

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARINA RAUEN FIRKOWSKI

A EVOLUÇÃO DA MINIATURIZAÇÃO EM *BRACHYCEPHALUS* (ANURA:
BRACHYCEPHALIDAE)

CURITIBA

2011

CARINA RAUEN FIRKOWSKI

A EVOLUÇÃO DA MINIATURIZAÇÃO EM *BRACHYCEPHALUS* (ANURA:
BRACHYCEPHALIDAE)

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Zoologia como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Marcio R. Pie

CURITIBA

2011

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores e professoras que durante minha graduação contribuíram, de maneira direta ou indireta, para minha formação como bióloga. Em especial, agradeço ao Marcio Pie por sua amizade, orientação e tudo que me ensinou durante esse período que passou.

Aos professores Mauricio Osvaldo Moura e Carlos Eduardo Conte agradeço também por aceitarem o convite para compor minha banca.

Obrigada a todos os colegas de laboratório, presentes e passados, aprendi com cada um de vocês.

Agradeço a minha família e amigas, sempre tive vocês ao meu lado e sem dúvida todos contribuíram para minha formação.

Com todo meu coração, agradeço a minha mãe Margarida Gandara Rauen e ao meu pai Carlos Firkowski por todo o amor, amizade e apoio sempre. Amo vocês.

RESUMO

Brachycephalus é um gênero de anuros endêmicos da floresta Atlântica, com distribuição geralmente restrita a ambientes alto-montanos. A miniaturização é um dos fenômenos peculiares de sua biologia. Essa monografia propõe uma análise comparativa da variação do tamanho de corpo em *Brachycephalus*, ao longo de gradientes latitudinal e altitudinal de sua distribuição geográfica. É testada a hipótese de maior grau de miniaturização em maiores latitudes e altitudes, considerando 14 espécies atualmente descritas e seis novas recentemente descobertas. A correlação entre as variáveis tamanho de corpo, latitude e altitude é obtida através da análise filogenética de quadrados mínimos generalizada. Os dados mostram melhor ajuste a um modelo de evolução por seleção estabilizadora e os resultados da análise suportam o efeito de ambas as variáveis sobre a evolução da miniaturização no gênero. Foi encontrada uma relação oposta à regra de Bergmann: latitude e altitude mostraram correlação negativa com a variação do tamanho de corpo entre os sapinhos-da-montanha, com efeito preponderante da latitude. Esses resultados são discutidos quanto ao desenvolvimento de *Brachycephalus* ser limitado por condições ambientais.

Palavras-chave: Regra de Bergmann. PGLS. Hiper-ossificação.

ABSTRACT

Brachycephalus is an endemic frog genus of the Atlantic forest, with distribution generally restricted to mountain tops. Miniaturization is one of the peculiar phenomena of its biology. This study proposes a comparative analyses of the variation in body size across latitudinal and altitudinal gradients throughout *Brachycephalus*' distribution. The hypothesis of increasing levels of miniaturization being found in higher latitudes e altitudes is tested, considering 14 described species and six recently discovered ones. The correlation between the variables body size, latitude and altitude is inferred through a phylogenetic generalized least squares analysis. The data shows a better fit to an evolution model of stabilizing selection and the results support the effect of both latitude and altitude on the evolution of miniaturization in *Brachycephalus*. Correlation was found in opposite direction to Bergmann's rule: both latitude and altitude show supportive negative correlation with body size, with a preeminent effect of latitude. These results are discussed in terms of *Brachycephalus*' development being limited by environmental condition.

Key words: Bergmann's rule. PGLS. Hyperossification.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
<i>BRACHYCEPHALUS</i> E A FLORESTA ATLÂNTICA.....	8
MICROENDEMISMO DOS SAPINHOS-DE-MONTANHA	9
MINIATURIZAÇÃO EM <i>BRACHYCEPHALUS</i>	10
A DIVERSIDADE DO GÊNERO	11
REGRA DE BERGMANN	11
A REGRA DE BERGMANN E MECANISMOS DE EVOLUÇÃO.....	13
MÉTODOS FILOGENÉTICOS COMPARATIVOS	14
ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CONTRASTES INDEPENDENTES	15
MATERIAL E MÉTODOS	17
ESCOLHA DE VARIÁVEIS.....	17
COMPILAÇÃO DOS DADOS	17
AJUSTE DOS DADOS A UM MODELO DE EVOLUÇÃO.....	20
ESTIMATIVA DA FILOGENIA	20
MÉTODO FILOGENÉTICO DE QUADRADOS MÍNIMOS GENERALIZADO	21
RESULTADOS	21
ESCOLHA DO MODELO DE EVOLUÇÃO.....	22
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ALTITUDINAL.....	22
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

APRESENTAÇÃO

O gênero *Brachycephalus* é endêmico da floresta Atlântica, caracterizado por sua distribuição geralmente restrita a ambientes alto-montanos. Um fenômeno típico da biologia de *Brachycephalus*, é a miniaturização. Embora reconhecida para diversos grupos de animais, sua importância e consequências para a biologia e evolução ainda são desconhecidas. Os dados já disponíveis para esses anuros permitem a busca de uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos em seu processo evolutivo. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi testar a hipótese de variação de tamanho corporal ao longo de gradientes latitudinal e altitudinal, resultando em maior grau de miniaturização em maiores latitudes e altitudes.

Na primeira parte da monografia, o gênero *Brachycephalus* é apresentado e caracterizado quanto à distribuição geográfica, diversidade e peculiares da história de vida e biologia, justificando o microendemismo e miniaturização desse grupo taxonômico. Trata, também, da definição da regra de Bergmann para gradientes de tamanho de corpo, revisando seu suporte entre táxons e brevemente discutindo os mecanismos responsáveis pela observação dos padrões. A abordagem metodológica de contrastes é descrita. Na segunda parte do trabalho, são apresentadas considerações sobre os materiais, métodos, resultados, a discussão e conclusão.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BRACHYCEPHALUS E A FLORESTA ATLÂNTICA

O gênero *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) constitui um grupo notável de anuros, com inúmeras peculiaridades em sua história de vida. Denominados popularmente sapinhos-de-montanha, são endêmicos da floresta Atlântica no sul e sudeste do Brasil (ex. RIBEIRO *et al.*, 2005, POMBAL JR. & GASPARINI, 2006, NAPOLI *et al.*, 2011).

A floresta Atlântica é considerada um dos *hotspots* de riqueza e biodiversidade

do mundo. É também caracterizada por um alto nível de endemismo, representado pelas mais de 8.500 espécies endêmicas (MYERS *et al.*, 2000) que correspondem a cerca de 50 % da fauna e flora local (COSTA *et al.*, 2000). Apesar de sua importância como um bioma altamente diverso, está entre os mais ameaçados. Estima-se que a distribuição original da floresta Atlântica excedia 1,5 milhões de km² que se estendiam desde o nordeste brasileiro até partes do Paraguai e Argentina (GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2003). Atualmente, mais de 93 % dessa formação foi perdida (MYERS *et al.* 2000) e as áreas remanescentes concentram-se principalmente ao longo da costa brasileira. Esforços consideráveis têm sido feitos para implementar estratégias eficientes de conservação e definir regiões prioritárias para proteção (TABARELLI *et al.*, 2005). Apesar do alto grau de fragmentação e perda de ambientes na floresta Atlântica, novas espécies continuam sendo descobertas (MORELLATO & HADDAD, 2000).

Um dos maiores desafios à conservação de um bioma complexo como esse é compreender os processos que geraram e mantém sua biodiversidade (MORITZ, 2002). Neste sentido, pouco se sabe sobre a história evolutiva da floresta Atlântica e os mecanismos responsáveis pela distribuição atual de suas espécies.

MICROENDEMISMO DOS SAPINHOS-DE-MONTANHA

Atualmente, os sapinhos-de-montanha são representados por 15 espécies descritas que apresentam distribuição disjunta ao longo das serras do Mar e da Mantiqueira (POMBAL JR. & IZECKSOHNI, 2011; HADDAD *et al.*, 2010; POMBAL JR., 2010).

O padrão de microendemismo observado no gênero *Brachycephalus* é justificado ao considerar sua baixa capacidade de dispersão e preferência por viver na serrapilheira em ambientes alto-montanos, garantindo o isolamento das populações por vales. Várias espécies de *Brachycephalus* são descritas e conhecidas para montanhas específicas, principalmente na Serra do Mar (ex. POMBAL JR. *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2006). Além de sua biologia e ecologia peculiares (POMBAL JR., 1992, 1999; POMBAL JR. *et al.*, 1994; WISTUBA, 1998), os sapinhos-de-montanha constituem um grupo notável pelo

colorido marcante e potencial aposematismo (SEBBEN *et al.* 1986, PIRES *et al.* 2005).

MINIATURIZAÇÃO EM *BRACHYCEPHALUS*

O gênero *Brachycephalus* é também caracterizado pelo alto grau de miniaturização (YEH, 2002). Esse fenômeno refere-se à evolução do tamanho de corpo reduzido em uma linhagem. Os sapinhos-de-montanha não ultrapassam 18 mm de comprimento rostro-cloacal e incluem alguns dos menores tetrápodes terrestres conhecidos. A menor espécie descrita para o gênero é *Brachycephalus didactylus*, em que machos medem no máximo 8,6 mm de comprimento rostro-cloacal e fêmeas 10,2 mm (IZECKSOHN, 1971; ESTRADA & HEDGES, 1996, LEHR & CATENAZZI, 2009, KRAUS, 2011).

A redução corporal tem consequências e custos para a biologia de um organismo e esse fenômeno está geralmente associado à simplificação ou perda de estruturas (HANKEN & WAKE, 1993). Para *Brachycephalus* é descrita a perda de falanges nos apêndices anteriores e posteriores, consequente redução do número de dígitos e a ausência de outros elementos ósseos (YEH, 2002). Outro aspecto associados a evolução da miniaturização nesse grupo de anuros é a hiperossificação de ossos do crânio e vértebras. O grau de mineralização varia, sendo ausente em algumas espécies do gênero (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2009).

Brachycephalus apresenta desenvolvimento direto, com ovos grandes e em pequeno número. Essa estratégia ecológica reprodutiva é também descrita para anuros não miniaturizados, mas em consequência do tamanho de corpo extremamente reduzido, é possível que essa especialização facilite a sobrevivência de *Brachycephalus* na serrapilheira (HANKEN & WAKE, 1993, POMBAL JR., 1999).

Embora a miniaturização seja um fenômeno comum em animais (BUCKUP, 1993, HANKEN & WAKE, 1993 e referências CHEN & CHAO, 1997, RIEPPEL & CRUMLY, 1997), estudos sobre a importância e consequências para a biologia e evolução ainda são escassos (ex. BLANCKENHORN, 2000; DUDLEY, 2000; YEH, 2002).

A DIVERSIDADE DO GÊNERO

O primeiro estudo abrangente sobre as relações filogenéticas de *Brachycephalus* (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011b) indicou um clado sulino, representado pelas espécies descritas do Paraná (*B. brunneus*, *B. izecksohni*, *B. pombali*, *B. ferruginus* e *B. pernix*), como um grupo monofilético independente das outras linhagens. Viagens de campo realizadas nos últimos dois anos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos, UFPR, encontraram 13 espécies novas de *Brachycephalus* ao longo da região sul da floresta Atlântica e pertencentes a este clado. Considerando a existência de várias novas espécies do gênero encontradas ao longo de uma pequena extensão geográfica, aproximadamente 100 km de floresta Atlântica, esses resultados indicam que a diversidade de *Brachycephalus* tem sido consideravelmente subestimada. Sugere-se que a diversificação do clado sulino de *Brachycephalus* pode ter ocorrido de maneira acelerada e associada ao estabelecimento de padrões de microendemismo (PIE *et al.*, não publicado).

A extrema limitação da distribuição geográfica de *Brachycephalus* em "ilhas" no topo de montanhas é responsável pela particular vulnerabilidade à extinção das espécies do gênero. Em geral, as principais consequências do endemismo são alto grau de endogamia, baixa variabilidade genética e elevado risco frente a distúrbios e mudanças ambientais (FREELAND, 2005). Por outro lado, a peculiaridade de suas distribuições geográficas torna essas espécies excelentes modelos para entender a dinâmica de ambientes montanos durante o passado evolutivo recente.

REGRA DE BERGMANN

A variação do tamanho de corpo ao longo de gradientes ambientais é uma das tendências ecogeográficas mais intensamente estudadas (ANGILLETTA & DUNHAM, 2003). Desde sua proposta em 1847, a regra de Bergmann tem recebido constante e considerável atenção (BLACKBURN *et al.*, 1999). Refere-se a variação geográfica do tamanho de corpo em animais. Carl Bergmann argumentou que duas espécies de animais endotérmicos diferindo apenas quanto ao tamanho do corpo teriam suas distribuições geográficas determinadas pelo tamanho corporal. Animais

menores exigiriam climas mais quentes para sobrevivência, levando a predominância de espécies maiores em direção aos pólos e menores próximas à linha do Equador. Em sua definição original, Bergmann considerou o efeito como interespecífico entre espécies proximamente relacionadas (JAMES, 1970). Entretanto, a regra de Bergmann já foi examinada e testada em uma variedade de níveis taxonômicos: entre indivíduos de uma mesma espécie (BARNETT, 1977, SMITH, 1998), entre espécies de um mesmo gênero (GITTLEMAN, 1985), entre grupos funcionais (COTGREAVE & STOCKLEY, 1994), entre espécies de níveis taxonômicos mais elevados (ZEVELOFF & BOYCE, 1988, COTGREAVE, 1994, BLACKBURN & GASTON, 1996b). Inicialmente a validade da regra foi considerada apenas para endotérmicos, como originalmente proposto por Bergmann, porém, estudos posteriores procuraram reconhecer o padrão também entre ectotérmicos (HAWKINS, 1995, MOUSSEAU, 1997, PARTRIDGE & COYNE, 1997, BELK & HOUSTON, 2002). Entretanto, mesmo procurando abranger ampla diversidade de táxons e regiões geográficas, sua aplicação como regra ainda permanece controversa.

Um consenso sobre a validade da regra de Bergmann existe para mamíferos e aves. Entre mamíferos o padrão descrito pelo gradiente é comumente observado (ASHTON *et al.*, 2000, MEIRI & DAYAN, 2003, BLACKBURN & HAWKINS, 2004), embora não se aplique a algumas espécies (MEIRI & SIMBERLOFF, 2004). Grande parte das aves também exhibe gradiente de tamanho de corpo (ASHTON, 2002a, MEIRI & DAYAN, 2003). Entretanto, evidências para a prevalência da regra de Bergmann em ectotérmicos permanecem conflitantes. Peixes parecem respeitar a regra em nível interespecífico (RAY, 1960), embora pouco suporte seja encontrado entre espécies (BELK & HOUSTON, 2002). Considerando anfíbios, o suporte é tanto a favor (RAY, 1960, LINDSEY, 1966) quanto contra (FEDER *et al.*, 1982). Ashton (2002b) propôs estudo bastante abrangente sobre a tendência à variação do tamanho de corpo entre espécies de anfíbios. Seus resultados sugeriram que os gradientes de Bergmann são comuns nesse grupo. Porém, o debate sobre essa questão continuou, pois muitos estudos apontaram para ausência desse padrão em outros grupos de espécies (SCHÄUBLE, 2004, KRIZMANIC *et al.* 2005, LAUGEN *et al.* 2005, MEASLEY & VAN DONGEN 2006, ADAMS & CHURCH, 2007). Dessa maneira, para anfíbios, um padrão geral não pode ser refutado ou confirmado

(ADAMS & CHURCH, 2007).

Grande parte das divergências de opinião é principalmente consequência das interpretações de evidências serem muitas vezes baseadas em definições distorcidas da regra de Bergmann. Complicações ainda permeiam o conceito da proposta, mesmo após 165 anos de sua publicação. Além disso, o nível taxonômico em que a regra de Bergmann é considerada operante pode levar a conclusões tendenciosas. Diversos autores propuseram revisões, reformulações e novas definições para a proposta original sobre a variação geográfica do tamanho corporal. Como um estado derivado, consideraram a aplicação da regra a um nível intra-específico (JAMES, 1970).

As definições posteriores da regra de Bergmann generalizam o padrão aceito entre endotérmicos, para todos os animais. As propostas ainda substituem a relação tamanho de corpo e temperatura por tamanho de corpo e latitude (BARNETT, 1977, GOUDIE & ANKEY, 1986, CUSHMAN *et al.*, 1993). Essa abordagem é sustentada graças à correlação consistente entre latitude e temperatura. Estudos a nível interespecífico têm encontrado padrão na observação de espécies de tamanho de corpo maior vivendo em elevadas latitudes (POULIN & HAMILTON, 1995, BLACKBURN & GASTON, 1996a), apesar das exceções (HAWKINS & LAWTON, 1995, SCHÄUBLE, 2004).

A REGRA DE BERGMANN E MECANISMOS DE EVOLUÇÃO

Há considerável divergência de opinião quanto a definição original de Bergmann incluir a variação geográfica do tamanho de corpo através de mecanismos herdados. Algumas reformulações da regra consideram a relação como um processo puramente empírico, independente de teorias fisiológicas para explicação do padrão (RENSCH, 1938, MAYR, 1956). Outros autores consideram explicitamente os processos responsáveis por essa tendência (LINDSEY, 1966, GOUDIE & ANKEY, 1986).

A hipótese de Bergmann para a variação de tamanho de corpo considera a perda de calor. Animais maiores têm menor razão área de superfície:volume que

animais menores, ajudando na preservação de calor em climas frios e, portanto, levando a predominância de animais de tamanho de corpo maior nessas condições. Seis hipóteses adicionais, revisadas em Blackburn *et al.* (1999), foram propostas por diversos autores na tentativa de explicar a tendência a observação desse padrão.

Embora existam inúmeras hipóteses para explicar a evolução do gradiente de Bergmann, principalmente em animais endotérmicos, há considerável controvérsia quanto a esse padrão ser esperado evoluir em ectotérmicos. A hipótese da conservação de calor pode ou não se aplicar àqueles ectotérmicos que termoregulam (OLALLA-TÁRRAGA & RODRÍGUEZ, 2007, OLALLA-TÁRRAGA *et al.*, 2006). Porém, é improvável para explicar a variação do tamanho de corpo em organismos que não termoregulam (CUSHMAN *et al.*, 1993).

Blackburn (1999) revisa que, ao considerar tanto padrão como processo, a regra é geralmente refutada. Se o padrão é observado, tende-se a ser refutado o mecanismo fisiológico responsável pela tendência observada. O autor justifica que os mecanismos são inúmeros e diferenciados, portanto as possibilidades que levariam uma espécie de tamanho corporal pequeno apresentar *fitness* inferior a uma espécie de tamanho maior em climas frios são diversas. Uma relação positiva não implica efeito do clima sobre as tolerâncias térmicas dos animais se não incluir uma relação positiva intra-específica nessa tendência (BLACKBURN *et al.*, 1999).

Apesar das inúmeras hipóteses propostas para explicar a evolução de gradiente de Bergmann, nenhuma responde porque esse padrão deve ser esperado em vertebrados ectotérmicos. Tanto do ponto de vista teórico quanto empírico, a questão “Anfíbios respeitam a regra de Bergmann?” permanece sem resposta.

MÉTODOS FILOGENÉTICOS COMPARATIVOS

Compreender quais mecanismos estão envolvidos no processo evolutivo e são responsáveis pela evolução das características biológicas de uma espécie exige conhecer sua história. Obter uma filogenia é uma maneira de reconstruir uma estimativa do passado. Muitas perguntas podem então ser feitas no que diz respeito a como tais espécies evoluíram. Com o desenvolvimento da biologia molecular como

ferramenta para o estudo da evolução, métodos analíticos foram propostos e a busca por respostas para questões a muito tempo discutidas pôde ser retomada. Entre as abordagens, estão as análises de macroevolução que consideram a filogenia através de métodos filogenéticos comparativos (PARADIS, 2006).

Os dados disponíveis para os sapinhos-de-montanha permitem a busca de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em seu processo evolutivo, sua importância e consequências. A filogenia oferece uma estimativa da história evolutiva das espécies e permite testar se há correlação entre características e a filogenia (PARADIS, 2006). Através de métodos filogenéticos comparativos, será testada a relação da variação de tamanho entre as espécies do gênero *Brachycephalus* ao longo de sua distribuição geográfica e gradientes altitudinais. A hipótese formulada, portanto, consiste na variação do tamanho corporal ao longo de gradientes latitudinal e altitudinal, resultando em maior grau de miniaturização com o aumento da latitude e altitude, em direção contrária a regra de Bergmann. Para 14 espécies atualmente conhecidas de *Brachycephalus* e 6 novas em processo de descrição, essa previsão será testada através de métodos filogenéticos comparativos para inferir a correlação entre mudanças evolutivas e relações filogenéticas nesse grupo de espécies.

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CONTRASTES INDEPENDENTES

Da perspectiva analítica comparativa, dois pontos devem ser considerados quando se incorpora uma filogenia aos dados: (i) a estimativa dos modelos de evolução; e (ii) o fato que as espécies não são independentes entre si quanto a suas características e relações filogenéticas. Esses pontos estão intimamente relacionados, pois o impacto da filogenia na distribuição de uma característica depende não apenas das relações entre as espécies, mas também de como essa característica evolui (HARVEY & PAGEL, 1991). Felsenstein (1985) foi o primeiro a propor um método que considera a filogenia em uma análise comparativa de variáveis contínuas, PIC (*Phylogenetic Independent Contrasts*). A abordagem de contrastes independentes foi desenvolvida para investigar a correlação evolutiva entre características herdadas, corrigindo o problema da falta de independência estatística. Os contrastes passam a refletir as diferenças genéticas entre as

espécies de forma linear, porque o método é baseado no modelo de evolução por movimento Browniano (BM).

O método PIC de Felsenstein (1985) é o mais utilizado em análises de correlação evolutiva entre caracteres quantitativos. Dele são derivadas abordagens com modificações propostas para tornar o método mais robusto à violações no pressuposto de evolução por BM. O método filogenético de quadrados mínimos generalizado (PGLS - *Phylogenetic Generalized Least Squares*) permite estimar a relação entre caracteres contínuos. Como modificação do PIC de Felsenstein, permite considerar a filogenia e, através de testes e dependendo do modelo de evolução escolhido, especifica de quais diferentes maneiras a estrutura da árvore pode afetar a covariância entre características (MARTINS & HANSEN, 1997). Além de BM, a análise PGLS implementa o modelo de evolução Ornstein-Uhlenbeck (O-U). O método também inclui o cálculo das correlações, testando vários fatores ao mesmo tempo. Para a aplicação da metodologia PGLS, três tipos de informação são necessárias: (i) dados para duas ou mais características fenotípicas para uma série de espécies, (ii) estimativa da relação filogenética entre essas espécies e (iii) comprimento de ramo da árvore filogenética em medida de mudança (ex. tempo de divergência) (GARLAND *et al.*, 1992). Usualmente são utilizadas características fenotípicas. Porém, variáveis culturais e ambientais também podem ser utilizadas, desde que sejam passadas para a próxima geração e apresentem uma distribuição contínua. Variáveis como latitude ou precipitação média anual não são herdadas no sentido genético convencional, porém são herdáveis considerando que os organismos nascem no mesmo local e sob as mesmas condições ambientais a que seus pais sobrevivem (GARLAND *et al.*, 1992).

A árvore filogenética utilizada precisa ser binária/dicotômica e o contraste é calculado para cada par de valores. A metodologia simplificada consiste no cálculo de diferenças ponderadas (contrastes) das características entre pares de espécies, incluindo tanto os terminais da filogenia quanto os nós. O cálculo é feito dos terminais para os ramos mais internos e o contraste calculado é independente dos demais em termos do processo evolutivo responsável pela diferença entre as espécies de um único contraste. Assim, para n espécies, $n-1$ contrastes são calculados (PARADIS, 2006). A covariância entre um par de espécies para dada

característica depende apenas do tempo de divergência, decrescendo linearmente com no caso de evolução por BM e exponencialmente por O-U (DINIZ FILHO, 2000, MARTINS & HANSEN, 1997). Após o ajuste aos modelos e aplicação dos contrastes, os valores obtidos são independentes da filogenia e métodos estatísticos de correlação são aplicados como parte da análise.

MATERIAL E MÉTODOS

ESCOLHA DE VARIÁVEIS

Na pesquisa para esta monografia, o efeito da latitude na evolução da miniaturização em *Brachycephalus* foi investigado através da análise PGLS para a correlação entre três variáveis: comprimento rostro-cloacal, latitude de distribuição e altitude de ocorrência.

Para cada espécie, a obtenção de uma estimativa dos valores típicos das variáveis foi realizada através do cálculo da média. Abordagens contrastantes utilizam medidas estatísticas de densidade e moda, que consideram o valor com maior frequência na amostra, eliminando a variação dos dados. A média é sensível à presença de valores discrepantes, mas esse tratamento foi escolhido justamente por contemplar a variação dos dados.

COMPILAÇÃO DOS DADOS

Para 14 espécies descritas de *Brachycephalus*, os valores de comprimento rostro-cloacal médio foram obtidos a partir da literatura (Tabela 1), considerando machos e fêmeas separadamente. Dados provenientes das descrições foram priorizados, mas em casos de indisponíveis os valores ou quando não foi possível acesso a publicação, as medidas foram compiladas de outros estudos (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2011, CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011b). Para as espécies novas ainda não descritas, as medidas foram concedidas pelo laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos (PIE *et al.*, não publicado) e DZUP Coleção de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná. Todos os espécimes haviam sido medidos com precisão de 0,1 mm

utilizando paquímetro digital, excluindo juvenis. A partir dos dados compilados, foi calculado o comprimento rostro-cloacal típico para cada espécie, representado pela média entre o tamanho de corpo médio para machos e para fêmeas.

Tabela 1. Literatura, museu e coleção consultados para compilação dos dados comprimento rostro-cloacal, distribuição latitudinal e altitudes de ocorrência.

Espécies	Referências
<i>B. alipioi</i>	Pombal Jr. & Gasparini, 2006, CFBH
<i>B. brunneus</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2005, DZUP
<i>B. ferruginus</i>	Alves <i>et al.</i> , 2006, CFBH
<i>B. hermogenesi</i>	Giaretta & Sawaya, 1998, Pimenta <i>et al.</i> 2007, ZUEC-AMP
<i>B. izecksohni</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2005, CFBH
<i>B. pernix</i>	Pombal Jr. <i>et al.</i> , 1998, CFBH, ZUEC-AMP
<i>B. pitanga</i>	Alves <i>et al.</i> , 2009
<i>B. pombali</i>	Alves <i>et al.</i> , 2006, CFBH, Pie <i>et al.</i> , não publicado
<i>B. toby</i>	Haddad <i>et al.</i> , 2010
<i>B. vertebralis</i>	Pombal Jr., 2001
<i>B. ephippium</i>	Clemente-Carvalho, 2011b
<i>B. didactylus</i>	Almeida-Santos <i>et al.</i> , 2011
<i>B. nodoterga</i>	Pombal Jr., 2010
<i>B. garbeanus</i>	Pombal Jr., 2010, CFBH
B. sp1	Pie <i>et al.</i> , não publicado
B. sp2	Pie <i>et al.</i> , não publicado
B. sp3	Pie <i>et al.</i> , não publicado
B. sp4	Pie <i>et al.</i> , não publicado
B. sp5	Pie <i>et al.</i> , não publicado
B. sp6	Pie <i>et al.</i> , não publicado

Os registros de latitude e altitude de todas as espécies atualmente descritas de *Brachycephalus* foram obtidos diretamente da DZUP Coleção de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, e através do portal *Specieslink* (<http://www.splink.org.br>) para as seguintes instituições: CFBH – Coleção "Célio F. B. Haddad", Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro; DZSJRP – Coleção de Anfíbios do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto; FNJV – Fonoteca Neotropical "Jacques Viellard", Universidade Estadual de Campinas; MBML – Museu de Biologia Professor Mello Leitão; MHNCI – Museu de História Natural Capão da Imbuia, Prefeitura Municipal de Curitiba; SinBiota – Sistema de Informação do Programa Biota, Fapesp, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; ZUEC – Museu de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas). Uma verificação cautelosa dos registros dos 544 espécimes através do portal *Specieslink* indicou considerável incerteza quanto ao nível de detalhes na identificação de espécies e precisão de coordenadas geográficas. Portanto, devido aos efeitos negativos potenciais de

registros incorretos, apenas as coordenadas das localidades tipo foram utilizadas para *B. alipioi*, *B. brunneus*, *B. ferruginus*, *B. hermogenesi*, *B. izecksohni*, *B. pernix*, *B. pitanga*, *B. pombali*, *B. pulex*, *B. toby*, *B. vertebralis* e *B. garbeanus*. Devido a incertezas também quanto à distribuição de *B. ehippium* após revalidação de suas antes consideradas variedades (POMBAL, 2010), foram incluídos apenas os quatro registros de *B. ehippium* indicados por Clemente-Carvalho *et al.* (2011a). Registros adicionais de *B. hermogenesi* foram incluídos baseado em Pimenta *et al.* (2007), excluindo apenas um dado pouco preciso. Devido a ausência de coordenadas nas descrições originais, registros para *B. didactylus* e *B. nodoterga* foram obtidos de Almeida-Santos *et al.* (2011) e Pombal Jr. (2010), respectivamente. Finalmente, a compilação de dados também incluiu sete registros de ocorrência para seis novas espécies recentemente descobertas e em processo de descrição (PIE *et al.*, não publicado). Para a obtenção de uma estimativa do registro de ocorrência típico para espécies com mais de um registro, foi calculada a média dos dados disponíveis. Para as demais espécies descritas o registro foi único e portanto representou a latitude típica. Os valores típicos de altitude foram obtidos através da média dos dados disponíveis para uma dada espécie.

A compilação dos dados considerou 20 espécies, 14 descritas e 6 recentemente descobertas (Tabela 2), reunindo em uma matriz os valores típicos por espécie calculados através da média para tamanho de corpo, latitude e altitude.

Tabela 2. Dados compilados para 20 espécies de *Brachycephalus* referentes ao comprimento rostro-cloacal (CRC) médio para machos e fêmeas, os respectivos tamanhos amostrais (N), a faixa latitudinal de distribuição e altitudinal de ocorrência.

Espécies	CRC médio macho (N)	CRC médio fêmea (N)	Latitude	Altitude
<i>B. alipioi</i>	13,9 (14)	13,9 (14)	20°28'24"S	915-1439
<i>B. garbeanus</i>	14,3 (2)	17,6 (1)	22°21'37"S	1300
<i>B. didactylus</i>	8,0 (18)	9,45 (18)	22°25'17"S- 22°25'17"S	35-850
<i>B. ephippium</i>	13,6 (11)	13,6 (11)	22°28'50"S- 23°11'00"S	150-1265
<i>B. vertebralis</i>	12,9 (27)	12,9 (27)	23°10'38"S	630-945
<i>B. pitanga</i>	11,5 (9)	13,4 (10)	23°20'40"S	60-935
<i>B. hermogenesi</i>	8,7 (3)	10,5 (4)	23°22'21"S-23°42'08"S	60-700
<i>B. toby</i>	11,8 (8)	13,9 (9)	23°27'20"S	750
<i>B. nodoterga</i>	12,4 (1)	12,4 (1)	23°42'00"S	750-1170
<i>B. brunneus</i>	9,8 (24)	11,54 (11)	25°14'18"S	1300-1630
B. sp3	9,35 (1)	9,35 (1)	25°20'51"S-25°21'15"S	1135-1405
<i>B. pernix</i>	12,5 (23)	14,9 (5)	25°23'19"S	1135-1400
<i>B. ferruginus</i>	12,2 (9)	13,8 (4)	25°27'03"S	1000-1400
<i>B. pombali</i>	12,9 (4)	14,22 (3)	25°35'58"S-25°36'40"S	915-1300
<i>B. izecksohni</i>	11,1 (11)	12,8 (4)	25°37'29"S	1000-1400
B. sp4	9,7 (7)	11,4 (3)	25°53'22"S	1400-1420
B. sp2	9,9 (5)	11,9 (5)	26°01'17"S	1240-1285
B. sp6	10,9 (2)	13,5 (1)	26°06'51"S	1270
B. sp5	9,7 (2)	11,3 (1)	26°13'59"S	800-835
B. sp1	9,5 (1)	10,7 (1)	26°47'59"S	640-790

AJUSTE DOS DADOS A UM MODELO DE EVOLUÇÃO

O PGLS envolve o ajuste dos dados a um modelo de evolução. Através das estimativas de máxima verossimilhança e AIC (*Akaike Information Criterion*), foi testado estatisticamente entre BM e O-U, qual modelo explica melhor a evolução do tamanho de corpo em *Brachycephalus*. O melhor modelo deve apresentar maior verossimilhança e o menor valor de AIC. Como O-U tem um parâmetro a mais que BM, a comparação das verossimilhanças pode ser feita através de LRT (*Likelihood Ratio Test*) considerando 1 grau de liberdade. Delta (d) é o dobro da razão entre as verossimilhanças do modelo mais complexo (O-U) e do mais simples (BM). Para o logaritmo das verossimilhanças, d é calculado por subtração. Quanto maior for a diferença de d para o valor zero, mais o modelo complexo é favorecido em relação ao mais simples.

ESTIMATIVA DA FILOGENIA

A análise PGLS é um método que utiliza a filogenia como informação sobre a relação evolutiva entre as espécies. Para obtenção de uma estimativa da filogenia de *Brachycephalus*, incluindo espécies descritas e novas, os dados foram

compilados de duas fontes. Foi incluída a primeira filogenia publicada recentemente para o gênero (CLEMENTE-CARVALHO *et al.*, 2011b) e sua complementação foi realizada com os dados para as novas espécies, cedidos pelo laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos (PIE *et al.*, não publicado).

A filogenia foi inferida através de uma análise filogenética Bayesiana do tipo *mixed-model* utilizando a abordagem analítica *BEAST implementada no programa BEAST (DRUMMOND & RAMBAUT 2007) versão 1.5.1 (3 de setembro de 2009). *BEAST permite considerar informações de múltiplos genes e dados faltantes na estimativa da filogenia (HELED & DRUMMOND, 2009). Foi utilizado o melhor modelo de evolução molecular selecionado no programa jModelTest (POSADA, 2008).

MÉTODO FILOGENÉTICO DE QUADRADOS MÍNIMOS GENERALIZADO

O método filogenético de quadrados mínimos generalizado (PGLS) é implementado no programa *R* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) pelos pacotes *ape*, *geiger* e *nlme*. Consiste em utilizar os valores das variáveis e os tamanhos de ramo da árvore filogenética para cálculo dos contrastes, dependentes do modelo de evolução escolhido. As análises estatísticas para inferência da relação entre as variáveis foram realizadas considerando os dados médios para cada espécie. O resultado é dado em termos do valor log da verossimilhança e valor AIC para o modelo utilizado, a correlação entre as variáveis e a significância estatística da análise.

RESULTADOS

Os resultados da análise PGLS suportam um efeito da latitude e altitude sobre a evolução da miniaturização no gênero *Brachycephalus*. Os dados mostraram um melhor ajuste ao modelo de seleção estabilizadora, O-U, com correlação indicando influência significativa da latitude e altitude sobre o tamanho de corpo dos sapinhos-de-montanha (Tabela 4), implicando evidência para gradientes de tamanho de corpo nesse grupo taxonômico.

ESCOLHA DO MODELO DE EVOLUÇÃO

O teste de ajuste dos dados a um modelo de evolução evidenciou O-U como melhor explicação para a variação do tamanho de corpo no gênero *Brachycephalus*. Suporte é encontrado através dos valores de máxima verossimilhança e AIC (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de máxima verossimilhança e AIC referentes ao teste de ajuste dos dados de tamanho médio de corpo aos modelos de evolução por movimento Browniano (BM) e processo Ornstein-Uhlenbeck (O-U). Destacado valores que indicam melhor ajuste para explicar a evolução do tamanho de corpo em *Brachycephalus* e suas probabilidades associadas para ($<0,05$).

Modelo de evolução	Máxima verossimilhança	P	AIC
BM	-54,992		114,734
O-U	-39,37234	2,281003e-08	84,74469

Os valores de delta (d) foram significativamente diferentes de zero (Tabela 3) e assim como os resultados da máxima verossimilhança e AIC, evidenciam o favorecimento do modelo O-U para explicar a evolução do tamanho de corpo em *Brachycephalus*.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ALTITUDINAL

Após o ajuste dos dados ao modelo O-U de evolução, os resultados obtidos pela análise PGLS indicam correlação moderada significativa entre o tamanho de corpo e a altitude de ocorrência das espécies (Tabela 4). O efeito da altitude sobre o tamanho de corpo apresenta relação negativa, contrária ao gradiente proposto por Bergmann. Portanto, indicando uma diminuição do tamanho corporal a medida que a ocorrência de *Brachycephalus* é considerada a maiores altitudes de sua distribuição.

Evidência para o efeito da latitude sobre a variação do tamanho de corpo no gênero *Brachycephalus* foi encontrada através da correlação negativa, forte e significativa entre essas duas variáveis (Tabela 4). Em direção oposta à regra de Bergmann, os resultados descrevem uma diminuição do tamanho corporal a medida que considera-se maiores latitudes da distribuição do gênero.

Tabela 4. Coeficiente de regressão calculado por quadrados mínimos generalizados entre o comprimento rostro-cloacal e as variáveis altitude e latitude. Razão entre o coeficiente de variação e o erro padrão dada pelo valor t. Suporte estatístico dado por $P(<0,05)$ e em destaque correlação significativa.

	Coeficiente	Erro padrão	Valor t	P	Correlação
Altitude	0,003832	0,001075	3,379111	0,0036	-0,430
Latitude	-0,569784	0,243988	-2,335298	0,0320	-0,984

DISCUSSÃO

Segundo a regra de Bergmann em sua definição mais recente, a correlação esperada entre tamanho de corpo e as variáveis latitude e altitude é positiva. Bergmann propõe que animais de maior tamanho corporal tendem a ser encontrados em regiões a maiores latitudes ou altitudes (OLALLA-TÁRRAGA & RODRÍGUEZ, 2007). De maneira contrária, a relação esperada entre tamanho de corpo e temperatura é negativa. A regra propõe que animais de tamanho de corpo maior tendem a ser encontrados em regiões mais frias. Apesar de seguirem direções opostas, as observações anteriores são complementares graças à correlação inversa consistente entre latitude/altitude e temperatura. A hipótese proposta nesse estudo é de um padrão oposto ao descrito pela regra de Bergmann: existência de variação do tamanho corporal ao longo de gradientes latitudinal e altitudinal, resultando em um maior grau de miniaturização a maiores latitudes e altitudes ao longo da distribuição dos sapinhos-da-montanha.

Quando determinada combinação de característica é consistentemente associada entre diversas espécies, é provável que forças evolutivas, como a seleção natural, estejam moldando essa associação. Porém, alternativamente, essa associação pode ser resultado da herança de um ancestral comum. Ainda, a combinação consistente de característica entre espécies pode ser consequência da evolução ao acaso. Nesse caso, a relação criada entre características é apenas aparente, pois não há associação evolutiva e espera-se que espécies mais proximamente relacionadas sejam mais similares entre si que quando comparadas com outras mais distantes. Portanto, como diferentes processos podem ser responsáveis pela observação de uma combinação consistente de características entre espécies, é necessário considerar suas relações filogenéticas ao analisar suas características (PARADIS, 2006).

Da perspectiva analítica comparativa, um dos dois pontos que devem ser considerados quando se incorpora uma filogenia aos dados é a estimativa dos modelos de evolução. A distribuição de uma característica depende de como ela evolui. O modelo BM assume que um caráter contínuo diverge ao acaso e indefinidamente ao longo de uma dimensão, podendo assumir qualquer valor no espaço e aumentando a variância como uma função linear do tempo. Em termos biológicos, é uma boa aproximação inicial por modelar evolução neutra através de um processo de deriva genética (DINIZ FILHO, 2000). Porém, outros modelos devem ser avaliados quanto a um melhor ajuste aos dados. Do ponto de vista biológico, caracteres estão usualmente submetidos a pressões seletivas e sua variação limitada por restrições estruturais e de desenvolvimento (DINIZ FILHO, 2000). Felsenstein (1988) sugeriu que nesses casos, a evolução seria melhor modelada por um processo O-U. O modelo recebe bastante atenção e é uma boa alternativa por considerar tanto o processo de deriva quanto a pressão seletiva estabilizadora restringindo a evolução em torno de um dado limite (MARTINS & HANSEN, 1997). O modelo O-U considera um limite na divergência dos dados através de uma força de restrição (DINIZ FILHO, 2000).

Os resultados do teste de ajuste dos dados a um modelo de evolução mostraram o modelo de seleção estabilizadora, O-U, como melhor explicação para a variação do tamanho de corpo no gênero *Brachycephalus*. O-U apresenta um parâmetro a mais que BM e espera-se que com o aumento da complexidade, aumente-se também sua probabilidade de aceite em relação a um modelo mais simples. Através das medidas de máxima verossimilhança e AIC, essa expectativa foi comprovada estatisticamente. Porém, mesmo com maior verossimilhança e menor AIC favorecendo o modelo mais complexo, a estatística delta (d) deve ser considerado, pois avalia se um aumento em complexidade dos cálculos é justificado. Quanto mais diferente de zero a razão entre as verossimilhanças do modelo mais complexo e do mais simples, mais o modelo complexo é favorecido em relação ao mais simples e justificando o aumento em complexidade dos cálculos. Com valores significativamente diferentes de zero e suportados por $P(<0,05)$, o modelo de evolução por seleção estabilizadora foi empregado na análise PGLS.

Considerados os contrastes entre os dados e a filogenia, a relação entre a

variável dependente, tamanho de corpo, e as variáveis independentes, latitude e altitude, mostrou-se negativamente correlacionada e suportada estatisticamente. Os resultados descrevem tendência ao aumento do grau de miniaturização a medida que considera-se maiores latitudes e altitudes de distribuição do gênero *Brachycephalus*. Sustentando a hipótese inicial e confirmando da existência de um gradiente de tamanho de corpo no gênero *Brachycephalus* como efeito da latitude e altitude, a análise filogenética comparativa sugere que a relação entre características não é apenas aparente, mas suportada por associação evolutiva.

A latitude tem efeito preponderante sobre a evolução do tamanho de corpo em *Brachycephalus*. É esperada maior variação no grau de miniaturização ao considerar diferentes faixas de latitudes de ocorrência. Quando considera-se diferentes faixas de altitude de distribuição, o gradiente de tamanho de corpo é menos intenso. Blackburn *et al.* (1999) argumentam que a relação revelada pelo controle da filogenia entre tamanho de corpo e latitude é geralmente fraca. Em contraste, os resultados obtidos nesse estudo indicam forte correlação entre essas variáveis. Os autores sugerem que a relação entre essas variáveis pode ser pouco significativa em pequena escala. Pouca variação em latitude pode implicar baixa variação de clima e resultar em pouco suporte para a relação. Por essa razão, os autores defendem uma maior probabilidade de suporte para a regra em comparações mais amplas. Porém, no caso de *Brachycephalus* e sua distribuição ao longo da Floresta Atlântica, essa explicação é pouco provável e contraditória dado os resultados. A floresta Atlântica, por sua extensão, abrange regiões de complexa topografia e relevo. Como consequência, é caracterizada por alta sazonalidade e gradientes ambientais extremos ao longo de sua distribuição (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1993). Graças a essas condições, a floresta Atlântica constitui grande diversidade também em termos de zonas climáticas e formações vegetacionais (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1988). Mesmo tratando-se de uma escala geográfica de estudo relativamente pequena, com pouca variação em latitude (20 a 26°), a diversidade vegetal e climática ao longo da distribuição de *Brachycephalus* é considerável, esclarecendo a relação forte encontrada entre as variáveis.

O tamanho amostral é também importante para o suporte das relações

encontradas. Combinar dados para espécies amostradas a partir de poucas localidades é menos confiável que obter registros para espécies mais extensamente amostradas (ADAMS & CHURCH, 2007). Além disso, a variação das estimativas tende a decrescer com o aumento do tamanho amostral (GOTELLI & ELLISON, 2004). Considerando a história de vida, biologia e grau de endemismo de *Brachycephalus*, a coleta de dados de grande parte das espécies é restrita a apenas uma localidade. Portanto, os registros são muitas vezes únicos, podendo afetar a robustez dos resultados pela amostragem obrigatoriamente restrita. Porém, os resultados mostram suporte confiável como reflexo das relações filogenéticas e variação considerável das estimativas entre espécies.

Se o desenvolvimento de *Brachycephalus* é limitado pelas condições ambientais onde vivem, espera-se que o grau de miniaturização aumente com a latitude e altitude de distribuições. A tendência à espécies com menor tamanho de corpo serem encontradas a maiores latitudes e altitudes de distribuição é justificada ao considerar a temperatura. Há uma relação negativa consistente entre essas variáveis e a temperatura, sendo maiores latitudes e altitudes geralmente associadas a menores temperaturas. Sob essas condições, os períodos de tempo favoráveis ao desenvolvimento são mais curtos, limitando o crescimento desses anuros. Para ectotérmicos, a sazonalidade melhor definida nessas regiões implica períodos reduzidos de crescimento e atingir maiores tamanhos de corpo nessas condições é menos provável. Os resultados discutidos suportam a visão que o desenvolvimento de *Brachycephalus* é limitado pelas condições ambientais onde vivem. Espécies do gênero com maior grau de miniaturização são de fato encontradas maiores latitude e altitudes de sua distribuição, refletindo a variação climática ao longo da floresta Atlântica.

As observações resultantes da análise de correlação através da abordagem de contrastes independentes PGLS suportam a presença de gradiente de tamanho de corpo nesse grupo de anuros, porém contrário a direção originalmente proposta pela regra de Bergmann. O consenso para a afirmação “Anfíbios respeitam a regra de Bergmann” tem grande parte do suporte baseado em um estudo de meta-análise, cuja amostragem geográfica limitada pelo número de espécie pode ter afetado os resultados e conclusões (ASHTON, 2002b). Porém, estudos mais recentes indicam

tanto a ausência de padrões de variação geográfica do tamanho de corpo (ADAMS & CHURCH, 2007) quanto padrões presentes e contrários a regra de Bergmann (ASHTON & FELDMAN, 2003, LAUGEN *et al.*, 2005, MEASLEY & VAN DONGEN, 2006), como o observado nesse estudo.

Como sugerido por Rensch (1938) e Mayr (1956), a regra de Bergmann foi relaxada para considerar apenas padrão. Apesar das evidências que confirmam a presença de gradiente de variação do tamanho de corpo no gênero *Brachycephalus*, permanece indefinido o mecanismo responsável pela evolução da miniaturização como efeito da latitude e altitude. As hipóteses até então propostas não consideram (i) que o tamanho de corpo pode ser geneticamente limitado como decorrência do desenvolvimento; (ii) que a temperatura pode ser importante e relevante para o tamanho do corpo apenas durante o período de crescimento. Para ectotérmicos a sazonalidade implica períodos reduzidos de crescimento e atingir tamanhos de corpo maiores nessas condições é menos provável (OLALLA-TÁRRAGA *et al.*, 2006); e/ou (iii) a possibilidade da exploração de microclimas, abordagens que poderiam alterar os resultados das análises.

CONCLUSÃO

A hipótese inicialmente proposta considerou a latitude e altitude como efeito preponderante na evolução da miniaturização em *Brachycephalus*. A análise filogenética comparativa ratifica essa visão. A altitude mostrou correlação negativa moderada com a variação do tamanho de corpo entre os sapinhos-da-montanha e a latitude mostrou-se fortemente correlacionada com o tamanho do corpo. Os resultados suportam a visão que o desenvolvimento de *Brachycephalus* é limitado pelas condições ambientais onde vivem como reflexo da variação climática existente ao longo da floresta Atlântica. As menores espécies de *Brachycephalus* são encontradas em maiores latitudes e altitudes, regiões associadas a menores temperaturas e consequentes períodos limitados de desenvolvimento. A pesquisa aqui realizada abriu perspectivas adicionais para o estudo continuado da evolução e diversificação de *Brachycephalus*.

REFERÊNCIAS

- Adams, D.C. & Church, J.O. 2007. Amphibians do not follow Bergmann's rule. *Evolution* 62(2):413-420.
- Almeida-Santos, M., Siqueira, C.C., Sluys, M.V. & Rocha, C.F.D. 2011. Ecology of the Brazilian Flea Frog *Brachycephalus didactylus* (Terrarana: Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 45(2):251-255.
- Alves, A.C.R, Sawaya, R.J. dos Reis, S.F. & Haddad, C.F.B. 2009. New Species of *Brachycephalus* (Anura : Brachycephalidae) from the Atlantic Rain Forest in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Journal of Herpetology* 43(2):212-219.
- Alves, A.C.R, Ribeiro, L.F, Haddad, C.F.B & dos Reis, S.F. 2006. Two New Species of *Brachycephalus* (Anura:Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná State, Southern Brazil. *Herpetologica* 62(2):221-233.
- Angilletta, M.J. & Dunham, A.E. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. *The American Naturalist* 162:332–342.
- Ashton, K.G. 2002a. Patterns of within-species body size variation of birds: strong evidence for Bergmann's rule. *Global Ecology and Biogeography* 11:505–523.
- Ashton, K.G. 2002b. Do amphibians follow Bergmann's rule? *Can. J. Zool.* 80:708–716.
- Ashton, K.G. & Feldman, C.R. 2003. Bergmann's rule in nonavian reptiles: turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution* 57:1151–1163.
- Ashton, K.G., Tracy, M.C. & de Queiroz, A. 2000. Is Bergmann's rule valid for mammals? *The American Naturalist* 156:390–415.
- Barnett, R.J. 1977. Bergmann's rule and variation in structures related to feeding in the gray squirrel. *Evolution* 31:538–545.
- Belk, M.C. & Houston, D.D. 2002. Bergmann's rule in ectotherms: a test using freshwater fishes. *The American Naturalist* 160:803–808.

Blackburn, T.M. & Gaston, K.J. 1996a. Spatial patterns in the body sizes of bird species in the New World. *Oikos* 77:436–446.

Blackburn, T.M. & Gaston, K.J. 1996b. Spatial patterns in the geographic range sizes of bird species in the New World. *Phil. Trans. R. Soc. B* 351:897–912.

Blackburn, T.M., Gaston, K.J. & Loder, N. 1999. Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. *Diversity and Distributions* 5:165–174.

Blackburn, T.M. & Hawkins, B.A. 2004. Bergmann's rule and the mammal fauna of northern North America. *Ecography* 27:715–724.

Blanckenhorn, W.U. 2000. The evolution of body size: what keeps organisms small? *Q. Rev. Biol.* 75:385–407.

Buckup, P.A. 1993. Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi). *Cladistics* 9:305–341.

Chen, C.P. & Chao, C.M. 1997. Reduction of growth rate as the major process in the miniaturization of the sand dollar *Sinaechinocyamus mai*. *Biol. Bull.* 193:90–96.

Clemente-Carvalho, R.B.G., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Haddad, C.F.B., Alves, A.C.R., Rocha, H.S., Pereira, G.R., Oliveira, D.F., Lopes, R.T. & dos Reis, S.F. 2009. Hyperossification in miniaturized toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic structure and macroscopic patterns of variation. *Journal of Morphology* 270(11):1285-95.

Clemente-Carvalho, R.B.G., Klaczko, J., Perez, S.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, A.C.R., Alves, S.I., Perez, C.F.B., Haddad & S.F. dos Reis. 2011b. Morphological and Molecular Variation in the Pumpkin Toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Journal of Herpetology* 45(1):94-99.

Costa, L.P., Leite, Y.L.R., da Fonseca, G.A.B., da Fonseca, M.T. 2000. Biogeography of South America forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* 32:872-881.

Cotgreave, P. 1994. Migration, body-size and abundance in bird communities. *Ibis* 136:493–496.

Cotgreave, P. & Stockley, P. 1994. Body size, insectivory and abundance in assemblages of small mammals. *Oikos* 71:89–96.

Cushman, J.H., Lawton, J.H. & Manly, B.F.J. 1993. Latitudinal patterns in European ant assemblages: variation in species richness and body size. *Oecologia* 95:30–37.

Diniz Filho, J.A.F. 2000. **Métodos filogenéticos comparativos**. Holos, Ribeirão Preto, São Paulo.

Dudley, R. 2000. **The biomechanics of insect flight: form, function, evolution**. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.

Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7 :214.

Estrada, A.R. & Hedges, S.B. 1996. At the lower size limit in tetrapods: a new diminutive frog from Cuba (Leptodactylidae:Eleutherodactylus). *Copeia*, 1996(4):852-859.

Feder, M.E., Papenfuss, T.J. & Wake, D.B. 1982. Body size and elevation in neotropical salamanders. *Copeia* 1982:186–188.

Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125:1–15.

Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annual Review of Genetics* 22:521-565.

Freeland, J.R. 2005. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons, Chichester.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1988. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1993. **Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Galindo-Leal, C. & Câmara, I.G. 2003. **Atlantic forest hotspots status: an overview**. in C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. pp. 3-11. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C.

Garland, T.Jr., Harvey, P.H. & Ives, A.R. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. *Systematic Biology* 41(1):18-32.

Giaretta, A.A. & Sawaya, R.J. 1998. Second Species of *Psyllophryne* (Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 4:985-987.

Gittleman, J.L. 1985. Carnivore body size—ecological and taxonomic correlates. *Oecologia* 67:540–554.

Gotelli, N.J. & Ellison, A.M. 2004. **A primer of ecological statistics**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Goudie, R.I. & Ankney, C.D. 1986. Body size, activity budgets, and diets of sea ducks wintering in Newfoundland. *Ecology* 67:1475–1482.

Haddad, C.F.B., Alves, A.C.R., Clemente-Carvalho, R.B.G. & dos Reis, S.F. 2010. A New Species of *Brachycephalus* from the Atlantic Rain Forest in São Paulo State, Southeastern Brazil (Amphibia: Anura: Brachycephalidae). *Copeia* 3:410-420.

Hanken, J. & Wake, D.B. 1993. Miniaturization of body size: organismal consequences and evolutionary significance. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:501-519.

Harvey, P.H. & Pagel, M.D. 1991. **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford Univ. Press, Oxford, England.

Hawkins, B.A. 1995. Latitudinal body-size gradients for the bees of the eastern United States. *Ecological Entomology* 20:195-198.

Hawkins, B.A. & Lawton, J.H. 1995. Latitudinal gradients in butterfly body sizes: is

there a general pattern? *Oecologia* 102:31–36.

Heled, J. & Drummond, A. J. 2008. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *BMC Evolutionary Biology* 8: 289.

Izecksohn, E. 1971. Novo gênero e nova espécie de Brachycephalidae do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Bol. Mus. Nac.*, 280:1-12.

James, F.C. 1970. Geographic size variation in birds and its relationship to climate. *Ecology* 51:365–390.

Kraus, F. 2011. At the lower size limit for tetrapods, two new species of the miniaturized frog genus *Paedophryne* (Anura, Microhylidae). *Zookeys* 154:71-88.

Krizmanic, I., Vukov, T.D. & Kalezic, M.L. 2005. Bergmann's rule is size-related in European newts (*Triturus*). *The Herpetological Journal* 15:205–206.

Laugen, A.T., Laurilla, A., Johnsson, K.I., Soderman, F. & Merila, J. 2005. Do common frogs (*Rana temporaria*) follow Bergmann's rule? *Evolutionary Ecology Research* 7:717–731.

Lehr, E. & Catenazzi, A. 2009. A new species of minute *Noblella* (Anura:Strabomantidae) from Southern Peru: the smallest frog of the Andes. *Copeia* 2009(1):148-156.

Lindsey, C.C. 1966. Body sizes of poikilotherm vertebrates at different latitudes. *Evolution* 20:456–465.

Martins, E.P. & Hansen, T.F. 1997. Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *American Naturalist* 149:646–667.

Mayr, E. 1956. Geographical character gradients and climatic adaptation. *Evolution* 10:105–108.

Measley, G.J. & Van Dongen, S. 2006. Bergmann's rule and the terrestrial caecilian *Schistometopum thomense* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). *Evolutionary Ecology Research* 8:1049–1059.

Meiri, S. & Dayan, T. 2003. On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography* 30:331–351.

Meiri, S., Dayan, T. & Simberloff, D. 2004. Carnivores, biases and Bergmann's rule. *Biological Journal of the Linnean Society* 81:579–588.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Mousseau, T.A. 1997. Ectotherms follow the converse to Bergmann's rule. *Evolution* 51:630–632.

Morellato, L.P.C., Haddad, C.F.B. 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792.

Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the processes that sustain it. *Systematic Biology* 51:238-254.

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.

Olalla-Tárraga, M.A. & Rodríguez, M.A. 2007. Energy and interspecific body size patterns of amphibian faunas in Europe and North America: anurans follow Bergmann's rule, urodeles its converse. *Global Ecology and Biogeography* 16:606–617.

Olalla-Tárraga, M.A., Rodríguez, M.A. & Hawkins, B.A. 2006. Broad-scale patterns of body size in squamate reptiles of Europe and North America. *Journal of Biogeography* 33:781–793.

Paradis, E. 2006. Analysis of Macroevolution with Phylogenies. In: Paradis, E. **Analysis of Phylogenetics and Evolution with R**. New York: Springer New York. p 133-181.

Partridge, L. & Coyne, J.A. 1997. Bergmann's rule in ectotherms: is it adaptive? *Evolution* 51:632–635.

Pimenta, B.V.S., Bérnils, R.S., Pombal Jr., J.P. 2007. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Brachycephalus hermogenesi*: filling gap and geographic distribution map. *Check List* 2007:3.

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, 2005.

Pombal Jr., J.P. 2010. A posição taxonômica das “variedades” de *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) descritas por Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Bol. Mus. Nac., N.S., Zool.* 526:1-12.

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. 1999. Oviposição e desenvolvimento de *Brachycephalus ephippium* (Spix) (Anura: Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 16:967-976.

Pombal Jr., J.P. 1992. **História natural de *Brachycephalus ephippium* (Anura; Brachycephalidae), na região de Campinas, Estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

Pombal Jr., J.P. & Izecksohn, E. 2011. Uma nova espécie de *Brachycephalus* (Anura, Brachycephalidae) do estado do Rio de Janeiro. *Pap. Avulsos Zool.* (São Paulo) 51(28).

Pombal Jr., J.P. & Gasparini, J.L. 2006. A new *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology* 1(2):87-93.

Pombal Jr., J.P., Wistuba, E.M. & Bornschein, M.R. 1998. A new species of Brachycephalidae (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Herpetology* 32(1):70-74.

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.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Poulin, R. & Hamilton, W.J. 1995. Ecological determinants of body size and clutch size in amphipods: a comparative approach. *Functional Ecology* 9:364–370.

R Development Core Team. 2006. R: a language and environment for statistical computing. Version 2.5.0. <http://cran.R-project.org>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Ray, C. 1960. The application of Bergmann's and Allen's rules to the poikilotherms. *Journal of Morphology* 106:85–108.

Rensch, B. 1938. Some problems of geographical variation and species-formation. *Proc. Linn. Soc. Lond.* 150:275–285.

Ribeiro, L.F., Alves, A.C.R., Haddad, C.F.B & dos Reis, S.F. 2005. Two New Species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the State of Paraná, Southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Bol. Mus. Nac., N.S., Zoo.* 519:1-18.

Rieppel, O. & Crumly, C. 1997. Paedomorphosis and skull structure in Malagasy chameleons (Reptilia: Chamaeleoninae). *J. Zool.* 243:351–380.

Sebben, A., Schwartz, C.A., Valente, D., Mendes, E.G. 1986. A tetrodotoxin-like substance found in the brazilian frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon*, 24:799-806.

Schäuble, C.S. 2004. Variation in body size and sexual dimorphism across geographical and environmental space in the frogs *Limnodynastes tasmaniensis* and *L. peronii*. *Biological Journal of the Linnean Society* 82:39–56.

Smith, F.A., Browning, H. & Shepherd, U.L. 1998. The influence of climate change on the body mass of woodrats *Neotoma* in an arid region of New Mexico, USA. *Ecography* 21:140–148.

Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M., Bedê, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira. IN: Conservation International Brasil.

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

Yeh, J. 2002. The effect of miniaturized body size on skeletal morphology in frogs. *Evolution* 56(3):628-41.

Zeveloff, S.I. & Boyce, M.S. 1988. **Body size patterns in North American mammal faunas.** Evolution of life histories of mammals (M.S. Boyce), pp. 123–146. Yale University Press, New Haven.