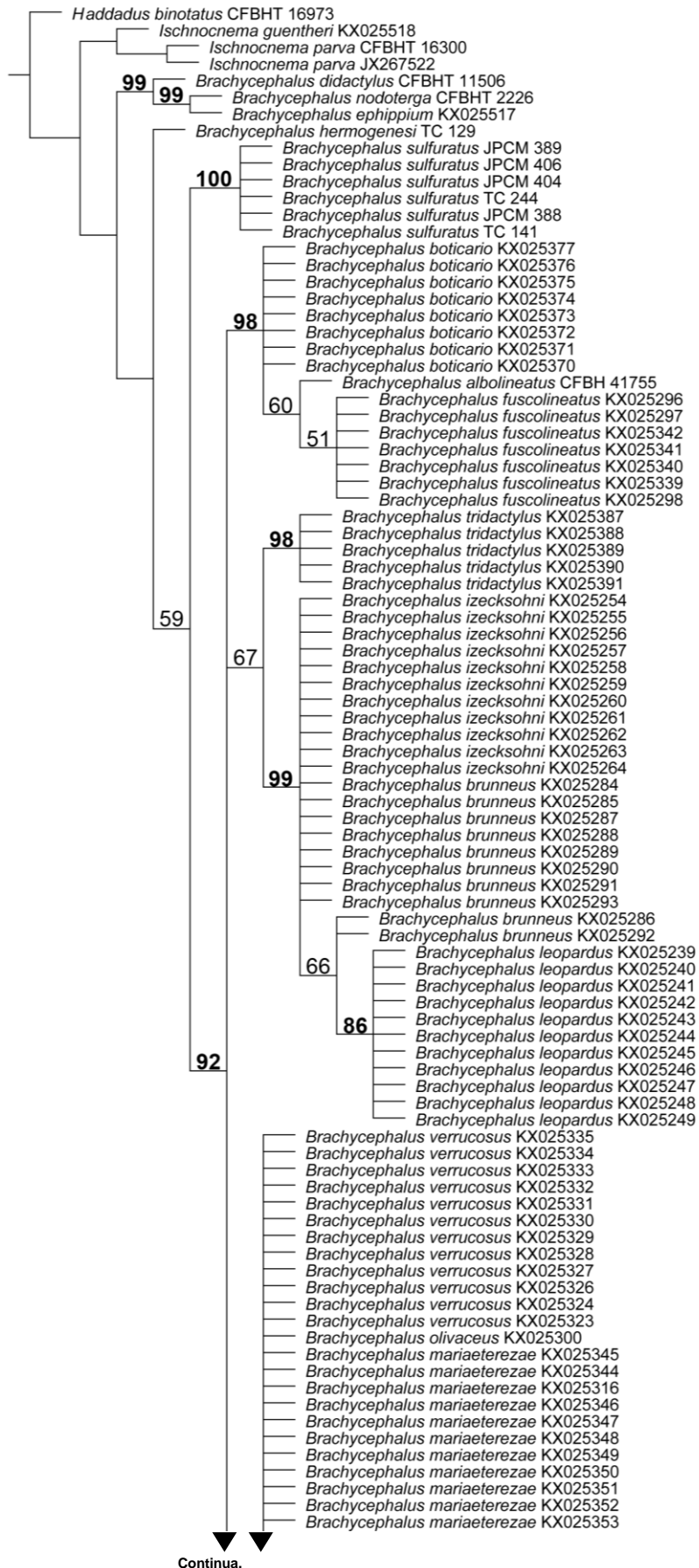


Figura 9 – Consenso estrito das 1176 árvores mais parcimoniosas mostrando os valores de suporte de Jackknife para *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix*. Em cores estão representadas as sequências de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*), da região de São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Em verde, sequências provenientes de indivíduos do morfotipo 1; em marrom morfotipo 2; em magenta morfotipo 3; e em laranja morfotipo 4. Apenas apresentam valor de suporte aqueles acima de 70%. Para os acrônimos das localidades consulte Material e Métodos. As sequências utilizadas nesta análise são apresentadas no Apêndice 4.

Continuação.

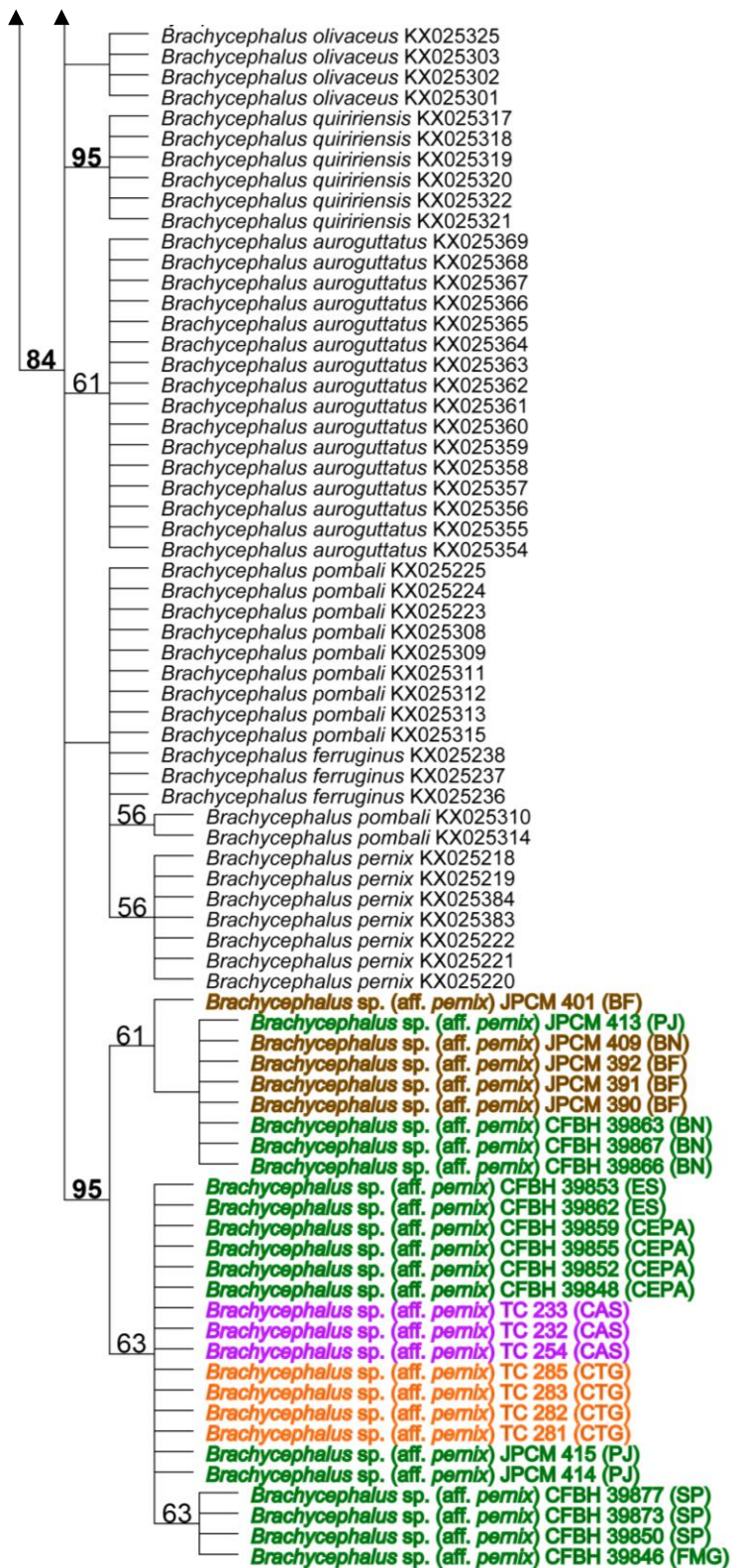


Figura 9 – Continuação.

Dentre os morfotipos amostrados de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) a distância genética média entre as populações encontradas corresponde a 0,4%, sendo sua amplitude 0 – 1,1%. A maior diferenciação ocorre entre as espécies do norte da Serra do Saí (BF e BN) e as localidades da Ilha de São Francisco do Sul (FMG e SP), apresentando de 0,8–1,1% de distância genética. No entanto, nota-se que a população da localidade PJ, no norte da Serra do Saí, apresenta distância genética entre 0,4% e 0,6% em relação às populações das localidades da Ilha e de 0,5% em relação à população da localidade limítrofe BN (Tabela 5).

As médias do número total de sequências obtidas para cada espécie de *Brachycephalus* do grupo *pernix* e para as populações de *B.* sp. (aff. *pernix*) foram calculadas. Assim, a média de variação entre as sequências de *B. boticario*, *B. ferruginus*, *B. fuscolineatus*, *B. leopardus*, *B. pernix*, *B. mariaeterezae* e *B. quiririensis* é zero. Para *B. auroguttatus*, *B. brunneus*, *B. izecksohni*, *B. pombali*, *B. sulfuratus* e *B. tridactylus* a variação foi 0,1% e para *B. olivaceus* a variação é 0,2%. Já para *B. verrucosus* e *B.* sp (aff. *pernix*) a variação encontrada entre as sequências foi maior, sendo 0,5% e 0,4% respectivamente.

Tabela 4 – Distâncias genéticas (%) entre as espécies de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* e a espécie simpátrica *B. sulfuratus* utilizando distâncias pareadas não corrigidas (*uncorrected p-distance*) para o fragmento 16S (16Sar-l e 16Sbr-h). n = número de sequências analisadas.

	Espécie	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>B. sulfuratus</i>	6																	
2	<i>B. tridactylus</i>	5	7,7																
3	<i>B. leopardus</i>	11	7,9	4,2															
4	<i>B. brunneus</i>	10	7,2	3,5	0,6														
5	<i>B. izecksohni</i>	11	7,1	3,5	0,7	0,1													
6	<i>B. albolineatus</i>	1	11,4	4,2	5,3	4,6	4,5												
7	<i>B. fuscolineatus</i>	7	8,6	4,2	5,3	4,6	4,5	0,5											
8	<i>B. boticario</i>	8	8,1	3,7	4,8	4,2	4,1	0,5	0,5										
9	<i>B. quiririensis</i>	6	7,6	6,2	5,7	5,6	5,5	4,4	4,4	4,4									
10	<i>B. pernix</i>	7	6,7	5,8	5,7	5,1	5,0	4,1	4,1	4,1	1,6								
11	<i>B. olivaceus</i>	5	6,8	5,4	5,3	4,7	4,6	4,1	4,1	4,1	1,5	0,9							
12	<i>B. verrucosus</i>	12	7,4	5,5	5,0	4,8	4,7	4,2	3,7	3,7	1,3	1,3	1,2						
13	<i>B. pombali</i>	11	6,7	5,6	5,5	4,9	4,8	3,9	3,9	3,9	1,4	0,3	0,7	1,1					
14	<i>B. ferruginus</i>	3	6,7	5,6	5,5	4,9	4,8	3,9	3,9	3,9	1,4	0,2	0,7	1,1	0,0				
15	<i>B. auroguttatus</i>	16	7,4	5,8	5,3	5,1	5,0	4,2	4,2	4,2	1,2	0,9	0,9	0,9	0,8	0,7			
16	<i>B. mariaeterezae</i>	11	7,2	5,8	5,3	5,1	5,0	4,1	4,1	4,1	1,1	0,9	0,4	0,9	0,7	0,7	0,5		
17	<i>B. sp. (aff. pernix)</i>	28	9,8	6,0	5,4	5,2	5,2	4,7	4,5	4,4	2,4	2,2	2,1	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	

Tabela 5 – Distância genética (%) entre as populações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) utilizando distância pareada não corrigida (*uncorrected p-distance*) para o fragmento 16S (16Sar-l e 16Sbr-h) para *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) nas localidades amostradas. n = número de sequências analisadas. *Vide* Material e Métodos para definições dos acrônimos.

	Localidade	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	BF (morfotipo 2)	1										
2	BN (morfotipo 1)	3	0,3									
3	BN (morfotipo 2)	4	0,2	0,1								
4	PJ (morfotipo 1)	3	0,3	0,5	0,4							
5	CTG (morfotipo 4)	4	0,6	0,7	0,6	0,2						
6	CAS (morfotipo 3)	3	0,5	0,7	0,6	0,2	0,0					
7	CEPA (morfotipo 1)	4	0,4	0,7	0,6	0,2	0,0	0,0				
8	ES (morfotipo 1)	2	0,5	0,8	0,7	0,3	0,2	0,1	0,1			
9	SP (morfotipo 1)	3	0,6	0,9	0,8	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3		
10	FMG (morfotipo 1)	1	0,8	1,1	1,0	0,6	0,4	0,4	0,4	0,5	0,2	

Também foram calculadas as médias das sequências obtidas para cada população encontrada, excetuando as populações com apenas um indivíduo [FMG (morfotipo 1) e BF (morfotipo 2)]. Desse modo, a média de variação encontrada dentre as sequências das populações BN (morfotipo 2), CAS (morfotipo 3), CEPA (morfotipo 1), CTG (morfotipo 4) e SP (morfotipo 1) foi zero. Entre. Já dentre as populações BN (morfotipo 1), ES (morfotipo 1) e PJ (morfotipo 1) as médias variaram entre 0,1, 0,2 e 0,4% respectivamente.

3.5 Observações de História Natural

Durante as expedições a campo foram observados machos vocalizando sob o folhicho. Machos apresentaram atividade intensa no início da manhã, diminuindo a atividade em horários próximos ao meio dia, que coincide com os horários mais quentes do dia. Um aumento notável da atividade se deu junto ao crepúsculo, sendo totalmente cessada após o ocaso. Em dias muito quentes (acima de 28°C) e/ou pouco úmidos (umidade relativa do ar abaixo de 80%) a atividade de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) se mostrou extremamente fraca. Ao passo que dias com temperaturas entre 18°C – 24°C, com umidade relativa elevada (90 – 100%) e folhicho úmido, principalmente acompanhado de garoa e neblina, foram ideias para uma maior abundância de espécimes em atividade de vocalização. Foram encontrados indivíduos cantando todos os meses do ano, inclusive com temperaturas baixas (cerca de 10°C) em dias úmidos (os invernos na região de estudo são chuvosos).

4 DISCUSSÃO

A maioria das espécies do gênero *Brachycephalus* é considerada microendêmica de áreas elevadas nas regiões montanhosas da Mata Atlântica (PIE *et al.*, 2013; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a). Entretanto, além dos sapos-pulga, conhecidos pela sua ampla distribuição geográfica e altitudinal (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PIMENTA *et al.*, 2007; VERDADE *et al.*, 2008; CONDEZ *et al.*, 2016), algumas espécies dos grupos de *B. ephippium* e de *B. pernix* não apresentam distribuições restritas às localidades-tipo e arredores. Este é o caso das espécies de sapinhos-pingo-de-ouro: *B. brunneus*, *B. ephippium*, *B. leopardus*, *B. nodoterga* e *B. olivaceus* (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2008; PIE *et al.*, 2013; CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016a).

O primeiro registro de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) em terras baixas é uma informação inédita para os sapinhos-pingo-de-ouro, até então conhecidos como um grupo de espécies restritas às encostas e aos topos de montanha (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011; CONDEZ *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.* 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016b). Adicionalmente, foi evidenciado o registro de quatro morfotipos distintos em áreas bastante próximas (240 km²), onde três destes parecem formar populações monomórficas (morfotipos 1, 2 e 4) e uma população é polimórfica (morfotipo 3). Uma ampla distribuição geográfica foi verificada somente para o morfotipo 1, ocorrendo desde o norte da Serra do Saí até a Ilha de São Francisco do Sul. Maiores investimentos de amostragem nessa região podem revelar uma distribuição geográfica mais ampla para os outros morfotipos e/ou a descoberta de novos morfotipos. A menor altitude registrada para o morfotipo 1 foi na Ilha de São Francisco do Sul (20 metros acima do nível do mar), na localidade SP. Na região norte da Serra do Saí foi verificada a presença dos morfotipos 1 e 2 em diferentes altitudes (BF e BN), o que fornece evidências empíricas de que os dois morfotipos possam ocorrer em mais localidades, tendo em vista que somente em BF e BN foram realizadas expedições em diferentes altitudes (Figura 4). Na região próxima ao centro da Serra do Saí foram encontrados os morfotipos 3 e 4, na face leste e oeste do Morro do Cantagalo, respectivamente.

Apesar dos fenótipos encontrados não apresentarem coocorrência, alguns casos de simpatria entre sapinhos-pingo-de-ouro são relatados na literatura. Estes se referem a *Brachycephalus ephippium* e *B. vertebralis* no município de Cunha no estado de São Paulo (SP) (POMBAL JR., 2001), a *B. ephippium* e *B. atelopoide* no município de Piquete em SP, a *B. ephippium* e *B. nodoterga* na Serra da Cantareira também em SP e, finalmente, entre *B. bufonoides* e *B. garbeanus* na Serra de Macaé no estado do Rio de Janeiro, por exemplo

(MIRANDA-RIBEIRO, 1920). No entanto, embora seja possível a ocorrência em simpatria, não há confirmação de sintopia nos casos citados acima e, devido a inconsistências históricas de coleta dessas espécies, uma investigação futura foi encorajada por Pombal Jr (2010). Por outro lado, parecem comuns os casos de sintopia entre sapinhos-pingo-de-ouro e sapos-pulga (BORNSCHEIN *et al.*, 2016a). A espécie de sapo-pulga *Brachycephalus sulfuratus* é conhecida desde o sul de São Paulo até Santa Catarina, sendo registrada em sintopia com *B.* sp. (aff. *pernix*) em seis localidades (BF, BN, CAS, CEPA, ES e PJ). Não registramos a ocorrência de *B. sulfuratus* na Ilha de São Francisco do Sul.

O encontro de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) em uma localidade no ambiente insular em um morro imerso na planície costeira, como na Fazenda Morro Grande, evidencia uma população isolada em provável declínio devido ao isolamento e a rápida fragmentação do entorno pela ação antrópica, o que pode levar a ameaça de sua conservação. Deste modo, é possível que pequenos morros, em ambiente insular, similares a este, possam abrigar esta ou outra espécie de *Brachycephalus*. Outros locais podem ser indicados como de potencial ocorrência, como a região limítrofe com os municípios de Garuva e Itapoá ao norte, mas já no estado do Paraná em sua porção costeira (Figura 2, acima), que parece dar continuidade ao mesmo complexo de montanhas relacionadas à Serra do Mar. Considerando as mudanças nos ambientes costeiros em épocas passadas, a existência de populações na Ilha de São Francisco do Sul sugere que as áreas amostradas não estiveram isoladas pela Baía Babitonga. Assim, é indispensável um maior investimento de amostragem e coleta para avaliar a possível ocorrência de populações de *Brachycephalus* nos municípios adjacentes à área de amostragem, atualmente interceptados pela Baía Babitonga. No ambiente insular, nas localidades FMG e SP, bem como no ambiente continental, localidades BF, BN, PJ, CEPA e ES, foi observado em suas paisagens um mosaico de ambientes antropizados, composto pela especulação imobiliária e portuária, aquicultura, pecuária, agricultura e silvicultura. Com a alteração e fragmentação no habitat natural a estruturação microclimática ambiental é modificada, o que pode desencadear alterações na distribuição original de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) e, conseqüentemente, provocar o declínio de suas populações ou até mesmo extinções locais.

A coloração conspícua em *Brachycephalus* é exclusiva dos sapinhos-pingo-de-ouro, apesar de não se aplicar a todo o grupo, e vem atraindo a atenção de pesquisadores principalmente devido à presença de toxinas e de peptídeos exclusivos, com potencial biomédico (SABBEN *et al.*, 1986; PIRES *et al.*, 2002, 2004; ARCANJO *et al.*, 2015). Para o grupo de *B. pernix*, até o momento, somente houve comprovação de aposematismo em *B.*

pernix, que apresentou maior toxicidade se comparada à toxicidade encontrada nas espécies de *B. ephippium* e *B. nodoterga* (PIRES *et al.*, 2004). Anfíbios do gênero *Brachycephalus*, juntamente com outros gêneros, como *Melanophryniscus*, apresentam colorações dorsais de advertência e os estudos que abordam a compreensão dessa característica são escassos (ROJAS, 2016).

A variação de coloração em *Brachycephalus* é frequentemente restrita a um breve comentário nas descrições originais, podendo ser encontrada na maioria das espécies. Alguns autores exploraram com mais clareza acerca dessas informações, ainda na descrição original [e.g. *B. pernix* (POMBAL JR, *et al.*, 1998), *B. brunneus* (RIBEIRO *et al.*, 2005), *B. ferruginus* (ALVES *et al.*, 2006), *B. pombali* (ALVES *et al.*, 2006), *B. pitanga* (ALVES *et al.*, 2009), *B. guarani* (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2012), *B. tridactylus* (GAREY *et al.*, 2012), *B. crispus* (CONDEZ *et al.*, 2014), *B. quiririensis* (PIE & RIBEIRO, 2015), *B. albolineatus* (BORNSCHEIN *et al.*, 2016b) e *B. sulfuratus* (CONDEZ *et al.*, 2016)]. Para *B. pitanga* a variação de coloração foi verificada nas populações do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar (OLIVEIRA, 2013). Já, para *B. nodoterga*, a variação de coloração foi evidenciada entre as populações de Cantareira, Salesópolis e Ilha de São Sebastião, no estado de São Paulo (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2015). No entanto, apesar da existência das variações de coloração intraespecíficas relatadas, estas ocorrem de forma gradual e não alteram o padrão geral de cor das espécies. Nossos dados indicam um caso insólito na literatura de *Brachycephalus*, onde evidenciamos diferentes morfotipos com colorações claramente distintas, cada um associado a uma diferente localidade.

A coloração parece ter grande função adaptativa nos animais, principalmente como sinal antipredatório, ora com cores que se confundem com as do ambiente, ora com cores conspícuas que se destacam em relação à coloração de fundo (WELLS, 2007; WOOLBRIGHT & STEWART, 2008; ROJAS, 2016). Em *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) a correspondência com a coloração de fundo foi notada no morfotipo 1, possivelmente ligada a crípse, sendo muito dificultado seu encontro por este motivo, o que, conseqüentemente, deve dificultar a sua detecção por predadores visualmente orientados (TOLEDO & HADDAD, 2008; BRUSA *et al.*, 2013). Os morfotipos 2 e 3 não têm uma coloração tipicamente críptica ou conspícua no dorso, mas pode ser disruptiva aos olhos do predador, dificultando assim, a distinção de suas formas (ROJAS 2016). Já o morfotipo 4 possui coloração conspícua sendo claramente destacado em meio ao folhiço. Um caso semelhante e deveras estudado diz respeito a *Oophaga pumilio*, uma espécie de dendrobatídeo tóxica e altamente polimórfica que ocorre na América Central. O complexo de cores exibido nesta espécie parece ser facilmente

reconhecido tanto por seus coespecíficos, quanto por um predador modelo, e a escolha das fêmeas pelos parceiros pode impulsionar a divergência entre os morfotipos das populações isoladas (SIDDQUI *et al.*, 2004). A evolução de diferentes fenótipos nestes dois casos [*B. sp.* (aff. *pernix*) e *Oophaga pumilio*] abrangeu uma diversidade de cores desde morfotipos crípticos até conspícuos e ainda está distante de ser compreendida; no entanto, parece que seu sucesso localmente devido a essa variação fica evidente e podem ser exemplos de divergência em sinais visuais (BRUSA *et al.*, 2013).

Na superfamília Brachycephaloidea, a variação de coloração é observada em diversas espécies como, por exemplo, em nível populacional, nas espécies de *Craugastor* do grupo de *C. rhodophis* (STREICHER *et al.*, 2014); em diferentes momentos, ao longo do tempo (durante 25 anos de coleta), em nove localidades de Porto Rico, foi verificada variação no polimorfismo na espécie *Eleutherodactylus coqui* (WOOLBRIGHT & STEWART, 2008). Em *Ischnocnema*, gênero irmão de *Brachycephalus*, também foi observado polimorfismo em nível populacional (TAUCCE *et al.*, 2012). No entanto, a coloração conspícua, aparentemente, surgiu em poucas espécies dessa superfamília. No caso de *Pristimantis gaigei*, a espécie apresenta populações que variam de pardas (não miméticas) e miméticas onde tem padrões de coloração semelhantes às espécies simpátricas e tóxicas dos dendrobatídeos *Phyllobates aurotaenia*, *P. lugubris* e *P. vittatus* (LYNCH, 1985). Nos dois grupos de anuros miniaturizados, em *Brachycephalus* (CONDEZ *et al.*, dados não publicados; obs. pessoal) e em *Eleutherodactylus* do grupo de *E. limbatus* de Cuba (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012), coincidentemente, ocorre toxicidade (ARCANJO *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 2013).

O polimorfismo parece ser comum em espécies aposemáticas, como verificado, por exemplo, em *Oophaga pumilio* (SIDDQUI *et al.*, 2004; WANG & SHAFFER, 2008), *Oophaga granulifera* (BRUSA *et al.*, 2013), *Adelphobates galactonotus* (HOOGMOED & AVILA-PIRES, 2012) e *Ranitomeya imitator* (SYMULA *et al.*, 2001; TWOMEY *et al.*, 2015b). As pressões seletivas que levam ao polimorfismo em seus diversos níveis ainda não são totalmente compreendidas, mas os predadores visualmente orientados podem ter um importante papel na pressão seletiva (WOOLBRIGHT & STEWART, 2008; STREICHER *et al.*, 2014; PALUH *et al.*, 2015; ROJAS 2016). Por exemplo, a coloração aposemática é mais facilmente detectável por um predador e tende a orientá-lo visualmente, lhe enviando um sinal de alerta para que esse associe a presa com a impalatabilidade (CHOUTEAU & ANGERS, 2011; ROJAS *et al.*, 2015). Assim, o viés predatório poderia estar associado à variação da cor. No entanto, isso não se aplica a todas as espécies. A hipótese da associação da presa à impalatabilidade, através da coloração, foi testada em populações de *Adelphobates*

galactonotus e não foi evidenciado que as novas cores de modelos de sapos introduzidas nas populações fossem mais vulneráveis à predação do que as cores locais (ROJAS *et al.*, 2015). Neste caso, talvez não seja o viés predatório a pressão para a variação geográfica de coloração. Outros fatores que poderiam estar atuando potencialmente para explicar as causas da divergência na coloração são a escolha do parceiro (seleção sexual), pois o acasalamento com base na cor pode manter a variação (SUMMERS *et al.*, 1999; SIDDIQUI *et al.*, 2004; MAAN & CUMMINGS, 2008, 2009; BRUSA *et al.*, 2013), a deriva genética, a seleção natural, e/ou a combinação desses e outros fatores adicionais (BRUSA *et al.*, 2013).

Foram evidenciadas algumas variações morfométricas entre as populações encontradas de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*), no entanto, um maior número amostral seria ideal, para individualizar cada população e obter resultados mais precisos, pois os intervalos de confiança se mostraram muito amplos. A análise multivariada mostrou três grupos bastante distintos sem sobreposição de intervalos de confiança: o primeiro composto por indivíduos pertencentes ao MORFO1_N e MORFO4, o segundo composto por indivíduos pertencentes ao MORFO1_I, MORFO1_S e MORFO2, e o terceiro composto por indivíduos caracterizados como MORFO 3. Nessas populações as variáveis que mais explicaram a diferenciação foram o comprimento do braço, o diâmetro da narina e o comprimento da coxa, sendo que a maior variação foi verificada para a primeira variável. Ao tentar relacionar as diferenças morfométricas dos quatro morfotipos com suas localizações geográficas e/ou altitude, por exemplo, não foram encontradas quaisquer relações. Contudo, se analisarmos somente os resultados das médias de comprimento do braço para o morfotipo 1 nota-se que as populações do norte as Serra do Saí possuem os maiores comprimentos de braço (CBR = 2,16 mm), seguidas pelas do sul da Serra do Saí (CBR = 2,07 mm) e pela população da Ilha de São Francisco do Sul (CBR = 2,03 mm), que também podem ser relacionadas nesta ordem desde a maior até a menor altitude. Além de um número amostral maior de indivíduos para determinar se esta relação é apropriada, também se faz necessária uma análise multivariada considerando possíveis diferenças morfométricas para ambos os sexos. Comparar os resultados de análises para machos e fêmeas em separado podem nos auxiliar na compreensão de variações populacionais e na identificação de diferenças significativas entre os morfotipos.

Para *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. izecksohni*, *B. pernix* e *B. pombali*, foi verificada a importância da análise multivariada para separar as espécies, visto que no grupo *pernix* as medidas dos indivíduos de diferentes espécies são altamente sobrepostas e, conseqüentemente, a caracterização taxonômica é dificultada (ALVES *et al.*, 2006). Todavia, neste trabalho a análise foi realizada com fêmeas e machos no mesmo conjunto de dados.

Além de não ser informado o número de indivíduos utilizados para cada sexo nas espécies, o dimorfismo sexual deveria ser levado em consideração. Isto porque, conjuntos com mais fêmeas poderiam apresentar-se fortemente distintos dos conjuntos com mais machos, por exemplo, então a análise poderia estar sendo tendenciosa para a separação dessas espécies. Adicionalmente, nossos resultados evidenciam que a variação encontrada na morfologia externa de *B. sp.* (aff. *pernix*) sugere a necessidade de uma revisão de alguns caracteres utilizados como diagnósticos nas descrições de espécies, como a rugosidade da pele e a presença e grau de desenvolvimento do tubérculo metatarsal externo, por exemplo.

Os elementos ósseos no gênero *Brachycephalus* são importantes evidências para entender os relacionamentos interespecíficos (CAMPOS *et al.*, 2010). Os sapinhos-pingo-de-ouro do norte da Mata Atlântica (grupo de *B. ephippium*) apresentam um gradiente de hiperossificação e mineralização do esqueleto entre as espécies (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2008, 2009). Já, os sapinhos-pingo-de-ouro do sul da Mata Atlântica (grupo de *B. pernix*) possuem completa ausência de hiperossificação e mineralização do esqueleto (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009); no entanto, outros elementos ósseos podem estar presentes, ausentes ou diferenciados. Por exemplo, em *B. brunneus* e *B. izecksohni* é possível diferenciar as espécies por duas características osteológicas: o tamanho dos processos transversos da coluna vertebral e a presença (em *B. brunneus*) ou ausência (em *B. izecksohni*) de elementos do pré-pólex nas extremidades anteriores (RIBEIRO *et al.*, 2005). Em *B. ferruginus* e *B. pombali* também há diferenças possíveis de verificar nos ossos, como a quantidade de odontóides na pré-maxila e na maxila, o tamanho dos processos transversos da coluna vertebral e a fórmula falangeal das extremidades posteriores (ALVES *et al.*, 2006). A análise óssea de *B. sp.* (aff. *pernix*) corrobora com o padrão do grupo (ausência de hiperossificação e mineralização do esqueleto) e, apesar de não analisar a região do crânio de todas as populações encontradas, as estruturas observadas não apresentaram diferenciações entre as populações. Assim, a osteologia pode fornecer caracteres relevantes para a diagnose de espécies e, portanto, deve ser usada. A utilização de técnicas mais robustas e não invasivas e destrutivas para uma avaliação osteológica entre os morfotipos encontrados no presente estudo, como raios-X ou CT-scan, poderá colaborar com informações mais precisas, visto que a diafanização pode inviabilizar o material e não revelar todas as estruturas, caso não seja preparada corretamente.

A comunicação acústica em *Brachycephalus* é muito pouco explorada e a descrição do canto pode ser encontrada para uma minoria de espécies no gênero (CONDEZ *et al.*, 2014; 2016). Oliveira (2013) definiu pelo menos quatro tipos de cantos em *Brachycephalus pitanga*

que variaram em número de notas, duração de notas, intervalo entre notas, frequência dominante e taxa de repetição de notas. Nesse sentido, a compreensão das variações nos cantos se torna muito complexa e com os dados reunidos no presente trabalho não foi possível obter informações suficientes para verificar estatisticamente diferenciações entre as populações. Foram evidenciadas algumas variações nos parâmetros de duração do canto, número de pulsos/nota e nas frequências entre os morfotipos analisados, o que certamente deve ser mais bem explorado em trabalhos futuros, pois a diferenciação entre os morfotipos pode também ser oriunda de isolamento acústico pela seleção sexual.

Embora as diferentes populações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*), analisadas no presente estudo, sejam reconhecíveis morfologicamente, a baixa divergência genética entre elas, como evidenciada pelos dados moleculares, sugere que não se tratam de espécies distintas. No entanto, se aceitamos que as demais espécies descritas de *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix* são válidas, mesmo com baixíssima divergência genética, então também podemos aceitar as populações de *B. sp.* (aff. *pernix*) como linhagens evolutivamente independentes. A maioria das espécies do grupo de *B. pernix* não apresenta diferenciação para este fragmento analisado do gene 16S, como é o caso de *B. ferruginus*, *B. pernix* e *B. pombali*; e também de *B. brunneus* e *B. izecksohni*, por exemplo, espécies com distâncias genéticas menores que 0,2%. Contudo, estas espécies foram suportadas por evidências osteológicas em suas respectivas descrições (RIBEIRO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2006). Por exemplo, populações do norte da Serra do Saí, BN (morfotipos 1 e 2) e BF (morfotipo 2), divergem das populações da Ilha de São Francisco do Sul (SP e FMG) num intervalo de 0,8 – 1,1%; todavia, a população PJ, também no norte da Serra do Saí e muito próxima de BN e BF, diverge das populações da Ilha, SP e FMG, 0,4% e 0,6%, respectivamente. Assim, analisando as distâncias genéticas, muitas vezes parece haver maior divergência entre populações próximas do que entre populações mais distantes, pois PJ diverge das populações limítrofes, BN e BF, em 0,5% e 0,3%, respectivamente.

Variações populacionais foram encontradas em *B. ephippium* (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2008; CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011b) em localidades do estado de São Paulo (Atibaia, Jundiá e São Francisco Xavier) e Rio de Janeiro (Macaé de Cima), através de evidências morfológicas do esqueleto e moleculares. *A posteriori*, a população do Rio de Janeiro foi removida da sinonímia de *B. ephippium* e elevada ao status específico como *B. garbeanus* (POMBAL JR, 2010). Já, para *B. nodoterga*, também foram verificadas variações populacionais entre localidades continentais e insulares através de análises moleculares, juntamente com diferenças osteológicas (CLEMENTE-CARVALHO *et*

al., 2015). A distância genética entre as populações de *B. nodoterga* da região continental (Cantareira e Salesópolis) para a insular (Ilha de São Sebastião) variou entre os fragmentos de DNA mitocondrial utilizados, sendo que para o 12S rRNA a distância foi de 1,2% e 1,4 %, para o 16S rRNA a distância foi de 1,0% e 1,1%, para o *Cytb* a distância foi de 1,5% e para o COI a distância foi de 0,9% e 0,8%, respectivamente. Esses dados foram muito similares ao encontrado entre as populações da Ilha de São Francisco do Sul e de BN/BF para o 16S rRNA.

A recente descoberta de nove espécies de sapinhos-pingo-de-ouro para a região sul da Serra do Mar e Vale do Itajaí (RIBEIRO *et al.*, 2015; PIE & RIBEIRO, 2015; BORNSCHEIN *et al.*, 2016b), nos estados de Paraná e Santa Catarina, foi fracamente fundamentada se considerarmos as diferentes ferramentas taxonômicas disponíveis atualmente que, se usadas integrativamente, permitem uma taxonomia mais solidamente definida. As descrições destes autores correspondem a singelas inferências morfológicas com uma série de inconsistências (ver Anexo I desta dissertação). Apesar destes autores afirmarem nas descrições originais que dados moleculares corroboram as diagnoses de tais espécies, *a posteriori* estes autores não fornecem evidências suficientes para determinar a identidade das espécies descritas (Firkowski *et al.*, 2016). Bornschein *et al.* (2016a) ampliaram a ocorrência de *B. olivaceus* para o município de Corupá (Morro do Boi), espécie conhecida anteriormente para duas localidades (Castelo dos Bugres e base da Serra Queimada, ambas no município de Joinville). *B. mariaeterezae*, espécie praticamente idêntica a *B. olivaceus*, é conhecida apenas para a localidade-tipo (topo da Serra Queimada, também no município de Joinville, RIBEIRO *et al.*, 2015). Estas duas espécies (*B. olivaceus* e *B. mariaeterezae*) foram diferenciadas apenas pela rugosidade da cabeça e pela coloração geral do corpo (RIBEIRO *et al.*, 2015). Os autores não fornecem evidências adicionais consistentes para diferenciar as duas espécies e, portanto, justificar o porquê *B. olivaceus*, espécie de distribuição relativamente ampla, não poderia ocorrer no topo do morro onde foi proposta a existência de *B. mariaeterezae*. Os dados moleculares apresentados no presente trabalho, resgatando as sequências disponibilizadas por Firkowski *et al.* (2016) no GenBank, indicam que as populações de *B. olivaceus* e *B. mariaeterezae* são muito semelhantes em nível molecular (DNA mitocondrial). Dessa forma, há possibilidade de que algumas dessas espécies recentemente propostas sejam inflações taxonômicas (sensu PADIAL & DE LA RIVA, 2006; Anexo 1). Em *Euparkerella*, por exemplo, diferentes espécies se distribuem em diferentes quotas altitudinais e representam entidades completamente divergentes molecularmente, com embasamento e comprovação através de análises populacionais acuradas (FUSINATO *et al.*, 2013). Nossos resultados para

as diferentes populações de *B. sp. (aff. pernix)* sugerem uma situação semelhante ao que acontece entre *B. mariaeterezae* e *B. olivaceus*, não sendo descartada a possibilidade de estas duas últimas espécies serem sinônimos.

A variação fenotípica apresentada para *Brachycephalus sp. (aff. pernix)* chama a atenção para espécies já descritas em condições similares e salienta a complexidade em se determinar uma unidade taxonômica no gênero. A ausência de divergência genética clara em *loci* mitocondrial pode ser explicada através do processo de introgressão (CONDEZ, 2014; PENNISI, 2016; e.g. SEQUEIRA *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2013), ou como verificado em Brusa *et al.* (2013), por uma radiação adaptativa recente. Além disso, a verificação da existência de fluxo gênico entre as populações, aliada ao entendimento biogeográfico e a correlação com a origem dos ambientes montanhosos e ilhas, são temas a serem explorados. Assim, se fazem estritamente necessárias abordagens integrativas mais profundas em nível taxonômico, genético e ecológico, para uma melhor compreensão dos fatores evolutivos que influenciaram e estruturaram essas divergências. É urgente um estudo sobre os limites interespecíficos de *Brachycephalus*, incluindo uma proposta de revisão taxonômica do gênero. A questão, a saber, se *B. sp. (aff. pernix)* consiste em uma única espécie torna relevante pensar em relação a real alopatria entre as populações e o que poderia ser definido como barreira geográfica para este grupo que tem baixa vagilidade e alta sensibilidade a alterações ambientais. Em Clemente-Carvalho *et al.* (2015) é possível verificar que as populações continentais se diferenciam da população da ilha, mas não embasam a existência de mais de uma espécie. No presente trabalho, dentre as nove populações encontradas, como citado acima, as distâncias genéticas também não as separa em unidades taxonômicas; no entanto, o DNA mitocondrial por si só não traz evidências suficientes para determinar se estamos diante de uma espécie, com populações diferenciadas fenotipicamente, ou se há mais espécies envolvidas.

O recente aprofundamento em estudos acerca do gênero *Brachycephalus* é crucial para estratégias e práticas de conservação, visto que a distribuição restrita pode indicar ao alto grau de ameaça (e.g. *B. pernix*; BRASIL, 2014). Dentro dos conceitos de insuficiência de dados atuais, no que diz respeito a biodiversidade, o presente trabalho atende ao preenchimento da lacuna Linneana, que visa o conhecimento básico da unidade taxonômica, e Wallaceana, onde contribui com o preenchimento da lacuna de distribuição de espécies (HORTAL *et al.*, 2015). A região estudada carece de unidades de conservação e de estudos direcionados a compreensão da composição de sua biodiversidade. As duas áreas que contêm algum grau de proteção referem-se a Reserva Particular de Patrimônio Natural Volta Velha em Itapoá, que

abrange um ambiente de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (FODTB), e o Parque Estadual Acaraí, que abrange FODTB e restinga nos seus limites. Apesar da ocorrência de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) em FODTB, esta espécie sempre esteve associada a encostas e não em FODTB associadas a planícies, como no caso dessas Unidades de Conservação. Dessa forma, tendo em vista a distribuição restrita de *B.* sp. (aff. *pernix*) e as ameaças a que está sujeita (e.g. especulação imobiliária, especulação portuária e silvicultura), o estado de conservação dessa nova espécie deve ser considerado Vulnerável, corroborando os critérios [VU B2 ab (i, iii e iv)] da Lista Vermelha da IUCN (IUCN 2016). A Serra do Saí e a Serra da Palha possuem importantes remanescentes florestais que ainda abrigam ambientes íntegros e uma gama representativa da biodiversidade do nordeste de Santa Catarina. Importantes sistemas evolutivos a serem estudados podem ser descobertos, como demonstrado nesse trabalho. Cabe a nós, pesquisadores, fornecer dados para a compreensão da biodiversidade local, contribuindo, assim, para a conservação futura desses ambientes, subsidiando com informações científicas aos tomadores de decisões. Apesar da necessidade de estudos mais profundos para o entendimento do sistema encontrado em *Brachycephalus*, um importante modelo evolutivo natural foi evidenciado, podendo auxiliar na compreensão da história evolutiva, ecológica e taxonômica deste gênero.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, A. D.; ORTIZ, F. R.; ROCHA, B., CONDEZ, T. H. 2015. A new record for *Brachycephalus nodoterga* (Amphibia, Anura, Brachycephalidae) in the state of São Paulo, Brazil. Checklist 11 (1769): 1 – 3.
- ALVES, A. C. R.; RIBEIRO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná state, southern Brazil. BioOne 62 (2): 221 – 233.
- ARCANJO, D. D. R.; VASCONCELOS, A. G.; COMERMA-STEFFENSEN, S. G.; JESUS, J. R.; SILVA, L. P.; PIRES JR, O. R.; COSTA-NETO, C. M.; OLIVEIRA, E. B.; MIGLIOLO, L.; FRANCO, O. L.; RESTINI, C. B. A.; PAULO, M.; BENDHACK, L. M.; BEMQUERER, M. P.; OLIVEIRA, A. P.; SIMONSEN, U.; LEITE, J. R. S. A. 2015 A novel vasoactive proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*. PlosOne 10 (12): 1 – 19.
- BERNECK, B. V. M.; GIARETTA, A. A.; BRANDÃO, R. A.; CRUZ, C. A. G.; HADDAD, C. F. B. 2017. The first species of *Aplastodiscus* endemic to the Brazilian Cerrado (Anura, Hylidae). ZooKeys 642: 115 – 130.
- BIOACOUSTICS RESEARCH PROGRAM. 2011. Raven Pro: interactive sound analysis software, Version 1.4. The Cornell Lab of Ornithology, New York, USA. Disponível em: <<http://www.birds.cornell.edu/raven>>. Acesso em: 08 dec. 2015.

- BORNSCHEIN, M. R.; FIRKOWSKI, C. R.; BELMONTE-LOPES, R.; CORRÊA, L.; RIBEIRO, L. F.; MORATO, S. A. A.; ANTONIAZZI-JR, R. L.; REINERT, B. L.; MEYER, A. L. S.; CINI, F. A.; PIE, M. R. 2016a. Geographical and altitudinal distribution of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) endemic to the Brazilian Atlantic Rainforest. PeerJ 4 (e2490): 1 – 41.
- BORNSCHEIN, M. R.; RIBEIRO, L. F.; BLACKBURN, D. C.; STANLEY, E. L.; PIE, M. R. 2016b. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Santa Catarina, southern Brazil. PeerJ 4(e2629): 1 – 19.
- BRASIL, 2014. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 444. Reconhece a “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção”. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=121&totalArquivos=144>>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- BRUSA, O.; BELLATI, A.; MEUCHE, I.; MUNDY, N. I.; PRÖHL, H. 2013. Divergent evolution in the polymorphic granular poison-dart frog, *Oophaga granulifera*: genetics, coloration, advertisement calls and morphology. Journal of Biogeography 40: 394 – 408.
- 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.
- CEI, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie) Monographs 2: 1 – 609.
- CHOUTEAU, M. & ANGERS, B. 2011. The role of predators in maintaining the geographic organization of aposematic signals. The American Naturalist 178 (6): 810 – 817.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; MONTEIRO, L.; BONATO, V.; ROCHA, H.; PEREIRA, G.; OLIVEIRA, D.; LOPES, R.; HADDAD, C. F. B.; MARTINS, E.; REIS, S. F. 2008. Geographic variation in cranial shape in the pumpkin toadlet (*Brachycephalus ephippium*): a geometric analysis. Journal of Herpetology 42 (1): 176 – 185.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; HADDAD, C. F. B.; ALVES, A. C. R.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, G. R.; OLIVEIRA, D. F.; LOPES, R. T.; REIS, S. F. 2009. Hyperossification in miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): microscopic structure and macroscopic patterns of variation. Journal of Morphology 270 (11): 1285 – 1295.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; KLACZO, J.; PEREZ, I.; ALVES, A. C. R.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2011a. Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 79 – 89.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; ALVES, A. C. R.; PEREZ, S. I.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2011b. Morphological and molecular variation in the pumpkin toadlet,

Brachycephalus ephippium (Anura: Brachycephalidae). Journal of Herpetology 45 (1): 94 – 99.

- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; GIARETTA, A. A.; CONDEZ, T. H.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2012. A new species of miniaturized toadlet, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. Herpetologica 68 (3): 365 – 374.
- CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; PEREZ, S. I.; TONHATI, C. H.; CONDEZ, T. H.; SAWAYA, R. J.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2015. Boundaries of morphological and molecular variation and the distribution range of a miniaturized froglet, *Brachycephalus nodoterga* (Anura: Brachycephalidae). Journal of Herpetology 50 (1):169 – 178.
- CONDEZ, T. H.; CLEMENTE-CARVALHO, R. B. G.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2014. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the highlands of the Atlantic Forest, southeastern Brazil. Herpetologica 70 (1): 89 – 99.
- CONDEZ, T. H.; MONTEIRO, J. P. C.; COMITTI, E. J.; GARCIA, P. C. A.; AMARAL, I. B.; HADDAD, C. F. B. 2016. A new species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. Zootaxa 4083: 40 – 56.
- CRUMP, M. L. & SCOTT JR, N. J. 1994. Visual encounter surveys. In: HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W.; HAYEK, L. C.; FOSTER, M. S. (Ed.). Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 84 – 92.
- DAYRELL, J. S.; OLIVEIRA, E. F.; CASSINI, C. S.; FEIO, R. N. 2006. *Brachycephalus ephippium*: geographical distribution. Herpetological Review 37 (1): 357.
- DUELLMAN, W. E. 1970. Hylid frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas. p. 753.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1994. Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press, London. 670 p.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32 (5): 1792 – 1797.
- FARRIS, J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. In: PLATNICK, N. I. & FUNK, V. A. (Eds). Advances in cladistics. Proceeding of the second meeting of the Willi Hennig Society. 2. v. Columbia University Press, New York. p. 7 – 36.
- FARRIS, J. S.; ALBERT, V. A.; KÄLLERSJÖ, M.; LIPSCOMB, D.; KLUGE, A. G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. Cladistics 12: 99 – 124.
- FIRKOWSKI, C. R.; BORNSCHEIN, M. R.; RIBEIRO, L. F.; PIE, M. R. 2016. Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian Atlantic Forest. Molecular Phylogenetics and Evolution 100: 345 – 60.

- FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1 – 370.
- FROST, D. R. 2016. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 02 dez. 2016.
- FUSINATTO, L. A.; ALEXANDRINO, J.; HADDAD, C. F. B.; BRUNES, T. O.; ROCHA, C. F. D.; SEQUEIRA, F. 2013. Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *PlosOne* 8 (11): e79504.
- GAREY, M. V.; LIMA, A. M. X.; HARTMANN, M. T.; HADDAD, C. F. B. 2012. A new species of miniaturized toadlet, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae), from southern Brazil. *Herpetologica* 68 (2): 266 – 271.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774 – 786.
- GOTELLI, N. J. & ELLISON, A. M. 2004. A primer of ecological statistics. Tradução: BACCARO, F. B.; SANTO, H. M. V. E.; PINTO, M. P.; DIAS, M. S.; LANDEIRO, V. L. Porto Alegre: Ed. Artmed. 528 p.
- HADDAD, C. F. B.; GIOVANELLI, J. G. R.; ALEXANDRINO, J. M. B. 2008. O aquecimento global e seus efeitos na distribuição e declínio dos anfíbios. In: BUCKERIDGE, M. (Org.). *A biologia e as mudanças climáticas no Brasil*. São Carlos: Ed. RIMA. p. 195 – 206.
- HANKEN, J. 1993. Adaptation of bone growth to miniaturization of body size. In: HALL, B. K. (ed.) *Bone Growth*—B. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 79 – 104.
- HANIFIN, C. T. 2010. The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX): toxicity in terrestrial vertebrates. *Marine Drugs* 8: 577 – 593.
- HANKEN, J. & WAKE, D. B. 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 501 – 519.
- 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 – 182.
- 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.

- HOOGMOED, M. S. & AVILA-PIRES, T. C. S. 2012. Inventory of color polymorphism in populations of *Dendrobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae), a poison frog endemic to Brazil. *Phyllomedusa* 11 (2): 95 – 115.
- HORTAL, J.; BELLO, F. DE; DINIZ-FILHO, J. A. F.; LEWINSOHN, T. M.; LOBO, J. M.; LADLE, R. J. 2015. Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46: 523 – 549.
- IUCN (2016) Guidelines for using the IUCN Red List categories and criteria. – Version 12. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Disponível em: <<http://jr.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>>. Acesso em: 9 jan. 2017.
- IZECKSOHN, E. 1971. Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro, Nova Série, Zoologia*, 280: 1 – 12.
- KAPLAN, M. 2002. Histology of the anteroventral part of the breast-shoulder apparatus of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae) with comments on the validity of the genus *Psyllophryne* (Brachycephalidae). *Amphibia-Reptilia* 23 (2): 225 – 227.
- LIMA, M. S. C. S.; PEDERASSI, J.; SOUZA, C. A. S. 2013. Habitat use by the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae), in the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 24 (2): 11 – 15.
- LYNCH, J. D. 1985. Mimetic and non-mimetic populations of *Eleutherodactylus gaigei* (Dunn) in lower Central America and Colombia (Amphibia: Anura, Leptodactylidae). *Studes on Neotropical Fauna and Environment* 20 (4): 195 – 202.
- MAAN, M. E. & CUMMINGS, M. E. 2008. Female preferences for aposematic signal components in a polymorphic poison frog. *Evolution* 62 (9): 2334 – 2345.
- MAAN, M. E. & CUMMINGS, M. E. 2009. Sexual dimorphism and directional sexual selection on aposematic signals in a poison frog. *PNAS* 106 (45): 19072 – 19077.
- MADDISON, W. P. & MADDISON, D. R. 2017. MESQUITE: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 585 p.
- MANLY, B. F. J. 2004. *Multivariate statistical methods: a primer*. 3 ed. London: Chapman and Hall. 224 p.
- MEDINA, I.; WANG, I. J.; SALAZAR, C.; AMÉZQUITA, A. 2013. Hybridization promotes color polymorphism in the aposematic harlequin poison frog, *Oophaga histrionica*. *Ecology and Evolution* 3 (13): 4388 – 4400.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. 1920. Os brachycephalideos do Museu Paulista (com tres especies novas). *Revista do Museu Paulista* 12: 306 – 318.

- NAPOLI, M. F.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; DIAS, I. R. 2011. A new species of flea-toad, genus *Brachycephalus* Fitzinger (Amphibia: Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa* 2739: 33 – 40.
- NARINS, P. M.; FENG, A. S.; FAY, R. R.; POPPER, A. N. 2007. Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York. 362 p.
- OLIVEIRA, E. G. 2013. História natural de *Brachycephalus pitanga* no Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, estado de São Paulo. 78 f. Dissertação (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- OLIVEIRA, E. G. & HADDAD, C. F. B. 2015. Diet seasonality and feeding preferences of *Brachycephalus pitanga* (Anura: Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 49 (2): 252 – 256.
- OLIVEIRA, J. C. F.; COCO, L.; PAGOTTO, R. V.; PRALON, E.; VRCIBRADIC, D.; POMBAL JR, J. P.; ROCHA, C. F. D. 2012. Amphibia, Anura, *Brachycephalus didactylus* (Izecksohn, 1971) and *Zachaenus parvulus* (Girard, 1853): Distribution extension. *Checklist* 8 (2): 242 – 244.
- PADIAL, J. M. & DE LA RIVA, I. 2006. Taxonomic inflation and the stability of species lists: the perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology* 55 (5): 859 – 867.
- PADIAL, J. M.; GRANT, T.; FROST, D. R. 2014. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa* 3825 (1): 1 – 132.
- PALUH, D. J.; KENISON, E. K.; SAPORITO, R. A. 2015. Frog or fruit? The importance of color and shape to bird predators in clay model experiments. *Copeia* 103 (1): 58 – 63.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W. O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. 1991. The simple fool's guide to PCR. 2. v. USA: Hawaii, Honolulu.
- PENNISI, E. 2016. Shaking up the tree of life. *Science* 354 (6314): 817 – 821.
- PIE, M. R.; MEYER, A. L. S.; FIRKOWSKI, C. R.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. 2013. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecological Modelling* 250: 165 – 176.
- PIE, M. R. & RIBEIRO, L. F. 2015. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Quiriri mountain range of southern Brazil. *PeerJ* 3 (e1179): 1 – 9.
- PIMENTA, B. V. S.; BÉRNILS, R. S.; POMBAL JR, J. P. 2007. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Brachycephalus hermogenesi*: filling gap and geographic distribution map. *Checklist* 3 (3): 277 – 279.

- PIRES JR, O. R.; SEBBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; LARGURA, S. W. R.; BLOCH JR, C.; MORALES, R. A. V.; SCHWARTZ, C. A. 2002. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Toxicon* 40: 761 – 766.
- PIRES JR, O. R.; SEBBEN, A.; SCHWARTZ, E. F.; MORALES, R. A. V.; BLOCH JR, C.; SCHWARTZ, C. A. 2005. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the anuran family Brachycephalidae. *Toxicon* 45: 73 – 79.
- POMBAL JR, J. P.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. 1994. Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 28: 516 – 519.
- POMBAL JR, J. P.; WISTUBA, E. M.; BORNSCHEIN, M. R. 1998. A new species of brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology* 32 (1): 70 – 74.
- POMBAL JR, J. P. 1999. Oviposição e desenvolvimento de *Brachycephalus ephippium* (Spix) (Anura, Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 967 – 976.
- POMBAL JR, J. P. 2001. A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Atlantic Rain Forest of southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 22: 179 – 185.
- POMBAL JR, J. P. 2010. A posição taxonômica das "variedades" de *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) descritas por Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia* 526: 1 – 12.
- POMBAL JR, J. P. & IZECKSOHN, E. 2011. Uma nova espécie de *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) do estado do Rio de Janeiro. *Papéis Avulsos de Zoologia* 51 (28): 443 – 451.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Austria: Vienna. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 08 dez. 2015.
- RIBEIRO, L. F.; ALVES, A. C. R.; HADDAD, C. F. B.; REIS, S. F. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1985 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia* 519: 1 – 18.
- RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R.; BELMONTE-LOPES, R.; FIRKOWSKI, C. R.; MORATO, S. A. A.; PIE, M. R. 2015. Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ* 3 (e1011): 1 – 36.
- RODRÍGUEZ, A.; ALONSO, R.; RODRÍGUEZ, J. A.; VENCES, M. 2012. Geographic distribution, colour variation and molecular diversity of miniature frogs of the *Eleutherodactylus limbatus* group from Cuba. *Salamandra* 48 (2): 71 – 91.
- RODRÍGUEZ, A.; POTTH, D.; SCHULZ, S.; GEHARA, M.; VENCES, M. 2013. Genetic diversity, phylogeny and evolution of alkaloid sequestering in Cuban miniaturized frogs

of the *Eleutherodactylus limbatus* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 541 – 554.

- ROJAS, D. P.; STOW, A.; AMÉZQUITA, A.; SIMÕES, P. I.; LIMA, A. P. 2015. No predatory bias with respect to colour familiarity for the aposematic *Adelphobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae). *Behaviour* 152: 1636 – 1656.
- ROJAS, B. 2016. Behavioural, ecological, and evolutionary aspects of diversity in frog colour patterns. *Biological Reviews* 1 – 22.
- SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; VALENTE, D.; MENDES, E. G. A. 1986. Tetrodotoxin-like substance found in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon* 24: 799 – 806.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B. V. M.; LANGONE, J. A.J. 2016. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira* 5 (2): 34 – 46.
- SEQUEIRA, F.; SODRÉ, D.; FERRAND, N.; BERNARDI, J. A. R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; VALLINOTO, M. 2011. Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred from mtDNA and nuclear markers. *Evolutionary Biology* 11 (264): 1 – 15.
- SIDDIQI, A.; CRONIN, T. W.; LOEW, E. R.; VOROBYEV, M.; SUMMERS, K. 2004. Interspecific and intraspecific views of color signals in the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 2471 – 2485.
- SUMMERS, K.; SYMULA, R.; CLOUGH, M.; CRONIN, T. 1999. Visual mate choice in poison frogs. *The Royal Society of London B* 266: 2141 – 2145.
- STREICHER, J. W.; GARCÍA-VÁZQUEZ, U. O.; PONCE-CAMPOS, P.; FLORES-VILLELA, P.; CAMPBELL, J. A.; SMITH, E. N. 2014. Evolutionary relationships amongst polymorphic direct-developing frogs in the *Craugastor rhodopsis* Species Group (Anura: Craugastoridae). *Systematics and Biodiversity* 12 (1): 1 – 22.
- SYMULA, R.; SCHULTE, R.; SUMMERS, K. 2001. Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *The Royal Society of London B* 268: 2415 – 2421.
- TABOADA, C.; GRANT, T.; LYNCH, J. D.; FAIVOVICH, J. 2013. New morphological synapomorphies for the new world direct-developing frogs (Amphibia: Anura: Terrarana). *Herpetologica* 69 (3): 342 – 357.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725 – 2729.
- TAUCCE, P. P. G.; LEITE, F. S. F.; SANTOS, P. S.; FEIO, R. N.; GARCIA, P. C. A. 2012. The advertisement call, color patterns and distribution of *Ischnocnema izecksohni*

- (Caramaschi and Kisteumacher, 1989) (Anura, Brachycephalidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 52 (9): 111 – 119.
- TAYLOR, W. R. & VAN DYKE, G. C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn* 9: 107 – 119.
- TOLEDO, L. F. & HADDAD, C. F. B. 2008. Colors and some morphological traits as defensive mechanisms in anurans. *International Journal of Zoology* 1 – 12.
- TRUEB, L. & ALBERCH, P. 1985. Miniaturization in the anuran skull: a case study of heterochrony. In: DUNCKER, H. R. & FLEISCHER, G. (Eds). *Vertebrate Morphology*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany. p. 113 – 121.
- TRUEB, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: HANKEN, J. & HALL, B. K. (Eds). *The skull*. 2. v. The University of Chicago Press, Chicago and London. p. 255 – 343.
- TWOMEY, E.; MAYER, M.; SUMMERS, K. 2015a. Intraspecific call variation in the mimic poison Frog *Ranitomeya imitator*. *Herpetologica* 71 (4): 252 – 259.
- TWOMEY, E.; VESTERGAARD, J. S.; VENEGAS, P. J.; SUMMERS, K. 2015b. Mimetic divergence and the speciation continuum in the mimic poison frog *Ranitomeya imitator*. *The American Naturalist* 187 (2): 205 – 224.
- VERDADE, V. K.; RODRIGUES, M. T.; CASSIMIRO, J.; PAVAN, D.; LIOU, N.; LANGE, M. 2008. Advertisement call, vocal activity, and geographic distribution of *Brachycephalus hermogenesi* (Giaretta and Sawaya, 1998) (Anura, Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 42 (3): 542 – 549.
- WANG, I. J. & SHAFFER, H. B. 2008. Rapid color evolution in an aposematic species: a phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Evolution* 62 (11): 2742 – 2759.
- WELLS, K. D. 2007. *The ecology and behavior of amphibians*. University Of Chicago Press 1400 p.
- WOOLBRIGHT, L. L. & STEWART, M. M. 2008. Spatial and temporal variation in color pattern morphology in the tropical frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Copeia* 2: 431 – 437.
- YEH, J. 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution* 56: 628 – 641.
- ZIMMERMAN, B. L. 1994. Audio strip transects. In: HEYER, W. R.; DONNELLY, M. A.; MCDIARMID, R. W.; HAYEK, L. C.; FOSTER, M. S. (Ed.). *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington and London: Smithsonian institution press. p. 92 – 97.

Apêndice 1. Espécimes de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) coletados nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina. Detalhes sobre a distinção entre os morfotipos devem ser consultados no texto.

***Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) morfotipo 1:** CFBH 39869, CFBH 39871, fêmeas adultas, enviados para análises de alcaloide e toxina respectivamente, coletados em 24 de novembro de 2015, por J.P.C. Monteiro, T.H. Condez e E.C. de Nardin, em Braço do Norte, município de Itapoá, estado de Santa Catarina (26°07'29"S; 48°43'48"W, Datum WGS 84, 220 metros acima do nível do mar); JPCM 412, fêmea adulta, coletada em 17 de setembro de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Palmito Juriti, Serra do Saí, município de São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina (26°08'09"S; 48°43'54"O, Datum WGS 84, 125 metros acima do nível do mar); JPCM 413–415, fêmeas adultas, coletadas em 17 de setembro de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Palmito Juriti, Serra do Saí, município de São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina (26°08'12"S; 48°44'08"O, Datum WGS 84, 170 metros acima do nível do mar). JPCM 403, fêmea adulta, JPCM 402, macho adulto, coletados em 07 de maio de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Bom Futuro, município de Garuva, estado de Santa Catarina (26°06'38"S; 48°44'26"O, Datum WGS 84, 282 metros acima do nível do mar).

***Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) morfotipo 2:** JPCM 391–94, machos adultos, coletados em 30 de novembro de 2015, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Braço do Norte, município de Itapoá, estado de Santa Catarina (26°07'24"S; 48°44'27"O, Datum WGS 84, 489 metros acima do nível do mar); JPCM 409, fêmea adulta, coletada em 16 de setembro de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Braço do Norte, município de Itapoá, estado de Santa Catarina (26°07'43"S; 48°44'30"O, Datum WGS 84, 521 metros acima do nível do mar); JPCM 410, JPCM 411, machos adultos, coletados em 17 de setembro de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Braço do Norte, município de Itapoá, estado de Santa Catarina (26°07'16"S; 48°44'08"O, Datum WGS 84, 394 metros acima do nível do mar). JPCM 400, fêmea adulta, JPCM 401, macho adulto, indivíduo diafanizado, coletados em 07 de maio de 2016, por J.P.C. Monteiro e E.C. de Nardin, em Bom Futuro, município de Garuva, estado de Santa Catarina (26°06'46"S; 48°44'42"O, Datum WGS 84, 339 metros acima do nível do mar).

***Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) morfotipo 3:** TC 232, TC 233, fêmeas adultas, coletados em 22 de novembro de 2013, por J.P.C. Monteiro e E.J. Comitti; TC 257, fêmea adulta, TC 259, macho subadulto, TC 253–256, TC 258, TC 260, TC 262, machos adultos, TC261, indivíduo diafanizado, coletados em 04 de dezembro de 2013, por T.H. Condez, J.P.C. Monteiro, E.J. Comitti, I.B. Amaral e P.C.A. Garcia; JPCM 355, macho adulto, indivíduo diafanizado, coletado em 28 de agosto de 2015, por J.P.C. Monteiro

e E.C. de Nardin; todos coletados no Casarão, face leste do Morro do Cantagalo, município de São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina (26°10'31"S; 48°42'45"O, Datum WGS 84, 150 metros acima do nível do mar). ***Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) morfotipo 4**: JPCM 259, macho subadulto, coletado em 17 de novembro de 2014, por J.P.C. Monteiro, E.J. Comitti e M.D. Freire; TC 280, fêmea subadulta, TC 281, TC 282, TC 284, fêmeas adultas, TC 283, TC 286, machos adultos, TC 285, macho adulto, indivíduo diafanizado, TC 278, indeterminado, enviado para análise de toxina, TC 279, indeterminado, enviado para análise de alcaloide, coletados em 20 de janeiro de 2015, por J.P.C. Monteiro, T.H. Condez e E.J. Comitti; JPCM 349, JPCM 354, fêmeas subadultas, JPCM 342, JPCM 346–348, JPCM 350, JPCM 353, fêmeas adultas, JPCM 341, macho subadulto, JPCM 343, JPCM 344, JPCM 345, JPCM 351, JPCM 352, machos adultos, coletados em 29 de agosto de 2015, por J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin e J. Valduga; todos coletados no Morro do Cantagalo, município de São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina (26°11'17"S; 48°43'48"O, Datum WGS 84, 265 metros acima do nível do mar).

Apêndice 2. Espécimes mensurados e analisados do gênero *Brachycephalus* do grupo de *B. pernix*.

Brachycephalus albolineatus (9 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Jaraguá do Sul, JPCM 231, 233, MHNCI 10290, 10296–300, 90349, (paratopótipos).

Brachycephalus auroguttatus (14 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Garuva, MHNCI 10199–10200, 10202, 10204–10, 10212–14, (paratopótipos).

Brachycephalus boticario (5 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Blumenau, MHNCI 10253, 10257–59, 10731, (paratopótipos).

Brachycephalus brunneus (27 espécimes): BRASIL: Paraná: Campina Grande do Sul, CFBH 7880, 7893, 7894, MHNCI 125, 1919, 1920, 10165–75, 10177–83, MNRJ 40289–91.

Brachycephalus ferruginus (7 espécimes): BRASIL: Paraná: Morretes, CFBH 8028, 8030, 8032, 40436–40438, MZUSP 15787.

Brachycephalus fuscolineatus (7 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Ilhota, CFBH 40448, MHNCI 10227, 10231–34, 10236, (paratopótipos).

Brachycephalus izecksohni (9 espécimes): BRASIL: Paraná: entre Guaratuba e Paranaguá, MNRJ 7381, 7382, 7384, (paratopótipos) CFBH 7375, 7384, 7386, 7387, MZUSP 132892, 132893.

Brachycephalus leopardus (26 espécimes): BRASIL: Paraná: Tijucas do Sul, CFBH 20940–55, MHNCI 10229, 10242, 10244–51, (paratopótipos).

Brachycephalus mariaeterezae (8 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Joinville, MHNCI 9811, 10190–94, 10196, 10197, (paratopótipos).

Brachycephalus olivaceus (15 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Joinville, CFBH 40439–40447, MHNCI 9813, (holótipo), 9815, (parátipo), 9816–18, 10238.

Brachycephalus pernix (38 espécimes): BRASIL: Paraná: Quatro Barras, CFBH 28888–91, MHNCI 1818–20, 3000–04, 3346–52, 3355, 3571, 9806–08, 9810, 10153–64, MNRJ 17343 (holótipo).

Brachycephalus pombali (7 espécimes): BRASIL: Paraná: Guaratuba, CFBH 8048, 8051, DZUP 213–16, 220.

Brachycephalus quiririensis (72 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Garuva, CFBH 40392–40435, MHNCI 10260, 10261, 10263–65, 10267–71, MZUSP 132902, 132904–07, 132910, 132912–14, 132916, 132918, 132920, 132921, 132925–29.

Brachycephalus tridactylus (16 espécimes): BRASIL: Paraná: Guaraqueçaba, MHNCI 10185–87, 10189, 10294, 10729, 10730, MNRJ 67312–14, MZUSP 137957 (holótipo), 137952–56 (paratopótipo).

Brachycephalus verrucosus (15 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Joinville, DZUP 476, MHNCI 9819, 9820, 10215–25, 10228.

Brachycephalus sp. (aff. *pernix*) (30 espécimes): BRASIL: Santa Catarina: Itapoá, CFBH 39863–39865, 39867, 39868, 39870, 39875, (parátipos), UFMG 18972 (parátipo). São Francisco do Sul: CFBH 39846, indivíduo diafanizado, 39848, indivíduo diafanizado, 39849, (parátipos), 39850 (holótipo), 39851 (paratopótipo), 39853–39862, (parátipos), 39872, 39873, 39876, 39877, (paratopótipos), UFMG 18973 (paratopótipo), 18970, 18971, (parátipos).

Apêndice 3. Dados das gravações de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) coletadas nos municípios de Itapoá e São Francisco do Sul, estado de Santa Catarina.

Brachycephalus sp. (aff. <i>pernix</i>)	População	Município	Data	Horário	UR (%)	Temp (°C)	Voucher	Gravador	Microfone	Fonte
Morfotipo 1	CEPA	SFS	21/01/2015	09:51	100	25.3	CFBH 39848 (parátipo)	Tascam DR-07MKII	Audio-technica ATR6550	E.J. Comitti, J.P.C. Monteiro, T.H. Condez
Morfotipo 1	CEPA	SFS	28/11/2015	17:57	94	22.0	Sem voucher	Marantz PMD-660	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin
Morfotipo 1	Braço do Norte	Itapoá	30/11/2015	13:30	100	17.4	Sem voucher	Marantz PMD-660	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin
Morfotipo 1	Serra da Palha	SFS	02/12/2015	16:00	100	18.5	Sem voucher	Marantz PMD-660	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin
Morfotipo 1	Palmito Juriti	SFS	17/09/2016	18:03	83	22.0	Sem voucher	Marantz PMD661MKII	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin
Morfotipo 2	Braço do Norte	Itapoá	17/09/2016	10:35	75	21.0	JPCM 411	Marantz PMD661MKII	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin
Morfotipo 3	Casarão	SFS	22/11/2013	13:00	75	20.0	Sem voucher	Tascam DR-07MKII	Audio-technica ATR6550	J.P.C. Monteiro, E.J. Comitti
Morfotipo 3	Casarão	SFS	04/12/2013	13:00	70	24.0	TC 262	Marantz PMD-660	Sennheiser ME-66	T.H. Condez, J.P.C. Monteiro, E.J. Comitti, I.B. Amaral, P.C.A. Garcia
Morfotipo 4	Morro Cantagalo	SFS	29/08/2015	18:15	91	17.4	JPCM 345	Marantz PMD-660	Sennheiser ME-66	J.P.C. Monteiro, E.C. de Nardin

Legenda: UR= umidade relativa do ar; Temp.= Temperatura; CEPA = Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Univille; SFS = São Francisco do Sul. Para informações de coleta e coordenadas das localidades consultar Apêndice 1.

Apêndice 4. Lista de vouchers, localidades e números de acesso no GenBank. Em negrito, sequências produzidas pelo presente trabalho. Todas as demais sequências foram obtidas no GenBank, das quais majoritariamente são oriundas do estudo de Firkowski *et al.* (2016). BA = estado da Bahia; PR = estado do Paraná; RJ = estado do Rio de Janeiro; SC = estado de Santa Catarina; SP = estado de São Paulo.

Espécie	Voucher	Localidade	Número de acesso no Genbank
<i>Brachycephalus albolineatus</i>	CFBH 41755	Jaraguá do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025354
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025355
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025356
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025357
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025358
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025359
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025360
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025361
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025362
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025363
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025364
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025365
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025366
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025367
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025368
<i>Brachycephalus auroguttatus</i>	não informado	não informado	KX025369
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025370
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025371
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025372
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025373
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025374
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025375
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025376
<i>Brachycephalus boticario</i>	não informado	não informado	KX025377
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025284
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025285
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025286
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025287
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025288
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025289
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025290
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025291
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025292
<i>Brachycephalus brunneus</i>	não informado	não informado	KX025293
<i>Brachycephalus didactylus</i>	CFBHT 11506	Teresópolis, RJ	-
<i>Brachycephalus ephippium</i>	DZUP 498	Ilhéus, BA	KX025517
<i>Brachycephalus ferruginus</i>	não informado	não informado	KX025236
<i>Brachycephalus ferruginus</i>	não informado	não informado	KX025237
<i>Brachycephalus ferruginus</i>	não informado	não informado	KX025238
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025296
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025297
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025298
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025339
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025340
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025341
<i>Brachycephalus fuscolineatus</i>	não informado	não informado	KX025342
<i>Brachycephalus hermogenesi</i>	TC 129	Salesópolis, SP	-

Espécie	Voucher	Localidade	Número de acesso no Genbank
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025254
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025255
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025256
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025257
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025258
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025259
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025260
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025261
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025262
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025263
<i>Brachycephalus izecksohni</i>	não informado	não informado	KX025264
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025239
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025240
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025241
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025242
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025243
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025244
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025245
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025246
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025247
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025248
<i>Brachycephalus leopardus</i>	não informado	não informado	KX025249
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025316
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025344
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025345
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025346
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025347
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025348
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025349
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025350
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025351
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025352
<i>Brachycephalus mariaeterezae</i>	não informado	não informado	KX025353
<i>Brachycephalus nodoterga</i>	CFBHT 2226	Santana do Parnaíba, SP	-
<i>Brachycephalus olivaceus</i>	não informado	não informado	KX025300
<i>Brachycephalus olivaceus</i>	não informado	não informado	KX025301
<i>Brachycephalus olivaceus</i>	não informado	não informado	KX025302
<i>Brachycephalus olivaceus</i>	não informado	não informado	KX025303
<i>Brachycephalus olivaceus</i>	não informado	não informado	KX025325
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025218
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025219
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025220
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025221
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025222
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025383
<i>Brachycephalus permix</i>	não informado	não informado	KX025384
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025223
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025224
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025225
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025308
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025309
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025310
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025311
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025312
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025313

Espécie	Voucher	Localidade	Número de acesso no Genbank
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025314
<i>Brachycephalus pombali</i>	não informado	não informado	KX025315
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025317
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025318
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025319
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025320
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025321
<i>Brachycephalus quiririensis</i>	não informado	não informado	KX025322
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	JPCM 388	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	JPCM 389	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	JPCM 404	Garuva, SC	-
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	JPCM 406	Garuva, SC	-
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	TC 141	Quatro Barras, PR	-
<i>Brachycephalus sulfuratus</i>	TC 244	Joinville, SC	-
<i>Brachycephalus tridactylus</i>	não informado	não informado	KX025387
<i>Brachycephalus tridactylus</i>	não informado	não informado	KX025388
<i>Brachycephalus tridactylus</i>	não informado	não informado	KX025389
<i>Brachycephalus tridactylus</i>	não informado	não informado	KX025390
<i>Brachycephalus tridactylus</i>	não informado	não informado	KX025391
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025226
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025227
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025228
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025229
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025230
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025231
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025232
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025233
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025234
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025235
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025323
<i>Brachycephalus verrucosus</i>	não informado	não informado	KX025324
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM401	Garuva, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39863	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39866	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39867	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM390	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM391	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM392	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM409	Itapoá, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39846	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39848	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39850	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39852	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39853	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39855	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39859	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39862	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39873	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	CFBH39877	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM413	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM414	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	JPCM415	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	TC232	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	TC233	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus sp. (aff. pernix)</i>	TC254	São Francisco do Sul, SC	-

Espécie	Voucher	Localidade	Número de acesso no Genbank
<i>Brachycephalus</i> sp. (aff. <i>pernix</i>)	TC281	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus</i> sp. (aff. <i>pernix</i>)	TC282	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus</i> sp. (aff. <i>pernix</i>)	TC283	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Brachycephalus</i> sp. (aff. <i>pernix</i>)	TC285	São Francisco do Sul, SC	-
<i>Haddadus binotatus</i>	CFBHT 16973	Tijuca, RJ	-
<i>Ischnocnema guentheri</i>	DZUP 448	Morretes, PR	KX025518
<i>Ischnocnema parva</i>	CFBHT 16300	Teresópolis, RJ	-
<i>Ischnocnema parva</i>	MNRJ 44559	Teresópolis, RJ	JX267522

CONCLUSÕES

- Novas populações de *Brachycephalus* foram encontradas nos municípios de Garuva, Itapoá e São Francisco do Sul, no nordeste de Santa Catarina.
- Uma nova espécie de sapinho-pingo-de-ouro [*Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*)] encontra-se em processo de descrição taxonômica, e constitui o primeiro registro de ocorrência deste grupo de espécies em áreas de baixa altitude.
- Ao investigar a distribuição de *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) foram descobertas populações próximas geograficamente que apresentam alta homogeneidade entre suas sequências de DNA analisadas, mas claramente são diferenciadas fenotipicamente, apresentando colorações que variam de crípticas a conspícuas.
- O grupo de espécies de *B. pernix* foi analisado para fins comparativos e a literatura relacionada, bem como as descrições originais destas espécies, apresentaram diversas inconsistências, ressaltando a necessidade de uma revisão taxonômica.
- Até o momento, não há evidências suficientes para afirmar que as diferentes populações de *Brachycephalus* encontradas tratam-se de uma mesma espécie, ou se há mais de uma espécie sob análise na região.
- Novos estudos moleculares e uma maior amostragem devem auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e na identidade das populações *Brachycephalus* sp. (aff. *pernix*) encontradas.
- Os resultados deste trabalho contribuem para um melhor entendimento da distribuição geográfica e altitudinal do gênero *Brachycephalus*, bem como auxiliam na compreensão da sua história evolutiva, taxonômica e ecológica.

ANEXO I

Comments on the current taxonomy of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae)

Correspondência submetida para revista Zootaxa em março de 2017

Comments on the current taxonomy of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae)

THAIS HELENA CONDEZ^{1,2}, JULIANE PETRY DE CARLI MONTEIRO¹ & CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD¹

¹*Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia e Centro de Aquicultura (CAUNESP), Campus Rio Claro, Av. 24-A, 1515, caixa postal 199, 13506–900, Rio Claro, SP, Brazil*

²*Corresponding author. E-mail: thacondez@gmail.com*

Since the first, and simplest, description of a species of the genus *Brachycephalus* Fitzinger 1826, by Spix (1824), an increasing number of informative traits has been investigated to facilitate species diagnoses, including those dealing with osteology (Izecksohn 1971), sexual dimorphism in body size (Alves *et al.* 2006), hyperossification of the skull and skeleton (Haddad *et al.* 2010) and advertisement call (Garey *et al.* 2012), plus traits from molecular data (Condez *et al.* 2016). However, the recent descriptions of nine species of *Brachycephalus* (see Pie & Ribeiro 2015; Ribeiro *et al.* 2015; Bornschein *et al.* 2016) included inadequate diagnoses, which lacked indispensable information for any further comparisons among species. Herein, we intend to address the main flaws of these species descriptions and highlight the urgent need for a rigorous review of the genus *Brachycephalus* in order to assess the validity of these taxonomic proposals.

Currently, the miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* are represented by 31 species, of which 15 comprise the southern Atlantic Forest group of pumpkin-toadlets (Clemente-Carvalho *et al.* 2011; Bornschein *et al.* 2016; Frost *et al.* 2016). According to available molecular phylogenies, five species were originally classified as belonging to this group: *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. izecksohni*, *B. pernix*, and *B. pombali* (Clemente-Carvalho *et al.* 2011; Padial *et al.* 2014). *Brachycephalus tridactylus* was later added based on morphological similarity (Garey *et al.* 2012). Recently, seven species of *Brachycephalus* were described by Ribeiro *et al.* (2015), more than doubling the number of known species for the southern Atlantic Forest group: *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, *B. leopardus*, *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, and *B. verrucosus*. Later, Pie & Ribeiro (2015) described *B. quiririensis* and, shortly thereafter, Bornschein *et al.* (2016) described *B. albolineatus*.

In a recent description of a new species of *Brachycephalus*, Bornschein *et al.* (2016) acknowledged that a new species is a hypothesis based on available evidence and any further evaluation, such as with bioacoustical and molecular methods, is important for further

corroborating the existence of a novel species. Taxonomists should attempt to use as much evidence as possible, and rely on the quality of data presented to support the identity of a new species. However, Pie & Ribeiro (2015), Ribeiro *et al.* (2015), and Bornschein *et al.* (2016) failed to provide all available evidence in their species diagnoses, as exemplified by the absence of molecular data, which was just briefly mentioned and only later provided by Firkowski *et al.* (2016). These species descriptions are also insufficient and based on doubtful diagnostic characters, such as body color and roughness of the skin; traits that may vary intraspecifically as a result of polymorphism or even be simply artifacts of specimen preservation (authors' personal observation). In addition, there are several key concerns regarding current *Brachycephalus* taxonomy, including poor and/or careless presentation of data, such as the use of incorrect anatomical terms and insufficient comparisons with related species.

In order to proceed with proper species identifications and comparisons among related taxa, a complete list of examined material needs to be included, both listed in the type series section and in the article's appendices. Pie & Ribeiro (2015) and Ribeiro *et al.* (2015) presented several inconsistencies between the number of specimens listed in each type series and those presented in the main text and tables. Aside from *Brachycephalus boticario*, *B. fuscolineatus*, *B. leopardus*, and *B. mariaeterezae*, for which all adult specimens listed in the type series were measured and listed in tables, all other species possessed either missing data or inconsistencies in identification and/or number of paratopotypes and paratypes reported. For example, in their description of *B. olivaceus*, authors attributed seven specimens to the type series but provided body measurements for 17 specimens (Table 3 in Ribeiro *et al.* 2015). Furthermore, the authors excluded critical information about whether specimens were adults or juveniles. A similar issue occurred with the type series of *B. auroguttatus* (Ribeiro *et al.* 2015). However, one cannot distinguish whether these inconsistencies are related to typographical errors or to the true absence of information of analyzed specimens. For *B. quiririensis* and *B. verrucosus*, not all of the adult specimens of the type series were included in the type series measurements, and the authors did not specify the reasons for this exclusion or why they chose only certain specimens to describe body size variation in the type series of these species (Pie & Ribeiro 2015; Table 7 in Ribeiro *et al.* 2015).

The body-size measurements of the species described by Pie & Ribeiro (2015) and Ribeiro *et al.* (2015) lacked information regarding sex, which results in wide ranges of intraspecific variation in snout-vent length (SVL), thereby making comparisons among species difficult. *Brachycephalus* females are typically larger than males and, even in the smallest species of pumpkin-toadlets of the southern Atlantic Forest group (*B. brunneus*, *B.*

ferruginus, *B. izecksohni*, *B. pernix*, *B. pombali*, and *B. tridactylus*), SVL ranges from 9.3 – 13.9 mm in males and 10.9 – 15.8 mm in females (Pombal *et al.* 1998; Ribeiro *et al.* 2005; Alves *et al.* 2006; Garey *et al.* 2012). With the available data for both sexes in the original species descriptions it is possible to distinguish several related species, such as *B. pernix*, *B. brunneus*, *B. izecksohni*, and *B. tridactylus*, based only on body-size measurements (Clemente-Carvalho *et al.* 2011; Pie *et al.* 2013). However, interspecific variation in mean body size among closely related species is not clear unless taking sexual size dimorphism into consideration. Bornschein *et al.* (2016) included only males in the type series of *B. albolineatus*, yet still used body size to diagnose the new species, hence disregarding known sexual size dimorphism within *Brachycephalus*.

Sexual dimorphism within species of *Brachycephalus* is currently only recognized for body size, vocal slits (present in males) and oocytes (present in females). The mature oocytes of adult females are sometimes visually perceptible through the transparent tegument of the venter. Alves *et al.* (2009) erroneously attributed vocal slits to a female of *B. pitanga*, which was subsequently followed in the original descriptions of *B. toby* (Haddad *et al.* 2010), *B. guarani* (Clemente-Carvalho *et al.* 2012), *B. olivaceus* (Ribeiro *et al.* 2015), *B. verrucosus* (Ribeiro *et al.* 2015), and *B. quiririensis* (Pie & Ribeiro 2015). This error was replicated presumably due to it being overlooked by authors and journal referees. In order to verify the presence of vocal slits, we analyzed male and female specimens (preferably of the type series) of *B. crispus*, *B. ephippium*, *B. fuscolineatus*, *B. garbeanus*, *B. guarani*, *B. olivaceus*, *B. pitanga*, *B. quiririensis*, *B. sulfuratus*, and *B. toby*, representing the main lineages within the genus (Appendix 1). We found vocal slits to be present in males and absent in females, as expected. In some species the vocal slits are easily observed (Figure 1), and difficulties in identifying this structure generally relate to poor quality of the preserved material. For example, we could not identify the vocal slits in the holotypes of *B. mariaeterezae* and *B. verrucosus* due to the extremely dry condition of the specimens. Except for Bornschein *et al.* (2016), where the entire type series of *B. albolineatus* is comprised of males, Pie & Ribeiro (2015) and Ribeiro *et al.* (2015) determined the sex of the holotypes, but did not mention the sexes of the specimens in the type series. Furthermore, along with replicating the error of reporting females with vocal slits, these authors also did not mention how they determined the sex of specimens.

As previously mentioned, our expanding knowledge of the diversity of *Brachycephalus* has made it necessary to include more than the few conventional characters traditionally used to diagnose species (Condez *et al.* 2016). Among additional character information, osteology remains one of the most important sources of characters for correctly diagnosing species of

Brachycephalus (Clemente-Carvalho *et al.* 2011). The evolutionary process of miniaturization is evident in all species of the genus *Brachycephalus*, so the reduction and loss of phalangeal bones in fingers and toes are fundamental diagnostic traits for these miniaturized species (Yeh 2002). However, the reduction and loss of phalanges cannot be adequately evaluated externally by a simple assessment of the reduced number of fingers and toes, as has been done in some of the recent *Brachycephalus* descriptions (Garey *et al.* 2012; Pie & Ribeiro 2015; Ribeiro *et al.* 2015). We argue that at least one of the paratypes of a new species must be cleared and double-stained or submitted to a high-resolution micro-computed tomography (micro-CT) scan to visualize the internal skeleton.

Ribeiro *et al.* (2015) provided no information about osteology, while Bornschein *et al.* (2016) included a micro-CT scan and a brief osteological description for *B. albolineatus*, but did not compare this information across species. The micro-CT scan employed by Bornschein *et al.* (2016) is non-destructive and very helpful in cases in which the type series has few individuals. The type series of *Brachycephalus albolineatus*, *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, and *B. olivaceus* include less than ten specimens, which may have influenced the authors not to clear and double-stain specimens. Unfortunately, the lack of osteological information in Pie & Ribeiro (2015) and Ribeiro *et al.* (2015) clearly undermine their species diagnoses.

The species descriptions of Pie & Ribeiro (2015), Ribeiro *et al.* (2015), and Bornschein *et al.* (2016), did not analyze the configuration of the pectoral girdle and the reduction of bones, such as the number of phalanges and functional fingers and toes (as analyzed previously in Ribeiro *et al.* 2005, for example). Furthermore, the simple external description of fingers and toes provided by these studies employed terms to describe just the general appearance of tips, presence and/or absence of fingers and toes, and their relative sizes, and were not congruent throughout the main text. Furthermore disagreements exist between the main text and supporting figures. Plus, we found some terminological inconsistencies with the literature, such as the use of “externally absent”, “vestigial or very reduced”, and “relatively distinct”. For example, according to the original descriptions, Toe V is “very reduced” in *B. brunneus* (Ribeiro *et al.* 2005) and *B. pombali* (Alves *et al.* 2006), “reduced or vestigial” in *B. leopardus* (Ribeiro *et al.* 2015), and “vestigial” in *B. quiririensis* (Pie & Ribeiro 2015). After analyzing preserved specimens, the original figures and species descriptions, we concluded that Toe V is externally absent in all of these species. Similarly, Toe I is also externally absent in *B. boticario* but described as “very reduced” by Ribeiro *et al.* (2015). In this particular case, the absence of Toe I is easily confirmed by the included figures and by the description of the relative lengths of toes ($II < III < IV$), in which the authors considered Toe I as absent. A confounding point is that Toe II is described as “relatively distinct” in *B. auroguttatus*, *B.*

mariaeterezae, *B. olivaceus*, and *B. verrucosus* (Ribeiro *et al.* 2015), which could mean the same thing as being reduced.

Ribeiro *et al.* (2015) considered the presence of external metatarsal tubercles as an important diagnostic trait for species related to *B. pernix* (herein treated as the southern Atlantic Forest pumpkin-toadlets). After analyzing several specimens, we conclude that this trait is not easily distinguishable and should be avoided in species comparisons. The joint between the metatarsal elements and the fibulare and tibiale can interfere with the recognition of external metatarsal tubercles, depending on the position that the foot was in when the specimen was preserved. Aside from the inappropriate use of metatarsal tubercles as diagnostic traits, the authors interchangeably used the terms metatarsal and metacarpal tubercles (Table 15 in Ribeiro *et al.* 2015). According to the original species descriptions, metacarpal tubercles are absent in all species within the *B. pernix* group (Pombal *et al.* 1998; Ribeiro *et al.* 2005; Alves *et al.* 2006; Garey *et al.* 2012). The outer metatarsal tubercle, which is sometimes wrongly named as metacarpal tubercle in Ribeiro *et al.* (2015, Table 15), is distinct, large, and ovoid in all species within this group, except for *B. tridactylus* (Garey *et al.* 2012) and *B. pernix* (Pombal *et al.* 1998). Thus, the comparative information presented in Ribeiro *et al.* (2015) is incorrect.

Along with other evidence, body color and skin texture are commonly used in diagnoses of species of *Brachycephalus*. However, there were several inconsistencies in the descriptions of these characteristics by Pie & Ribeiro (2015), Ribeiro *et al.* (2015), and Bornschein *et al.* (2016), who did not even mention any other diagnostic traits, such as the aforementioned hyperossification and reduction of bones. In the diagnosis of *B. fuscolineatus*, Ribeiro *et al.* (2015) described the general coloration as “predominantly yellow with a stripe along the vertebral column varying from dark brown to black,” but failed to mention the pronounced green color accompanying the vertebral stripe of specimens in life (Figure 10 in Ribeiro *et al.* 2015). Additionally, the species descriptions in Ribeiro *et al.* (2015) lacked information on intrapopulation variation in body color. Intraspecific color variation in life was only presented for *B. mariaeterezae* (Figure S1 in Ribeiro *et al.* 2015), *B. quiririensis* (Figure 3 in Pie & Ribeiro 2015), and *B. albolineatus* (Figure 3 in Bornschein *et al.* 2016). Intraspecific color variation in preservative is provided for *B. albolineatus*, *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, *B. olivaceus*, and *B. verrucosus* in a single image in the original description of *B. albolineatus* (Figure 4 in Bornschein *et al.* 2016).

When characterizing the dorsal skin texture of *B. auroguttatus*, *B. boticario*, *B. fuscolineatus*, and *B. verrucosus*, Ribeiro *et al.* (2015) used a variety of terms including “granular”, “rough”, “rugose”, and “very rough”. Also, confusion is introduced when the

terms “very rough dorsum”, “rough dorsum” and “dorsum granular” are employed. To be useful for subsequent comparisons the application of these terms must be properly justified according to the presence and/or absence of granules or other structures, such as warts and glands, on the dorsal skin of the specimens. Similar to the condition of body color, the general texture of the tegument in *Brachycephalus* can be altered due to desiccation in preserved specimens and could result in a technical artifact being used as a diagnostic character.

Another serious flaw of the aforementioned species descriptions is the lack of sufficient species comparisons, which are brief and are sometimes included in the description of diagnostic traits in the diagnosis section (Ribeiro *et al.* 2015). Furthermore, not all related species are included in comparisons. For example, in the species diagnosis section of *B. boticario* the authors mention that the new species is “highly similar to *B. pernix*, but distinct from that species by its rugose dorsum” (Ribeiro *et al.* 2015). The authors continue to employ the single diagnostic character of skin texture in species comparisons: “the rugose body dorsum (of the new species) is also similar to that of *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. auroguttatus*, *B. verrucosus*, and *B. fuscolineatus*, as opposed to the smooth dorsum of *B. izecksohni*, *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. pombali*, *B. tridactylus*, and *B. leopardus*” (Ribeiro *et al.* 2015). However, the authors did not provide substantial differences among the newly described species of *Brachycephalus*; so, readers are left with little idea of how the authors formed their conclusions regarding the distinction of the new species from *B. mariaeterezae*, *B. olivaceus*, *B. auroguttatus*, *B. verrucosus*, and *B. fuscolineatus*, the five other species analyzed in the same publication. Perhaps even more problematic is the description of *B. quiririensis* (Pie & Ribeiro 2015), which is not compared in depth with any other species of *Brachycephalus*, even related species described in Ribeiro *et al.* (2015). Despite of the attempt to present useful comparisons among the described species and *B. albolineatus*, Bornschein *et al.* (2016) had to rely on similarities in body color and texture, since there was no information on osteology or other morphological characters available for the species described by Pie & Ribeiro (2015) and Ribeiro *et al.* (2015).

As a result of the increased interest in this group of miniaturized toadlets, several new species of *Brachycephalus* are likely to be described in upcoming years. Meanwhile, despite being considered microendemics in isolation along the main mountains of the coastal Atlantic Forest (Pie *et al.* 2013), the widespread distribution of some species of *Brachycephalus* (i.e., *B. brunneus*, *B. ephippium*, *B. leopardus*, *B. nodoterga*, *B. olivaceus* and all known species of flea-toads within the genus; authors’ personal observation) suggests that perhaps not all recently discovered populations should be considered as new species before being properly analyzed and compared to all valid species.

At the same time that there is still a great number of new species to be described, many amphibian species are under dramatic declines and extinctions (Köhler *et al.* 2017). Most *Brachycephalus* species are not properly evaluated in terms of conservation status due to the lack of information on natural history and distribution range. A well-done taxonomy is also necessary for adequate threat status assessments with obvious influence in the effective conservation planning and future management of the amphibian diversity.

It is clear that the lack of information in species descriptions, and/or the inclusion of misinformation, will adversely affect efforts to understand the taxonomy and systematics of the genus *Brachycephalus*, and will likely propagate subsequent errors in the literature. Oversimplified species descriptions, such as those by Pie & Ribeiro (2015), Ribeiro *et al.* (2015), and Bornschein *et al.* (2016), are highly inappropriate and need to be prevented because they jeopardize future efforts to understand the diversity of this remarkable group of frogs.

Acknowledgments

We thank José P. Pombal Jr. for valuable discussions about sexual dimorphism in *Brachycephalus*; Julio C. Moura-Leite, Marcio R. Pie and Luiz F. Ribeiro for allowing access to preserved specimens under their care; Bianca V. M. Berneck for assistance in figure preparation; Miranda M. Gray and Erik R. Wild for language review and comments on an earlier version of this manuscript. Our work was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP; #2013/50741-7, #2014/50342-8, #2015/00641-1, #2016/16871-9) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #302518/2013-4 and #131947/2015-0).

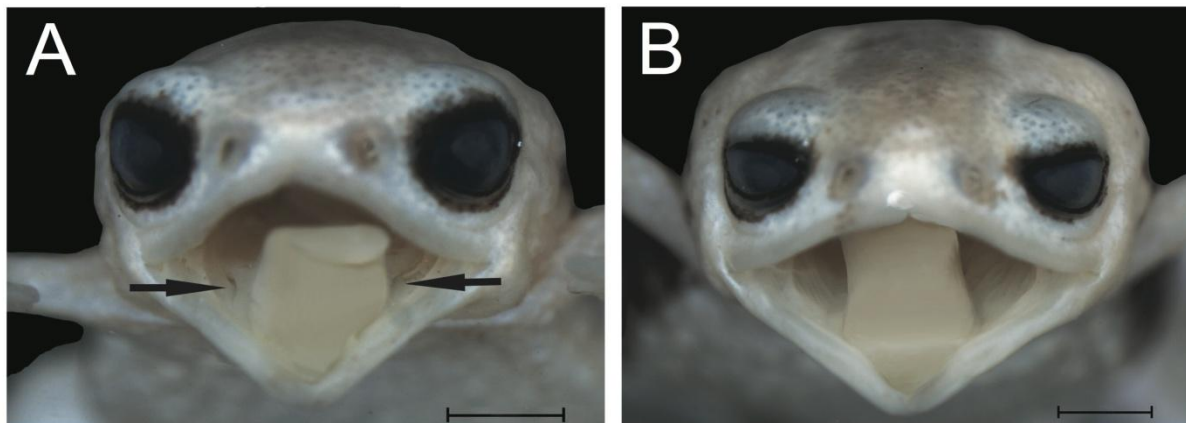
References

- Alves, A.C.R., Ribeiro, L.F., Haddad, C.F.B. & Reis, S.F. (2006) Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná state, southern Brazil. *BioOne*, 62 (2), 221–233.
<https://doi.org/10.1655/05-41.1>
- Alves, A.C.R., Sawaya, R.J.S., 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), 212–219.
<https://doi.org/10.1670/0022-1511-43.2.212>

- Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F., Blackburn, D.C., Stanley, E.L. & Pie, M.R. (2016). A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Santa Catarina, southern Brazil. *PeerJ*, 4 (e2629), 1–19.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2629>
- Clemente-Carvalho, R.G.B., Klaczo, J., Perez, I., Alves, A.C.R., Haddad, C.F.B. & Reis, S.F. (2011) Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 79–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.05.017>
- Clemente-Carvalho, R.B.G., Giaretta, A.A., Condez, T.H., Haddad, C.F.B. & Reis, S.F. (2012) A new species of miniaturized toadlet, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae), from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Herpetologica*, 68, 365–374.
<http://dx.doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00085.1>
- Condez, T.H., Monteiro, J.P.C., Comitti, E.J., Garcia, P.C.A., Amaral, I.B. & Haddad, C.F.B. (2016) A new species of flea-toad (Anura: Brachycephalidae) from southern Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa*, 4083, 40–56.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4083.1.2>
- Firkowski, C.R., Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F. & Pie, M.R. (2016) Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 345–360.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.023>
- Frost, D.R. (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from:
<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed 10 Dec 2016)
- Garey, M.V., Lima, A.M.X., Hartmann, M.T. & Haddad, C.F.B. (2012) A new species of miniaturized toadlet, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae), from southern Brazil. *Herpetologica*, 68 (2), 266–271.
<https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00074.1>
- Haddad, C.F.B., Alves, A.C.R., Clemente-Carvalho, R.B.G. & Reis, S.F. (2010) A new species of *Brachycephalus* from the Atlantic Rain Forest in São Paulo state, southeastern Brazil (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Copeia*, 2010, 410–420.
<https://doi.org/10.1643/CH-09-102>
- 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.

- Köhler, J., Jansen, M. Rodríguez, A., Kok, P.J.R., Toledo, L.F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C.F.B., Rödel, M. & Vences, M. (2017) The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, in press.
- Padial, J.M., Grant, T. & Frost, D.R. (2014) Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. *Zootaxa*, 3825 (1), 1–132.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3825.1.1>
- Pie, M.R., Meyer, A.L.S., Firkowski, C.R., Ribeiro, L.F. & Bornschein, M.R. (2013) Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecological Modelling*, 250, 165–176.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.10.019>
- Pie, M.R. & Ribeiro, L.F. (2015) A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Quiriri mountain range of southern Brazil. *PeerJ*, 3 (e1179), 1–9.
<https://doi.org/10.7717/peerj.1179>
- Pombal Jr., J.P., Wistuba, E.M. & Bornschein, M.R. (1998) A new species of brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology*, 32 (1), 70–74.
<https://doi.org/10.2307/1565481>
- Ribeiro, L.F., Alves, A.C.R., Haddad, C.F.B. & Reis, S.F. (2005) Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1985 from the state of Paraná, southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, 519, 1–18.
- Ribeiro, L.F., Bornschein, M.R., Belmonte-Lopes, R., Firkowski, C.R., Morato, S.A.A. & Pie, M.R. (2015) Seven new microendemic species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil. *PeerJ*, 3 (e1011), 1–36.
<https://doi.org/10.7717/peerj.1011>
- Spix, J.B. (1824) Animalia nova sive species novae testudinum et ranarum, quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I Bavariae Regis suscepto collegit et descripsit. Monachii, *Typis Francisci Seraphi Hybschmanni*, 22, 1–29.
- Yeh, J. (2002) The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution*, 56, 628–641.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01372.x>

Figure 1. Vocal slits in preserved specimens of *Brachycephalus quiririensis*. A. Adult male (CFBH 40434), arrows indicate vocal slits; B. adult female (CFBH 40406), without vocal slits. Scale bar = 2 mm.



Appendix 1. Specimens of *Brachycephalus* examined for the presence of vocal slits.

Brachycephalus crispus – CFBH 10698–99, 10701–02, 10707, 23894, 23902, 27857–58, 27861–63, 27865–68, 29659–60, 29822–23, 29825–27, 29829–38, 29840 (paratopotypes), Bacia B, Núcleo Cunha, Parque Estadual da Serra do Mar, municipality of Cunha, state of São Paulo; *Brachycephalus ephippium* – CFBH 13946, Rocio, municipality of Petrópolis, state of Rio de Janeiro; CFBH 16822, municipality of Atibaia, state of São Paulo; CFBH 16828, municipality of São Francisco Xavier, state of São Paulo; CFBH 16835, 16850, 16856. 30835, 30838, 35766, 35768, 40241, 40245, Serra do Japi, municipality of Jundiá, state of São Paulo; *Brachycephalus fuscolineatus* – CFBH 40448, Morro do Baú, municipality of Ilhota, state of Santa Catarina; *Brachycephalus garbeanus* – CFBH 23569–70, municipality of Macaé de Cima, state of Rio de Janeiro; CFBH 26919, municipality of Nova Friburgo, state of Rio de Janeiro; *Brachycephalus guarani* – CFBH 27233 (holotype), CFBH 27231–32, 27234–35, 29564 (paratopotypes), Morro Prumirim, municipality of Ubatuba, state of São Paulo; *Brachycephalus mariaeterezae* – MHNCI 9811 (holotype), Reserva Particular do Patrimônio Natural Caetezal, municipality of Joinville, state of Santa Catarina; *Brachycephalus olivaceus* – CFBH 40439–40, 40442–47, Castelo dos Bugres, APA Dona Francisca, municipality of Joinville, state of Santa Catarina; *Brachycephalus pitanga* – CFBH 16746 (holotype), CFBH 16747, 16750, 16755, 16756, 16758, 16760–65 (paratopotypes), Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, municipality of São Luís do Paraitinga, state of São Paulo; *Brachycephalus pombali* – CFBH 8048, 8051, Pico da Igreja, municipality of Guaratuba, state of Paraná; *Brachycephalus quiririensis* – CFBH 40406, 40412–14, 40418–20, 40422–26, 40428–35, Campos do Quiriri, municipality

of Garuva, state of Santa Catarina; *Brachycephalus sulfuratus* – CFBH 39150 (paratypes), Morro do Anhangava, municipality of Quatro Barras, state of Paraná; CFBH 39139–40, 39329–32 (paratopotypes), Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais da Univille, Vila da Glória, Distrito do Saí, municipality of São Francisco do Sul, state of Santa Catarina; CFBH 39141–42, 39144, 39407–10 (paratypes), Morro do Cantagalo, Vila da Glória, Distrito do Saí, municipality of São Francisco do Sul, state of Santa Catarina; CFBH 39145–47 (paratypes), Castelo dos Bugres, Área de Proteção Ambiental Dona Francisca, municipality of Joinville, state of Santa Catarina; CFBH 39148–49 (paratypes), Parque Estadual da Ilha do Cardoso, municipality of Cananéia, state of São Paulo; *Brachycephalus toby* – CFBH 20598 (holotype), CFBH 20581–83, 20586–88, 20590–91, 20593, 20595–96, 20599, 23004–06 (paratopotypes), CFBH 12902–03, 20597, Morro do Corcovado, municipality of Ubatuba, state of São Paulo; *Brachycephalus verrucosus* – MHNCI 9819 (holotype), Morro da Tromba, municipality of Joinville, state of Santa Catarina.