



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

VARIAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES DE *THOROPA*
COPE, 1865 (ANURA: CYCLORAMPHIDAE)

ARIADNE FARES SABBAG

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

Rio Claro, SP
Julho - 2019

ARIADNE FARES SABBAG

**VARIAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES
DE *THOROPA* COPE, 1865 (ANURA: CYCLORAMPHIDAE)**

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

Orientador: Dr. Célio F. B. Haddad
Co-orientadores: Dra. Maria Tereza
Chiarioni Thomé e Dr. Taran Grant

Rio Claro, SP
Julho – 2019

S114v Sabbag, Ariadne Fares
Variação genética e morfológica das espécies de
Thoropa Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae) / Ariadne
Fares Sabbag. -- Rio Claro, 2019
202 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad

1. Anuros. 2. Filogenética. 3. Taxonomia. 4.
Morfologia. 5. Morfometria. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: VARIAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES DE THOROPA COPE, 1865 (ANURA: CYCLORAMPHIDAE)

AUTORA: ARIADNE FARES SABBAG

ORIENTADOR: CELIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD

COORIENTADORA: MARIA TEREZA CHIARIONI THOMÉ

COORIENTADOR: TARAN GRANT

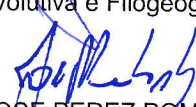
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. CARLA SANTANA CASSINI
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz

Profa. Dra. DENISE DE CERQUEIRA ROSSA FERES
Departamento de Zoologia e Botânica / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto


Prof. Dr. FABIO RAPOSO DO AMARAL
Biologia Evolutiva e Filogeografia / Universidade Federal de São Paulo- Campus Diadema


Prof. Dr. JOSE PEREZ POMBAL JUNIOR
Museu Nacional-UFRJ /Rio de Janeiro-RJ

Rio Claro, 19 de julho de 2019

*Ao meu pai Rubens,
à minha tia Tera,
e à minha avó Neid.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e principalmente ao Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, por ter me orientado e me auxiliado durante todo o desenvolvimento da tese, e por sempre ter sido para mim um exemplo de cientista e administrador. Agradeço também por ele ter me ajudado a desconstruir a minha ilusão da graduação de que um pesquisador bom como ele jamais aceitaria uma aluna ruim como eu.

Aos meus coorientadores escolhidos a dedo, M. Tereza C. Thomé e Taran Grant, pela paciência com meu jeito de trabalhar e/ou pela coragem de enfrentar comigo os desafios do meu jeito de trabalhar. Por me ensinarem uma das coisas que mais admiro em ambos, que é o critério científico. Especialmente à M. Tereza C. Thomé que tem me ensinado, entre outras tantas coisas, o equilíbrio entre o critério e a produção.

Aos especialistas membros da banca Fábio R. do Amaral, José P. Pombal Jr., Denise de C. Rossa-Feres, Carla S. Cassini, Luciana A. Fusinato, Boris A. Blotto, Thaís H. Condez, Pedro Paulo G. Taucce e Kaleb P. Gatto por aceitarem colaborar com o progresso do meu trabalho com correções, sugestões e discussões.

Às especialistas membras das minhas bancas de avaliação de projeto, de avaliação de progresso e da qualificação, Carla M. Lopes, Luciana A. Fusinato, Ana Carolina C. Lourenço, Bianca von M. Berneck e Clarisse Palma, por terem me ajudado e me acompanhado por todo o doutorado.

À Mariana L. Lyra e Délio Baêta por terem me ajudado tanto com diversos aspectos dos estudos e dos caminhos, por saberem sobre a minha tese quase tanto quanto eu, e por serem para mim pessoas inspiradoras.

Ao Miguel Vences pelo sequenciamento de Filogenômica Ancorada, à Mariana L. Lyra e Pedro Paulo G. Taucce por me ajudarem com envio de amostras, interpretação e tratamento dos dados.

À Cinthia A. Brasileiro por me ajudar com características das espécies, e me ajudar a delinear exames de gônadas. Ao Rafael Consolmagno por me auxiliar com informações sobre reprodução de *Thoropa taophora*.

Ao Pedro H. Dias por me ensinar quase tudo que sei sobre girinos. À Isabela R. S. Cavalcanti por me ensinar com paciência e fofura sobre histologia. Ao Enio Mattos e ao Phillip Lenktaitis por me acudirem e tirarem minhas dúvidas todas sempre que eu precisava, e por deixarem uma boa Kiss FM sempre disponível.

Aos curadores e gerentes de coleções herpetológicas que perderam horas de seus tempos para me ajudar, mesmo que apenas para informações: Nadya C. Pupin e Célio F. B. Haddad (CFBH); Aline S. Benetti e Taran Grant (MZUSP); Manoela W. Cardoso, Pedro H. M. de S. Pinna, e José P. Pombal Jr (MNRJ e AL-MN); Luciana B. Nascimento (MCNAM); Antonio Mollo Neto, Juliana Lima e Miguel T. Rodrigues (MTR, IB, USP); Bruno Teixeira e Victor G. D. Orrico (MZUESC); Clodoaldo Assis e Renato N. Feio (MZUFV); Isabel de C. C. Marques e Paulo G. A. Garcia (UFMG); Hélio R. da Silva (UFRRJ e EI); Karina R. E. Gomes, Adriana D. da Silva e Luís Felipe de Toledo (ZUEC); Sergio P. de Carvalho e Silva e Marcia R. Gomes (ZUFRJ); Santiago J. Castroviejo-Fisher e Glaucia M. F. Pontes (MCP); Cristiano B. Ferreira e Denise de C. Rossa-Feres (DZSJRP); Juliana P. Silva e Fernanda Lirio (MBML); Ariovaldo A. Giaretta e Thiago R. de Carvalho (AAG-UFU); Roy McDiarmid, Rayna Bell, Kenneth Tighe, Robert Wilson, Addison Wynn, Christina K. Sami, Esther Langan, Steve Gotte (USNM); David Kizirian, David Dickey, Lauren Vonnahme (AMNH); Lauren Scheinberg (CAS); Kaylin Martin e Stephen P. Rogers (CMNH); Alan Resetar (FMNH); Rafe Brown, Richard E. Glor e Luke Welton (KUMNH); José Rosado (MCZ); Jimmy A. McGuire e Carol L. Spencer (UC); Jonathan A. Campbell e Carl J. Franklin (TNHC); Dan Rabosky e Greg Schneider (UM-LSA); Patrick Semal e Olivier S. G. Pauwels (IRSNB); Annemarie Ohler (MNHN); Georg Gassner e Silke Schweiger (NMW); Daniel K. Johansson (ZMUC); Maria Rita S. Pires e Paula S. Barbosa (UFOP); Márcio B. Martins e Diego J. Alvares (UFRGS); Marcelo F. Napoli (UFBA); Ana T. Carvalho-e-Silva (UNIRIO); Yvonne Schaarschmidt e Melita Vamberger (SNSD).

Aos órgãos governamentais SISBio-ICMBio (MMA), IEMA (ES), IEF (MG), COTEC-IF (SP), INEA (RJ) e SMAC (Rio de Janeiro, RJ) pelas licenças federais e estaduais concedidas para coleta. E ao Comitê de Ética no Uso Animal pela aprovação do projeto.

Aos colegas cientistas que me ajudaram com estatística, análises, informações, coletas, tecidos, exemplares, fotografias e canto: Luiza Cholak, Classius de Oliveira, Felipe S. F. Leite, Hans Thomassen, Fernando Leal, Renato N. Feio, Amanda L. Santiago, Ana Carolina C. Lourenço, Carla M. Lopes, Délio Baêta, Kelly Zamudio, Thaís H. Condez, Fábio P. de Sá, Marcus Thadeu Santos, Ana Paula V. Motta, Anyelet V. Aguilár, Paulo D. P. Pinheiro, Thiago R. de Carvalho, Boris A. Blotto, Priscila A. Lemes, Leo R. Malagoli, Natalia Salles, Luciana Ramos, Juliane P. Monteiro, Nadya C. Pupin, Gustavo Colaço, Tiago L. Pezutti.

Ao meu cunhado adorado Luiz Carlos Irber Jr, por me ajudar com inúmeros problemas computacionais, de bioinformática e por me ensinar Python. À minha irmã Stéfanie F. Sabbag,

um dos meus pilares existenciais, e certamente uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço, por me ajudar com todas minhas dúvidas sobre arte e diagramação.

Aos colegas, familiares e amigos que me deram teto e afeto em viagens de trabalho: Vivian Saad, Soudki Saad, Felipe Saad, Nadia El Hage, Roberto Sabbag, Janailma Freire, Victor G. D. Orrico, Carla S. Cassini, Amanda L. Santiago, Ana Carolina C. Lourenço, Daniel Moraes, Manoela W. Cardoso, Rafael Silva, Luciana Ramos, Angele Martins, Pedro Peloso, Silvia Pavan, Roy McDiarmid e Grace Wyngaard.

Aos grandes amigos nascidos da herpetologia, alguns dos quais me acompanharam por todo o doutorado e que eu não vou deixar em paz tão cedo: Nadya C. Pupin, Julián Faivovich, Eliziane G. de Oliveira, Danilo Delgado, Mariana L. Lyra, Maria Tereza C. Thomé, Juliane P. Monteiro, Marina W. Faria, Bianca von M. Berneck, Boris Blotto, Carla M. Lopes, Ana Carolina C. Lourenço, Priscila Lemes, Lucas N. Bandeira, Carla S. Cassini, Victor G. D. Orrico, Amanda Lantyer Silva, Thaís H. Condez, Fábio P. de Sá e Leo R. Malagoli.

Aos queridos amigos do laboratório, que fazem parte da melhor equipe de trabalho que eu poderia desejar durante o doutorado: Mariana L. Lyra, Maria Tereza C. Thomé, Nadya C. Pupin, Bianca von M. Berneck, Boris Blotto, Carla M. Lopes, Ana Carolina C. Lourenço, Priscila Lemes, Eliziane G. de Oliveira, Danilo Delgado, Paulo D. P. Pinheiro, Kaleb P. Gatto, Pedro Paulo G. Taucce, Thaís H. Condez, Juliane P. Monteiro, Marcus Thadeu Santos, Natalia Salles, Francisco Brusquetti, João G. Giovanelli, Amanda L. Santiago, Anyelet V. Aguilar, Ana Paula M. Vieira, Fábio Perin de Sá, Leo R. Malagoli, Luiza Cholak, Suélen Mello, Olívia Araújo e Katyuscia de A. Vieira.

Aos integrantes do Laboratório de Anfíbios do IB, USP, que sempre me receberam muito bem: Adriana M. Jeckel, Gabriel J. Cohen, Raquel Montesinos, Isabela R. S. Cavalcanti, Denis J. Machado, Jhon J. O. Sarria, Marvin A. Criollo, Marco A. Rada, Rafael dos S. Henrique, Carola A. M. Yovanovich, Mariane Targino, Pedro H. Dias.

Aos colegas e professores do DIBSI 2017, pelo ótimo curso de bioinformática básica, principalmente Titus Brown, Luís Carlos Irber Jr, Amanda Lantyer Silva, Andrés Brunetti, Adriano Mondini e Juan Sousa. E à Stéfanie F. Sabbag por cuidar da gente por todo o tempo de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo número 141454/2015-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Programa BIOTA – Temático, número 13/50741-7) e Smithsonian Institute pelas bolsas e auxílios concedidos. À Mary Sangrey, Meredith Price e Gordon Bullock por me ajudarem com

burocracias diversas. Ao CEIS pelo apoio com coleta de dados molecular, e à Seção Técnica de Pós-Graduação da UNESP por sempre me ajudar com diversos problemas.

Ao John Carlos por me ajudar com inglês.

Aos profissionais excelentes que suportaram meus problemas mentais por todos esses anos: Larissa F. Fares, Elias Ajub, e principalmente Hélio Hoshina.

À minha querida mãe, Janete Aparecida Fares, que sempre me apoiou mesmo não confiando na minha escolha profissional, mas que atualmente até sabe o que é uma *Pipa*.

Aos meus melhores amigos, com quem eu adoraria conviver mais, por todo apoio que sempre me deram e simplesmente por existirem: Clara Di Martino, Priscila A. Rossi, Luiz Fernando C. Coradello, Luana Hortenci, Xênia M. Lopes, Rafaela Sanfelice, Erico P. Felix, Andréia N. Figueiredo, Aline G. Zaffani, Rafael Lemes, Gisele Vieira, Mariana Bissoli, Renata Tardivo, Pavel Dodonov, Jonas E. Gallão, Alois F. Müller, Jefferson Mercadante, Daniela M. D. Gayotto, Tylá P. Duarte, Gabriela Sumariva, Roger Fernandes, Heitor Savala, Bruno H. de Mello, Fabiano Benini, Lucas Malakin, Alice Di Martino Félix, João Guilherme Benini. E aos meus novos amigos David Bet, Carol Bet, Klyger Oliveira e Fabíola Bonfá. Ao meu primo Felipe Soudki Saad, por todo o reconhecimento e preocupação comigo. A todos meus tios e primos que adoro, mesmo que a maioria opiniões políticas e sociais completamente diferentes das minhas, em especial Janice Fares, Jaime Fares, Jorge Fares, Gislaine Fusco Fares, Vivian Sabbag Saad, Elisabete Conejo, Astrid Sabbag Mayard Sabbag que mais me apoiam. E à minha nova família que estou adorando conhecer: José Gabriel P. Baêta da Costa, Patrícia Simões Baêta da Costa, Roselene P. Baêta da Costa, Tatiana Arantes, Rosângela B. Baungratz, Luís Baungratz, Marilena V. Baêta da Costa, Alexandre Baêta, Diúde Campos e Délio Baêta da Costa. Aos meus amores peludos: Bertha Lutz, Doris Cochran, Polaco Woitovicz, Ada, Laila, Satine, Beleza, Lillo, Stich, Terror, Susto, Sortudo, Lina, Jimmy, Chica, Gandolfo, Tulipa, Killer, Teca, Izzie, Lin, Laessie, Lili, Star, Shelley, Wendy.

Às cientistas e professoras excepcionais que me empurraram e me puxaram para a herpetologia, e nas quais eu sempre me inspiro: Maria Elina Bichuette, Denise de C. Rossa-Feres e Juliana Zina.

E por fim, ao meu amado Délio Baêta, que esteve comigo em todos os momentos do doutorado (os bons e os ruins), que me aguentou com amor, com e sem paciência, que é para mim um dos melhores herpetólogos que conheço, e de quem tenho um imenso orgulho.

Gratidão a todos!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer às pessoas sem as quais essa tese não existiria.

Não apenas porque eu não teria conseguido elaborá-la, mas porque tudo em mim dependeu dos seus ensinamentos.

Quero agradecer a todas as pessoas que me ensinaram algo

Aos que me ensinaram a andar, a falar

A pedir desculpas, a agradecer, a pedir

Aos que me ensinaram a não deixar comida no prato

A guardar o que eu não ia levar no lugar certo

A terminar a tarefa antes de brincar

Aos que me ensinaram a escrever, letra por letra, palavra por palavra

Aos que mesmo sem saber escrever direito, me ensinavam a fazer caligrafia, contas, tarefas

Aos que me ensinaram muito, aos que me ensinaram pouco

Aos que não me deixavam faltar das aulas de inglês, aos que não me deixavam faltar de nada

Aos que me ensinaram matemática, português, história, geografia

Aos que me ensinaram física, química, biologia, literatura, redação, geometria

Aos que me ensinaram pintura, desenho, esportes, dança, inglês, espanhol, francês, música

Aos que me ensinaram violão, teclado, violino, ponto-cruz, culinária

Aos que me ensinaram citologia, embriologia, bioquímica, histologia, zoologia, botânica

Aos que me ensinaram estatística, cálculo, biofísica, fisiologia

Aos que me ensinaram genética, filogeografia, sistemática, anatomia

Aos que me ensinaram autocrítica e autoanálise

Aos licenciados, aos mestres, aos doutores

Aos jovens, aos idosos

Aos equilibrados, aos histéricos

Aos depressivos, aos felizes

Aos que ganhavam bem, aos que ganhavam mal, aos que não ganhavam nada
Aos que amavam o que faziam, aos que só queriam que aquilo acabasse

Aos que eram amados, aos que só eu amava, aos que nem eu amava
Aos que me odiavam, aos que me amavam, aos que nem ligavam
Aos que nem sabiam meu nome, aos que todo ano contavam a origem do meu nome
Aos que me pediam para ficar quieta, aos que me pediam ajuda
Aos que me acordavam, aos que me deixavam dormir
Aos que jamais acreditariam se ouvissem que eu dormia
Aos que se lembram de mim, ou só do nome, ou só da “carinha”
Aos que não lembravam nem quando conviviam comigo
Aos que se orgulhariam de saber que cheguei ao doutorado
Aos que nem se importariam

Aos que adoraram trabalhar comigo, aos que jamais repetiriam
Aos que me disseram que não dava tempo, aos que disseram que ainda era pouco
Aos que me puseram limites, aos que quiseram que eu os superasse

Aos que me ensinaram, mesmo sem perceber, que é preciso encontrar um equilíbrio
Entre a contextualização e a extrapolação
Entre a compreensão e a expressão
Entre a argumentação e a decisão

Eu não chegaria aqui sem eles, o que quer que seja o “aqui”
Eles estão aqui por todos os lados, em mim, na minha história, na minha tese
Em cada pequeno erro, em cada pequeno acerto
Em cada letra bem colocada, em cada palavra bem escrita, em cada crase mal-usada
Em cada conceito aprendido, em cada conceito confundido

Agradeço a todos que quiseram me ensinar, que tentaram me ensinar, que foram obrigados a
me ensinar, ou aos que nem sabem o quanto me ensinaram
Agradeço a todos aqueles que são tantos, e com tantos feitos, que não cabem em uma arte
malfeita, em uma lista improvisada ou em uma memória mediana
Tampouco cabem em uma tese, mas são a tese

Agradeço a todos eles que poderiam ser outros, e poderia dar no mesmo
Mas foi no somatório de seus feitos que eu surgi, tal qual sou hoje
E não trocaria eles por quaisquer outros
Qualquer orgulho que eu possua do meu tenro caminho acadêmico é na verdade orgulho deles
Orgulho de ter tido eles como tutores, professores, orientadores
Orgulho que se confunde com gratidão, porque é gratidão
Gratidão imensurável e indescritível
Sou muitíssimo grata a todos eles, por tudo o que sou, por tudo o que fiz, por tudo que posso ser.

Espero um dia ser para alguém pelo menos um pouco do que foram para mim!

Janete A. Fares Rubens G. Sabbag Reid N. Fares Sousa J. Souza Gislaine F. Fares
Constantina G. Sabbag Janice Fares Viviane P. Saad Zenia C. Sabbag
Stefanie F. Sabbag Jaime Fares Mayara Sabbag Daisy N. Sabbag
Ali Fares Jamil Fares Sidney Sabbag Astrid Sabbag Jorge Fares
Luiz Carlos Inber Jr. Sueli G. Fares Felipe S. Saad Lucinda Fares
Celso P. Miller Cláudia Sabbag Elisabete Cenejo Soudki Saad Saleh Fares
Yolanda Kenaud Ahmed Fares Ana N. Fares Jurie Maluli Wagner P. Miller
Silvia M. P. Norette Adeline Silveira Mauro C. Miller Noemi Klafke
Regina Igizias Eda Franca Marisa Silveira Marcos A. F. Jesus
Abelardo B. Kica Maria F. Paula Virginia Nouweldo Maurício A. Kamiani
Jose Luis Alvarez Luiz Fernando Marchesin Walter Jarath Jr. Katia Pellegrino
Marsilene F. Queiroz Marcia F. S. Guimarães Nilza R. F. C. Lima Joel Vieira
Mary D. B. Leuzi M. Zélia Beato Lucia M. R. R. Vieira Hernani M. F. Jr.
Adalberto A. Gonçalves Silvia S. Bednarski Mara C. B. S. Freitas Roberto Ferrari
Jose Wagner Machado Vera L. G. Kacanichski Reinaldo V. Souza Jr.
Cláudia M. B. S. Ravelli Antonio J. Aydar Antonieta M. Mercato John C. Karpinsky
Marli P. R. Camargo Darcilia A. Falco Paulo R. Castelli Celso C. Egea
Maria Luiza S. Teixeira Valéria B. N. Peruzzini Jania Pellegrino M. Aparecida A. Tridico
M. Fatima R. S. Narciso Eliete F. J. Reis M. Auxiliadora Martins Edion M. Filho
M. Eliete Jacomini Alda R. S. Pizzini Alcio Caetano Rodrigo Jair Vieira
Adaumir K. Castro Pedro A. Neto Antenor Godoy Marcelo Augusto
Marcelo N. pia Alexandry S. Margal Quizia Cass Armando A. L. Vieira Jose R. Verani
Gilberton Moraes Pedro M. Galatti Jr. Alaide A. F. Gersner Kalva M. S. Matos
Marcos Del Lanza Reinaldo C. A. A. Brito Flavio A. Silva Marisa N. Fernandes
Odete Rocha Alberto C. Peret Norma Portari Orlando M. Filho Marcos Anduin
Alexandre K. Oliveira Marcelo A. Fernandes Carlos L. B. A. Prado Susana T. Strixino
Angélica M. T. M. Dias M. Inês S. Lima Julio C. Garavello Carlos R. Souza Silva
Swak Mourao Mirna L. R. Selguim Manoel M. D. Filho Keico O. Nonaka
M. Elina Buchette Marcos A. Batalha Ana L. Kalinin Francisco J. Kamin
Juliana Zina Cristiano S. Neto Marcel C. Tanaka Vanias K. Resende Cyril Bernard
Helio Y. Hoshina M. Tereza M. N. Manuwr Fabio R. Amaral Carla M. Lopes
Bianca V. M. Bernick Luis M. Giasson Kelly R. Zamudio Milton Ribeiro Taran Grant
Cinthia A. Brasileiro Victor G. D. Orrico Thais H. Condez Clarisse Palma
Julian Javovich Mariana L. Lyra A. Cardinal C. Lourenço Selma M. A. Santos
M. Tereza C. Thorne Cynthia R. A. Prado Mauro G. Rodrigues Luciana A. Fusinatto
Helio Baeta Marcos P. Pizo Jose P. Guadanucci Thiago Carvalho Celso B. Haddad

RESUMO

Thoropa Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae) é um gênero de rãs endêmicas do domínio Mata Atlântica e de ecótonos associados. Possui atualmente seis espécies (*T. miliaris*, *T. petropolitana*, *T. taophora*, *T. lutzi*, *T. megatympnum* e *T. saxatilis*), divididas em dois grupos morfológicos: grupo petropolitana (*T. petropolitana* e *T. lutzi*) e grupo miliaris (*T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympnum* e *T. saxatilis*). Todas as espécies se reproduzem e se desenvolvem em rochas molhadas de água doce, encontradas em afloramentos rochosos, cachoeiras e riachos. Um estudo recente sobre a filogenia molecular mostrou que *T. miliaris* é parafilética a *T. taophora*, e que *T. taophora*, *T. megatympnum* e *T. saxatilis* são monofiléticas com alto suporte (Sabbag et al. 2018). Esse estudo também encontrou diversos clados dentro de cada uma das espécies, especialmente em *T. miliaris*. Porém, não foi possível estudarem molecularmente as espécies do grupo petropolitana porque existe apenas uma amostra de DNA disponível para o grupo. No presente trabalho, estudamos aspectos genéticos e morfológicos das seis espécies do gênero a fim de investigar a diversidade molecular previamente encontrada, a parafilia de *T. miliaris* e as características morfológicas das espécies que coincidam com a diversidade genética conhecida. Encontramos que os clados conhecidos de *T. miliaris* são linhagens evoluindo separadamente e que os clados conhecidos de *T. taophora* fazem parte de uma linhagem única. *Thoropa miliaris* e *T. taophora* são reciprocamente monofiléticas. Também encontramos que a diversificação desse complexo de espécies parece ter ocorrido muito mais tarde do que havia sido publicado. As espécies do grupo petropolitana possuem algumas diferenças morfológicas externas em adultos e larvas que permite distingui-las do grupo miliaris. Dentro do grupo miliaris é possível distinguir *T. megatympnum* e *T. saxatilis*, embora com poucas características diagnósticas. Dentro do complexo *T. miliaris* + *T. taophora*, entretanto, não encontramos características morfológicas que coincidam com a diversidade genética conhecida e tampouco pudemos diferenciar as duas espécies válidas. Fizemos também uma revisão taxonômica de *T. petropolitana* com a designação de um neótipo.

Palavras-chave: delimitação de espécies, Filogenômica Ancorada, linhagens, anfíbios, Mata Atlântica, Campo rupestre, caracteres externos, anuros adultos, girinos, taxonomia

ABSTRACT

Thoropa Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae) is a frog genus endemic to the Atlantic forest domain and associated ecotones. It comprises six species (*T. miliaris*, *T. petropolitana*, *T. taophora*, *T. lutzi*, *T. megatympalum* and *T. saxatilis*), divided in two morphological groups: petropolitana group (*T. petropolitana* and *T. lutzi*) and miliaris group (*T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympalum* and *T. saxatilis*). All the species reproduce and develop in freshwater wet rocks that can be found in rock outcrops, waterfalls and streams. A recent study on molecular phylogeny has shown that *T. miliaris* is paraphyletic in respect to *T. taophora* and that *T. taophora*, *T. megatympalum* and *T. saxatilis* are monophyletic with high support. This study also found many clades inside each of those species, especially within *T. miliaris*. Nevertheless, it was not possible to study molecular aspects of the petropolitana group because there is only one DNA sample available for the group. In this work, we studied genetic and morphological aspects of all six species of the genus in order to investigate the molecular diversity found previously, the paraphyly found for *T. miliaris*, and the species morphological characteristics that coincide with the known genetic diversity. We found that the known clades of *T. miliaris* are separately evolving lineages and that the clades of *T. taophora* are part of a whole lineage. *Thoropa miliaris* and *T. taophora* are reciprocally monophyletic. We also found that the diversification of this species complex seems to have happened much later than previously known. The species of petropolitana group possesses some external morphological differences in adults and larvae that allow them to be separated from species of the miliaris group. Within miliaris group it is possible to distinguish *T. megatympalum* and *T. saxatilis* although with few diagnostic characteristics. Inside the complex *T. miliaris* + *T. taophora*, however, we could not find morphological characteristics that coincide with the known genetic diversity, neither we could differentiate the two valid species. We also did a taxonomic review of *T. petropolitana* with a neotype designation.

Keywords: species delimitation, Anchored Phylogenomics, lineages, amphibians, Atlantic forest, external characters, adult anurans, tadpoles, taxonomy

SUMÁRIO

Introdução geral.....	16
Referências bibliográficas.....	23
Capítulo 1: Estrutura genética de populações sintópicas e simpátricas do complexo de <i>Thoropa miliaris</i> (Spix, 1824) e <i>Thoropa taophora</i> (Miranda-Ribeiro, 1923) (Anura: Cycloramphidae).....	26
Abstract.....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Material e métodos.....	30
Amostragem.....	30
Extração de DNA total e obtenção dos marcadores moleculares.....	30
Tratamento dos dados e análises.....	31
Estrutura populacional segundo o genoma nuclear.....	31
Relacionamentos filogenéticos.....	34
Estimativas de fluxo gênico.....	34
Delimitação de linhagens.....	35
Relógio molecular.....	37
Resultados.....	38
Estrutura populacional segundo o genoma nuclear.....	38
Relacionamentos filogenéticos.....	38
Estimativas de fluxo gênico.....	42
Delimitação de linhagens.....	44
Relógio molecular.....	45
Discussão.....	46
Estrutura populacional e relações filogenéticas.....	47
Relações filogenéticas.....	50
Fluxo gênico.....	51
Delimitação de espécies e taxonomia.....	52
Relógio molecular.....	53
Biogeografia e conservação.....	54
Conclusões.....	55
Referências bibliográficas.....	55
Capítulo 2: Variação morfológica das espécies de <i>Thoropa</i> Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae).....	61
Abstract.....	61
Resumo.....	61
Introdução.....	62
Caracteres sexuais secundários.....	62
Diagnoses específicas e hipótese filogenética.....	64
Material e métodos.....	65
Espécimes.....	65
Associação às linhagens.....	69
Presença de espermatozoides e caracteres sexuais secundários.....	69
Morfologia externa de adultos e larvas.....	73
Coloração e desenho.....	73
Morfometria de adultos e contagens de papilas.....	73
Análises estatísticas.....	74
Resultados.....	76

Associação às linhagens.....	76
Presença de espermatozoides e caracteres sexuais secundários.....	77
Morfologia externa de adultos e larvas.....	83
Coloração e desenho.....	98
Morfometria de adultos.....	108
Discussão.....	126
Associação às linhagens.....	126
Machos adultos e desenvolvimento das almofadas nupciais.....	126
Morfologia externa de adultos e larvas.....	127
Morfometria de adultos.....	128
Conclusões.....	130
Referências bibliográficas.....	131
Capítulo 3: Designação do neótipo de <i>Thoropa petropolitana</i> (Wandolleck, 1907) (Anura: Cycloramphidae).....	135
Abstract.....	135
Resumo.....	135
Introdução.....	135
Histórico taxonômico.....	136
Material e métodos.....	139
Espécimes.....	139
Caracteres morfológicos.....	140
Resultados.....	141
Descrição do neótipo de <i>Thoropa petropolitana</i> (Wandolleck, 1907).....	141
Síntipos.....	142
Neótipo.....	142
Diagnose.....	142
Descrição do neótipo.....	142
Medidas do neótipo.....	145
Coloração em vida.....	145
Coloração em álcool.....	146
Sinonímia de <i>Eupsophus fuliginosus</i> a <i>Thoropa petropolitana</i>	146
História natural.....	148
Canto.....	148
Variação.....	148
Larvas.....	150
Distribuição geográfica.....	153
Discussão.....	153
Referências bibliográficas.....	157
Considerações finais e perspectivas futuras.....	162
Limites entre espécies.....	162
Biogeografia e conservação.....	163
Referências bibliográficas.....	165
Apêndices.....	167
Referências bibliográficas.....	186
Anexo 1.....	187

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) é um grupo de rãs que ocorre exclusivamente no Brasil no domínio da Mata Atlântica (*sensu* Ab'Sáber 1977) e no campo rupestre (Silveira et al. 2016), da Bahia até o Rio Grande do Sul, com exceção do Paraná. Vivem e se reproduzem em afloramentos rochosos úmidos, como cachoeiras, quedas d'água, formações rochosas com água doce ou pedras em riachos de vazão baixa (Bokermann 1965; Caramaschi e Sazima 1984; Cocroft e Heyer 1988; Feio et al. 2006), em geral expostos ao sol (Giaretta e Facure 2004; Consolmagno et al. 2016).

A história natural das espécies de *Thoropa* é parcialmente conhecida. Todas as espécies do gênero reproduzem-se nesses filmes de água doce que escorrem sobre rochas, onde as fêmeas depositam os ovos e onde os girinos exotróficos semiterrestres se desenvolvem (Barth 1956; Bokermann 1965; Heyer e Crombie 1979; Giaretta e Facure 2004; Haddad e Prado 2005). Os machos de algumas espécies do gênero são conhecidos por serem territoriais (*T. miliaris*, *T. petropolitana*, e *T. taophora*), poligínicos (*T. taophora*) e cuidarem da desova (*T. petropolitana* e *T. taophora*) (Heyer e Crombie 1979; Giaretta e Facure 2004; Muralidhar et al. 2014; Consolmagno et al. 2016). Em termos de dieta, as espécies de *Thoropa* são generalistas, se alimentando de diversos grupos de invertebrados (Bokermann 1965; Siqueira et al. 2006), especialmente formigas (Brasileiro et al. 2010). Em populações litorâneas, invertebrados marinhos (e.g. *Ligia oceanica*) constituem importantes itens alimentares (Sazima 1971; Brasileiro et al. 2010), o que evidencia a tolerância dessas populações a ambientes de salinidade elevada (Abe e Bicudo 1991).

Thoropa contém seis espécies válidas: *T. miliaris* (Spix, 1824), *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923), *T. lutzi* Cochran, 1938, *T. megatympanum* Caramaschi e Sazima, 1984 e *T. saxatilis* Cocroft e Heyer, 1988 (Figura 1). *Thoropa lutzi* e *T. petropolitana* formam o chamado grupo *petropolitana* e as restantes fazem parte do grupo *miliaris* (Sabbag et al. 2018).

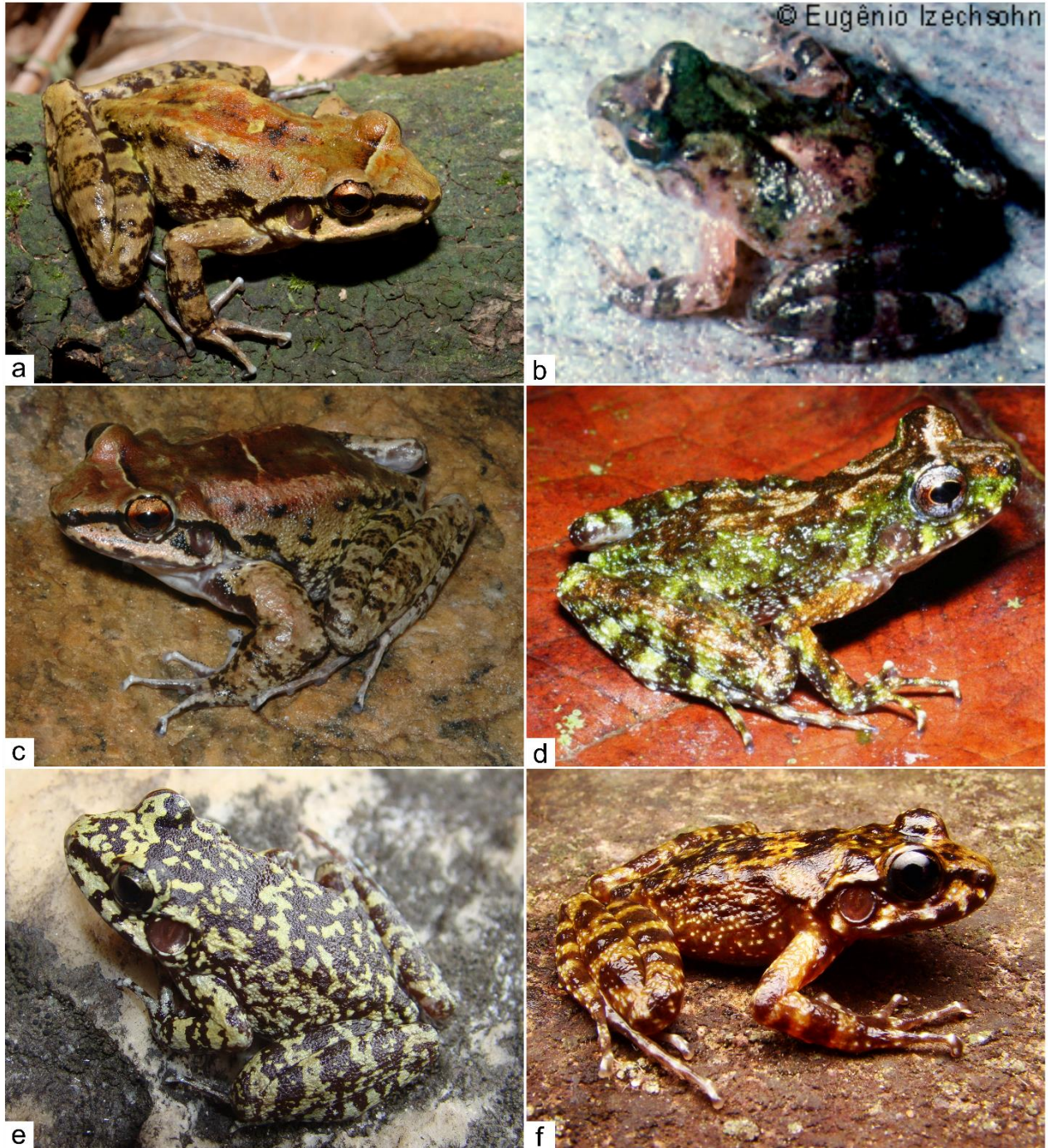


Figura 1: Espécies válidas do gênero *Thoropa*. (a) *T. miliaris*, Santa Teresa, ES, foto de J. P. Pombal Jr; (b) *T. petropolitana*, Teresópolis, RJ, foto de Eugênio Izechson; (c) *T. taophora*, Ubatuba, SP, foto de Célio F. B. Haddad; (d) *T. lutzi*, Mimoso do Sul, ES, foto de João L. Gasparini; (e) *T. megatympanum*, Botumirim, MG, foto de Fernando Leal; e (f) *T. saxatilis*, São Francisco de Paula, RS, foto de Patrick Colombo.

Com exceção de *T. saxatilis*, as espécies de *Thoropa* do grupo *miliaris* ocorrem em abundância. *Thoropa miliaris* e *T. taophora* habitam desde costões rochosos no nível do mar até cachoeiras e afloramentos rochosos a cerca de 1500 m de altitude. *Thoropa miliaris* é a espécie com distribuição mais ampla, sendo conhecida para os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e sul e sudeste do estado da Bahia (Feio et al. 2000, 2006) (Figura 2). *T. taophora*, por outro lado, apresenta distribuição restrita à Serra do Mar e litoral do estado de São Paulo (Maxson e Heyer 1982; Feio et al. 2006) (Figura 2). *Thoropa megatympanum* ocorre no campo rupestre (*sensu* Silveira et al. 2016), que localiza-se em um ecótono de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica na Cadeia do Espinhaço (Silveira et al. 2016), no estado de Minas Gerais e centro-sul da Bahia (Leite et al. 2008; Sabbag et al. 2018) (Figura 2).

Das seis espécies do gênero, três se encontram em alguma categoria de ameaça em listas internacionais, nacionais e regionais (Tabela 1), incluindo as contidas no grupo *petropolitana* (*Thoropa lutzi* e *T. petropolitana*). *Thoropa petropolitana* era conhecida por ocorrer na Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro (Figura 2), e permanece sem novos registros desde 1982 apesar de constantes esforços de coleta. *Thoropa lutzi* era conhecida para os arredores da cidade do Rio de Janeiro (Izecksohn e Carvalho-e-Silva 2001), onde é considerada desaparecida, e para as regiões serranas do Espírito Santo e leste de Minas Gerais onde ainda é encontrada (Sabbag et al. 2018) (Figura 2). *Thoropa saxatilis* é restrita ao sul do Brasil e ainda é encontrada nas encostas da Serra Geral, desde Santa Catarina até o Rio Grande do Sul (Cocroft e Heyer 1988) (Figura 2). *T. saxatilis* não é encontrada na localidade tipo desde a descrição, sendo atualmente conhecida de poucas localidades. Uma das hipóteses para o desaparecimento dessas populações e espécies é a redução do ambiente desses animais, causada especialmente pela ação humana. A crescente ação antrópica sobre o domínio da Mata Atlântica já reduziu sua área total a quase 10% da área original (Ribeiro et al. 2009), uma das razões pelas quais ela é considerada há anos como uma área prioritária para a conservação da biodiversidade (Myers et al. 2000).

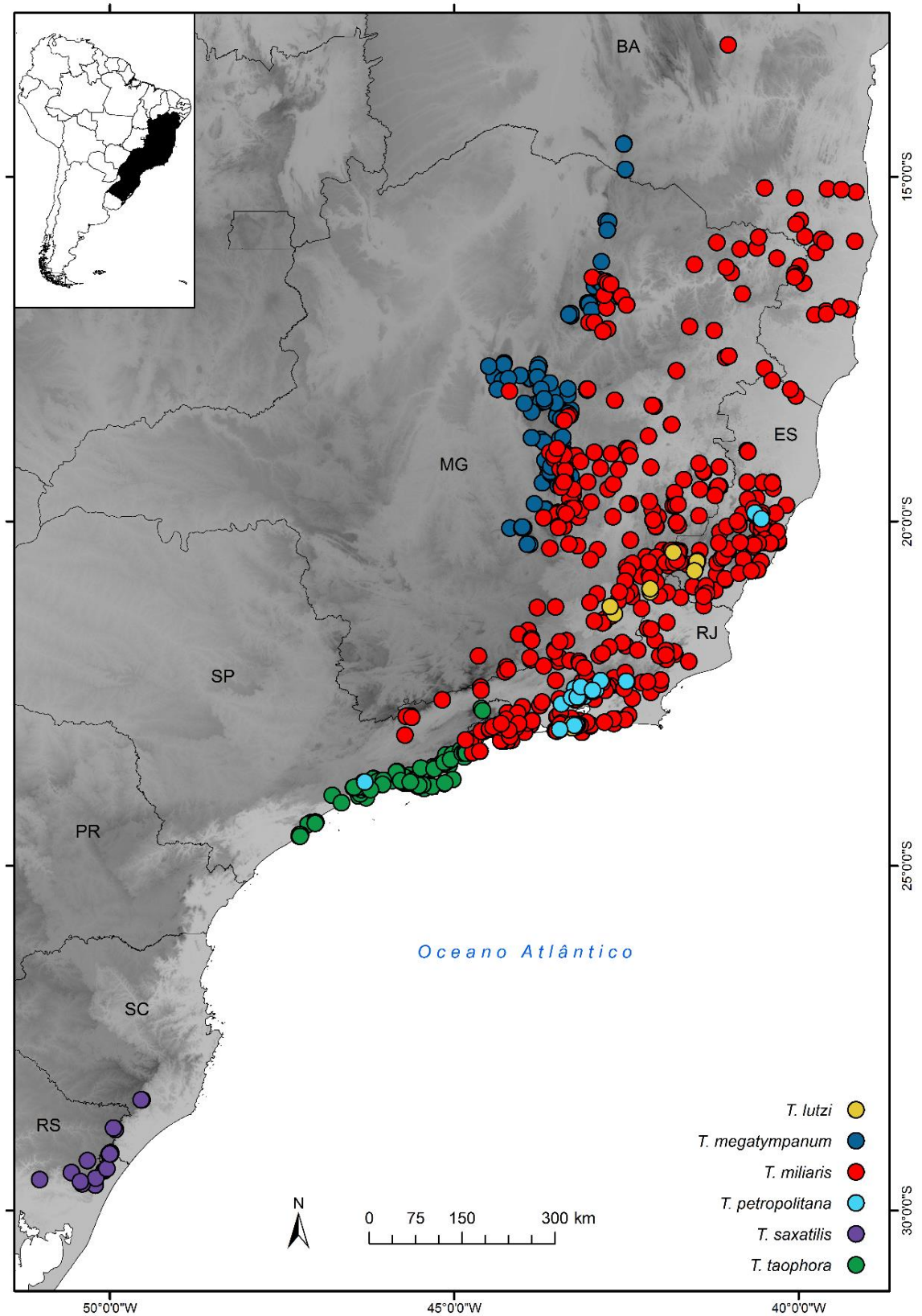


Figura 2: Distribuição encontrada para as espécies do gênero *Thoropa* baseada em exemplares analisados nesta tese. Altitude mostrada em escala de cinza, sendo o cinza mais claro representativo do nível do mar.

Tabela 1: Classificação das espécies de *Thoropa* quanto à categoria de ameaça, na lista internacional (“Global”, Carvalho-e-Silva e Peixoto 2004; Garcia 2004; Garcia et al. 2010; Caramaschi et al. 2010), na lista nacional (ICMBio 2018), e nas listas estaduais, por unidade federativa (IPEMA 2007; Estado de São Paulo 2009; FATMA 2011; Rio Grande do Sul 2014). As categorias seguem a padronização da União Internacional para a Conservação da Natureza (em inglês: *IUCN*), sendo: DD = dados insuficientes; LC = não preocupante; VU = vulnerável; EN = ameaçada; CR = criticamente em perigo. O símbolo “-” é para casos em que a espécie não é conhecida para a unidade federativa e o símbolo “?” é para espécies não mencionadas ou não encontradas em listas. O símbolo “*” refere-se a uma classificação suposta para *T. taophora* na lista internacional, que é a mesma classificação de *T. miliaris* em razão da sinonímia desfeita por Feio et al. (2006).

Espécie	<i>T. lutzi</i>	<i>T. megatympanum</i>	<i>T. miliaris</i>	<i>T. petropolitana</i>	<i>T. saxatilis</i>	<i>T. taophora</i>
Global	EN	LC	LC	VU	NT	LC*
Nacional	DD	LC	LC	EM	VU	LC
BA	-	?	?	-	-	-
MG	-	?	?	-	-	-
ES	EN	-	?	CR	-	-
RJ	?	-	?	?	-	-
SP	-	-	LC	DD	-	LC
SC	-	-	?	-	CR	-
RS	-	-	?	-	EN	-

A partir de dados moleculares, Sabbag et al. (2018) avaliaram a distribuição da diversidade genética, as relações filogenéticas e os tempos de divergência no grupo *miliaris* (Sabbag et al. 2018) (Anexo 1). Encontraram que as quatro espécies desse grupo possuem subestrutura que varia entre dois e cinco clados por espécie, sendo *Thoropa miliaris* a mais estruturada delas (Sabbag et al. 2018) (Figura 3). Recuperaram o grupo *miliaris* como monofilético, *Thoropa megatympanum*, *T. saxatilis* e *T. taophora* como monofiléticas e *T. miliaris* como parafilética em relação a *T. taophora* (Sabbag et al. 2018) (Figura 3). Clados de *T. miliaris* e *T. taophora* ocorreram em simpatria ou sintopia em algumas localidades, como Paraty e Santa Maria Madalena (RJ), Carangola (MG), Domingos Martins, Cachoeiro de Itapemirim e Santa Teresa (ES) (Sabbag et al. 2018) (Figura 4). Por fim, o relógio molecular utilizado indicou que as espécies iniciaram seu processo de divergência provavelmente no Mioceno (cerca de 30 milhões de anos atrás) sendo que *T. saxatilis* teria sido a primeira a divergir, seguida de *T. megatympanum* que, por sua vez, é irmã do complexo de *T. miliaris* + *T. taophora* (Sabbag et al. 2018).

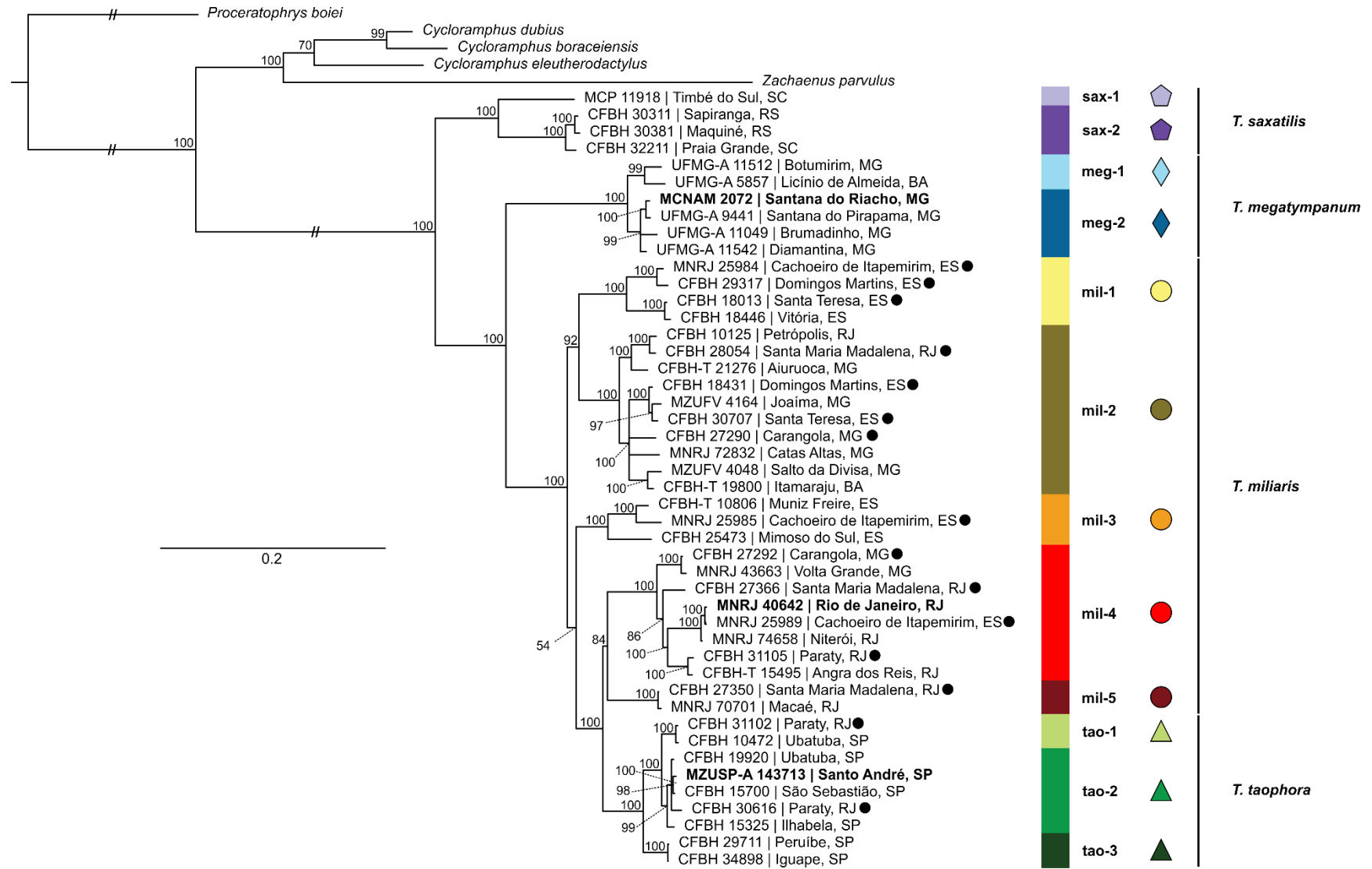


Figura 3: Árvore filogenética de consenso de 50%, elaborada com genes concatenados, obtida por inferência Bayesiana, mostrando os clados internos das quatro espécies de *Thoropa* do grupo *miliaris*. Círculos pretos correspondem a localidades com simpatrias ou sintopias de clados. Os símbolos de cada clado são símbolos servem para a localização no mapa da “Figura 4”. Modificado de Sabbag et al. (2018).

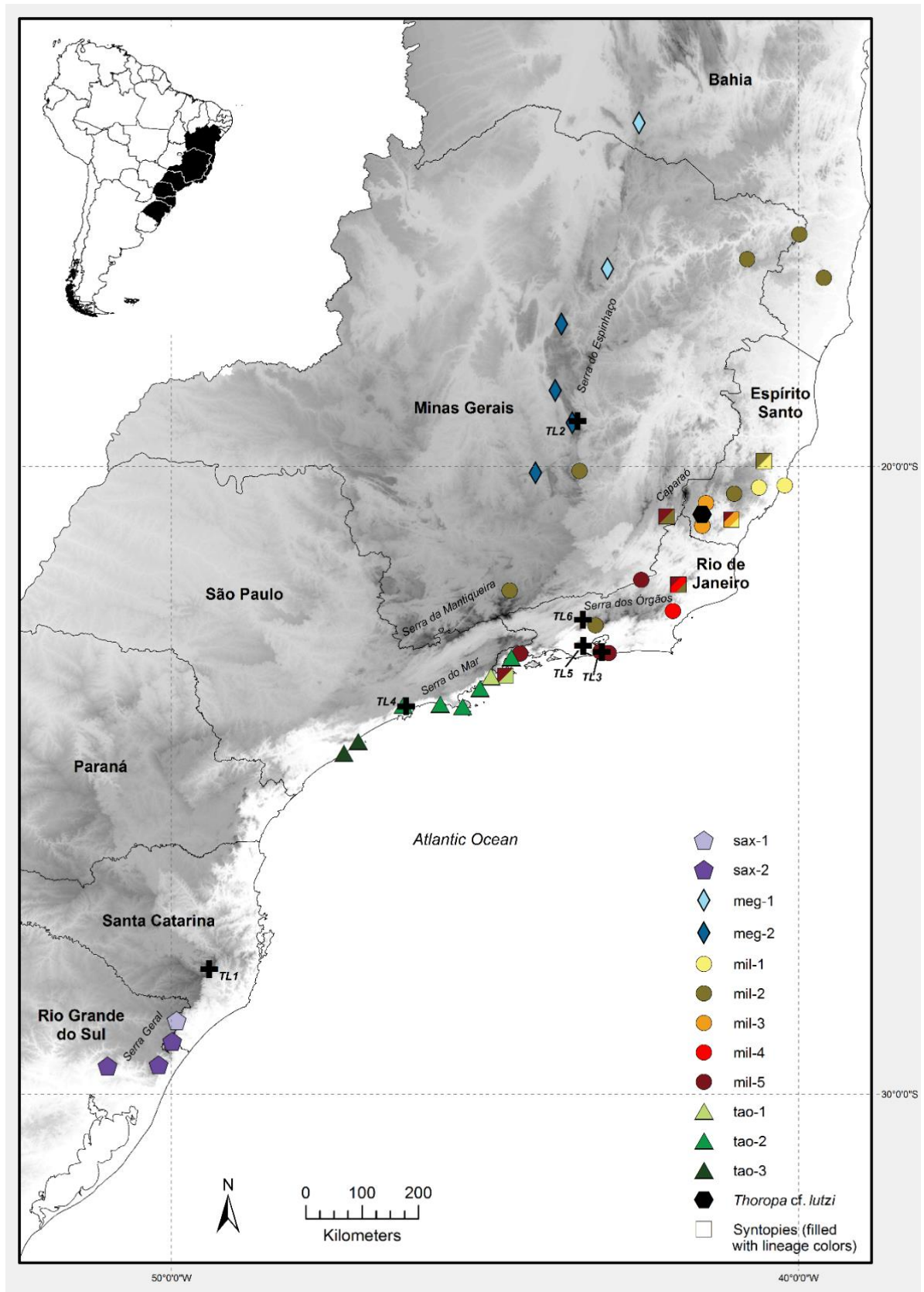


Figura 4: Distribuição conhecida dos clados de *Thoropa* do grupo *miliaris*. Os sinais de adição indicam as localidades-tipo das espécies do gênero *Thoropa*, sendo TL1, TL2, TL3, TL4, TL5 e TL6, respectivamente *T. saxatilis*, *T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. taophora*, *T. lutzi* e *T. petropolitana*. Os quadrados indicam as localidades com simpatrias ou sintopias de clados, com cores específicas de cada caso. Retirado de Sabbag et al. (2018). Altitude mostrada em escala de cinza, sendo o branco representativo do nível do mar.

Nesta tese acessamos a variação molecular e morfologia externa de adultos e girinos de *Thoropa* para explorar algumas questões que permaneceram abertas com o trabalho de Sabbag et al. (2018). Nosso primeiro objetivo foi caracterizar a estrutura genética das populações do complexo de *Thoropa miliaris* e *T. taophora*, investigando possíveis hibridações e fluxo gênico entre os clados identificados por Sabbag et al. (2018) (capítulo 1). O segundo objetivo foi averiguar a validade das diagnoses publicadas para as seis espécies do gênero e procurar possíveis características morfológicas coincidentes com o padrão da diversidade genética encontrada no grupo *miliaris* (capítulo 2). Por fim, fizemos uma revisão de *T. petropolitana* para efetivar ajustes taxonômicos pertinentes para essa espécie (capítulo 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Sáber, A.N. 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. *Geomorfologia* 1–21.
- Abe, A.S., e J.E.P.W. Bicudo. 1991. Adaptations to salinity and osmoregulation in the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). *Zool. Anz.* 227:313–318.
- Barth, R. 1956. Observações anatômicas sobre a larva de *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 54:489–497.
- Bokermann, W.C.A. 1965. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 525–537.
- Brasileiro, C.A., M. Martins, e I. Sazima. 2010. Feeding ecology of *Thoropa taophora* (Anura: Cycloramphidae) on a rocky seashore in Southeastern Brazil. *South Am. J. Herpetol.* 5:181–188.
- Caramaschi, U., L.B. Nascimento, e D. Silvano. 2010. *Thoropa megatympnum*. IUCN Red List Threat. Species
- Caramaschi, U., e I. Sazima. 1984. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). *Rev. Bras. Zool.* 2:139–146.
- Carvalho-e-Silva, S.P. de, e O.L. Peixoto. 2004. *Thoropa petropolitana*. IUCN Red List Threat. Species
- Cochran, D.M. 1938. Diagnoses of new frogs from Brazil. *Proceeding Biol. Soc. Washingt.* 51:41–42.
- Croft, R.B., e W.R. Heyer. 1988. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). *Proc. Biol. Soc. Washingt.* 101:209–220.

- Consolmagno, R.C., G.S. Requena, G. Machado, e C.A. Brasileiro. 2016. Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70:785–795.
- Cope, E.D. 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia s. Salientia. *Nat. Hist. Rev. New series*:97–120.
- Estado de São Paulo. 2009. Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo - Vertebrados. (P.M. Bressan, M.C.M. Kierulff, e A.M. Sugieda, orgs.). Governo do estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo. 648 pp.
- FATMA. 2011. Lista das espécies da fauna ameaçada de extinção em Santa Catarina. 58.
- Feio, R.N. 2002. Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 217 pp.
- Feio, R.N., F.A. Juncá, e U. Caramaschi. 2000. Geographic distribution: *Thoropa miliaris*. *Herpetol. Rev.* 31:252.
- Feio, R.N., M.F. Napoli, e U. Caramaschi. 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. do Mus. Nac.* 64:41–60.
- Garcia, P. 2004. *Thoropa saxatilis*. IUCN Red List Threat. Species
- Garcia, P., O.L. Peixoto, e G. Moreira. 2010. *Thoropa miliaris*. IUCN Red List Threat. Species
- Giaretta, A.A., e K.G. Facure. 2004. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). *Biota Neotrop.* 4:1–10.
- Haddad, C.F.B., e C.P.A. Prado. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *Bioscience* 55:207–217.
- Heyer, W.R., e R.I. Crombie. 1979. Natural history notes on *Craspedoglossa stejnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). *J. Washingt. Acad. Sci.* 69:17–20.
- ICMBio. 2018. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. V-Anfíbios. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 131 pp.
- IPEMA. 2007. Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. (M. Passamani e S.L. Mendes, orgs.). Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória, ES. 140 pp.
- Izecksohn, E., e S.P. de Carvalho-e-Silva. 2001. Anfíbios do município do Rio de Janeiro. Editora UFRJ. 148 pp.

- Leite, F.S.F., F.A. Juncá, e P.C. Eterovick. 2008. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4:158–176.
- Maxson, L.R., e W.R. Heyer. 1982. Leptodactylid frogs and the Brazilian shield: an old and continuing adaptive relationship. *Biotropica* 14:10–15.
- Miranda-Ribeiro, A. 1923. Os hylodideos do Museu Paulista. *Rev. do Mus. Paul.* 825–846.
- Muralidhar, P., F.P. De Sá, C.F.B. Haddad, e K.R. Zamudio. 2014. Kin-bias, breeding site selection and female fitness in a cannibalistic Neotropical frog. *Mol. Ecol.* 23:453–463.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. Fonseca, e J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.
- Ribeiro, M.C., J.P. Metzger, A.C. Martensen, F.J. Ponzoni, e M.M. Hirota. 2009. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* 142:1141–1153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Rio Grande do Sul, A.L. 2014. Espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. DOE número 173, de 09 de setembro de 2014, Brasil.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 122:142–156.
- Sazima, I. 1971. The occurrence of marine invertebrates in the stomach contents of the frog *Thoropa miliaris*. *Cienc. Cult.* 23:647–648.
- Silveira, F.A.O., D. Negreiros, N.P.U. Barbosa, ... H. Lambers. 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant Soil* 403:129–152.
- Siqueira, C.C., M. Van Sluys, C. V. Ariani, e C.F.D. Rocha. 2006. Feeding ecology of *Thoropa miliaris* (Anura, Cycloramphidae) in four areas of Atlantic rain forest, Southeastern Brazil. *J. Herpetol.* 40:520–525.
- Spix, J.B. v. 1824. *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae Regis*. F. S. Hübschmann, München.
- Wandolleck, B. 1907. Einige Neue und Weniger Bekannte Batrachier von Brasilien. *Abhandlungen und Berichte des Zool. und Anthropol. Museums zu Dresden* 1–15.

CAPÍTULO 1

Estrutura genética de populações sintópicas e simpátricas do complexo de *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) e *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Anura: Cycloramphidae)

ABSTRACT

The *Thoropa miliaris* + *T. taophora* species complex comprises high genetic diversity distributed in several clades that occur sympatrically and syntopically in the southeastern Atlantic forest of Brazil. In this study, we sequenced samples from the *Thoropa miliaris* species group (*T. saxatilis*, *T. megatympanum*, *T. miliaris* and *T. taophora*) for hundreds of nuclear genes through Anchored Phylogenomics to investigate *T. miliaris* paraphyly in respect to *T. taophora*, as well as gene flow between clades that co-occur. For this purpose, we combined assignment analyses with traditional and coalescent methods of phylogeny reconstruction, measured gene flow levels among clades and delimited species molecularly. We recovered most clades as populations in assignment analyses. We did not find intense sharing of alleles among most clades, suggesting independently evolving lineages. The exception includes two clades within *T. miliaris*, which are subdivided and admixed. We found positive gene flow values between other clades, but their interpretation is ambiguous. The species trees show improved resolution compared to previous studies, and species delimitation suggests that many of the clades constitute putative species. Diversification of the group seems to have occurred much later than suggested in previous studies, especially during the Pleistocene.

Keywords: Anchored Phylogenomics, Atlantic forest, lineages, rock frogs, molecular delimitation

RESUMO

O complexo de espécies de *Thoropa miliaris* + *T. taophora* apresenta uma grande diversidade genética distribuída em clados distintos que ocorrem simpátrica e sintopicamente na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. Neste estudo sequenciamos indivíduos de *Thoropa* do grupo

miliaris (*T. saxatilis*, *T. megatympanum*, *T. miliaris* e *T. taophora*) para centenas de genes nucleares utilizando a técnica de Filogenômica Ancorada para investigar a parafilia de *T. miliaris* em relação a *T. taophora*, assim como o fluxo gênico entre os clados que co-ocorrem. Para isso, combinamos análises de atribuição e métodos tradicionais e coalescentes de construção de filogenias com métodos que medem níveis de fluxo gênico e delimitam espécies molecularmente. Recuperamos a maioria dos clados como populações nas análises de atribuição. Não encontramos compartilhamento intenso de frequências alélicas entre a maioria dos clados, o que sugere linhagens evoluindo independentemente. As exceções incluem dois clados de *T. miliaris*, que são subdivididos e com indivíduos misturados. Encontramos valores de fluxo gênico positivo entre vários clados, porém sua interpretação é ambígua. As árvores de espécies mostram uma resolução melhorada em comparação com estudos anteriores e a delimitação de espécies sugere que muitos dos clados constituem espécies putativas. A diversificação do grupo parece ter ocorrido muito mais tarde do que sugerido em estudos anteriores, especialmente durante o Pleistoceno

Palavras-chave: Delimitação molecular, Filogenômica Ancorada, linhagens, Mata Atlântica, rãs-das-pedras

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas mais estudados da América do Sul (Turchetto-Zolet et al. 2013) e contém uma quantidade gigantesca de espécies de animais e plantas (Ribeiro et al. 2009). Anfíbios na Mata Atlântica já somam mais de 620 espécies descritas (Rossa-Feres et al. 2017), enquanto muitas ainda aguardam descrição. A enorme maioria ainda carece de estudos de história natural, ecologia e evolução, sendo que para muitas delas a informação que temos se restringe à sua posição na árvore da vida. Ainda assim, a taxonomia dos anuros da Mata Atlântica sofre de diversos problemas que não se resolvem apenas com sequenciamento, como espécies com descrições precárias e até séries-tipo perdidas (Dubois 2017), gerando confusões taxonômicas antigas e recentes que perduram ao longo dos anos.

Espécies são unidades fundamentais da biologia em qualquer nível de estudo, desde ecologia de ecossistemas até biologia molecular de organismos (Queiroz 2005). Portanto, a delimitação de espécies, feita em última instância pela taxonomia, é necessária para guiar estudos de história natural, comportamento, evolução, especiação, ecologia, anatomia, dentre outras áreas. E, claro, importante para questões socioambientais como divulgação científica,

educação ambiental e políticas públicas de conservação da biodiversidade.

A delimitação de espécies e a taxonomia incluem incontáveis polêmicas, desde os primeiros historiadores naturais até os dias atuais. Independente do objetivo (estudar especiação ou conduzir uma decisão socioambiental), muitas dessas polêmicas devem-se à dificuldade de se encontrar um conceito de espécie único e/ou à intrínseca arbitrariedade dos conceitos existentes (Queiroz e Gauthier 1992; Queiroz 2007). Separar tipos anatômicos e comportamentais pode incluir fatores de abstração humanos, tornando o processo às vezes pessoal. Nos últimos anos, delimitar espécies tornou-se uma tarefa comumente feita com informações genéticas resumidas e árvores filogenéticas (Padial et al. 2010). Mas apesar de informações genéticas serem mais objetivas, elas não excluem a arbitrariedade humana da delimitação de unidades taxonômicas.

Um dos poucos consensos quanto aos conceitos de espécie (ou ainda, a parte comum entre todos os conceitos) é que uma espécie é uma série ancestral-descendente de populações intercruciantes com tendências evolutivas próprias (i.e., “linhagens” *sensu* Simpson 1951) (Queiroz 2007). Generalizando, entendemos que para uma espécie ser considerada uma espécie ela não poderia ter, por exemplo, níveis de fluxo gênico muito intensos com outra espécie, embora esses níveis sejam discutíveis (Nosil 2008). Ou, em outras palavras, organismos semelhantes que dividem o mesmo ambiente e que não trocam genes devem pertencer a espécies diferentes.

Dentre as espécies de Mata Atlântica com confusões taxonômicas está o gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae). *Thoropa* é um gênero de rãs com características ecológicas muito conservadas em todas as espécies: todas habitam, se reproduzem e se desenvolvem em rochas úmidas. Atualmente existem seis espécies válidas no gênero: *T. lutzi*, *T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. petropolitana*, *T. saxatilis* e *T. taophora*. Embora algumas espécies sejam muito abundantes nos ambientes em que são encontradas (*T. megatympanum*, *T. miliaris* e *T. taophora*, Brasileiro et al. 2010; Sabbag et al. 2018), metade das espécies do gênero (*T. lutzi*, *T. petropolitana* e *T. saxatilis*) está em alguma categoria de ameaça em listas internacionais, nacionais e regionais (IPEMA 2007; ICMBio 2018). Isso torna esse gênero extremamente relevante para estudos de conservação e taxonomia.

Recentemente, Sabbag et al. (2018) publicaram uma filogenia molecular para as espécies de *Thoropa* do grupo *miliaris*, que são aquelas ainda encontradas em maior abundância na natureza (*T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. saxatilis* e *T. taophora*). Nesse estudo, Sabbag et al. (2018) incluíram três fragmentos de origem mitocondrial e dois fragmentos oriundos do genoma nuclear, com uma amostragem espalhada por quase a totalidade das distribuições

geográficas das espécies e calibração temporal via relógio molecular. Segundo essa hipótese filogenética, a diversificação do grupo é antiga, tendo iniciado no Eoceno, com *Thoropa saxatilis* sendo a primeira espécie do grupo a divergir, seguida de *T. megatympanum* (com intervalo de confiança incluindo Oligoceno e Mioceno, Sabbag et al. 2018). A maior parte dos eventos de diversificação ocorreu no Mioceno e Pleistoceno, incluindo o surgimento de linhagens em *T. saxatilis* e *T. megatympanum* e a diversificação do clado *T. miliaris* + *T. taophora*. No entanto, as relações nesse clado não foram totalmente resolvidas e a subestrutura em *T. miliaris* inclui diversos clados profundamente divergentes e que apresentam distribuições geográficas que se sobrepõem. Embora estes clados sejam suportados individualmente, seus relacionamentos não o são e rendem a *T. miliaris* o status de espécie parafilética em relação a *T. taophora* (Sabbag et al. 2018).

Embora a abordagem de Sabbag et al. (2018) tenha incluído genes nucleares, suas genealogias individuais não recuperaram os mesmos clados observados no DNA mitocondrial (Sabbag et al. 2018), não ficando claro, portanto, se os clados em *Thoropa miliaris* constituem unidades que evoluem independentemente (i.e., linhagens sem fluxo gênico significativo). Se essas linhagens forem “verdadeiras” (não trocarem alelos intensamente), então a falta de resolução filogenética entre elas seria uma consequência das baixas taxas de substituição nucleotídica típicas para esses genes nucleares. Alternativamente, a falta de resolução nas árvores nucleares pode ser reflexo de níveis de fluxo gênico não negligenciáveis. Nesse caso, a subestrutura no clado *T. miliaris* + *T. taophora* seria artefato do DNA mitocondrial, cujas taxas rápidas de substituição nucleotídica e ausência de recombinação teriam gerado um sinal dominante sobre a matriz de dados moleculares.

Assim, nosso estudo foi elaborado com o intuito de investigar o status dos clados de *Thoropa miliaris* observados por Sabbag et al. (2018), perguntando especificamente: (I) *Thoropa miliaris* é, de fato, uma espécie parafilética em relação a *T. taophora*? (II) Existem linhagens evoluindo independentemente em *T. miliaris* e *T. taophora*? (III) Caso existam, qual é a relação entre elas e quando divergiram? Para responder essas perguntas, utilizamos sequenciamento de alto desempenho, mais especificamente Filogenômica Ancorada (Lemmon et al. 2012) para obter centenas de marcadores nucleares de representantes de todas as potenciais linhagens de *T. miliaris*, incluindo localidades em que as mesmas ocorrem em simpatria (sobreposição de distribuições geográficas, termo inicialmente cunhado por Poulton 1903) e sintopia (ocorrência em um mesmo microambiente, *sensu* Rivas 1964). Com esses marcadores, utilizamos métodos baseados em frequências alélicas (análises de atribuição) e métodos coalescentes, para averiguar com maior precisão a estrutura genética nesse sistema,

testando a presença de fluxo gênico entre as potenciais linhagens, estabelecendo suas relações filogenéticas e tempos de divergência.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostramos 29 indivíduos, 23 deles previamente incluídos na árvore filogenética de Sabbag et al. (2018). A escolha foi baseada em critérios geográficos e taxonômicos, de forma a abranger todos os clados de *Thoropa miliaris* e *T. taophora*, incluindo topótipos de ambas as espécies e indivíduos de diferentes clados ocorrendo em localidades de sintopia (Carangola, MG) e simpatria (Santa Teresa, Cachoeiro do Itapemirim e Domingos Martins, ES; Santa Maria Madalena e Paraty, RJ) com outros clados. Adicionalmente, incluímos um indivíduo de *T. saxatilis* coletado a cerca de 60 km da localidade tipo e um topótipo de *T. megatympanum*, para contemplar a diversidade genética de todas as espécies do grupo (Tabela 1). As seis amostras não incluídas em Sabbag et al. (2018) foram obtidas a partir de coleções zoológicas e em coletas em campo (licença de coleta MMA-ICMBio-SISBIO 30181-1).

Extração de DNA total e obtenção dos marcadores moleculares

Extraímos o DNA total com o kit de extração Qiagen DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Inc.), seguindo as recomendações do fabricante. Estimamos a concentração do DNA total utilizando Qubit® 3.0 (ThermoFisher Scientific, Inc) e enviamos entre 80 e 120 ng por amostra (no mínimo 5 ng/μL) de DNA para o Centro de Filogenômica Ancorada (*Center for Anchored Phylogenomics*, Florida State University, www.anchoredphylogeny.com) para captura de loci ortólogos não-ligados através da técnica de filogenômica ancorada (AHE: *anchored hybrid enrichment*, Lemmon et al. 2012). Nessa técnica são feitas bibliotecas genômica com adaptadores individuais para cada amostra. Em seguida, os loci são capturados por sondas homólogas, sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 2000 (2x250) e recuperados com *pipelines* próprios de bioinformática, resultando em alinhamentos independentes para cada locus que são interpretáveis ao olho humano.

Para os seis indivíduos novos, utilizamos parte da extração do DNA total para amplificar e sequenciar o fragmento 3' do gene ribossomal 16S rRNA utilizando os *primers* 16Sar-L e 16Sbr-H (Palumbi et al. 2002), chamado aqui de 16S-ARBR. Esse fragmento foi utilizado para fornecer um posicionamento das amostras novas nos clados resultantes do estudo de Sabbag et al. (2018). As condições utilizadas na amplificação e no sequenciamento são as mesmas de

Sabbag et al. (2018), também feitas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP, Rio Claro, SP) e na empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

Tratamento dos dados e análises

Obtivemos um total de 436 loci nucleares distribuídos em arquivos independentes no formato *fasta*, cada arquivo com os dois alelos de cada indivíduo separadamente (portanto, no máximo 58 sequências por arquivo *fasta*) (Tabela 2). Realizamos então uma segunda filtragem, começando pela eliminação de arquivos vazios e passando pela identificação de sítios com ambiguidades e *gaps*, que foram codificados como dado ausente (“N”). Fizemos essa segunda filtragem através de um *script* Bash (Apêndice 1), recuperando 414 loci em alinhamentos de alta qualidade. Um segundo problema, a existência de um sítio vazio no final de cada alinhamento, foi resolvido com substituição simples no editor de texto Notepad++ (<https://notepad-plus-plus.org/>), usando expressões regulares, que permitem substituições simultâneas em múltiplos arquivos. Em seguida, encurtamos e padronizamos os nomes dos indivíduos em cada arquivo com um *script* em linguagem Python (Apêndice 2), adicionando também uma identificação em consonância com os nomes dos clados encontrados por Sabbag et al. (2018) (Tabela 1).

Estrutura populacional segundo o genoma nuclear

Para averiguar a estrutura do genoma nuclear e obter uma primeira avaliação da presença de fluxo gênico no sistema, utilizamos análises de atribuição realizadas com o programa STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Para gerar o arquivo de entrada do programa, partimos dos arquivos limpos e renomeados, primeiramente convertidos para o formato *phylip* com a ferramenta “Fasta2Phylip” (Mullins Lab, University of Washington, <https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/perlscript/docs/Sequence.html>). Extraímos então os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*, ou SNPs) de cada loci com a ferramenta SNP-sites (Page et al. 2016). Dos 414 loci, oito foram descartados por não possuírem nenhum SNP, sendo totalmente compostos por sítios invariantes, restando 406 loci. Utilizamos então um *script* em Python (Apêndice 3) para extrair o primeiro sítio de cada arquivo de SNP e codificar alelos e eventuais dados faltantes (i.e., “N”) com números inteiros (“A” = 1; “C” = 2, “G” = 3, “T” = 4, “N” = -1).

Tabela 1: Amostras das espécies de *Thoropa* do grupo *miliaris* utilizadas nesse estudo, com os respectivos números de registro em coleção (acrônimos das coleções seguem padronização de Sabaj 2016, sendo: CFBH = Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, UNESP, Rio Claro, SP; MCNAM = Coleção de Anfíbios do Museu de Ciências Naturais da PUC-MG, Belo Horizonte, MG; MCP = Coleção Herpetológica do Museu de Ciências e Tecnologia da PUC-RS, Porto Alegre, RS; MNRJ = Coleção Herpetológica do Museu Nacional, Rio de Janeiro, RJ; MZUSP = Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia da USP, São Paulo, SP), localidades de coleta, município, unidade federativa (UF), coordenadas geográficas e código da localidade. Coordenadas com asteriscos representam centroides obtidos no programa ArcGIS v.10.1. Topótipos estão representados por pontos pretos.

Espécie	Registro	Localidade	Município	UF	Latitude	Longitude	Código
<i>T. saxatilis</i>	MCP 11918	Cascata da Cortina, Serra da Rocinha, Serra Velha	Timbé do Sul	SC	-28,8287	-49,9156	L1
<i>T. megatympanum</i> ●	MCNAM 2072	Parque Nacional da Serra do Cipó	Santana do Riacho	MG	-19,3017*	-43,6041*	L2
<i>T. taophora</i>	CFBH 34898	Cachoeira do Pocinho	Iguape	SP	-24,5719	-47,2485	L3
<i>T. taophora</i>	CFBH 31102	Trilha para a praia das Laranjeiras, Trindade	Paraty	RJ	-23,3322	-44,6797	L4
<i>T. taophora</i> ●	MZUSP 143712	Cachoeira da Pedra Lisa, PE da Serra do Mar	Santo André	SP	-23,8049	-46,3010	L5
<i>T. taophora</i>	CFBH 15325	Ilha de São Sebastião, PE de Ilhabela	Ilhabela	SP	-23,8311	-45,3528	L6
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27350	Morumbeca, trilha da casa da Magdala para o Pico do Desengano, PE do Desengano	Santa Maria Madalena	RJ	-21,8792	-41,9186	L7
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28065	Imediações da estação Morumbeca, próximo da casa de pesquisa, PE do Desengano	Santa Maria Madalena	RJ	-21,8766	-41,9159	L8
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 70701	Parque Natural Municipal Fazenda Atalaia	Macaé	RJ	-22,3046	-41,9999	L9
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 25984	Parque Municipal Pico do Itabira	Cachoeiro de Itapemirim	ES	-20,8489	-41,0678	L10
<i>T. miliaris</i>	CFBH 29317	Panelas	Domingos Martins	ES	-20,3355	-40,6281	L11
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18013	Estação Biológica Santa Lúcia	Santa Teresa	ES	-19,9651	-40,5405	L12
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18446	Morro da Gamela	Vitória	ES	-20,2984	-40,3015	L13
<i>T. miliaris</i>	CFBH 41072	Afloramento rochoso no túnel Rodovia SP-123, km 31	Pindamonhangaba	SP	-22,8450	-45,6182	L14
<i>T. miliaris</i>	CFBH 10125	Estrada Rio de Janeiro-Petrópolis, km 86	Petrópolis	RJ	-22,5333	-43,2338	L15
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28054	Imediações da estação Morumbeca, trilha para o pico do Desengano, PE do Desengano	Santa Maria Madalena	RJ	-21,8803	-41,9169	L16
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27290	Cachoeira próxima à Pedra Dourada, Caminho da Luz	Carangola	MG	-20,7960	-42,1056	L17
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18431	Pedra Azul	Domingos Martins	ES	-20,4353	-41,0215	L18
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 72832	Cascatona, RPPN Santuário do Caraça	Santa Bárbara	MG	-20,0705	-43,4891	L19
<i>T. miliaris</i>	CFBH 30707	REBIO Augusto Ruschii, Nova Lombardia	Santa Teresa	ES	-19,9119	-40,5494	L20
<i>T. miliaris</i>	CFBH 32133	Pedra do Monte Pescoço	Itamaraju	BA	-16,9488	-39,6003	L21
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 10806	Sítio Recanto da Mata	Muniz Freire	ES	-20,5822	-41,4736	L22
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25473	Barra Pontões	Mimoso do Sul	ES	-20,9462	-41,5314	L23
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25474	Barra Pontões	Mimoso do Sul	ES	-20,9462	-41,5314	L23
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27292	Cachoeira próxima à Pedra Dourada, Caminho da Luz	Carangola	MG	-20,7960	-42,1056	L24
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27366	Estrada para o Sossego do Imbé, partindo de Santa Maria Madalena, PE do Desengano	Santa Maria Madalena	RJ	-21,9305	-41,7925	L25
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 40642	Pista Cláudio Coutinho, Praia Vermelha, Urca	Rio de Janeiro	RJ	-22,9501	-43,1547	L26
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 14343	Serra da Bocaina	São José do Barreiro	SP	-22,7489*	-44,5869*	L27
<i>T. miliaris</i>	CFBH 31105	Costão rochoso na praia das Laranjeiras, Trindade	Paraty	RJ	-23,3344	-44,6766	L28

Tabela 2: Amostras de *Thoropa* do grupo *miliaris* com respectivos clados de Sabbag et al. (2018) e cobertura de loci amostrados para Filogenômica Ancorada (“AHE”, em porcentagem), considerando um total de 414 loci, com números de registro em coleção (acrônimos seguem Sabaj 2016), município e unidade federativa (UF). Topótipos estão representados por pontos pretos.

Espécie	Registro	Município	UF	Clado	% AHE
<i>T. saxatilis</i>	MCP 11918	Timbé do Sul	SC	sax-1	85,51
<i>T. megatympanum</i> ●	MCNAM 2072	Santana do Riacho	MG	meg-2	92,75
<i>T. taophora</i>	CFBH 34898	Iguape	SP	tao-3	93,96
<i>T. taophora</i>	CFBH 31102	Paraty	RJ	tao-1	89,61
<i>T. taophora</i> ●	MZUSP 143712	Santo André	SP	tao-2	93,00
<i>T. taophora</i>	CFBH 15325	Ilhabela	SP	tao-2	93,72
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27350	Santa Maria Madalena	RJ	mil-5	93,72
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28065	Santa Maria Madalena	RJ	mil-5	71,01
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 70701	Macaé	RJ	mil-5	93,72
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 25984	Cachoeiro de Itapemirim	ES	mil-1	93,96
<i>T. miliaris</i>	CFBH 29317	Domingos Martins	ES	mil-1	93,48
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18013	Santa Teresa	ES	mil-1	94,44
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18446	Vitória	ES	mil-1	93,96
<i>T. miliaris</i>	CFBH 41072	Pindamonhangaba	SP	mil-2	93,96
<i>T. miliaris</i>	CFBH 10125	Petrópolis	RJ	mil-2	94,44
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28054	Santa Maria Madalena	RJ	mil-2	94,20
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27290	Carangola	MG	mil-2	94,20
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18431	Domingos Martins	ES	mil-2	93,96
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 72832	Santa Bárbara	MG	mil-2	92,75
<i>T. miliaris</i>	CFBH 30707	Santa Teresa	ES	mil-2	93,48
<i>T. miliaris</i>	CFBH 32133	Itamaraju	BA	mil-2	94,20
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 10806	Muniz Freire	ES	mil-3	93,72
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25473	Mimoso do Sul	ES	mil-3	94,69
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25474	Mimoso do Sul	ES	mil-3	94,69
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27292	Carangola	MG	mil-4	93,00
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27366	Santa Maria Madalena	RJ	mil-4	93,72
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 40642	Rio de Janeiro	RJ	mil-4	94,44
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 14343	São José do Barreiro	SP	mil-4	93,96
<i>T. miliaris</i>	CFBH 31105	Paraty	RJ	mil-4	94,44

Com essa matriz de entrada, primeiro estimamos o parâmetro de frequência alélica (λ), utilizando um milhão de iterações de *burn-in* seguidas de um milhão de réplicas de MCMC, considerando apenas uma população. Com o lambda resultante ($\lambda = 0,4104$) fizemos uma análise com o modelo de *admixture* (que aceita que indivíduos possam ter ancestralidade mista), considerando frequências correlacionadas e um valor de “K” (número de populações possíveis) variando de um a 15. Para cada valor de K fizemos 10 corridas (réplicas). Em seguida, utilizamos a plataforma *online* STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (Earl e VonHoldt 2012), que resume os resultados de todas as iterações para apreciação da variação de L(K), calcula o índice de Evanno (ΔK , Evanno et al. 2005) e fornece arquivos para o programa CLUMPP (Jakobsson e Rosenberg 2007, ver abaixo). A partir desses arquivos, fizemos permutações no CLUMPP com o algoritmo “LargeKGreedy” com 200 mil permutações para cada K. Para isso utilizamos a infraestrutura computacional GridUnesp

(NCC/UNESP). As figuras dos agrupamentos populacionais foram editadas no Excel® com histogramas 100 % agrupados e no CorelDraw®. Consideramos valores de Q abaixo de 0,9 como possíveis indícios de mistura entre populações.

Relacionamentos filogenéticos

A partir dos arquivos *phylip* obtidos anteriormente, construímos árvores filogenéticas independentemente para cada um dos 414 fragmentos e uma árvore de genes com todos os fragmentos concatenados. Utilizamos o critério de máxima verossimilhança implementado no programa RAxML v.8.1.21 (Stamatakis 2014). Utilizamos o modelo GTRGAMMA de substituição nucleotídica, *bootstrap* rápido (Stamatakis et al. 2008) e 100 réplicas. Utilizamos o programa Archeopteryx v.0.9928 beta (Han e Zmasek 2009) para visualização interativa de todas as árvores de genes, enraizando preferencialmente em *Thoropa saxatilis*. Na ausência de *T. saxatilis* utilizamos *T. megatympanum* como raiz e na ausência de *T. megatympanum* utilizamos como raiz os terminais com ramos mais longos. Utilizamos um valor mínimo de 0,75 de *bootstrap* para considerar um nó como resolvido nas árvores de genes.

A partir dessas árvores de genes individuais, reconstruímos relações filogenéticas no grupo com o programa ASTRAL v.5.6.3 (ASTRAL-III: Zhang et al. 2018). Esse programa infere a melhor árvore de espécies a partir das frequências de “quartetos” (com quatro taxa/terminais) de árvores de genes não enraizadas, calculando comprimentos de ramos em unidades coalescentes (i.e., número de gerações dividido pelo tamanho efetivo populacional), e valores de suporte em probabilidades posteriores locais (PPL). Para atribuir as amostras sequenciadas a “espécies” nas análises do ASTRAL-III, organizamos os dados de duas formas diferentes. Primeiro classificamos as amostras sequenciadas segundo os oito clados inferidos por Sabbag et al. (2018). Em seguida, classificamos as amostras conforme populações que minimizam o desequilíbrio de Hardy-Weinberg obtidas na análise de atribuição realizada com o programa STRUCTURE (ver detalhes acima). Utilizamos um valor mínimo de 0,95 de probabilidade posterior local para considerar um nó como resolvido nas árvores de espécies obtidas com o ASTRAL. Para a visualização das árvores utilizamos o programa FigTree v.1.4.3 (<https://github.com/rambaut/figtree/releases>).

Estimativas de fluxo gênico

Para estimar valores de fluxo gênico entre os clados e agrupamentos utilizamos os 414 loci de AHE no programa G-PhoCS v.1.2.3 (Gronau et al. 2011). Esse programa utiliza métodos coalescentes bayesianos e cadeia de Markov (i.e., MCMC) para estimar

probabilidades de migração de uma população para outra, utilizando médias *a priori* para as distribuições dos parâmetros θ (*theta*, relacionado à proporção de sítios variantes) e τ (*tau*, que indica o tempo de divergência, como produto entre o tempo em anos e a taxa de mutação). O programa utiliza também médias de distribuições *a priori* das taxas de migração (m). Essas três médias são fornecidas ao programa através dois valores, α e β , que seguem uma distribuição do tipo GAMMA, em que a média é igual a α/β . Entretanto, como o programa exige que os valores de α e β sejam os mesmos para θ e τ , não conseguimos até o momento escolher valores que sirvam para ambos os parâmetros. Utilizamos, então, valores aleatórios para testes preliminares, sendo eles: $\alpha = 3,0$ (para θ e τ); $\beta = 3000,0$ (para θ e τ); $\alpha = 0,002$ e $\beta = 0.00001$ (para m). Utilizamos também uma função de ajuste automático de parâmetros, fornecida pelo algoritmo do programa. Além disso, fornecemos ao programa a topologia da árvore de espécies produzida com o ASTRAL-III para os agrupamentos resultantes das análises de atribuição. Para definir as bandas de migração (pares de populações formados por uma população de origem – “O” – e uma população de destino – “D” –, Gronau et al. 2011), consideramos a possibilidade de (i) fluxo gênico entre agrupamentos do STRUCTURE que contêm amostras ocorrendo em sintopia ou simpatria com amostras de agrupamentos distintos e (ii) fluxo gênico entre os agrupamentos do STRUCTURE que mostraram indício de possível mistura (valores de Q inferiores a 0,9).

Para cada caso consideramos fluxo gênico nos dois sentidos (ou seja, estimamos duas bandas de migração). Fizemos duas réplicas das análises, cada réplica com 1.000.000 iterações, amostrando a cada 10 iterações, na nuvem computacional do projeto DataSounds (<http://www.datasounds.org/>), hospedado pela plataforma Rackspace US, Inc. Fizemos o *burn-in* das corridas posteriormente no programa Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al. 2018), retirando os primeiros 10 % de iterações. No Tracer também conferimos a convergência das análises, considerando como convergidas as corridas que possuísem parâmetros com valores médios de ESS (*effective sample size*, Rambaut et al. 2018) iguais ou maiores do que 200.

A partir das médias fornecidas pelo programa Tracer, calculamos a taxa total de migrantes (“ m ”) e a quantidade esperada de migrantes por geração (“ $\Delta_{\text{mig/ger}}$ ”). A taxa total de migrantes (“ m ”) é o produto da taxa média de migrantes entre a origem e o destino pelo τ médio calculado para o nó que inclui a origem e o destino ($m_{\text{OD}} \times \tau_{\text{OD}}$). A quantidade esperada de migrantes por geração (“ $\Delta_{\text{mig/ger}}$ ”) é o produto da taxa média de migrantes entre a origem e o destino pelo θ médio calculado para o destino ($m_{\text{OD}} \times \theta_{\text{D}}$).

Delimitação de linhagens

Conduzimos análises conjuntas de delimitação bayesiana de espécies e inferência de árvores de espécies com o programa BPP v.3.4 (Yang 2015; Flouri et al. 2018). Esse método utiliza o modelo coalescente para comparar diferentes possibilidades de delimitação de potenciais espécies (Yang e Rannala 2010) e árvores filogenéticas de espécies (Yang e Rannala 2014, 2017) com metodologia bayesiana e cadeias de Markov com “saltos reversíveis” (*reversible jump Monte Carlo Markov Chain*, rjMCMC; (Rannala e Yang 2013). Esse programa considera a seleção incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*) devido a polimorfismos ancestrais e considera também discordâncias entre árvores de genes e árvores de espécies.

Os algoritmos do programa assumem que as sequências não apresentam recombinação dentro de um loci, mas que apresentam recombinação entre os loci. Assumem também que não existe migração entre as sequências (fluxo gênico) e que a evolução dos loci segue a teoria neutra de relógio molecular com o modelo de substituição nucleotídica JC69 (Yang 2015). Por essa razão, os autores afirmam que loci ideais são aqueles que são curtos (entre 500 e 1000 pb) e fracamente ligados (Yang e Flouri 2018). Utilizamos então os loci de AHE que tivessem entre 500 e 1000 pb (48 loci no total) em um teste preliminar de utilização do programa com a análise A11, que estima paralelamente a árvore de espécies e o modelo de delimitação dos grupos (Yang e Rannala 2014).

À semelhança do G-PhoCS, o BPP faz uso do θ e τ . O usuário fornece valores de α e β da mesma forma, porém seguindo uma distribuição do tipo INVERSE GAMMA, em que a média é igual a $\beta/(\alpha - 1)$ para $\alpha > 1$ e a variância é igual a $\beta^2/[(\alpha - 1)^2(\alpha - 2)]$ para $\alpha > 2$. O programa separa os θ de todas as populações atuais e ancestrais, para os quais α e β são os mesmos, e utiliza α e β apenas para o τ do ancestral comum entre todas as populações (chamado aqui de τ_0). Os outros valores de τ , dos outros ancestrais do sistema, são obtidos pela distribuição uniforme de Dirichlet (Yang e Rannala 2010, equação 2). Para esses testes preliminares, seguimos a abordagem de Leaché e Fujita (2010) de combinar diferentes “extremos” de θ e τ_0 em testes distintos. Como Leaché e Fujita (2010) utilizaram uma versão anterior do BPP na qual a distribuição desses parâmetros era do tipo GAMMA, precisamos adaptar os valores para a distribuição INVERSE GAMMA, utilizando a média e a variância dos parâmetros de Leaché e Fujita (2010). Sendo assim, fizemos as seguintes combinações: (i) θ s grandes ($\alpha = 2$; $\beta = 0,1$) e τ_0 antigo ($\alpha = 2$; $\beta = 0,1$); (ii) θ s pequenos ($\alpha = 2$; $\beta = 0,001$) e τ_0 recente ($\alpha = 2$; $\beta = 0,001$); (iii) θ s grandes ($\alpha = 2$; $\beta = 0,1$) e τ_0 recente ($\alpha = 2$; $\beta = 0,001$); e (iv) θ s pequenos ($\alpha = 2$; $\beta = 0,001$) e τ_0 antigo ($\alpha = 2$; $\beta = 0,1$). Testamos também dois algoritmos diferentes de rjMCMC oferecidos pelo programa, chamados pelos autores de algoritmos “0” e

“1”.

Para essas análises agrupamos os indivíduos de acordo com os clados obtidos em Sabbag et al. (2018) na tentativa de manter a premissa de ausência ou valores mínimos de fluxo gênico (ver resultados). Utilizamos como *prior* de modelo de espécies o *uniform rooted trees* e *finetune* de 0,1 para todos os parâmetros. As cadeias de Markov com “saltos reversíveis” foram de 500.000 iterações, amostrando a cada cinco iterações, e descartando as 10.000 primeiras amostragens. As análises foram feitas na nuvem computacional do projeto DataSounds, hospedado na plataforma Rackspace US, Inc.

Relógio molecular

Utilizamos o programa StarBEAST2 v.14 (Ogilvie et al. 2017), implementado na plataforma do programa BEAST v.2.5.0 (Bouckaert et al. 2014), para estimar árvores de espécies datadas com relógios moleculares. StarBEAST2 utiliza cadeias de Markov (Drummond et al. 2002) em inferências bayesianas com estrutura coalescente. Elaboramos o arquivo de entrada para o StarBEAST com o utilitário BEAUti, com os 48 loci de AHE que continham entre 500 e 1000 pb e com o fragmento de 16S-ARBR, para o qual possuíamos uma taxa de evolução molecular relativa (0,0019794 substituições por sítio por milhão de anos) obtida a partir das análises calibradas com a taxa de evolução molecular do fragmento de ND2, por Sabbag et al. (2018). Utilizamos dois agrupamentos distintos para os indivíduos de *Thoropa*, um com os clados de Sabbag et al. (2018) e outro seguindo as populações encontradas nas análises de atribuição com o STRUCTURE. Seguimos os parâmetros sugeridos pelo tutorial “StarBEAST v14 tutorial” de Huw A. Ogilvie (Barido-Sottani et al. 2018), que incluiu ligar os relógios moleculares quando usando um relógio molecular estrito, usar o modelo HKY de substituição nucleotídica, estimando as taxas de substituição, o parâmetro Kappa, e utilizando as frequências das bases na opção “empírica”; modelo populacional de populações constantes; os relógios estritos, com taxas estimadas para os 48 loci de AHE e a taxa de 16S-ARBR calculada, e o modelo *Birth-Death*. Fizemos as corridas com 500 milhões de gerações, amostrando as árvores e as estatísticas a cada 50 mil gerações. O programa foi rodado na nuvem computacional do projeto DataSounds, hospedado pela plataforma Rackspace US, Inc. Conferimos a convergência das corridas com o programa Tracer, considerando como convergidas as análises que apresentassem parâmetros com valores médios de ESS iguais ou maiores do que 200. Convertemos as árvores para o formato editável no utilitário TreeAnnotator do BEAST2, com *burn-in* de 25 %, com *maximum clade credibility tree* e *median heights*. Editamos as árvores no FigTree.

RESULTADOS

Estrutura populacional segundo o genoma nuclear

Os resultados do STRUCTURE suportam o mesmo número ótimo de populações (K) tanto pelo critério do ΔK (Figura 1a) quanto pelo critério do Evanno (Figura 1b), sendo esse K = 10 (Figura 1c, Apêndices 4 e 5). *Thoropa saxatilis* e *T. megatympanum* se apresentaram como populações separadas. Os três clados de *T. taophora* (tao-1, tao-2, e tao-3, Sabbag et al. 2018) se apresentaram como uma população única. Em *T. miliaris*, todos os clados de Sabbag et al. (2018) foram recuperados separadamente como populações.

Com exceção de mil-2 e mil-4 que apresentaram subestrutura (populações mil-2a e mil-2b, e populações mil-4a e mil-4b), os agrupamentos não apresentam estrutura interna. Essas são também as únicas populações que apresentaram limites genéticos pouco definidos (valores de Q inferiores a 0,9): mil-2a, que apresentou evidência de possível fluxo gênico com mil-2b, e mil-4a com mil-4b (Figura 1c). A alocação das amostras que mostraram compartilhamento de alelos foi feita a partir das suas respectivas posições nas árvores de genes.

Relacionamentos filogenéticos

Nas árvores de genes feitas independentemente com cada loci, *Thoropa taophora* é recuperada como monofilética com alto suporte ($> 0,75$) em algumas das árvores e *T. miliaris* em nenhuma delas. Em nenhuma árvore de gene as relações entre *T. megatympanum* + *T. taophora* + *T. miliaris* são resolvidas. Por outro lado, a árvore de genes concatenados recuperou *T. miliaris* e *T. taophora* como monofiléticas com alto suporte e a relação entre elas foi recuperada com suporte máximo, sendo *T. saxatilis* irmã de todas as outras e *T. megatympanum* irmã de *T. taophora* + *T. miliaris* (Figura 2). Além disso, a árvore concatenada também recuperou todas as linhagens de *T. miliaris* como monofiléticas com alto suporte e com relações resolvidas. Mil-5 é irmã de todas as outras, mil-1 irmã de mil-2 + mil-3 + mil-4, mil-2 irmã de mil-3 + mil-4 e mil-3 irmã de mil-4 (Figura 2).

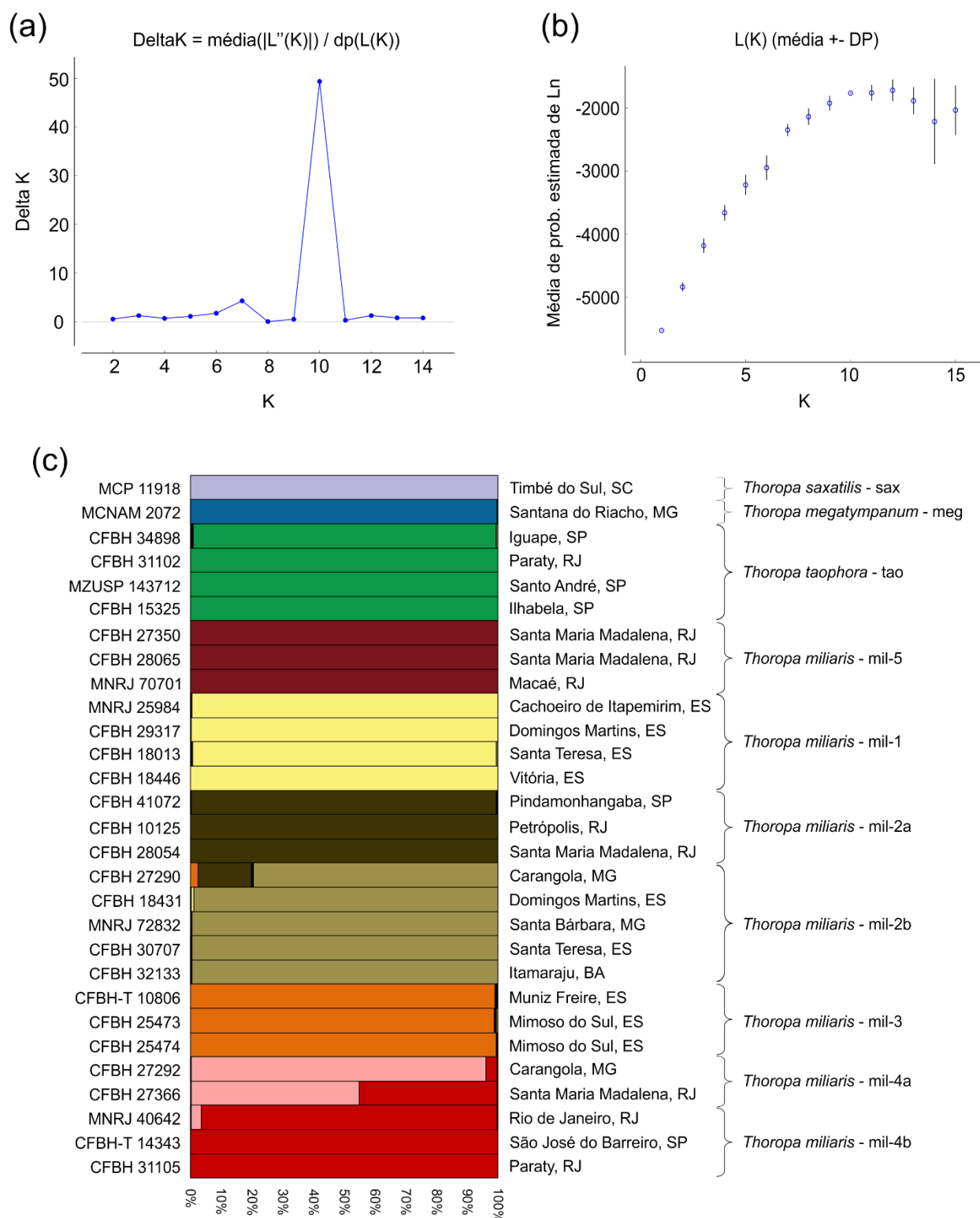


Figura 1: Resultados das análises de atribuição feitas com STRUCTURE, STRUCTURE HARVESTER e CLUMPP. (a) representação gráfica para o ΔK ; (b) representação gráfica do critério de Evanno; (c) histograma 100 % empilhado do melhor agrupamento das amostras de *Thoropa* do grupo *miliaris* ($K = 10$), colorido por grupos.

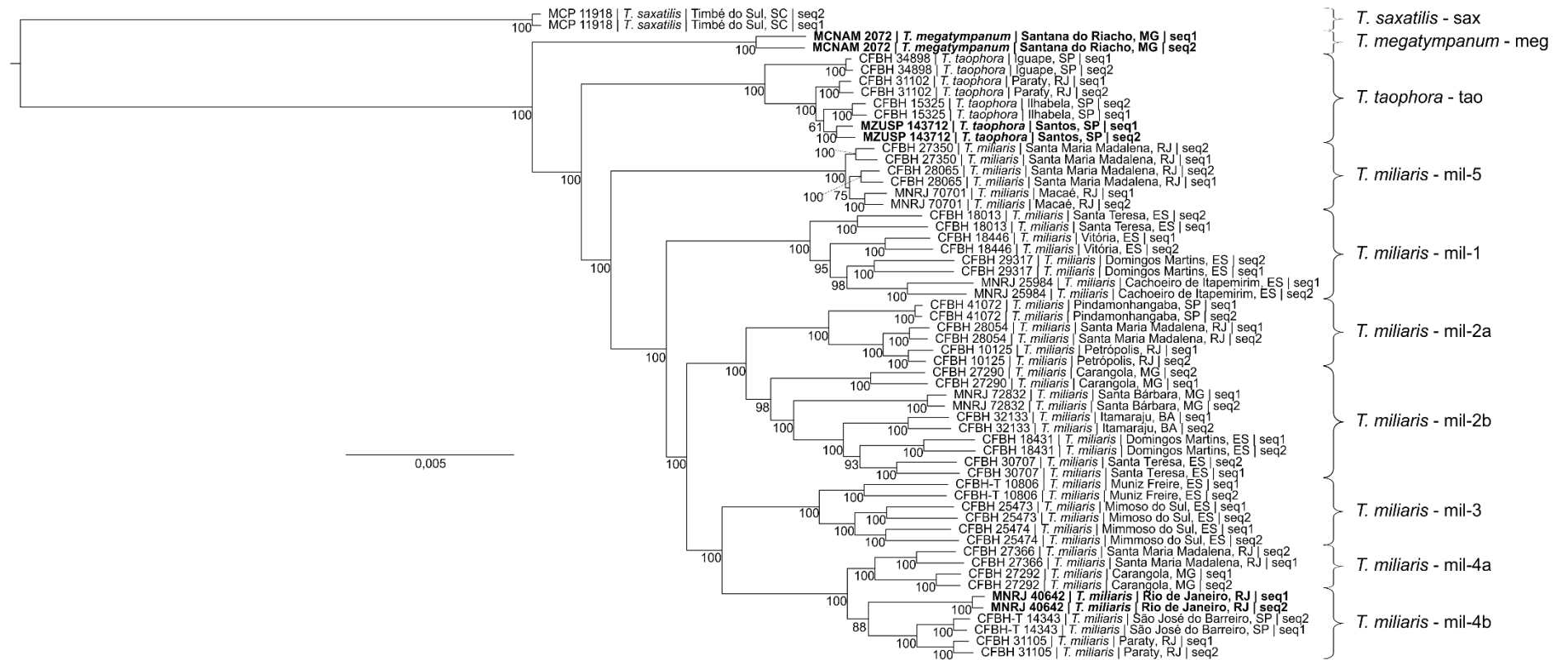


Figura 2: Árvore de genes concatenados, inferida pelo programa RAxML. Valores de suporte abaixo dos nós são valores de “bootstrap” em porcentagem. Terminais em negrito são topotipos de *Thoropa megatympanum*, *T. miliaris* e *T. taophora*.

As árvores de espécies obtidas com o ASTRAL-III também recuperaram *Thoropa saxatilis* irmã de todas as outras, *T. megatympanum* irmã de *T. taophora* + *T. miliaris* e *T. miliaris* como monofilética. Todos os nós apresentaram altos valores de suporte, com exceção de alguns nós com suportes ligeiramente mais moderados. São eles o nó que inclui mil-2 e mil-3 + mil-4 (PPL = 92 %) na árvore feita considerando os oito clados de Sabbag et al. (2018) como espécies (Figura 3) e do nó que inclui mil-2a + mil-2b a mil-3 + (mil-4a + mil-4b) (PPL = 92 %) na árvore considerando as dez populações das análises de atribuição (Figura 3) (Figura 4).

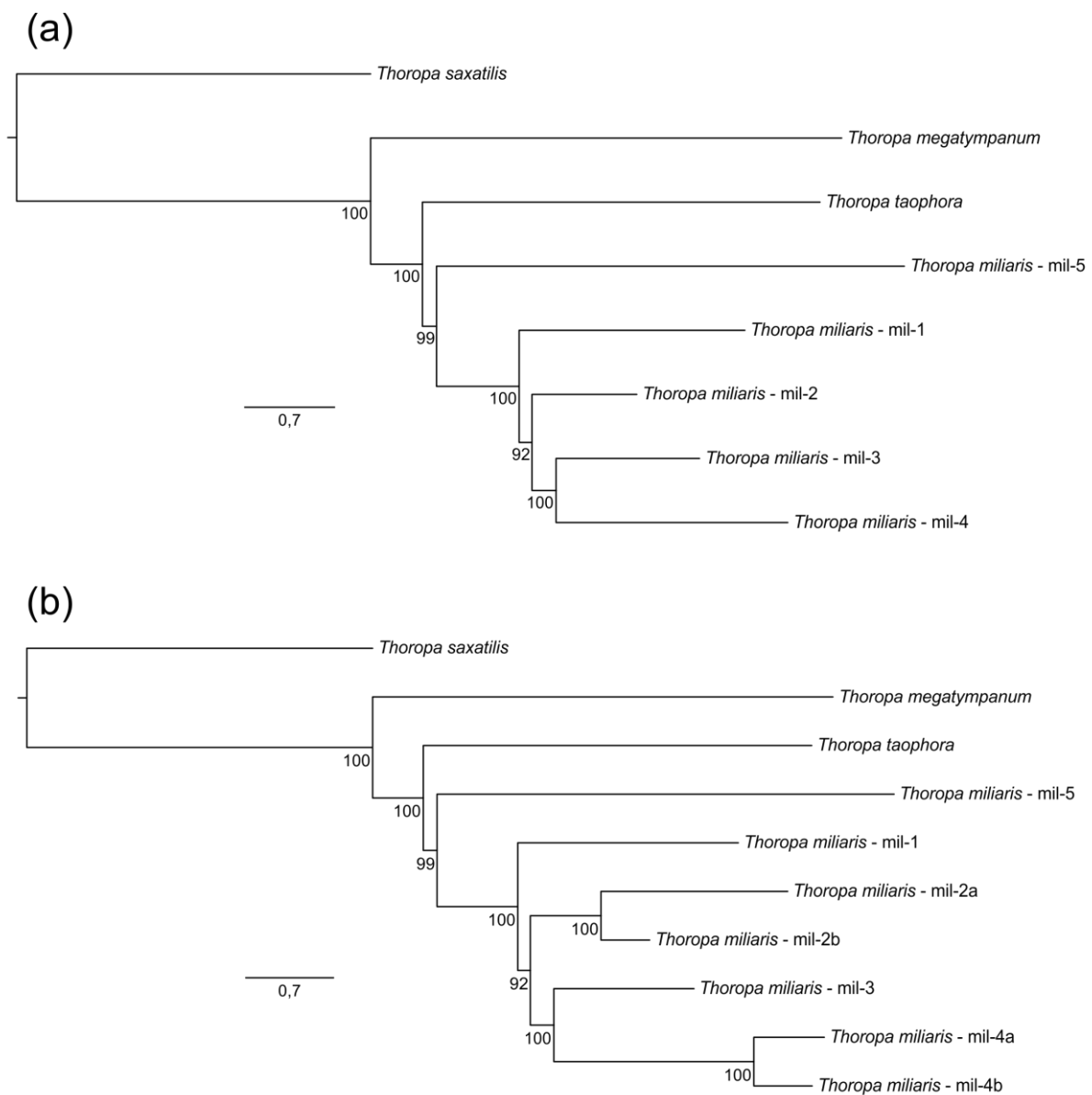


Figura 3: Árvores de espécies inferidas pelo programa ASTRAL-III, considerando como espécies: (a) os oito clados obtidos por Sabbag et al. (2018), e (b) e as dez populações encontradas com o melhor K (K = 10) inferido pela análise de atribuição. Os valores de suporte abaixo dos nós são valores de probabilidades posteriores locais (PPL) e o comprimento de ramo é dado em unidades de coalescência.

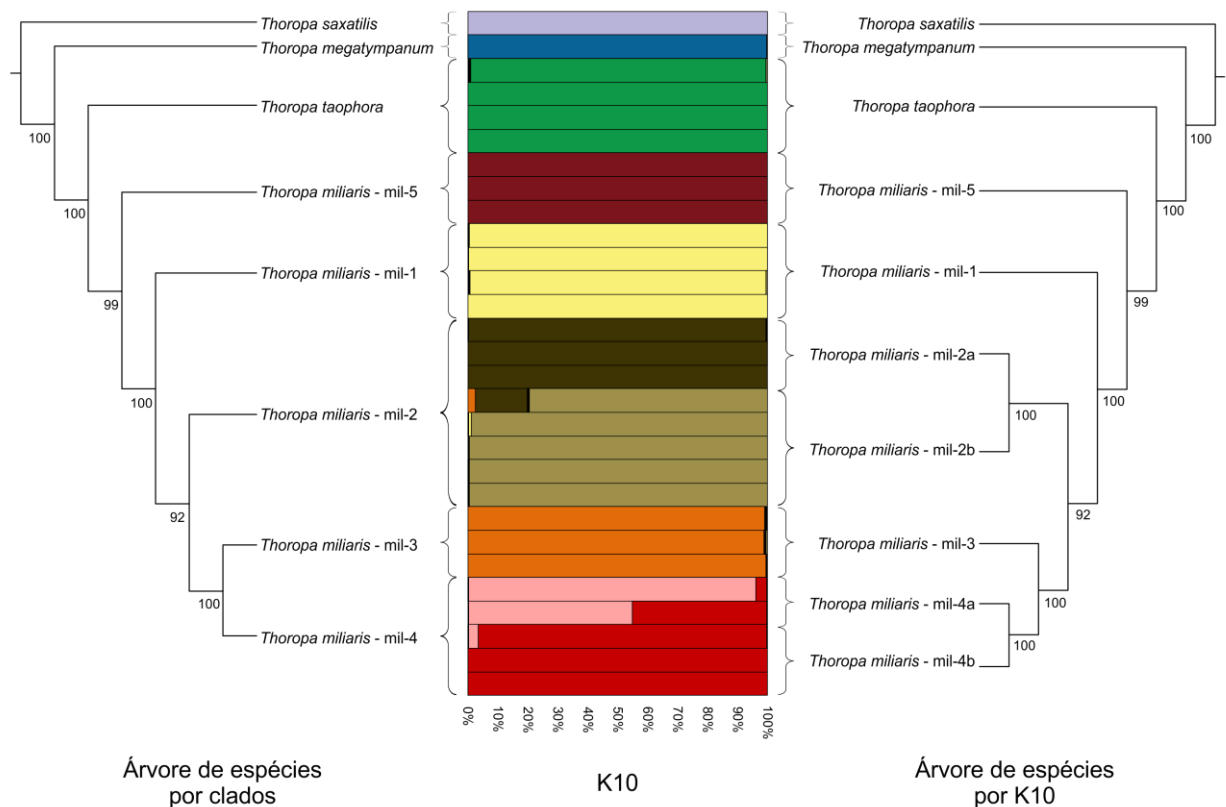


Figura 4: Diagramas representativos das topologias das árvores de espécies por coalescência juntamente com o K10 inferido nas análises de atribuição. Esquerda: árvore de espécies inferida com os oito clados de Sabbag et al. (2018). Centro: histograma 100 % empilhado do melhor K (K = 10) das análises de atribuição. Direita: árvore de espécies inferida com os dez grupos encontrados nas análises de atribuição. Valores de suporte abaixo dos nós indicam as probabilidades posteriores locais (PPL) em porcentagem (%). Os comprimentos dos ramos das árvores não possuem escala.

Estimativas de fluxo gênico

Estimamos a migração em duplo sentido (“a” e “b”) para oito bandas no programa G-PhoCS, nomeadas de b1 a b8 (Figura 5). As bandas b1 e b2 consideram migração entre as populações que apresentaram evidência de possível fluxo gênico segundo análises de atribuição, sendo elas mil-2 (mil-2a e mil-2b) e mil-4 (mil-4a e mil-4b). A banda b3 considera migração entre as populações mil-1 e mil-2b, que são simpátricas tanto em Domingos Martins (ES) quanto em Santa Teresa (ES). A banda b4 considera migração entre populações mil-2b e mil-4a, que são sintópicas em Carangola (MG). As bandas b5, b6 e b7 consideram migração entre populações mil-2a, mil-4a e mil-5 (em pares), que são sintópicas e simpátricas em Santa Maria Madalena (RJ). E a banda b8 é entre *Thoropa taophora* e mil-4b, sintópicas em Paraty (RJ).

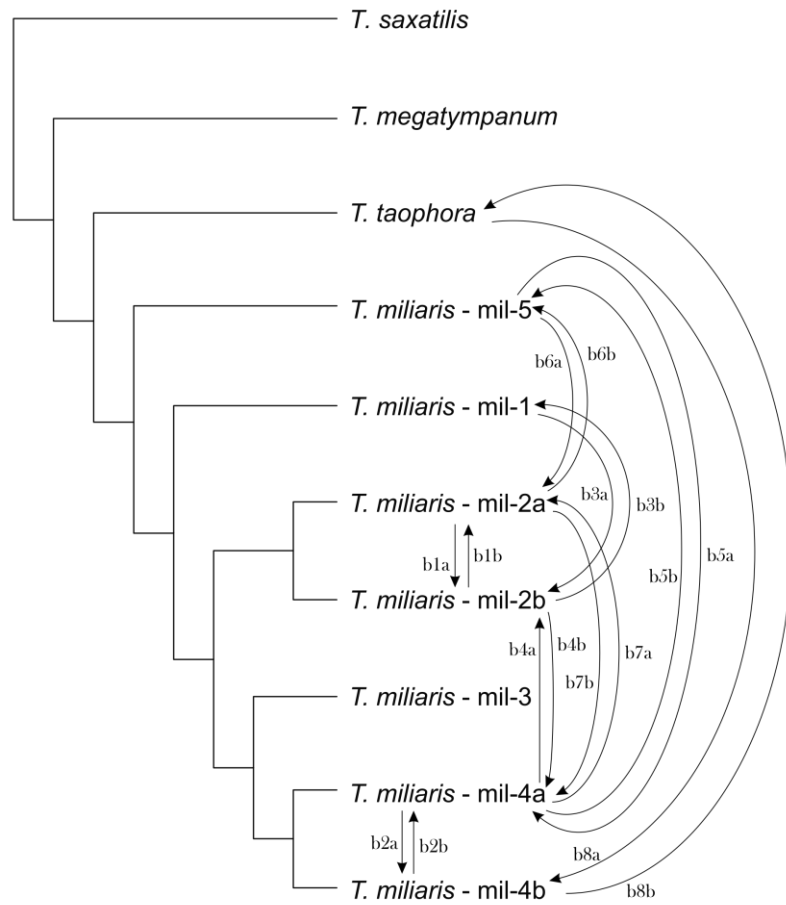


Figura 5: Diagrama representativo das bandas de migração utilizadas para estimar fluxo gênico com G-PhoCS, juntamente com a topologia inferida por coalescência considerando os agrupamentos da análise de atribuição. As setas representam as bandas de migração, com códigos de b1a até b8b.

Algumas das bandas e sentidos testados tiveram ambas as réplicas pouco convergidas, como b1b (de mil-2b para mil-2a), b2b (de mil-4b para mil-4a), b4a (de mil-4a para mil-2b), b7a (de mil-4a para mil-2a), b7b (de mil-2a para mil-4a). Outras tiveram apenas uma réplica pouco convergida, como b4b (de mil-2b para mil-4a), b5b (de mil-4a para mil-5) e b8a (de *Thoropa taophora* para mil-4b) (Tabela 3). Dessas, poucas corridas tiveram muita dificuldade de convergência, nunca duas réplicas da mesma banda (Tabela 3). A maior quantidade de migrantes por geração foi de 0,11228, de mil-2b para mil-1 (b3b), e a menor foi de 0,00034 migrantes por geração, entre mil-4b e *T. taophora* (b8b) (Tabela 3). A maior taxa total de migração foi encontrada de mil-1 para mil-2b (b3a) e a menor taxa total foi encontrada entre mil-4b e *T. taophora* (b8b) (Tabela 3).

Tabela 3: Bandas de migração utilizadas no programa G-PhoCS, com respectivos sentidos (origem e destino), com resultados obtidos sumarizados pelo programa Tracer para cada réplica (“Rep”), sendo eles: “ θ_D ” (θ médio da população de destino), “ τ_{OD} ” (τ médio do nó que inclui as populações de origem e destino), “ X_m ” (taxa média de migração calculada para a banda), “IC (X_m)” (intervalo de 95 % de confiança da taxa média de migração da banda), “ m ” (quantidade esperada de indivíduos migrantes por geração), “ $\Delta_{mig/ger}$ ” (número de migrantes por geração). Valores com baixos ESS (menores do que 100) estão em vermelho e valores com ESS medianos (entre 100 e 200) estão em azul.

Banda	Sentido		Réplica	Fornecidos				Calculados	
	Origem	Destino		θ_D	τ_{OD}	X_m	IC (X_m)	m	$\Delta_{mig/ger}$
b1a	mil-2a	mil-2b	1 ^a	0.01523	0.00257	3.24100	[0,3709, 6,4092]	0.04936	0.00832
			2 ^a	0.01522	0.00257	3.25400	[0,5115, 6,2907]	0.04953	0.00835
b1b	mil-2b	mil-2a	1 ^a	0.00276	0.00269	22.97400	[11,0769, 35,3937]	0.06348	0.06173
			2 ^a	0.00277	0.00269	22.21500	[10,65, 34,4597]	0.06151	0.05969
b2a	mil-4a	mil-4b	1 ^a	0.00289	0.00123	25.10400	[3,6275, 50,8436]	0.07245	0.03088
			2 ^a	0.00286	0.00126	37.53500	[9,7308, 67,5995]	0.10735	0.04741
b2b	mil-4b	mil-4a	1 ^a	0.00314	0.00121	23.13000	[0,00001, 52,937]	0.07258	0.02808
			2 ^a	0.00314	0.00122	24.33100	[0,00001, 53,5521]	0.07640	0.02968
b3a	mil-1	mil-2b	1 ^a	0.01466	0.00429	20.14000	[15,6407, 24,5684]	0.29525	0.08648
			2 ^a	0.01468	0.00428	19.94700	[15,4076, 24,4357]	0.29282	0.08543
b3b	mil-2b	mil-1	1 ^a	0.00886	0.00443	25.32900	[19,9327, 30,9913]	0.22431	0.11228
			2 ^a	0.00886	0.00443	25.32900	[19,9327, 30,9913]	0.22431	0.11228
b4a	mil-4a	mil-2b	1 ^a	0.01532	0.00361	0.70600	[0,00002, 1,7654]	0.01082	0.00255
			2 ^a	0.01533	0.00361	0.32900	[0,00001, 1,3808]	0.00504	0.00119
b4b	mil-2b	mil-4a	1 ^a	0.00316	0.00362	3.60000	[0,0226, 7,5615]	0.01138	0.01303
			2 ^a	0.00316	0.00362	4.29600	[0,8312, 8,3955]	0.01357	0.01555
b5a	mil-5	mil-4a	1 ^a	0.00317	0.00567	3.51600	[0,5433, 6,9252]	0.01113	0.01995
			2 ^a	0.00316	0.00568	3.70600	[0,5824, 7,2667]	0.01172	0.02106
b5b	mil-4a	mil-5	1 ^a	0.00150	0.00572	6.59200	[1,2039, 12,3173]	0.00987	0.03772
			2 ^a	0.00151	0.00570	6.51200	[2,0127, 12,0572]	0.00983	0.03714
b6a	mil-5	mil-2a	1 ^a	0.00288	0.00566	1.60600	[0,0021, 3,5049]	0.00462	0.00909
			2 ^a	0.00288	0.00566	1.50800	[0,00003, 3,4197]	0.00434	0.00853
b6b	mil-2a	mil-5	1 ^a	0.00151	0.00579	7.78900	[3,1847, 12,6529]	0.01172	0.04507
			2 ^a	0.00150	0.00579	7.90900	[3,2882, 12,8959]	0.01188	0.04580
b7a	mil-4a	mil-2a	1 ^a	0.00285	0.00361	4.35900	[0,6902, 8,5542]	0.01241	0.01575
			2 ^a	0.00285	0.00362	4.35600	[0,00005, 8,3141]	0.01241	0.01577
b7b	mil-2a	mil-4a	1 ^a	0.00317	0.00361	1.25200	[0,00001, 4,3432]	0.00397	0.00452
			2 ^a	0.00317	0.00361	1.77400	[0,00003, 4,5225]	0.00563	0.00641
b8a	<i>T. taophora</i>	mil-4b	1 ^a	0.00291	0.00578	0.07063	[0,00001, 0,4006]	0.00021	0.00041
			2 ^a	0.00291	0.00575	1.02800	[0,0001, 2,9321]	0.00300	0.00591
b8b	mil-4b	<i>T. taophora</i>	1 ^a	0.00277	0.00578	0.05905	[0,00001, 0,3264]	0.00016	0.00034
			2 ^a	0.00278	0.00577	0.06204	[0,00001, 0,348]	0.00017	0.00036

Delimitação de linhagens

Os resultados das análises do BPP variando os parâmetros θ e τ_0 foram semelhantes e suportam os oito clados como espécies (Tabela 4), sendo elas: *Thoropa saxatilis* (“sax”), *T.*

megatympanum (“meg”), *T. taophora* (“tao”) e os cinco clados publicados de *T. miliaris* (“mil-1”, “mil-2”, “mil-3”, “mil-4” e “mil-5”) (Sabbag et al. 2018). Das oito combinações diferentes feitas (com rjMCMC 0 ou 1, e com diferentes valores de θ_s e τ_0), apenas uma (combinação “iii” com rj = 1) não encontrou probabilidades posteriores máximas em todas as iterações para as oito linhagens.

O BPP não encontrou, entretanto, convergência nas hipóteses de relacionamento, sendo que as hipóteses mais prováveis de cada combinação resultaram em no máximo 22 % de probabilidade posterior (Tabela 4) e eram, em geral, diferentes em pelo menos algum relacionamento interno. A única unanimidade em relação à topologia diz respeito à posição de *Thoropa saxatilis*, que aparece como irmã de todas as outras em todos os testes.

Tabela 4: Resultados das análises feitas com o BPP para inferir concomitantemente a melhor árvore de espécies e a melhor delimitação de linhagens. “C” indica a identificação da combinação feita com θ_s e τ_0 diferentes. “rj” indica o algoritmo utilizado para a cadeia de Markov com “saltos reversos” (“rjMCMC”). Os valores de θ_s (theta) e τ_0 (thau) estão indicados com α e β . Para cada combinação diferente de rjMCMC, θ_s e τ_0 , o BPP forneceu as melhores árvores e as melhores delimitações de linhagens, com respectivos números de iterações que recuperaram aquela topologia ou delimitação (“N_{it}”), probabilidades posteriores (“PP”), e o resultado (“topologia” para árvores, e “N_{esp}” para número de linhagens inferidas).

C	rj	θ_s (α , β)	τ_0 (α , β)	Resultados					
				Árvores			Delimitações		
				N _{it}	PP	topologia	N _{it}	PP	N _{esp}
i	0	2, 0,1	2, 0,1	11901	0,023802	(sax, ((mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))), (meg, (mil-5, tao))))	500000	1,000000	8
i	1	2, 0,1	2, 0,1	12953	0,025906	(sax, (meg, ((mil-5, tao), (mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))))))	500000	1,000000	8
ii	0	2, 0,001	2, 0,001	101071	0,202142	(sax, (meg, (mil-5, tao, ((mil-4, mil-3), (mil-1, mil-2))))))	500000	1,000000	8
ii	1	2, 0,001	2, 0,001	103891	0,207782	(sax, (meg, (tao, (mil-5, ((mil-4, mil-3), (mil-1, mil-2))))))	500000	1,000000	8
iii	0	2, 0,1	2, 0,001	12222	0,024444	(sax, (meg, ((mil-5, tao), (mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))))))	500000	1,000000	8
iii	1	2, 0,1	2, 0,001	9822	0,019644	(sax, (meg, ((mil-5, tao), (mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))))))	474574	0,949148	8
iv	0	2, 0,001	2, 0,1	111814	0,223628	(sax, (meg, (tao, (mil-5, (mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))))))	500000	1,000000	8
iv	1	2, 0,001	2, 0,1	100139	0,200278	(sax, (meg, (tao, (mil-5, (mil-1, (mil-2, (mil-4, mil-3))))))	500000	1,000000	8

Relógio molecular

Os resultados do StarBEAST2, tanto considerando as espécies como clados de Sabbag et al. (2018) quanto considerando as espécies como as populações inferidas pelo STRUCTURE, mostram que as diversificações ocorreram a partir do final do Mioceno e se intensificaram principalmente no Plioceno, até o Pleistoceno (Figura 6). Com exceção dos valores da raiz, os intervalos de confiança são curtos. Além disso, tanto a topologia da árvore por clados quanto a topologia da árvore por populações recuperaram *Thoropa saxatilis* irmã de todas as outras com alto suporte, *T. megatympanum* irmã de *T. taophora* + *T. miliaris* também com alto suporte e *T. miliaris* parafilética em relação a *T. taophora* com suporte baixo.

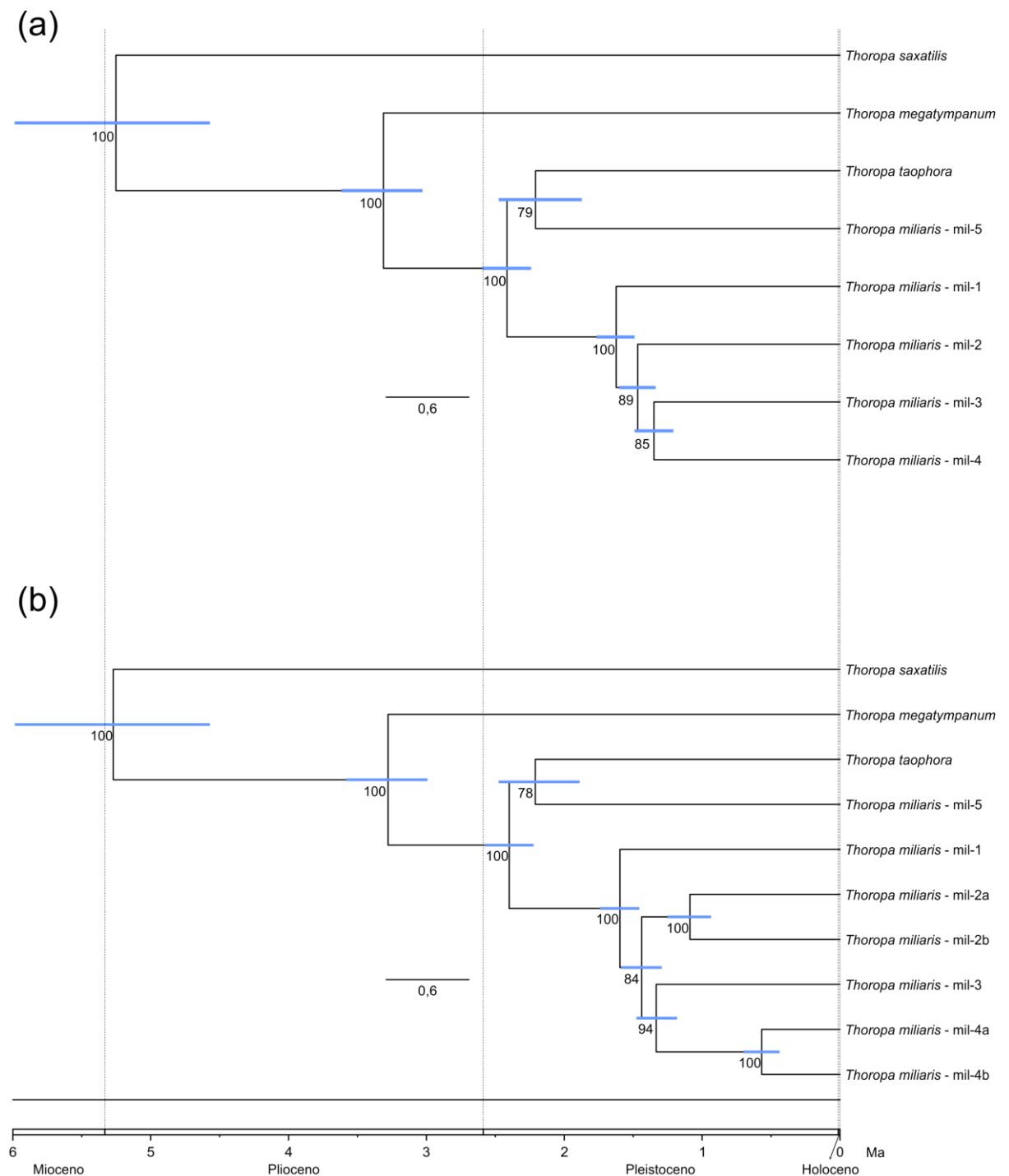


Figura 6: Árvores de espécies datadas, inferidas pelo StarBEAST2, considerando as espécies como: (a) clados (Sabbag et al. 2018) e (b) as dez populações obtidas pelo STRUCTURE. Valores abaixo dos nós indicam probabilidades posteriores. Barras azuis indicam os intervalos de confiança das datações. Na parte inferior, a barra de referência das épocas geológicas está em milhões de anos (Ma).

DISCUSSÃO

A diversificação de *Thoropa* do grupo *miliaris* foi recentemente investigada utilizando uma ampla amostragem populacional e dados multilocus que suportaram uma história ancestral

para o grupo *miliaris* e suas quatro espécies, bem como diversos clados bem suportados de *T. miliaris* e cujos relacionamentos não foram resolvidos (Sabbag et al. 2018). Portanto, nesse trabalho não ficou claro se *T. miliaris* é uma espécie monofilética e se a estrutura contida pode representar linhagens verdadeiras adicionais. No presente trabalho sequenciamos indivíduos destas espécies e suas linhagens para centenas de fragmentos, testando a hipótese alternativa de que as mesmas trocam genes em níveis não negligenciáveis. Através de análises de atribuição, análises filogenéticas e coalescentes, encontramos que a diversidade genética no grupo está sim distribuída em linhagens que parecem estar evoluindo com alguma independência porém, possivelmente com fluxo gênico entre algumas delas. Os relacionamentos entre estas potenciais espécies suportam a monofilia do grupo atualmente chamado de *T. grupo miliaris*. Curiosamente, suas diversificações são muito mais recentes do que acreditávamos, ocorrendo principalmente no Pleistoceno. Nossos resultados trazem consequências importantes para a taxonomia, biogeografia e conservação deste grupo, que são discutidos abaixo.

Estrutura populacional e relações filogenéticas

Os critérios de Evanno e de L(K) foram unânimes na obtenção do K ótimo, indicando que os indivíduos sequenciados são mais bem alocados em dez populações distintas. A estruturação encontrada por nossas análises de atribuição parece indicar ausência de intenso fluxo gênico atual entre a maioria das populações no que diz respeito aos fragmentos genéticos analisados.

Dessas populações, três (*Thoropa saxatilis*, *T. megatympanum* e *T. taophora*) correspondem a espécies válidas previamente recuperadas como monofiléticas com alto suporte (Sabbag et al. 2018), três correspondem a clados previamente descritos e considerados como possíveis linhagens de *T. miliaris* (Sabbag et al. 2018) e quatro correspondem a populações aninhadas nos dois clados restantes de *T. miliaris*. Esse número pode, no entanto, representar ainda uma subestimativa do número de populações, visto que a presença de amostras geograficamente distantes e molecularmente divergentes (e que, portanto, possuem a tendência de não compartilharem alelos com outras amostras) pode afetar as análises de atribuição (Puechmaille 2016). Algumas formas de testar se esse é o caso incluem refazer as análises separadamente por espécie ou então refazer as análises deixando as populações com amostragem numericamente equivalente (Puechmaille 2016). Esse teste poderia confirmar também se as linhagens de *T. taophora* representam de fato uma única população genética que troca genes livremente, já que a amostra de Iguape (SP) é parte de uma linhagem apontada como uma espécie putativa contida em *T. taophora* (Fitzpatrick et al. 2009).

Thoropa taophora está distribuída em todo o litoral do estado de São Paulo até Paraty, no estado do Rio de Janeiro e na Serra de Paranapiacaba, também no estado de São Paulo (Figura 7). Das populações de *T. miliaris*, o clado mil-1 distribui-se na porção sul do estado do Espírito Santo. O clado mil-2 distribui-se por áreas montanhosas no interior dos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. O clado mil-3 é endêmico de Muniz Freire e Mimoso do Sul, municípios do estado do Espírito Santo. O clado mil-4 ocorre nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, incluindo a localidade-tipo de *T. miliaris*. E o clado mil-5 é localizado na porção norte da Serra do Mar no Rio de Janeiro, abrangendo os municípios de Santa Maria Madalena e Macaé. Mil-2a inclui indivíduos de Pindamonhangaba (SP), Petrópolis e Santa Maria Madalena (RJ); e mil-2b inclui indivíduos de Carangola e Santa Bárbara (MG), Domingos Martins e Santa Teresa (ES) e Itamaraju (BA). Mil-4a inclui indivíduos de Carangola (MG) e Santa Maria Madalena (RJ); e mil-4b inclui São José do Barreiro (SP), Paraty e Rio de Janeiro (RJ). Tanto mil-2 quanto mil-4 aparentam possuir uma subestruturação geográfica norte-sul (discutido adiante).

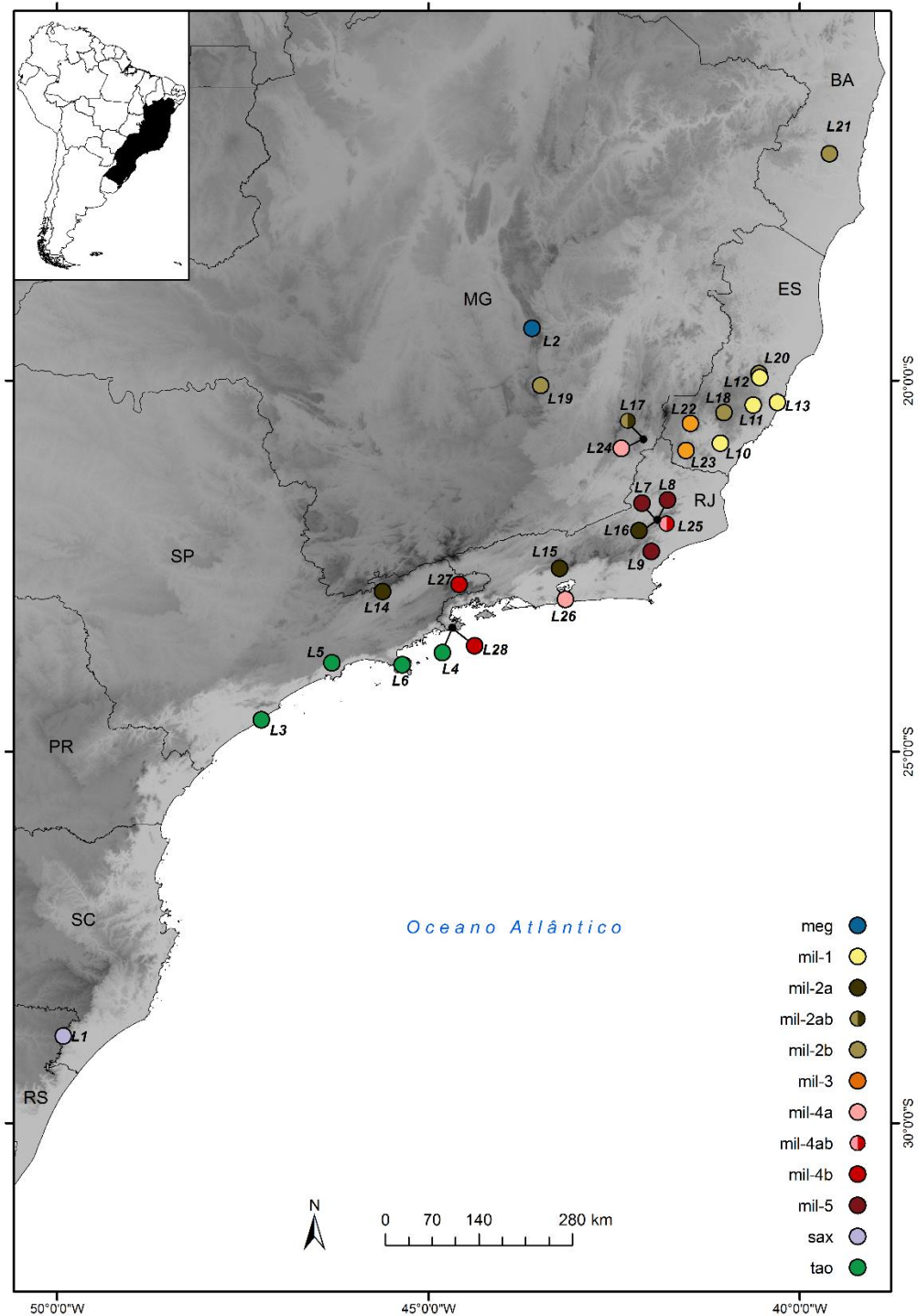


Figura 7: Distribuição das amostras de *Thoropa* do grupo *miliaris* sequenciadas para Filogenômica Ancorada coloridas pelos grupos identificados pelas análises de atribuição (“K10”, identificadas como “meg”, “mil-1”, “mil-2a”, “mil-2b”, “mil-3”, “mil-4a”, “mil-4b”, “mil-5”, “sax”, “tao” seguindo a Figura 1). Altitudes estão representadas em escala de cinza, a cada 50 km, a partir do nível do mar (cinza mais claro). “RS”, “SC”, “PR”, “SP”, “MG”, “RJ”, “ES”, “BA” são as siglas das unidades federativas, respectivamente: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Para melhor visualização, algumas sintopias e simpatrias foram representadas com círculos pretos pequenos com hastes até os círculos de cada amostra. As duas amostras que apresentaram mistura de alelos (“mil-2ab” e “mil-4ab”) estão representadas por duas cores.

Os limites observados entre algumas das populações podem também ser reflexo da representatividade geográfica entre as amostras (Frantz et al. 2009). Esse pode ser o caso, por exemplo, entre as populações de mil-1 e mil-4, sendo possível que um aumento na amostragem com ênfase em um maior número de localidades possa ajudar a testar essa hipótese. No entanto, a existência de limites genéticos claros entre populações ocorrendo em simpatria e sintopia sugere que o isolamento pela distância não é uma força dominante no grupo de populações estudado.

Relações filogenéticas

Thoropa miliaris não é recuperada como monofilética em nenhuma das 414 árvores de genes construídas individualmente. Das 413 árvores em que aparece *T. taophora* (uma árvore do total não possuía nenhum indivíduo dessa espécie), a monofilia de *T. taophora* foi recuperada em 340 topologias com alto suporte. Das 73 árvores em que *T. taophora* não foi recuperada monofilética, 12 foram enraizadas em *T. megatympanum* pela ausência de *T. saxatilis* e cinco foram enraizadas em algum terminal de *T. miliaris* (preferencialmente de ramo mais longo) pela ausência de *T. saxatilis* e *T. megatympanum*. As relações entre as espécies e clados segue o mesmo padrão encontrado nas árvores individuais de loci nucleares anteriormente publicados (Sabbag et al. 2018), que é uma ausência de resolução na maioria deles. Esse resultado parece ser um reflexo dos tempos de divergência entre clados associado à estocasticidade do processo coalescente. O fato de a divergência de topologia entre fragmentos gênicos ocorrer apenas nas espécies recentes sugere seleção incompleta de linhagens. A hipótese alternativa (fluxo gênico intenso causando estas discordâncias) parece pouco plausível porque os limites entre estas espécies foram recuperados com muita clareza na análise de atribuição.

Ao incorporar os loci de AHE e o processo coalescente, obtivemos um dos ganhos mais marcantes do nosso estudo: a resolução das relações entre as espécies de *Thoropa* do grupo *miliaris*, especialmente no que diz respeito a *T. miliaris* e *T. taophora* na árvore de espécies em comparação com a árvore de espécies de Sabbag et al. (2018). Tanto na árvore de genes feita com os loci concatenados quanto nas árvores de espécies recuperamos *T. miliaris* como monofilética com alto suporte e confirmamos *T. taophora* como sua espécie irmã. Outra diferença importante entre esse estudo e o de Sabbag et al. (2018) é a resolução das relações entre alguns clados internos de *T. miliaris* através de nós bem suportados: o clado mil-5 aparece como irmão de todos os outros e o clado mil-1 como irmão de mil-2 + mil-3 + mil-4. Apenas as relações entre mil-2, mil-3 e mil-4 permanecem ligeiramente menos suportadas e apenas nas

árvores de espécies (Figura 3). Na árvore de genes concatenados, mil-2 aparece como irmã de mil-3 + mil-4 e mil-3 aparece irmã de mil-4 (Figura 2).

Paralelamente, os nós com PPL de 92 % nas árvores de espécie são os mesmos nós que agrupam clados que apresentaram subdivisão nas análises de atribuição (Figura 4). Acreditamos que uma explicação para isso seja a presença das amostras que apresentam misturas de alelos (CFBH 27290, Carangola, MG; e CFBH 27366, Santa Maria Madalena, RJ) que são “interpretadas” como seleção incompleta de linhagens pelos programas baseados em coalescência. Uma maneira de testar a influência dessas amostras nos valores de suporte é retirando-as das análises.

Fluxo gênico

As maiores quantidades de migrantes foram encontradas nas bandas b3a (0,08543-0,08648 migrantes por geração) e b3b (0,11228 migrantes por geração), com altos ESS e réplicas com resultados semelhantes. Essas bandas são entre as populações de mil-1 para mil-2b e de mil-2b para mil-1. Isso possui sentido geográfico e evolutivo, já que essas linhagens são irmãs e incluem as duas regiões de simpatria do centro-sul do estado do Espírito Santo amostradas nesse estudo (Domingos Martins e Santa Teresa). Existe pouquíssima evidência de fluxo gênico entre *T. taophora* e mil-4b (bandas b8a e b8b) (entre 0,00034 e 0,00591 migrantes por geração), mesmo essas duas linhagens ocorrendo em simpatria em Paraty (RJ). Isso corrobora a hipótese de parafilia de *T. miliaris* em relação a *T. taophora* nas árvores de genes nucleares ser resultado da estocasticidade do processo coalescente associada com divergência recente entre as espécies.

Apesar de não terem os maiores valores de migrantes por geração como esperado, as bandas formadas entre subpopulações de mil-2 e mil-4 também apresentaram algum fluxo gênico, especialmente nas bandas b1b, b2a e b2b (entre 0,02808 e 0,06173). Nossas análises também mostram fluxo gênico nas bandas que envolvem as três linhagens simpátricas em Santa Maria Madalena, principalmente entre as linhagens mil-4a e mil-5 (b5b) e mil-2a e mil-5 (b6b). Mesmo que algumas réplicas possuam valores baixos de ESS, elas possuem resultados similares, o que pode indicar consistência nas estimativas (Gronau et al. 2011). Para melhorar a convergência das réplicas seria necessário repetirmos as análises alterando os parâmetros *a priori* para conferir se as análises mantêm essa consistência (Gronau et al. 2011).

No entanto, nossos resultados são difíceis de interpretar. Primeiro porque o G-PhoCS parece possuir alto poder de reconhecer a ocorrência de eventos de migração, mas possui baixa capacidade para inferir as taxas desses eventos (Gronau et al. 2011), o que nos faz pensar que

é possível que exista ou tenha existido algum fluxo gênico entre as linhagens. De qualquer forma, não está claro se a abordagem utilizada é suficientemente sensível para diferenciar entre fluxo gênico passado e fluxo ocorrendo no presente. Outro problema é que, embora as taxas de migração sejam positivas, há subjetividade na interpretação quanto ao seu significado biológico, ou seja, na decisão de interpretá-los como valores altos ou baixos. Este é um problema inerente da escolha arbitrária de modelos e poderá ser resolvido com ranqueamento de modelos (Thomé e Carstens 2016), algo que está fora do escopo deste estudo.

Delimitação de espécies e taxonomia

Nossas análises feitas com o BPP mostram uma quase unanimidade em aceitar a existência de oito linhagens (possíveis espécies) dentro de *Thoropa* do grupo *miliaris*, sendo que as subdivisões encontradas para mil-1 e mil-4 não foram consideradas. Embora o BPP não tenha conseguido encontrar uma árvore também unânime, todas as oito análises mostram *T. saxatilis* irmã de todas as outras e *T. megatympanum* irmã de *T. miliaris* + *T. taophora*. Isso corrobora os resultados da árvore de genes concatenados feita com o RAxML e das árvores de espécies feitas com o ASTRAL-III, bem como os resultados anteriormente publicados (Sabbag et al. 2018).

Os testes que efetuamos, variando valores altos e baixos de θ e τ_0 , são comuns em vários estudos (e.g., Fusinatto et al. 2013; Gehara et al. 2017; Delić et al. 2017; Ramos et al. 2019), pela impossibilidade de saber como são as distribuições reais desses parâmetros para cada sistema. No entanto, esses trabalhos não reportam as diferenças ou semelhanças entre os testes, de forma que não sabemos se os mesmos também encontraram resultados consistentes com valores diferentes de θ e τ_0 . Encontramos apenas um estudo feito com lêmures em Madagascar que reportou resultados diferentes testando esses parâmetros em diferentes combinações (Blair et al. 2014). Com isso, interpretamos o fato de quase todos os testes que efetuamos terem chegado a probabilidades posteriores máximas como um indício da existência de pelo menos oito linhagens no nosso sistema, suportadas por 48 loci.

Ainda não testamos que tipo de delimitação de linhagens o BPP faria com as dez populações encontradas pelo STRUCTURE. Esse tipo de teste seria interessante porque o BPP pode juntar linhagens previamente definidas mas não pode separá-las (Yang 2015). Portanto, não é possível ainda dizer se as linhagens mil-2a, mil-2b, mil-4a e mil-4b seriam identificadas pelas análises de atribuição e, portanto, se poderiam ser consideradas espécies putativas.

Sukumaran e Knowles (2017) defendem que existe um problema conceitual na utilização do termo “espécie” quando falamos sobre metodologias coalescentes que auxiliam

na delimitação de unidades evolutivas independentes. Segundo os autores, estes métodos não delimitam “espécies”, mas sim populações divergentes e “discretas”, que podem ou não receber nomes formais específicos. Existem poucos sistemas naturais com agrupamentos rigorosamente comprovados como descontínuos e que, portanto, mereçam o rótulo de espécies reais, já que existe a possibilidade de espécies serem abstrações humanas (Coyne e Orr 2004). Um exemplo de sistema comumente julgado como discreto e próximo do que seriam as espécies “reais” é um sistema de populações divergentes e simpátricas (Coyne e Orr 2004), que é o caso de algumas das populações desse estudo.

Carstens et al. (2013) defendem que a concordância entre métodos pode ser utilizada como critério na aceitação ou rejeição de hipóteses de partilha formal de espécies baseadas em dados genéticos. Já Padial et al. (2010) defendem o uso de mais de uma fonte de evidência (por exemplo, combinar dados genéticos com dados fenotípicos) na tomada de decisões taxonômicas, algo já praticado por muitos taxonomistas antes da formalização da “taxonomia integrativa”. No presente estudo não utilizamos nem métodos adicionais de delimitação de espécies e nem dados de outra natureza que não genéticos. Assim, optamos por assumir uma posição conservadora por hora, interpretando que os métodos outrora desenvolvidos para a delimitação de espécies auxiliaram na delimitação de linhagens que poderão ou não corresponder a espécies formais uma vez que mais dados sejam agregados. Ainda assim, embora não haja consenso sobre o que são espécies e de como delimitá-las, o processo de especiação em si vem sendo definido como o surgimento de barreiras reprodutivas entre populações (Ravinet et al. 2017), algo que parece ter acontecido em pelo menos algumas linhagens de *T. miliaris* que, apesar de ocorrem sintopicamente, parecem não trocar genes. Felizmente, a inclusão de muitas das localidades tipo no presente estudo (de *T. megatympanum*, *T. miliaris* e *T. taophora*) será de grande utilidade caso as linhagens venham a ser descritas, já que auxiliam a definir quais delas manterão os nomes das espécies atualmente válidas.

Relógio molecular

As estimativas de tempo das análises feitas com StarBEAST mostram datas até seis vezes menores do que as datas obtidas por Sabbag et al. (2018). Com a resolução de parte da topologia nessa análise em relação à anterior, a data da diversificação entre *Thoropa miliaris* e *T. taophora* aparece como mais antiga do que a diversificação dentro da linhagem mil-4. Outro ganho do nosso estudo é em relação ao intervalo de confiança das datações: em Sabbag et al. (2018) as datações foram feitas com três loci e os intervalos de confiança variaram entre aproximadamente dois e 15 milhões de anos, enquanto no presente estudo, com 49 loci,

obtivemos uma redução de cerca de dez vezes nesses intervalos, que passaram a variar entre 0,25 e 1,5 milhão de anos, aproximadamente. O aumento de resolução temporal com a adição de um número maior de fragmentos é esperado por conta da estocasticidade do processo coalescente e ilustra bem os benefícios pelo uso de um maior número de loci, especialmente em grupos de espécies mais recentes.

Biogeografia e conservação

Em termos espaciais, a estrutura genética encontrada apresenta padrão filogeográfico no sentido que as amostras agrupadas numa mesma população não estão muito distantes umas das outras (Figura 2), o que sugere a retenção de sinal filogenético em suas distribuições. Em termos temporais, grande parte da diversificação no grupo parece ter ocorrido no Pleistoceno. Estudos com outros organismos deste bioma apontaram que a diversificação nesta época pode ter sido influenciada por flutuações climáticas e/ou barreiras geográficas decorrentes de atividade neotectônica (Turchetto-Zolet et al. 2013). Por exemplo, a estrutura interna de mil-2 e mil-4 parece seguir uma orientação norte-sul: mil-2a distribui-se mais ao norte e mil-2b distribui-se mais ao sul, assim como mil-4b que se distribui mais ao norte e mil-4a distribui-se ao sul. Estruturação Norte-Sul é muitas vezes interpretada como decorrente de diversificação por isolamento em refúgios, embora a estrutura populacional encontrada não pareça coincidir com os refúgios apontados em estudos anteriores (e.g., Carnaval e Moritz 2008; Carnaval et al. 2009) (Figura 2), mas não descartamos a possibilidade de processos de diversificação que incluam refúgios desconhecidos.

Os indivíduos que mostraram aparente mistura de alelos são de regiões de sintopias e simpatrias de clados já detectadas em Sabbag et al. (2018). É possível hipotetizar que as sintopias e simpatrias de linhagens sejam resultado de contatos secundários posteriores a eventos de diversificação por vicariância (Sabbag et al. 2018). Se isso for verdadeiro, as barreiras neotectônicas listadas por Saadi et al. (2003) e apontadas por Thomé et al. (2014) poderiam ter sido transpostas após a diversificação. Outra hipótese (não excludente) é que a alta diversidade genética nessas áreas reduzidas indique a existência de refúgios florestais do passado (Carnaval et al. 2009).

Independentemente do processo de especiação sofrido por *Thoropa* do grupo *miliaris*, esse cenário de alta diversidade genética em espécies com aspectos ecológicos tão similares merece atenção para conservação. Embora exista uma tendência para a inclusão da diversidade genética em programas de conservação (Owen et al. 2019; Mazel et al. 2019; Rapacciuolo et al. 2019), em casos como esses no Brasil a conservação das linhagens muitas vezes só é possível

caso nomes formais sejam atribuídos a elas. Conforme mencionado acima, análises de outros sistemas de informação poderão resultar em novas espécies formais que poderão ter seus *status* de conservação apreciados individualmente. Isso é de extrema importância, uma vez que já existem duas espécies do gênero que se encontram desaparecidas e possivelmente extintas, o que torna essa tarefa ainda mais urgente.

CONCLUSÕES

Com relação às nossas perguntas iniciais, podemos afirmar que *Thoropa miliaris* não é parafilética em relação a *T. taophora* como encontrado previamente (Sabbag et al. 2018) e que ambas foram recuperadas como monofiléticas com alto suporte. *Thoropa saxatilis* é irmã de todas as outras, *T. megatympanum* é irmã de *T. taophora* + *T. miliaris* e *T. taophora* é irmã de *T. miliaris*. Também encontramos que existem de cinco a sete linhagens evoluindo de maneira independente no que hoje consideramos ser *Thoropa miliaris*, de forma parcialmente coincidente com os clados obtidos por Sabbag et al. (2018). Não encontramos evidência de linhagens evoluindo independentemente dentro de *T. taophora*. Todas essas divergências do complexo de *T. taophora* + *T. miliaris* parecem ter ocorrido durante o Pleistoceno, muito mais tarde do que havia sido inferido previamente (Sabbag et al. 2018).

Considerando nossos resultados obtidos, é possível que *Thoropa taophora* seja uma espécie única e que estejamos lidando com populações que sejam entidades únicas (“linhagens”) dentro de *T. miliaris*. Todas elas podem apresentar algum fluxo gênico atual ou no passado. Essas linhagens que encontramos como entidades independentes podem ser consideradas como espécies candidatas (*sensu* Padial et al. 2010) ou, no mínimo, como unidades evolutivamente significativas (*Evolutionary Significant Units*, Ryder 1986). Precisamos de estudos com características de outras naturezas para delimitar melhor as espécies e começar a entender os processos de especiação que levaram esse grupo a essa atual diversidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barido-Sottani, J., V. Bošková, L. Du Plessis, ... T. Stadler. 2018. Taming the BEAST - a community teaching material resource for BEAST 2. *Syst. Biol.* 67:170–174.
- Blair, C., K.L. Heckman, A.L. Russell, e A.D. Yoder. 2014. Multilocus coalescent analyses reveal the demographic history and speciation patterns of mouse lemur sister species.

- BMC Evol. Biol. 14:1–12. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-57>
- Bouckaert, R., J. Heled, D. Kühnert, T. Vaughan, C.H. Wu, D. Xie, M. a. Suchard, A. Rambaut, e A.J. Drummond. 2014. BEAST 2: a software platform for bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput. Biol. 10:1–6. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Brasileiro, C.A., M. Martins, e I. Sazima. 2010. Feeding ecology of *Thoropa taophora* (Anura: Cycloramphidae) on a rocky seashore in Southeastern Brazil. South Am. J. Herpetol. 5:181–188.
- Carnaval, A.C., M.J. Hickerson, C.F.B. Haddad, M.T. Rodrigues, e C. Moritz. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. Science (80-.). 323:785–789.
- Carnaval, A.C., e C. Moritz. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. J. Biogeogr. 35:1187–1201. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01870.x>
- Carstens, B.C., T.A. Pelletier, N.M. Reid, e J.D. Satler. 2013. How to fail at species delimitation. Mol. Ecol. 22:4369–4383. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.12413>
- Cope, E.D. 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia s. Salientia. Nat. Hist. Rev. New series:97–120.
- Coyne, J.A., e H.A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. 546 pp.
- Delić, T., V. Švara, C.O. Coleman, P. Trontelj, e C. Fišer. 2017. The giant cryptic amphipod species of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea, Amphipoda). Zool. Scr. 46:740–752. DOI: <https://doi.org/10.1111/zsc.12252>
- Drummond, A.J., G.K. Nicholls, A.G. Rodrigo, e W. Solomon. 2002. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. Genetics 161:1307–1320.
- Dubois, A. 2017. Diagnoses in zoological taxonomy and nomenclature. Bionomina 12:63–85. DOI: <https://doi.org/10.11646/bionomina.12.1.8>
- Earl, D.A., e B.M. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4:359–361.
- Evanno, G., S. Regnaut, e J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14:2611–2620.
- Fitzpatrick, S.W., C.A. Brasileiro, C.F.B. Haddad, e K.R. Zamudio. 2009. Geographical

- variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* 18:2877–2896.
- Flouri, T., X. Jiao, B. Rannala, e Z. Yang. 2018. Species tree inference with BPP using genomic sequences and the multispecies coalescent. *Mol. Biol. Evol.* 35:2585–2593.
- Frantz, A.C., S. Cellina, A. Krier, L. Schley, e T. Burke. 2009. Using spatial bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? *J. Appl. Ecol.* 46:493–505.
- Fusinatto, L.A., J. Alexandrino, C.F.B. Haddad, T.O. Brunes, C.F.D. Rocha, e F. Sequeira. 2013. Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic forest. *PLoS One* 8:e79504. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079504>
- Gehara, M., A. Barth, E.F. de Oliveira, M.A. Costa, C.F.B. Haddad, e M. Vences. 2017. Model-based analyses reveal insular population diversification and cryptic frog species in the *Ischnocnema parva* complex in the Atlantic forest of Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* 112:68–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.04.007>
- Gronau, I., M.J. Hubisz, B. Gulko, C.G. Danko, e A. Siepel. 2011. Bayesian inference of ancient human demography from individual genome sequences. *Nat. Genet.* 43:1031–1035.
- Han, M. V., e C.M. Zmasek. 2009. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics* 10:1–6. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-356>
- ICMBio. 2018. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. V-Anfíbios. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 131 pp.
- IPEMA. 2007. Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. (M. Passamani e S.L. Mendes, orgs.). Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória, ES. 140 pp.
- Jakobsson, M., e N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.
- Leaché, A.D., e M.K. Fujita. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 277:3071–3077.
- Lemmon, A.R., S.A. Emme, e E.M. Lemmon. 2012. Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Syst. Biol.* 61:727–744.
- Mazel, F., M.W. Pennell, M.W. Cadotte, ... W.D. Pearse. 2019. Reply to: “Global

- conservation of phylogenetic diversity captures more than just functional diversity". *Nat. Commun.* 10:858. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08603-5>
- Nosil, P. 2008. Speciation with gene flow could be common. *Mol. Ecol.* 17:2103–2106.
- Ogilvie, H.A., R.R. Bouckaert, e A.J. Drummond. 2017. StarBEAST2 brings faster species tree inference and accurate estimates of substitution rates. *Mol. Biol. Evol.* 34:2101–2114.
- Owen, N.R., R. Gumbs, C.L. Gray, e D.P. Faith. 2019. Global conservation of phylogenetic diversity captures more than just functional diversity. *Nat. Commun.* 10:859.
- Padial, J.M., A. Miralles, I.D. la Riva, e M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* 7:1–14.
- Page, A.J., B. Taylor, A.J. Delaney, J. Soares, T. Seemann, J.A. Keane, e S.R. Harris. 2016. SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb. Genomics* 2:1–5.
- Palumbi, S.R., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice, e G. Grabowski. 2002. The simple fool's guide to PCR - version 2.0. 1–45 pp.
- Poulton, E.B. 1903. What is a species? *Proc. Entomol. Soc. London* 77–116.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, e P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Puechmaille, S.J. 2016. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Mol. Ecol. Resour.* 16:608–627.
- Queiroz, K. de. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. P. 6600–6607 in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Queiroz, K. de. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56:879–886. DOI: <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Queiroz, K. de, e J. Gauthier. 1992. Phylogenetic taxonomy. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23:449–480. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.002313>
- Rambaut, A., A.J. Drummond, D. Xie, G. Baele, e M.A. Suchard. 2018. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67:901–904.
- Ramos, E.K.S., R.F. de Magalhães, N.C.S. Marques, D. Baêta, P.C. de A. Garcia, e F.R. Santos. 2019. Cryptic diversity in Brazilian endemic monkey frogs (Hylidae, Phyllomedusinae, *Pithecopus*) revealed by multispecies coalescent and integrative approaches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 132:105–116. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.11.022>

- Rannala, B., e Z. Yang. 2013. Improved reversible jump algorithms for bayesian species delimitation. *Genetics* 194:245–253. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149039>
- Rapacciuolo, G., C.H. Graham, J. Marin, ... T.M. Brooks. 2019. Species diversity as a surrogate for conservation of phylogenetic and functional diversity in terrestrial vertebrates across the Americas. *Nat. Ecol. Evol.* 3:53–61.
- Ravinet, M., R. Faria, R.K. Butlin, J. Galindo, N. Bierne, M. Rafajlović, M.A.F. Noor, B. Mehlig, e A.M. Westram. 2017. Interpreting the genomic landscape of speciation: a road map for finding barriers to gene flow. *J. Evol. Biol.* 30:1450–1477. DOI: <https://doi.org/10.1111/jeb.13047>
- Ribeiro, M.C., J.P. Metzger, A.C. Martensen, F.J. Ponzoni, e M.M. Hirota. 2009. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* 142:1141–1153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Rivas, L.R. 1964. A reinterpretation of the concepts “sympatric” and “allopatric” with proposal of the additional terms “syntopic” and “allotopic”. *Syst. Zool.* 13:42–43.
- Rossa-Feres, D. de C., M.V. Garey, U. Caramaschi, ... C.F.B. Haddad. 2017. Anfíbios da Mata Atlântica: lista de espécies, histórico dos estudos, biologia e conservação. P. 237–314 in *Reviões em Zoologia - Mata Atlântica* (E.L. de A. Monteiro-Filho e C.E. Conte, eds.). Editora UFPR, Curitiba.
- Ryder, O.A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Tree* 1:9–10.
- Saadi, A., M.N. Machette, K.M. Haller, R.L. Dart, L.-A. Bradley, e A.M.P.D. de Souza. 2003. Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. Denver, Colorado, USA. 63 pp.
- Sabaj, M.H. 2016. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an online reference. Version 6.5. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol.* Washington, DC 5:802–832.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 122:142–156.
- Simpson, G.G. 1951. The species concept. *Evolution* (N. Y). 5:285–298.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313.

- Stamatakis, A., P. Hoover, e J. Rougemont. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 57:758–771. DOI: <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
- Sukumaran, J., e L.L. Knowles. 2017. Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114:1607–1612. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1607921114>
- Thomé, M.T.C., e B.C. Carstens. 2016. Phylogeographic model selection leads to insight into the evolutionary history of four-eyed frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:8010–8017.
- Thomé, M.T.C., K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, e J. Alexandrino. 2014. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic forest. *Mol. Ecol.* 23:6152–6164. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.12986>
- Turchetto-Zolet, A.C., F. Pinheiro, F. Salgueiro, e C. Palma-Silva. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* 22:1193–213. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.12164>
- Yang, Z. 2015. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Curr. Zool.* 61:854–865.
- Yang, Z., e T. Flouri. 2018. BP&P. Versions 3.4 & 4.0. 0.
- Yang, Z., e B. Rannala. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:9264–9269.
- Yang, Z., e B. Rannala. 2014. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 31:3125–3135.
- Yang, Z., e B. Rannala. 2017. Bayesian species identification under the multispecies coalescent provides significant improvements to DNA barcoding analyses. *Mol. Ecol.* 26:3028–3036.
- Zhang, C., M. Rabiee, E. Sayyari, e S. Mirarab. 2018. ASTRAL-III: polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC Bioinformatics* 19:15–30.

CAPÍTULO 2

Variação morfológica das espécies de *Thoropa* Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae)

ABSTRACT

The genus *Thoropa* has six species distributed in the Atlantic Forest and *campo rupestre*. Although small, this genus is marked by taxonomic confusions and identification problems. In this study, we compared *Thoropa* species to verify if the original species diagnoses can still help to describe their species diversity after many years of new specimens collected. To do that, we used discrete and continuous characters from the external morphology of tadpoles, males, and females, also questioning the validity of the current criteria used to define an adult male, which is used for the identification of some species in the genus. Additionally, we associate individuals to recently delimited lineages in the *Thoropa miliaris* species group to verify if morphological variation follows genetic diversity. There are few morphological and morphometric differences among valid species of *Thoropa*, most of which are related to the separation of the *petropolitana* and *miliaris* groups. We found no morphological differences among the known molecular lineages in the *T. miliaris* species group. We suggest that the genus *Thoropa* must have its diagnosis and species limits revisited so that the taxonomy reflects evolutionary history.

Keywords: adults, Amphibia, diagnostic characters, tadpoles, Atlantic Forest, morphology.

RESUMO

O gênero *Thoropa* contém seis espécies na Mata Atlântica e campo rupestre. Embora seja um gênero pequeno, é marcado por grandes confusões taxonômicas e problemas de identificação. Nesse estudo, comparamos as espécies de *Thoropa* para verificar se as diagnoses das espécies ainda ajudam a descrever a atual diversidade, após vários anos de novas coletas. Para isso, utilizamos caracteres de morfologia externa e características merísticas de machos e fêmeas, questionando também os atuais critérios de definição de machos adultos para algumas espécies

do gênero usados na diagnose de algumas espécies. Adicionalmente, tentamos associar os indivíduos a linhagens já publicadas de *Thoropa* do grupo *miliaris* recentemente delimitadas para verificar se existem diferenças morfológicas que acompanham a diversidade genética conhecida. Existem poucas diferenças morfológicas e morfométricas entre as espécies do gênero. A maioria das diferenças coincide com a separação do grupo *petropolitana* e do grupo *miliaris*. Entre as linhagens moleculares conhecidas praticamente não existe diferença morfológica. Entretanto, sugerimos que o gênero precisa ter as diagnoses específicas revisadas e os limites entre espécies ainda necessitam ser melhor investigados.

Palavras-chave: adultos, anfíbios, caracteres diagnósticos, girinos, Mata Atlântica, morfologia.

INTRODUÇÃO

Thoropa Cope, 1865 é um gênero de rãs que ocorre na Mata Atlântica e no campo rupestre, atualmente com seis espécies válidas: *T. miliaris* (Spix, 1824), *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923), *T. lutzi* Cochran, 1938, *T. megatympanum* Caramaschi e Sazima, 1984 e *T. saxatilis* Cocroft e Heyer, 1988. As espécies são morfológicamente separadas em dois grupos: grupo *miliaris* (*T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympanum* e *T. saxatilis*) e grupo *petropolitana* (*T. petropolitana* e *T. lutzi*) (Sabbag et al. 2018). Essas espécies de anuros são conhecidas por habitarem rochas úmidas com um filme de água onde vivem os adultos, subadultos, jovens recém-metamorfoseados, girinos e desovas (Feio 2002; Sabbag et al. 2018).

Caracteres sexuais secundários

As espécies de *Thoropa* apresentam caracteres sexualmente dimórficos, ou seja, caracteres sexuais secundários que representam quaisquer diferenças entre os sexos que não estejam diretamente associadas às gônadas e dutos gonadais (Norris e Lopez 2011). Esses caracteres sexualmente dimórficos em *Thoropa* dizem respeito ao tamanho do corpo, tamanho do braço e almofadas nupciais nas mãos.

No grupo *miliaris* alguns autores alegam que as fêmeas adultas são pelo menos um pouco maiores que os machos adultos (*Thoropa miliaris*: Bokermann 1965; Cocroft e Heyer 1988). Outros afirmam que as fêmeas adultas são um pouco menores que os machos adultos (*T. megatympanum*: Caramaschi e Sazima 1984). Neste grupo os machos adultos também possuem braços e antebraços mais robustos (ou seja, com a musculatura hipertrofiada) do que as fêmeas

adultas (Bokermann 1965; Heyer et al. 1990; Feio 2002). No grupo *petropolitana* os registros de dimorfismo sexual relacionam-se apenas ao tamanho do corpo, sendo as fêmeas adultas um pouco maiores que os machos adultos (Bokermann 1965).

Além disso, os machos adultos de todas as espécies do gênero possuem almofadas nupciais com projeções epidérmicas papilares (PEPs, Luna et al. 2018). Na literatura de *Thoropa* essas estruturas são chamadas “espinhos” ou “espículos” (Cochran 1954; Lutz 1954; Bokermann 1965; Caramaschi e Sazima 1984; Cocroft e Heyer 1988; Heyer et al. 1990; Giaretta e Facure 2004; Feio et al. 2006; Rebouças et al. 2017), mas aqui usaremos a terminologia padronizada por Luna et al. (2018) e chamaremos essas estruturas de PEP. Elas são formadas por evaginações da epiderme e da derme, que em *Thoropa* podem ser de dois tipos morfológicos diferentes: “PEPs em formato de espinho” (*spine-shaped papillae*) no grupo *miliaris* e em *T. petropolitana*; e “PEPs em formato de cone” (*cone-shaped papillae*) em *T. lutzi* (Luna et al. 2018; C. Luna, *comunicação pessoal*).

As PEPs no grupo *miliaris* são encontradas no dorso do dedo II (numeração dos dedos das mãos segundo Fabrezi e Alberch 1996), nas margens mediais dos dedos III e IV e na face distal do tubérculo metacarpal interno (chamado de “tenar” por alguns autores). No dorso do dedo II as PEPs aparecem na articulação entre o metacarpo e a falange proximal (ou “articulação metacarpal-falangeal”, Rebouças et al. 2017) e em outras partes do dedo. Ainda no grupo *miliaris*, indivíduos com PEPs no dedo IV sempre têm PEPs no dedo III, no dedo II e no tubérculo metacarpal interno; indivíduos com PEPs no dedo III sempre têm PEPs no dedo II e no tubérculo metacarpal interno; e indivíduos com PEPs no dedo II não necessariamente possuem PEPs no tubérculo metacarpal interno ou nos dedos III e IV (Rebouças et al. 2017). Isso leva à hipótese de que existe uma sequência ontogenética no surgimento dessas PEPs, sendo que o primeiro local a surgirem é no dorso da articulação metacarpal-falangeal do dedo II, seguido de outras partes do dedo II, seguido do dedo III e IV (Rebouças et al. 2017). As populações de *Thoropa miliaris* do Rio de Janeiro (RJ) apresentam indivíduos de um ano com alguma PEP e indivíduos de um ano já podem ter PEPs no dedo IV (Rebouças et al. 2017).

Para Rebouças et al. (2017), o aparecimento das PEPs nos dedos III e IV parece ser simultâneo, já que nenhum indivíduo foi encontrado com PEPs em um desses dedos e sem PEPs no outro. As PEPs parecem também não se renovarem a cada ano ou estação chuvosa, de forma que nascem PEPs novas, mas as antigas não desaparecem (Cochran 1955 “1954”; Bokermann 1965). Na literatura existe registro de que alguns exemplares apresentam algo que se assemelha a uma troca de pele, em que a pele dos dedos parece estar se desprendendo juntamente com a “capa” das PEPs e por baixo dessa capa a PEP se mantém com o mesmo formato, porém com

uma superfície sem queratina (Bokermann 1965, que usa o termo "quitina"). Acreditamos que essa “capa” descrita seja o que se conhece como “estrato córneo” da epiderme (também presente em toda a pele das mãos), estrutura que nas PEPs é queratinizada e com uma cor escura ou preta (Luna et al. 2018). Outros exemplares de *Thoropa* apresentam a cor da PEP mais pálida do que a PEP escura (Cochran 1955 "1954"). Cochran (1955 "1954") acredita que essa cor mais pálida não esteja relacionada à estação reprodutiva, pois exemplares coletados em maio e em fevereiro do mesmo ano, em locais diferentes, apresentavam essa característica.

As PEPs em *Thoropa petropolitana* aparecem apenas na articulação metacarpal-falangeal (Bokermann 1965; Feio 2002). E as PEPs em *T. lutzi* localizam-se também na articulação metacarpal-falangeal (porém estendendo-se pela face dorsal do metacarpo) e na região medial do tubérculo metacarpal interno (Bokermann 1965).

Diagnoses específicas e hipótese filogenética

O grupo *petropolitana* possui as duas menores espécies do gênero, e que além do menor tamanho, compartilham também desenhos dorsais semelhantes e girinos com características diferenciadas, os quais as separam das espécies do grupo *miliaris* (Wandolleck 1907; Cochran 1938; Sabbag et al. 2018). *Thoropa petropolitana* é diferenciada de *T. lutzi* pelo tamanho ainda menor, pelo tipo e distribuição das PEPs das almofadas nupciais e pelo canto (Bokermann 1965; Nunes-de-Almeida et al. 2016a).

Na revalidação de *Thoropa taophora*, Feio et al. (2006) consideram duas características diagnósticas principais para a espécie em relação a *T. miliaris*: tamanho do corpo maior e maior quantidade de PEPs no dedo IV. Ambas as características são utilizadas para machos adultos, sendo esses machos adultos definidos como machos que possuem PEPs no terceiro dedo (aqui chamado de dedo IV). Outra característica usada para separar *T. miliaris* de *T. taophora* é a variação do desenho dorsal, já que *T. taophora* possui desenhos mais marcados e menos variáveis do que *T. miliaris*, embora com alguma sobreposição (Feio et al. 2006).

Thoropa megatympanum foi separada das demais (*T. miliaris*, *T. petropolitana* e *T. lutzi*, as espécies válidas até a descrição de *T. megatympanum*) pelo maior diâmetro do tímpano, pelo menor tamanho das pernas e pelo padrão de desenho dorsal (Caramaschi e Sazima 1984). *Thoropa miliaris* também possui mais PEPs no dedo IV do que *T. megatympanum* (Feio 2002). Quatro anos depois da descrição de *T. megatympanum*, *T. saxatilis* foi descrita e uma das características diagnósticas da espécie é também o tímpano maior do que o tímpano das demais espécies, mas especificamente em relação ao diâmetro do olho (Cocroft e Heyer 1988). Adicionalmente, algumas descrições afirmam que a diferença entre as espécies é “cabeça mais

larga do que longa” ou “cabeça mais longa do que larga” (Caramaschi e Sazima 1984; Feio e Caramaschi 2002).

Uma hipótese filogenética molecular recentemente publicada com as espécies do grupo *miliaris* mostrou uma quantidade maior de linhagens putativas do que a quantidade de espécies reconhecidas para o grupo, especialmente dentro de *Thoropa miliaris* (Sabbag et al. 2018). Essa hipótese mostrou também a parafilia de *T. miliaris* em relação a *T. taophora*, baixas resoluções nas relações entre as linhagens internas de *T. miliaris* e o posicionamento de um indivíduo de *T. lutzi* fora do que seria o gênero *Thoropa* (Sabbag et al. 2018). Subsequentemente (capítulo 1), a adição de numerosos loci resolveu a parafilia de *T. miliaris* e estabeleceu relações mais precisas, revelando ainda que muitas das linhagens de *T. miliaris* levantadas por Sabbag et al. (2018) parecem evoluir de forma independente e poderão ser reconhecidas como espécies válidas no futuro (capítulo 1).

Sendo assim, no presente estudo nosso objetivo geral é avaliar a validade das diagnoses e caracterizações morfológicas de *Thoropa*. Especificamente, investigamos: (i) se as diagnoses das espécies ainda são válidas, considerando o aumento das amostragens nos últimos 20 anos e quais são as sinapomorfias putativas de cada espécie; (ii) se a morfologia externa de adultos e larvas reflete o mesmo padrão encontrado para marcadores moleculares em (Sabbag et al. 2018) e no capítulo 1 desta tese, e se existem sinapomorfias putativas ou características diagnósticas para as linhagens levantadas até então.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes

Examinamos material das seguintes coleções zoológicas: Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil; Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia da USP, São Paulo, SP, Brasil; Coleção do Prof. Dr. Miguel Trefault Rodrigues, USP, São Paulo, SP, Brasil; Coleção Herpetológica do Museu Nacional (incluindo a coleção Adolfo Lutz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Coleção de Anfíbios do Laboratório de Herpetologia da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Ciências Naturais da PUC-MG, Belo Horizonte, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia da UESC, Ilhéus, BA, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia “Adão José Cardoso” da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia João Moojen da UFV, Viçosa, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios da UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil; Coleção de Anfíbios Eugenio Izecksohn da UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil; Coleção Herpetológica do

Departamento de Zoologia da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Coleção de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brasil; Coleção Zoológica do Museu de Biologia Professor Mello Leitão, Santa Teresa, ES, Brasil; Coleção Científica de Anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil; Division of Amphibians and Reptiles, National Museum of Natural History, Washington, DC, USA; Herpetology Collection, Museum of Zoology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA; Texas Natural History Collections, University of Texas, Austin, TX, USA; Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, CA, USA; Herpetology Collection, Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA, USA; Amphibian and Reptile Collection, Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA; Section of Herpetology, Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, PA, USA; Herpetology Collection, California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA; Department of Herpetology, American Museum of Natural History, New York, NY, USA; Coleção do Prof. Dr. Ariovaldo A. Giaretta, UFU, Uberlândia, MG, Brasil. Como não pudemos visitar ou emprestar exemplares de coleções europeias, obtivemos dos curadores e gerentes dessas coleções fotos de *Thoropa* e seus sinônimos, incluindo as coleções: Collection de Vertébrés, Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, Belgique; Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France; Herpetologische Sammlung, Naturhistorisches Museum Wien, Wien, Österreich; Zoologisk Museum, Københavns Universitet, Københavns, Danmark. Todas as abreviações institucionais seguem Sabaj (2016). Analisamos os espécimes através de visitas ou empréstimos e, quando necessário, através de fotografias e informações cedidas por algumas coleções, estando listados no Apêndice 6.

Adicionalmente, fizemos duas tentativas de encontrar *T. petropolitana* na região da Serra dos Órgãos (RJ) e uma tentativa de encontrar *T. lutzi* no município do Rio de Janeiro. Fizemos também algumas coletas para obter larvas e tecidos das regiões de sintopia e simpatrias, bem como de regiões de falhas amostrais, sendo elas: Estação Ecológica Juréia-Itatins, Iguape, SP; Santa Teresa, ES; Parque Nacional da Serra da Bocaina; Santo Antônio do Pinhal, SP; Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Petrópolis e Teresópolis, RJ; litoral norte do estado de SP; Paraty, RJ; região sul do estado da BA. Também obtivemos doações de tecido de algumas coleções, a partir de exemplares que foram analisados morfológicamente, de exemplares de regiões de sintopias e simpatrias de linhagens ou de exemplares de locais ainda não amostrados (Apêndice 6), com o intuito de alocar os indivíduos nas linhagens obtidas por Sabbag et al. (2018).

Para escolher os indivíduos a serem analisados morfolologicamente, priorizamos indivíduos que possuísem DNA sequenciado por Sabbag (2013), ou que pelo menos possuísem tecido disponível em coleções zoológicas. Populações do grupo *miliaris* sem nenhuma amostra de tecido coletada e as espécies sem sequências ou tecidos disponíveis (*Thoropa petropolitana* e *T. lutzi*), foram analisadas morfolologicamente mesmo que não pudessem ser atribuídas a nenhuma linhagem. Analisamos um total de 2406 exemplares, sendo 1209 de *Thoropa miliaris*, 328 de *T. petropolitana*, 251 de *T. taophora*, 68 de *T. lutzi*, 476 de *T. megatympanum* e 74 de *T. saxatilis*, todos espalhados pelas distribuições geográficas totais das espécies (Figura 1). Todos os exemplares foram analisados quanto à identificação das espécies, sexo (fêmeas ou machos adultos, ou fêmeas ou machos jovens) e estágio de desenvolvimento (larvas, metamorfos ou juvenis). Consideramos como fêmeas adultas apenas os indivíduos que apresentassem ovócitos na cavidade abdominal, visto por transparência da pele ou vistos diretamente se o abdômen estivesse aberto. Utilizamos esse critério porque desconfiávamos de uma variação de tamanho suficiente para existirem machos sem PEPs que tivessem tamanho de fêmeas e aparentassem ser fêmeas. Consideramos como machos os indivíduos que possuísem PEPs na mão ou que possuísem testículos vistos em abdômen já aberto, mas para definir se esses machos seriam considerados como jovens ou adultos, seguimos um caminho metodológico específico (explicado abaixo).

Medimos o comprimento rostro-cloacal (CRC, explicado na seção “*Morfologia externa de adultos e larvas*”) de todo os indivíduos, com exceção das larvas e dos exemplares das coleções que não visitamos e que foram analisados por fotografias. Porém, como eram muitos indivíduos, selecionamos subconjuntos de indivíduos para análises específicas de características diagnósticas, priorizando abranger todas as populações possíveis, bem como indivíduos em bom estado de conservação e indivíduos passíveis de ter o fragmento de 16S-ARBR sequenciado. Então, para um subconjunto do total de indivíduos, medimos a largura e comprimento da cabeça, diâmetro do tímpano, diâmetro do olho, diâmetro do antebraço e diâmetro do braço (explicado na seção “*Morfologia externa de adultos e larvas*”). E para um subconjunto ainda menor de indivíduos obtivemos 15 medidas (explicado na seção “*Morfologia externa de adultos e larvas*”).

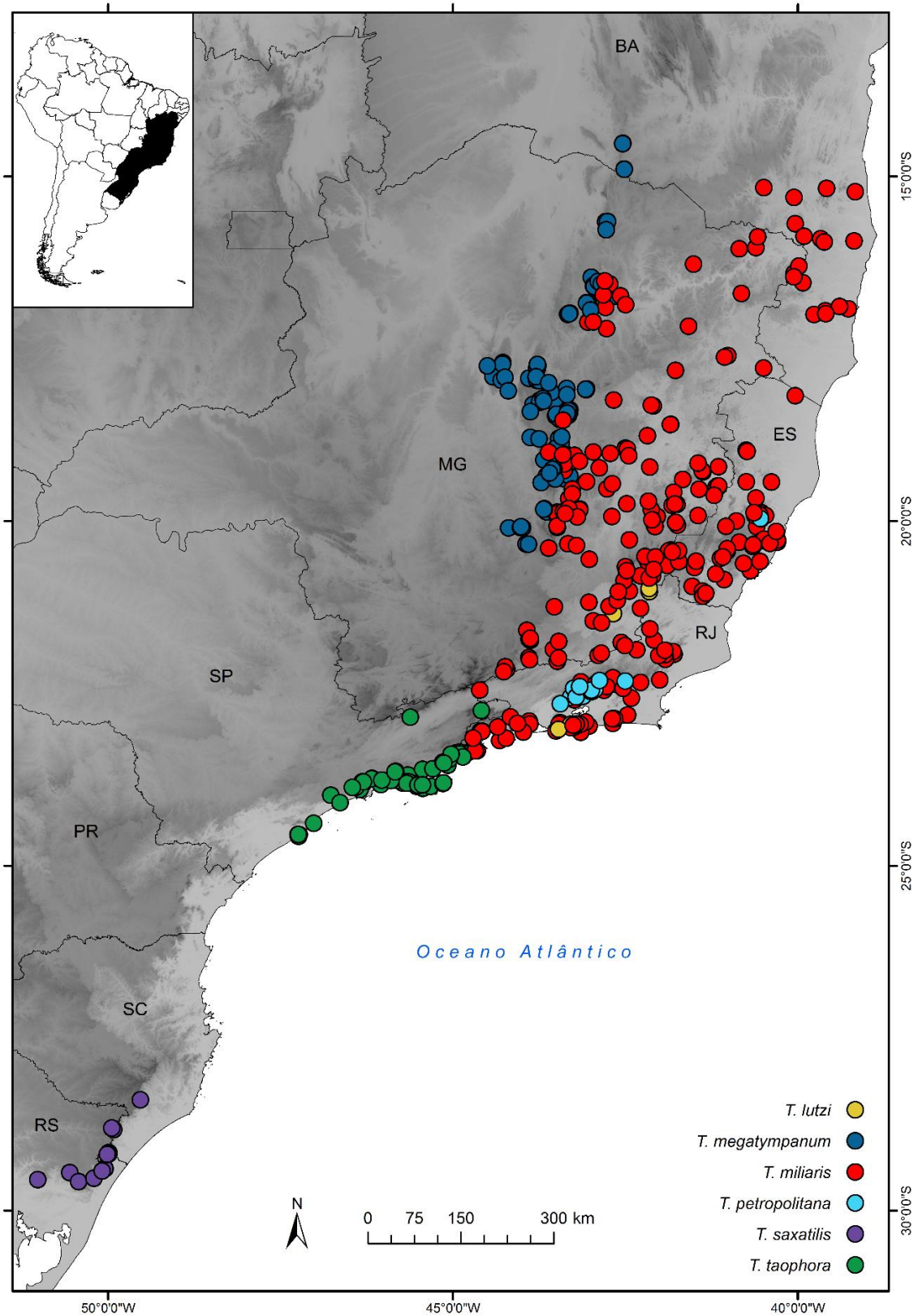


Figura 1: Distribuição dos exemplares selecionados para análise de características morfológicas e morfométricas das espécies de *Thoropa*. “RS”, “SC”, “PR”, “SP”, “MG”, “RJ”, “ES”, “BA” são as siglas das unidades federativas, respectivamente: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Altitudes estão representadas em escala de cinza, a cada 50 km, a partir do nível do mar (cinza mais claro).

Associação às linhagens

Para indivíduos que possuíssem tecido (fígado, músculo, dedos ou cauda de girinos) coletado e conservado em etanol P.A. (95 %), fizemos a extração do DNA total com um protocolo de extração por acetato de amônio adaptado (Lyra et al. 2017) ou com o kit de extração de DNA genômico DNeasy® (Qiagen Inc.), seguindo o protocolo do fabricante. Utilizamos o DNA total diretamente para amplificar principalmente a parte 3' do gene ribossomal 16S rRNA (aqui chamado de 16S-ARBR), com os *primers* 16Sar-L e 16Sbr-H (Palumbi et al. 2002), a fim de alocar os indivíduos em alguma das linhagens de Sabbag et al. (2018). Para indivíduos difíceis de atribuir a alguma linhagem com o 16S-ARBR, fizemos também parte do gene de NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e a região 5' do gene da Citocromo C oxidase subunidade 1 (COI), que são fragmentos para os quais já possuíamos sequências feitas de (Sabbag 2013).

Conferimos e limpamos os eletroferogramas no programa Geneious R7 (<https://www.geneious.com>). Alinhamos as sequências obtidas com as sequências obtidas em estudos prévios (Fitzpatrick et al. 2009; Sabbag 2013; Sabbag et al. 2018) com o programa MAFFT v.7.407 (Katoh e Standley 2013), com o método iterativo E-INS-i.

Para associar cada indivíduo a uma linhagem, selecionamos do fragmento 16S-ARBR apenas os sítios que tínhamos confiança na homologia obtida pelo alinhamento. Dessa forma, retiramos sítios com dados faltantes ou sítios com gaps de alinhamentos, e usamos o programa DnaSP 6 (Rozas et al. 2017) para determinar os “haplótipos” das sequências e relacionar as amostras novas às amostras das linhagens genéticas de Sabbag et al. (2018). Para os indivíduos que não conseguimos associar a linhagens com essa abordagem, fizemos uma árvore filogenética com o fragmento de 16S-ARBR utilizando máxima verossimilhança na plataforma *online* do programa IQ-TREE (<https://iqtree.org>).

Presença de espermatozoides e caracteres sexuais secundários

O conceito de macho adulto de *Thoropa* do grupo *miliaris* (*sensu* Bokermann 1965; Feio et al. 2006) vem sendo usado como um macho que possua PEPs no dedo IV, que é o último dedo no qual surgem PEPs em uma sequência ontogenética. Até 2017, não existiam trabalhos relacionando atividade reprodutiva com a quantidade, distribuição de PEPs, tamanho do corpo e idade de indivíduos de *Thoropa*. Bokermann (1965) acreditava que o desenvolvimento dos indivíduos seria rápido o suficiente para que na estação seguinte ao nascimento eles já estivessem aptos para a reprodução. Segundo o que se conhece, os indivíduos eclodem dos ovos entre quatro e sete dias depois da desova e a duração da fase larval é entre 20 e 40 dias

(Bokermann 1965; Heyer e Crombie 1979; Consolmagno et al. 2016), o que é um tempo de desenvolvimento relativamente rápido para anuros. Rebouças et al. (2017) fizeram o primeiro estudo que relacionou a idade de indivíduos com a distribuição de PEPs e o tamanho de corpo em *T. miliaris*. Segundo os autores, indivíduos com aproximadamente um ano de idade e uma média de 43,7 mm de comprimento já possuíam alguma PEP nas mãos e alguns indivíduos de um ou dois anos de idade ainda estavam sem PEPs.

De qualquer forma, definir um macho adulto em *Thoropa* como sendo um macho com PEPs no dedo IV é uma decisão arbitrária e operacional com fins diagnósticos e não envolve uma discussão sobre o amadurecimento sexual dos animais. As PEPs, como uma característica secundária e hormônio-dependente, podem estar mais relacionadas a fatores externos (e.g., disponibilidade de território, disputas territoriais, disponibilidade de fêmeas) do que a aspectos taxonômicos. Como demonstrado por Rebouças et al. (2017), indivíduos maiores e mais velhos possuem maior quantidade de PEPs. Avaliamos se um macho com PEP no dedo IV (operacionalmente definido como macho adulto) é o único tipo de macho que detém capacidade reprodutiva. E, caso seja, se os critérios para separar as espécies de *Thoropa* baseados em machos adultos têm sentido diagnóstico.

Em anfíbios anuros, os testículos são em geral pareados, ovulares, compactos, bilaterais e cercados por uma película fibrosa e elástica (Lofts 1974; Norris e Lopez 2011). Internamente, são formados por cavidades, que são elementos ou unidades seminíferas (unidades de um testículo responsáveis pela produção de gametas masculinos). Essas unidades seminíferas são na literatura ora chamadas de “lóbulo seminífero” (Norris e Lopez 2011), ora chamadas de “túbulo seminífero” (Lofts 1974; Burgos e Fawcett 1956; Villagra et al. 2012), ora chamadas de “lóculo seminífero” (Duellman e Trueb 1994). Embora não exista um consenso, vamos utilizar o termo “lóculo seminífero”, porque a estrutura do parênquima não possui uma forma “cilíndrica” de um túbulo típico como em outros vertebrados, mas formas globulares ou ovais (Oliveira e Vicentini 1998; C. Oliveira, comunicação pessoal).

Dentro dos lóculos seminíferos dos anfíbios anuros adultos e sexualmente ativos, são encontrados usualmente cistos com células germinativas em diversos estágios de desenvolvimento, como espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (Norris e Lopez 2011), caracterizando uma maturação não regionalizada e heterogênea (Lofts 1974). Quando já estão quase maduros e alongados, os gametas já são chamados de espermatozoides e ficam presos nas células de Sertoli pelo acrossoma (Lofts 1974; Norris e Lopez 2011). Quando estão prontos para serem liberados, eles se soltam das células de Sertoli e ficam soltos nos lúmens dos lóculos seminíferos (Norris e Lopez 2011) até o próximo

amplexo. Nossa hipótese é de que um indivíduo sexualmente maduro de *Thoropa* possua lóculos seminíferos com espermatozoides maduros, presos ou não nas células de Sertoli. Então, nosso objetivo foi verificar quais distribuições de PEPs das mãos do grupo *miliaris* estão associadas à existência de espermatozoides maduros.

Selecionamos indivíduos da coleção CFBH de localidades cujas séries de coleta fossem amplas e procuramos indivíduos com distribuições de PEPs diferentes. De cada indivíduo extraímos um testículo. Para encontrar indivíduos machos sem PEPs, fizemos uma secção na lateral direita dos indivíduos sem PEPs (que podiam ser fêmeas de qualquer idade ou machos jovens), para procurar pelos testículos. Quando encontrávamos os testículos, fazíamos a extração de um deles. No total, extraímos testículo de 61 indivíduos. Categorizamos a distribuição de PEPs da seguinte maneira: (a) indivíduos machos sem PEPs; (b) PEPs apenas na articulação metacarpal-falangeal; (c) PEPs na articulação metacarpal-falangeal e no tubérculo metacarpal interno; (d) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e no dedo III; (e) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos III e II; (f) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos III, II e IV, necessariamente todas pretas; (g) PEPs completamente brancas ou marrons. Criamos essa última categoria (“g”) porque alguns indivíduos possuem PEPs completamente sem o extrato córneo queratinizado supracitado (apresentando uma cor branca) ou algum tipo de processo de perda ou ganho desse extrato córneo queratinizado (apresentando uma cor marrom).

Os indivíduos escolhidos pertencem, na sua maioria, a *Thoropa taophora*, por ser a espécie mais abundante da coleção CFBH. Porém, também selecionamos alguns indivíduos de *T. miliaris* (com vários padrões de distribuição de PEPs e o mais espalhado possível pela distribuição da espécie) e dois indivíduos de *T. saxatilis* (um sem nenhuma PEP e um com PEPs em todos os dedos nos quais elas ocorrem no grupo *miliaris* – dedo II, dedo III, dedo IV e tubérculo metacarpal interno).

Colocamos as gônadas em um tubo com etanol 70 % para conservação. Em seguida, medimos o comprimento e a largura das gônadas (considerando um elipsoide aproximado) com paquímetro digital Mitutoyo (precisão de 0,01 mm). Também pesamos as gônadas em uma balança analítica AG200 Gehaka®.

Após a medição e pesagem das gônadas, iniciamos o processo de desidratação para preparação histológica. Como as gônadas já se encontravam em álcool 70 %, a primeira etapa de desidratação foi em uma parte de etanol 70 % e uma parte de etanol 95 % por 45 minutos. Em seguida, transferimos cada gônada para uma parte de etanol 70 % e duas partes de etanol

95 % por 45 minutos. A terceira etapa consistia em uma parte de etanol 95 % apenas, também por 45 minutos. Em seguida descartamos esse etanol mantivemos as gônadas em 95 % por mais 45 minutos. Por fim, colocamos as gônadas em uma parte de etanol 95 % e uma parte de historresina da Leica Biosystems© para a primeira etapa da infiltração, que durou quatro horas. Após essas quatro horas, colocamos as gônadas em historresina pura e as deixamos durante uma noite, com as tampas dos frascos abertas, em uma câmara a vácuo para secar completamente o etanol das amostras. Após retirarmos as gônadas do vácuo, fizemos a inclusão delas em uma solução de 500 μ L de historresina e 33,4 μ L de endurecedor fornecido pelo fabricante. Fizemos a inclusão em placas com poços numerados e posicionamos o material na orientação desejada de corte (cortes transversais, seguindo Trauth et al. 2015). Após dois dias, colamos o bloco de resina com colas do tipo epóxi em blocos de madeira de 2 cm de largura por 2 cm de profundidade e 3 cm de comprimento. Identificamos os blocos de madeira com os números dos exemplares e posicionamos os blocos no micrótomo Leica RM2255 (Leica Biosystems©). Para alinhar a lâmina do micrótomo ao material incluído na historresina foi necessário aparar um pouco cada bloco com cortes de 10 μ m. Ao chegar à gônada, fazíamos os cortes de 5,0 μ m de espessura cada e montávamos preferencialmente três lâminas com oito cortes em cada lâmina, sobre gotas de água colocadas na lâmina. O uso da historresina não favorece cortes seriados, especialmente pela sensibilidade que a resina tem à umidade e pela descontinuidade dos cortes. Dessa forma, alguns cortes eram perdidos, o que não nos prejudicaria já que nosso interesse era apenas verificar a presença de espermatozoides. Deixamos as lâminas secando por algumas horas em uma chapa aquecida a 37 °C e então as submetemos ao processo de coloração. Fizemos a coloração em azul de toluidina por 40 segundos, seguida de uma lavagem rápida em água destilada e, em seguida, uma lavagem rápida em fucsina básica e uma lavagem final rápida em água destilada. Deixamos as lâminas novamente em uma chapa aquecida a 37 °C e em seguida montamos as lâminas colando as lamínulas com Entellan® (SigmaAldrich). Analisamos as lâminas de cada indivíduo com microscópio fotográfico Olympus BX51 (Olympus Corporation©) de aumento padrão de 10 vezes na lente ocular, utilizando aumentos e focos diferentes dependendo do estado do corte. Caracterizamos os cortes através dos seguintes critérios: corte com pelo menos um lóculo seminífero com espermatozoides presos à célula de Sertoli; corte com pelo menos um lóculo seminífero com espermatozoides livres no lúmen; e cortes com pelo menos um lúmen de lóculo que pareça ter sido recém-esvaziado. Consideramos que essas três opções são sinais de que o indivíduo é maduro sexualmente.

Morfologia externa de adultos e larvas

Primeiramente avaliamos as características diagnósticas das espécies contidas nas descrições para definir quais caracteres de morfologia externa eram passíveis de serem categorizados e analisados em uma coleta de dados objetiva. Seguimos a nomenclatura morfológica de Cei (1980) e Duellman (2001) e caracteres definidos e/ou utilizados por Duellman (1970), McDiarmid e Altig (1999), Grant et al. (2006), Taboada et al. (2013), Grant et al. (2017), Rebouças et al. (2017), Luna et al. (2018), Dias (2018), Colaço (2018) para a morfologia externa de adultos. Verificamos a variação de desenho dorsal entre as espécies, principalmente no grupo *miliaris*. Como desenhos e cores são características subjetivas e difíceis de definir, mantivemos a análise em caráter preliminar.

Para a morfologia externa de girinos, utilizamos a terminologia de McDiarmid e Altig (1999) e nos baseamos em girinos entre os estágios 37 e 40 (*sensu* Gosner 1960). Utilizamos essa amplitude de estágios pela dificuldade de obtermos amostras de um único semaforonte para todas as espécies e linhagens. Também seguimos algumas das características morfológicas definidas para larvas de *Thoropa* por Dias (2018).

Coloração e desenho

Fizemos observações de padrões de cor e desenho em exemplares vivos e fixados, com o intuito de avaliar algumas diferenças diagnósticas das espécies. Como padrões de desenho e cor em taxonomia de anfíbios são critérios extremamente subjetivos, fizemos apenas análises superficiais e preliminares, a fim de buscar por padrões óbvios, sem nos atentar a terminologias específicas desse sistema.

Morfometria de adultos e contagens de PEPs

Como na literatura algumas diferenças entre as espécies são baseadas em características morfométricas, analisamos 15 caracteres merísticos com métodos previamente descritos (Duellman 2001) e redefinidos (Watters et al. 2016), com acréscimos de outras duas medidas (diâmetro do antebraço e diâmetro do braço). Obtivemos todas as medidas (em mm) com um paquímetro digital Mitutoyo (precisão de 0,01 mm). As medidas que utilizamos incluem: comprimento rostro-cloacal (CRC, distância em linha reta do focinho à cloaca, com o exemplar o mais reto possível); largura da cabeça (LC, linha reta no ponto mais largo da cabeça, em geral na altura do ângulo das mandíbulas); comprimento da cabeça (CC, linha reta do focinho até a articulação do quadrado-jugal com o pterigóide, na extremidade posterior da mandíbula); diâmetro do tímpano (DT, maior diâmetro do tímpano, incluindo o anel timpânico, medido

preferencialmente do lado esquerdo); diâmetro do olho (DO, maior diâmetro do olho, medido preferencialmente do lado esquerdo); distância interorbital (DIO, menor distância entre os olhos); distância internasal (DIN, a menor distância entre as narinas, inserindo o paquímetro na borda interna delas); distância entre o olho e a narina (DON, da margem anterior do olho à margem posterior da narina, medido preferencialmente do lado esquerdo); distância do olho ao focinho (DOF, da margem anterior do olho ao focinho, medido preferencialmente do lado esquerdo); comprimento do pé (CP, da base proximal do tubérculo metatarsal interno até a ponta do maior artelho, medido preferencialmente do lado esquerdo, o mais reto possível); comprimento da mão (CM, da base proximal do tubérculo metacarpal interno até a ponta do maior dedo, medido preferencialmente do lado esquerdo, o mais reto possível); comprimento da tíbia (CT, do joelho até o calcanhar, medido preferencialmente do lado esquerdo); comprimento do fêmur (CF, da cloaca até o joelho, medido preferencialmente do lado esquerdo e ventralmente); diâmetro do antebraço (DA, com o paquímetro rente à articulação do cotovelo); diâmetro do braço (DB, com o paquímetro rente à inserção do braço no corpo).

Para o grupo *miliaris* e para *Thoropa petropolitana* também analisamos algumas características das PEPs utilizando estereomicroscópios, como distribuição (apenas para o grupo *miliaris*), quantidade e cor das PEPs.

Análises estatísticas

Como não há tecido disponível para *Thoropa petropolitana* e *T. lutzi* (da localidade-tipo) e não se sabe o relacionamento filogenético entre elas e as outras espécies, com exceção de uma amostra de *T. lutzi* de Alegre, ES (Sabbag et al. 2018), elas não puderam ser analisadas em um cenário de linhagens moleculares de *Thoropa*. Da mesma forma, não há tecido para algumas populações das outras quatro espécies e também não puderam ser associadas às linhagens de Sabbag et al. (2018). Portanto, fizemos duas análises diferentes: uma análise considerando indivíduos das seis espécies válidas (e, portanto, com números amostrais maiores), e uma análise considerando apenas indivíduos que pudessem ser associados às linhagens anteriormente publicadas (e, portanto, com um número amostral menor e sem as espécies do grupo *petropolitana*). Caso as nossas análises histológicas mostrassem um critério diferente do utilizado na literatura para definir machos adultos (Feio et al. 2006), faríamos as análises estatísticas exploratórias sob ambos os critérios, para efeitos de comparação.

Inicialmente testamos os dados quanto à homocedasticidade e a normalidade, todos utilizando o programa R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e o programa RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018), mas cada análise com um pacote, citados a seguir. Fizemos os testes de

homocedasticidade de duas maneiras: com o teste “M de Box” utilizando o pacote “biotools” (da Silva et al. 2017) e utilizando uma análise das variâncias diretamente no RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018). Fizemos os testes de normalidade com dois métodos: com o teste de Shapiro-Wilks e com a análise de histogramas das distribuições dos valores ambos diretamente no RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018). Segundo esses quatro testes, nossos dados morfométricos não são normais e nem homocedásticos.

Como o comprimento rostro-cloacal é uma das características diagnósticas entre as espécies, plotamos em um gráfico de caixas as medidas de CRC para cada espécie e linhagem, separando machos adultos e fêmeas adultas. Fizemos esses gráficos nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018) com o pacote “ggplot2” v.3.0.0 (Wickham et al. 2018). Para testar se existem características sexualmente dimórficas nas espécies, testamos também a espessura (i.e., diâmetro) dos antebraços em relação ao CRC e a espessura (i.e., diâmetro) dos braços em relação ao CRC, entre machos adultos e fêmeas adultas. Os testes foram feitos com gráficos de caixas, por espécie e por linhagem, nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018), usando o pacote “ggplot2” v.3.0.0 (Wickham et al. 2018).

Outra característica diagnóstica de *Thoropa megatympanum* e *T. saxatilis* é o diâmetro do tímpano muito maior nelas do que nas outras espécies de *Thoropa* (Caramaschi e Sazima 1984; Cocroft e Heyer 1988). Assim, verificamos se a razão entre o diâmetro do tímpano e o comprimento da cabeça é diferente entre as espécies (*sensu* Caramaschi e Sazima 1984) e também se a razão entre o diâmetro do tímpano e o diâmetro do olho é diferente entre as espécies (*sensu* Cocroft e Heyer 1988). Esses testes foram feitos com gráficos de caixas, por espécies e linhagens, separando machos e fêmeas, nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018) com o pacote “ggplot2” v.3.0.0 (Wickham et al. 2018). Por fim, fizemos gráficos de caixas apenas para os machos adultos das espécies do grupo *miliaris*, usando a quantidade bruta de PEPs no dedo IV da mão esquerda, que é a mão do indivíduo de *T. taophora* que contém mais PEPs (36 PEPs) (Feio et al. 2006). Esses gráficos também foram elaborados nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018) utilizando o pacote “ggplot2” v.3.0.0 (Wickham et al. 2018). Para todos os gráficos de caixas fizemos análises de variância (ANOVA) com testes *F* para verificar se existem diferenças significativas gerais entre as médias dos grupos (espécies, linhagens, machos e fêmeas). Fizemos essas análises nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018). Adicionalmente, fizemos comparações par-a-par não

planejadas com o método HSD de Tukey. Para todas as análises consideramos como significativos os resultados com valores de P menores do que 0,05.

No decorrer da coleta de dados, notamos que alguns jovens das espécies cujos adultos possuíam a cabeça mais larga do que longa possuíam, contrariamente, a cabeça mais longa do que larga. Isso também pareceu visível pela angulação do tímpano, que em indivíduos maiores fica mais inclinado e em indivíduos menores fica mais próximo ao vertical. Supusemos, então, que as diferenças entre largura e comprimento da cabeça entre as espécies pudessem ser também explicadas pelo tamanho dos exemplares, que refletem, ao menos em *Thoropa miliaris*, sua idade (Rebouças et al. 2017). Para testar isso colocamos em gráficos de dispersão simples o comprimento e a largura da cabeça de cada espécie em relação ao CRC, porém sem distinção de sexo, idade e estágio de desenvolvimento, desde que estivessem metamorfoseados. Sobre esses gráficos de dispersão fizemos regressões lineares simples, obtendo a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2). Elaboramos essas análises nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018), utilizando o pacote “ggplot2” v.3.0.0 (Wickham et al. 2018).

Fizemos também duas análises multivariadas: uma análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) e uma análise de discriminantes lineares (*linear discriminant analysis*, LDA), ambas sem o efeito da alometria, para comparar morfometricamente todas as características das espécies e linhagens. Para retirar o efeito alométrico das amostras, calculamos as razões entre as 14 medidas e os CRC de cada exemplar e analisamos as 14 variáveis resultantes para machos adultos e fêmeas adultas separadamente. Fizemos as análises nos programas R v.3.4.0 (R Core Team 2017) e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018), sendo que utilizamos o pacote “ggfortify” (Horikoshi et al. 2018) para a PCA e o pacote “flipMultivariates” (DisplayR, Inc.) para a LDA.

Adicionalmente, resumimos as estatísticas básicas (valores mínimo e máximo, média e desvio padrão de cada medida) utilizando os programas R v.3.4.0 e RStudio v.1.1.456 (RStudio Team 2018) com o pacote “psych” (Revelle 2019).

RESULTADOS

Associação às linhagens

Obtivemos um total de 798 sequências de 16S-ARBR de *Thoropa* do grupo *miliaris*, em um alinhamento de 604 pb. Desse total de pares de bases, 186 pb eram de sítios com *gaps* ou dados faltantes, para os quais possuíamos pouca confiança na homologia. O número de

“haplótipos” resultantes obtidos com o DnaSP (Rozas et al. 2017) foi 102 e a “diversidade haplotípica” foi de 0,9642. A maior parte das amostras manteve a distribuição conhecida da literatura (Sabbag 2013; Sabbag et al. 2018) (Figura 2). As principais mudanças refletem-se no aumento de amostras de *T. miliaris* (mais especificamente das linhagens mil-1 e mil-2) que se distribuem na Cadeia do Espinhaço (Figura 2).

Alguns exemplares não puderam ser associados a linhagens já existentes através das abordagens utilizadas, então os consideramos como pertencentes ao grupo topologicamente mais próximo possível segundo a árvore de verossimilhança produzida pelo programa IQ-TREE. Essas amostras correspondem a alguns indivíduos de *T. megatympanum* distribuídas ao longo da Cadeia do Espinhaço, indivíduos de *T. miliaris* no leste do estado de Minas Gerais e indivíduos de *T. taophora* na Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro (Figura 3). Não utilizamos essas amostras para as análises morfométricas por linhagens.

Presença de espermatozoides e caracteres sexuais secundários

Dos 61 testículos que retiramos para cortes histológicos, dois foram perdidos em alguma etapa da rotina histológica. Dos 59 machos que analisamos 15 eram machos sem PEP; oito eram machos com PEPs apenas na articulação metacarpal-falangeal; um possuía PEPs na articulação metacarpal-falangeal e no tubérculo metacarpal interno; um possuía PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e no dedo III; sete possuíam PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos III e II; 14 possuíam PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos III, II e IV, necessariamente todas pretas; e 12 possuíam PEPs completamente brancas ou marrons (Tabela 1). A maioria dos indivíduos possuía pelo menos espermatozoides já desenvolvidos e presos às células de Sertoli e vários possuíam espermatozoides livres no lúmen (Figura 4). Apenas dois machos (CFBH 7648 e CFBH 12627) não possuíam espermatozoides prontos ou presos às células de Sertoli, ambos machos sem PEPs (Figura 4). Alguns indivíduos possuíam testículos muito diminutos e não pudemos medir nem pesar com os equipamentos. Alguns exemplos de distribuição de PEPs e cortes histológicos estão na Figura 5.

O maior indivíduo da coleção CFBH, uma *Thoropa miliaris* de Santa Maria Madalena, RJ (CFBH 28065), é o macho que apresentou o maior testículo analisado (Tabela 1) e possuía não só espermatozoides prontos e presos à célula de Sertoli, como espermatozoides livres e lóculos que pareciam recém-esvaziados. Considerando os resultados encontrados, nosso critério de macho adulto é um macho que possua alguma PEP.

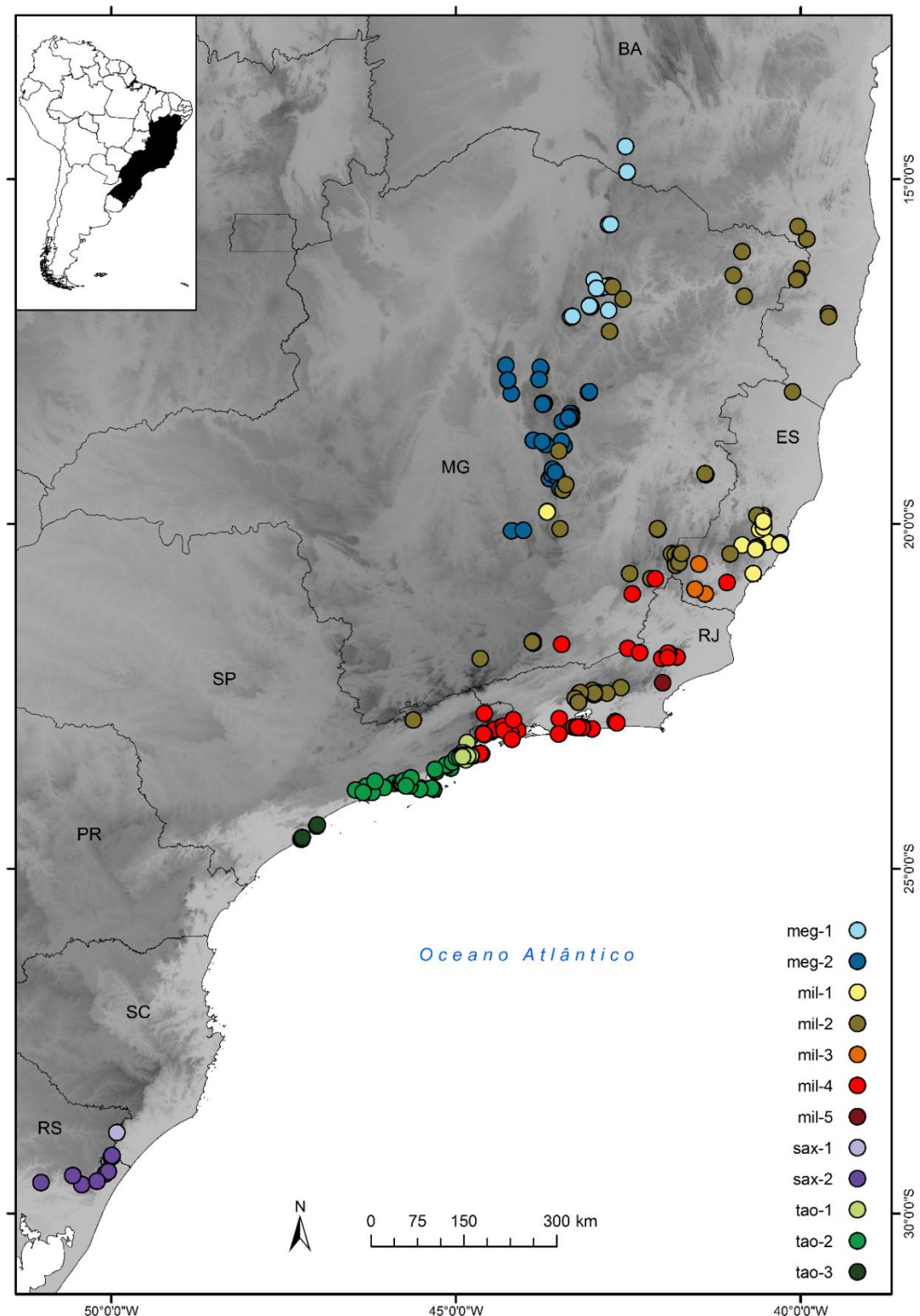


Figura 2: Mapa de distribuição das amostras moleculares de *Thoropa* do grupo *miliaris* utilizadas nesse trabalho, separadas por linhagem de Sabbag et al. (2018), sendo: “meg-1” e “meg-2” (*T. megatympanum*), “mil-1”, “mil-2”, “mil-3”, “mil-4” e “mil-5” (*T. miliaris*), “sax-1” e “sax-2” (*T. saxatilis*) e “tao-1”, “tao-2”, “tao-3” (*T. taophora*). “RS”, “SC”, “PR”, “SP”, “MG”, “RJ”, “ES”, “BA” são as siglas das unidades federativas, respectivamente: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Altitudes estão representadas em escala de cinza, a cada 50 km, a partir do nível do mar (cinza mais claro).

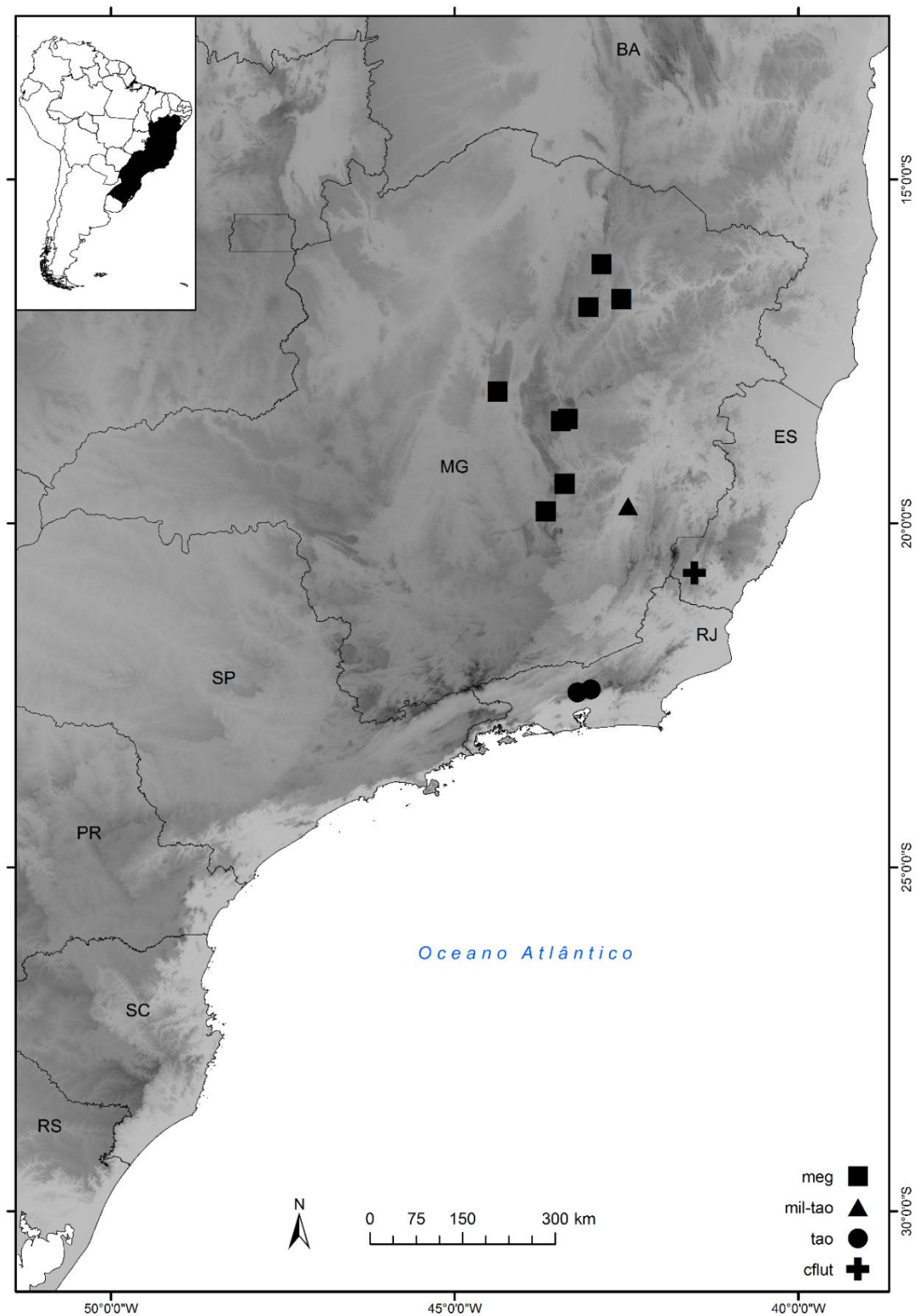


Figura 3: Mapa de distribuição da amostra molecular de *Thoropa* cf. *lutzi* (CFBH-T 10562) e das amostras moleculares do grupo *miliaris* que não pudemos alocar em nenhuma linhagem conhecida de Sabbag et al. (2018). “RS”, “SC”, “PR”, “SP”, “MG”, “RJ”, “ES”, “BA” são as siglas das unidades federativas, respectivamente: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. Quadrado é para amostras que se agrupam com *T. megatympanum* (“meg”); triângulo são amostras que agrupam-se com *T. miliaris* + *T. taophora* (“mil-tao”); círculo é para amostras que se agrupam com *T. taophora* (“tao”); o sinal de adição refere-se à amostra de *T. cf. lutzi* (“cflut”). Altitudes estão representadas em escala de cinza, a cada 50 km, a partir do nível do mar (cinza mais claro).

Tabela 1: Machos utilizados para análise de testículos de *Thoropa taophora*, *T. miliaris* e *T. saxatilis*, com os respectivos números de exemplares na coleção CFBH, comprimento rostro-cloacal (CRC, em mm); município, unidade federativa (UF); data de coleta; categoria de PEPs (“P”) sendo: (a) indivíduos sem PEP, (b) PEPs apenas na articulação metacarpal-falangeal, (c) PEPs na articulação metacarpal-falangeal e tubérculo metacarpal interno, (d) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, tubérculo metacarpal interno e dedo III, (e) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, tubérculo metacarpal interno, e dedos III e II, (f) PEPs na articulação metacarpal-falangeal, tubérculo metacarpal interno, e dedos III, II e IV, todas pretas e (g) PEPs brancas ou marrons. Três colunas referem-se à análise macroestrutural dos testículos, com massa (“m”) em gramas; comprimento (“c”) em mm; e largura (“l”) em mm. A coluna “presos” marca os testículos nos quais encontramos pelo menos um lóculo seminífero com espermatozoides presos às células de Sertoli. A coluna “livres” marca os testículos nos quais encontramos ao menos um lóculo seminífero com espermatozoides livres no lúmen. E a coluna “vazios” marca testículos com lóculos seminíferos recém-esvaziados (com lúmen amplo e sem espermatozoides).

Espécie	CFBH	CRC	Município	UF	Data de coleta	P	m	c	l	presos	livres	vazios
<i>T. miliaris</i>	28071	48,26	Santa Maria Madalena	RJ	22/fev/2011	a	0,0022	2,54	1,40	X		
<i>T. miliaris</i>	14986	25,56	Santa Teresa	ES	07/mar/2007	a	0,0000	1,66	0,89	X		
<i>T. saxatilis</i>	30385	34,25	Maquiné	RS	22/nov/2011	a	0,0031	3,48	1,93	X		
<i>T. taophora</i>	30310	46,91	Bertioga	SP	12/nov/2011	a	0,0041	2,99	1,57	X	X	
<i>T. taophora</i>	15341	49,07	Ilhabela	SP	17/jan/2007	a	0,0016	3,39	1,21	X	X	
<i>T. taophora</i>	40889	43,65	Ilhabela	SP	10/ago/2010	a	0,0000	2,30	0,89	X	X	
<i>T. taophora</i>	40900	35,04	Ilhabela	SP	10/ago/2010	a	-	-	-	X		
<i>T. taophora</i>	41833	39,66	Mogi das Cruzes	SP	15/nov/2013	a	0,0013	2,16	1,01	X	X	
<i>T. taophora</i>	12627	35,23	Peruibe	SP	09/out/2005	a	-0,0011	-	-			
<i>T. taophora</i>	30282	38,70	São Sebastião	SP	10/nov/2011	a	0,0001	1,88	0,81	X		
<i>T. taophora</i>	30293	50,84	São Sebastião	SP	12/nov/2011	a	0,0026	2,87	1,41	X	X	X
<i>T. taophora</i>	12607	42,93	Ubatuba	SP	28/abr/2004	a	0,0000	2,31	0,90	X		X
<i>T. taophora</i>	15665	45,96	Ubatuba	SP	13/dez/2006	a	0,0002	2,36	1,23	X	X	
<i>T. taophora</i>	7654	42,06	Ubatuba	SP	29/abr/2004	a	0,0008	2,82	0,98	X		
<i>T. taophora</i>	7648	28,97	Ubatuba	SP	29/abr/2004	a	-	-	-			
<i>T. miliaris</i>	25478	51,59	Mimoso do Sul	ES	07/dez/2009	b	0,0102	4,37	2,62	X	X	
<i>T. miliaris</i>	36384	47,64	Paraty	RJ	06/abr/2014	b	0,0040	3,30	2,02	X	X	
<i>T. miliaris</i>	36379	30,37	Paraty	RJ	06/abr/2014	b	0,0010	2,24	1,02	X	X	
<i>T. miliaris</i>	14970	29,86	Santa Teresa	ES	07/mar/2007	b	0,0009	2,28	1,24	X		
<i>T. taophora</i>	19719	47,13	Caraguatatuba	SP	11/nov/2005	b	0,0054	4,31	1,68	X	X	
<i>T. taophora</i>	42347	44,91	Ubatuba	SP	28/mar/2016	b	0,0025	2,62	0,96	X	X	X
<i>T. taophora</i>	19921	52,01	Ubatuba	SP	24/fev/2008	b	0,0060	7,55	1,82	X	X	
<i>T. taophora</i>	10938	48,27	Ubatuba	SP	06/out/2004	b	0,0050	4,09	1,55	X	X	
<i>T. miliaris</i>	25138	52,47	Alegre	ES	01/jul/2009	c	0,0088	3,86	2,01	X		
<i>T. miliaris</i>	26382	49,96	Linhares	ES	05/jan/2002	d	0,0036	2,85	2,04	X	X	
<i>T. miliaris</i>	11329	49,00	Domingos Martins	ES	18/jan/2006	e	0,0022	2,56	1,53	X		
<i>T. miliaris</i>	36381	52,19	Paraty	RJ	06/abr/2014	e	0,0042	3,35	1,85	X		
<i>T. miliaris</i>	18438	29,96	Vitória	ES	24/nov/2007	e	0,0034	3,22	1,74	X	X	
<i>T. taophora</i>	30308	53,15	Bertioga	SP	12/nov/2011	e	0,0041	2,66	1,75	X	X	
<i>T. taophora</i>	42145	63,05	Iguape	SP	18/jan/2016	e	0,0027	3,15	1,92	X	X	
<i>T. taophora</i>	40897	55,34	Ilhabela	SP	10/ago/2010	e	0,0058	3,93	1,76	X	X	X
<i>T. taophora</i>	15614	58,51	São Sebastião	SP	19/dez/2006	e	0,0061	4,32	2,22	X	X	
<i>T. miliaris</i>	30633	40,65	Paraty	RJ	15/dez/2011	f	0,0022	2,59	1,63	X		
<i>T. miliaris</i>	28065	96,89	Santa Maria Madalena	RJ	22/fev/2011	f	0,0461	9,58	3,43	X	X	X
<i>T. miliaris</i>	18437	35,47	Vitória	ES	24/nov/2007	f	0,0080	5,08	2,27	X	X	
<i>T. saxatilis</i>	30386	39,20	Maquiné	RS	22/nov/2011	f	0,0133	6,26	2,18	X	X	
<i>T. taophora</i>	30301	45,70	Bertioga	SP	12/nov/2011	f	0,0078	2,59	2,00	X	X	
<i>T. taophora</i>	43576	64,27	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0227	4,57	2,91	X	X	
<i>T. taophora</i>	43578	59,70	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0121	3,98	2,41	X	X	
<i>T. taophora</i>	43586	61,50	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0113	3,81	2,24	X	X	
<i>T. taophora</i>	43584	62,88	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0145	4,20	1,89	X	X	
<i>T. taophora</i>	43572	53,97	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0054	3,02	1,94	X	X	
<i>T. taophora</i>	43585	57,66	São Sebastião	SP	fev/2018	f	0,0086	2,81	2,24	X	X	
<i>T. taophora</i>	12733	76,32	Ubatuba	SP	09/abr/2000	f	0,0234	5,91	3,15	X	X	
<i>T. taophora</i>	12736	81,24	Ubatuba	SP	22/out/2000	f	0,0255	7,33	2,78	X	X	
<i>T. taophora</i>	12735	59,9	Ubatuba	SP	09/abr/2000	f	0,0137	4,36	2,20	X	X	
<i>T. miliaris</i>	25119	37,81	Domingos Martins	ES	10/nov/2009	g	0,0052	3,25	1,93	X	X	
<i>T. miliaris</i>	37723	48,21	Pedro Canário	ES	02/jul/2005	g	0,0019	2,27	1,50	X		
<i>T. miliaris</i>	27365	59,52	Santa Maria Madalena	RJ	21/nov/2010	g	0,0310	6,67	3,57	X	X	X
<i>T. taophora</i>	42147	51,76	Iguape	SP	18/jan/2016	g	0,0042	3,12	1,81	X	X	X
<i>T. taophora</i>	15343	57,84	Ilhabela	SP	17/jan/2007	g	0,0066	4,03	2,01	X	X	
<i>T. taophora</i>	43577	69,23	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0223	4,08	2,98	X	X	
<i>T. taophora</i>	43575	62,30	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0167	7,46	2,14	X	X	
<i>T. taophora</i>	43589	60,63	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0075	3,78	1,98	X	X	
<i>T. taophora</i>	43573	54,68	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0083	3,46	1,68	X	X	
<i>T. taophora</i>	43588	59,93	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0094	3,81	1,87	X	X	
<i>T. taophora</i>	43581	60,73	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0158	4,18	2,08	X	X	
<i>T. taophora</i>	43583	54,50	São Sebastião	SP	fev/2018	g	0,0089	2,77	2,30	X	X	

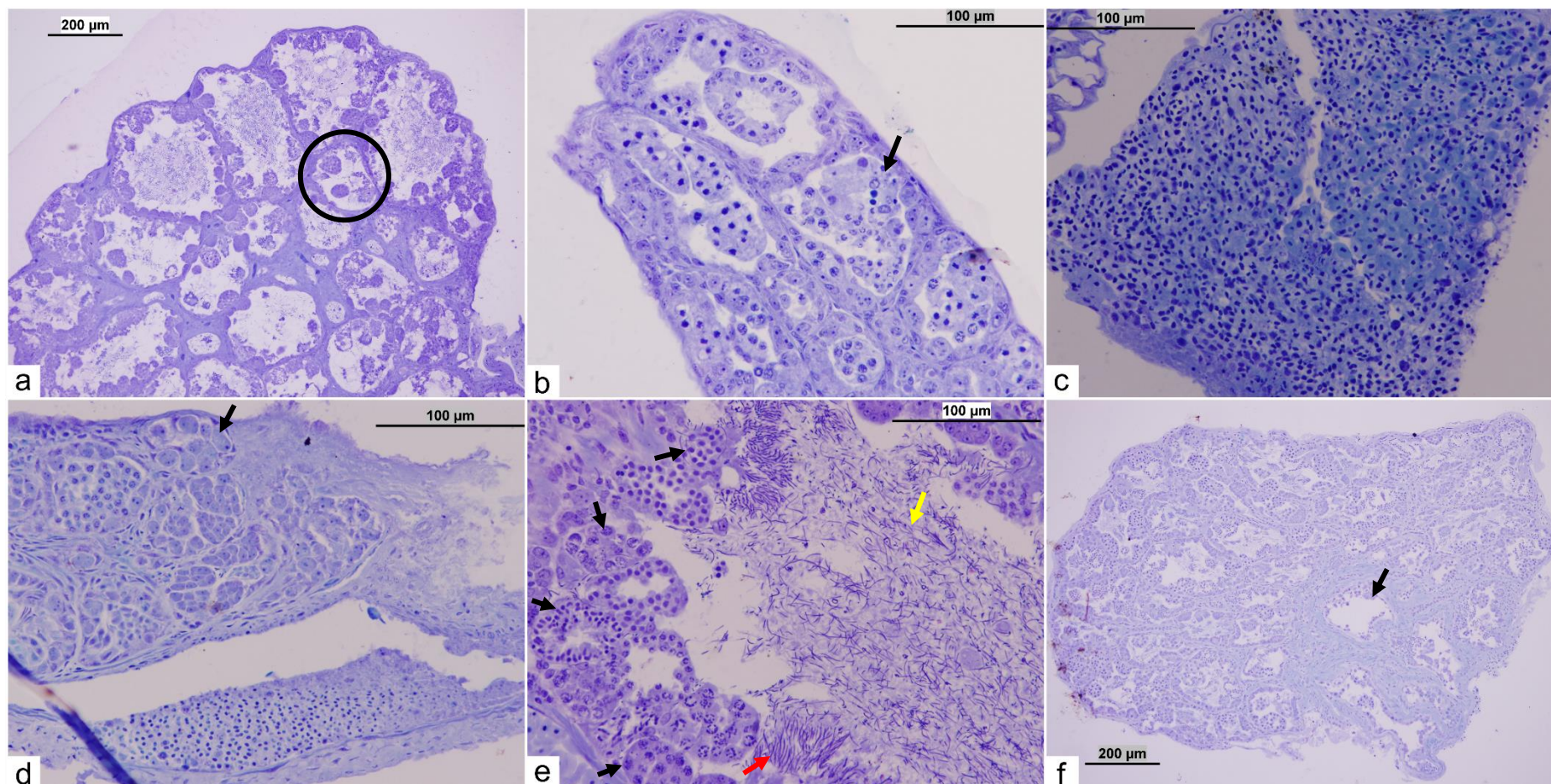


Figura 4: Fotografias de cortes histológicos de testículos. (a) *Thoropa taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 43572), com aumento de 10 x 1, com vários lóculos seminíferos (círculo preto em um deles); (b) *T. taophora*, Ubatuba, SP (CFBH 7648, indivíduo sem PEPs), com aumento de 20 x 2, com lóculos seminíferos em formação e sem espermatozoides (seta preta em um deles); (c) *T. taophora*, Iguape, SP (CFBH 12627, indivíduo sem PEPs), com aumento de 20 x 2, mostrando células ainda indiferenciadas no testículo; (d) *T. taophora*, Ilhabela, SP (CFBH 40900, indivíduo sem PEPs), com aumento de 10 x 1, com lóculos seminíferos em formação e sem espermatozoides (seta preta em um deles); (e) *T. miliaris*, Santa Maria Madalena, RJ (CFBH 27365, indivíduo com PEPs esbranquiçadas ou marrom-claras), com aumento de 20 x 2, mostrando os diferentes estágios de desenvolvimento dos gametas (setas pretas), espermatozoides presos à célula de Sertoli (seta vermelha) e espermatozoides livres no lúmen (seta amarela); (f) *T. taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 30293, indivíduo sem PEPs), com aumento de 10 x 1, mostrando lóculos seminíferos aparentemente recém-esvaziados (seta preta).

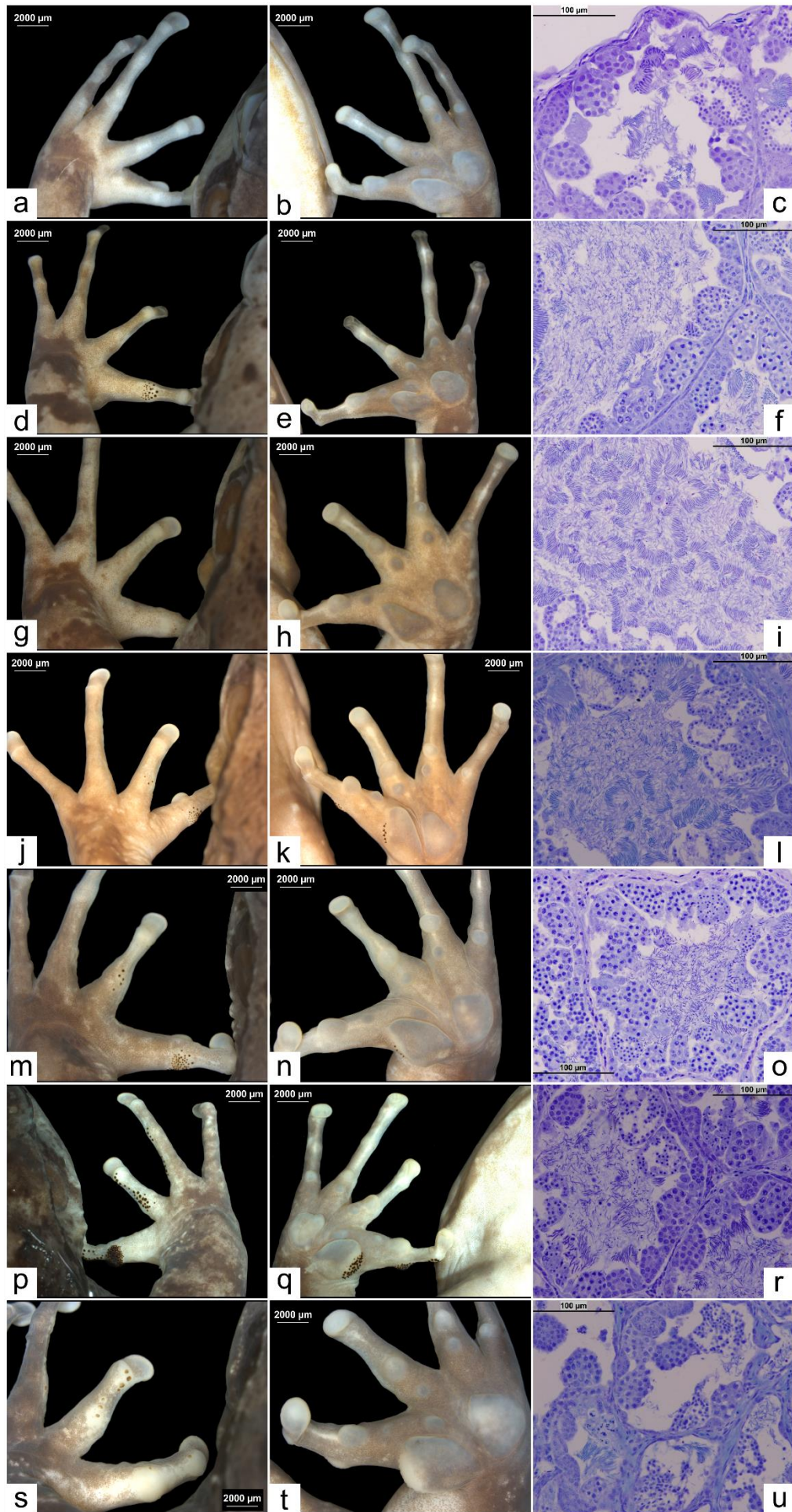


Figura 5 (página anterior): Vistas dorsais e ventrais das categorias de distribuição de PEPs que utilizamos para separar os indivíduos escolhidos para verificar a ocorrência de espermatozoides nos testículos (a-b, d-e, g-h, j-k, m-n, p-q, s-t), com exemplo de corte histológico (aumentado 20 x 2) do testículo de algum indivíduo atribuído àquela categoria (c, f, i, l, o, r, u). (a, b, c) *Thoropa taophora*, Ilhabela, SP (CFBH 15341), indivíduo sem PEPs; (d, e, f) *T. miliaris*, Paraty, RJ (CFBH 36384), indivíduo com PEPs na articulação metacarpal-falangeal; (g, h, i) *T. miliaris*, Cariacica, ES (CFBH 25138), indivíduo com PEPs na articulação metacarpal-falangeal e no tubérculo metacarpal interno; (j, k, l) *T. miliaris*, Linhares, ES (CFBH 26382), indivíduo com PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e no dedo III; (m, n, o) *T. taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 15614), indivíduo com PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos III e II; (p, q) *T. taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 15595) e (r) *T. taophora*, Bertiooga, SP (CFBH 30301), ambos os indivíduos com PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno, e nos dedos III, II e IV, necessariamente todas pretas; (s, t) *T. taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 43577) e (u) *T. taophora*, Iguape, SP (CFBH 42147), ambos os indivíduos com PEPs brancas ou marrons.

Morfologia externa de adultos e larvas

Analizamos os indivíduos para 46 características de morfologia externa de adultos e 42 características de morfologia externa de larvas (Tabela 2). A maioria das características possui os mesmos estados para todas as espécies. Porém, existem algumas diferenças entre espécies, tais como o formato do focinho, ocorrência de fenda e saco vocal, ordem de tamanho dos dedos, tipo e distribuição das projeções epidérmicas PEPs das almofadas nupciais, formato e extensão da expansão dérmica posterolateral das larvas, posição do espiráculo relativa à expansão dérmica posterolateral em larvas, características da parede ventral do tubo cloacal em larvas, entre outras. Até o momento não encontramos diferenças entre as linhagens do grupo *miliaris* para a maioria das características analisadas.

Encontramos também variações individuais em algumas características, não associadas a linhagens ou espécies, como, por exemplo, a quantidade e localização de tubérculos supernumerários nas mãos, comprimento relativo do dedo V, ocorrência de uma macroglândula inguinal amarelada, formato do processo dentígero do vômer, quantidade de grânulos laterais e posterodorsais, ocorrência da quilha tarsal, ocorrência do menisco nos olhos das larvas e formato da borda da parede ventral do tubo cloacal das larvas.

Nenhuma das espécies do grupo *miliaris* possui fenda vocal ou saco vocal (Figura 6), embora alguns indivíduos possuam dobras musculares próximas à língua que dão a impressão de serem fendas vocais em uma análise superficial. Já o grupo *petropolitana* apresenta fendas vocais, sendo que *Thoropa petropolitana* é possível ver sacos vocais pareados (Figura 6).

Em todas as espécies existem inúmeros grânulos nas laterais do corpo e na parte final do dorso (Figura 7). Embora exista variação individual nessa característica, *Thoropa lutzi* e *T. megatympanum* parecem possuir maior quantidade do que as outras espécies. Todas as espécies também possuem prega discoidal (*sensu* Taboada et al. 2013) que externamente pode ser vista por uma suave alteração na rugosidade da pele do ventre (Figura 7). Nas espécies do grupo

petropolitana, entretanto, ela é mais marcada, especialmente nas laterais do ventre.

As almofadas nupciais das espécies do grupo *miliaris* são iguais nos quesitos de morfologia das projeções epidérmicas PEPs (PEPs), sendo todas em formato de espinho (PFE), porém possuem grande variação individual de distribuição, cor, tamanho e quantidade de PEPs (Figura 8). Encontramos diversos indivíduos recentemente coletados com PEPs brancas ou em tons de marrom e alguns indivíduos em que é possível ver o estrato córneo se desprendendo da pele do animal, ou apenas na PEP, ou por toda a mão (Figura 8). Encontramos também variação individual quanto à ocorrência de PEPs na face dorsal do metacarpo do dedo II, aparentando ser o último local a aparecerem PEPs (Figura 8). Os indivíduos de *Thoropa petropolitana* possuem o mesmo tipo morfológico de PEPs (PFE), mas com muito menos variação individual, sendo que a cor e a quantidade de PEPs parecem ser as únicas características variáveis (Figura 8). *Thoropa lutzi*, por outro lado, possui as PEPs em formato de cone (PFC), sem variação de distribuição, mas com bastante variação de cor. Não sabemos detalhes sobre a quantidade de PEPs em *T. lutzi* (Figura 8).

Os dedos das espécies possuem alguma variação nos seus comprimentos relativos. *Thoropa petropolitana*, *T. lutzi* e *T. saxatilis* possuem o dedo II menor do que o dedo III, enquanto que *T. miliaris*, *T. taophora* e *T. megatympanum* possuem o dedo II maior do que o dedo III (Figura 9). Além disso, as falanges terminais de *T. saxatilis* são mais largas do que as falanges terminais das outras espécies (Figura 9). A ordem de tamanho dos artelhos é igual para todas as espécies, com alguma variação individual (Tabela 2, Figura 10).

As larvas do gênero possuem bastante variação individual e alguma variação entre espécies ou linhagens (Tabela 2). De maneira geral, as larvas de *Thoropa* têm o corpo deprimido, a cauda longa e as nadadeiras reduzidas. A maioria das diferenças entre as espécies se encontra na expansão dérmica posterolateral (*sensu* Dias 2018), na posição do espiráculo relativa à expansão dérmica posterolateral, no tubo cloacal e nas nadadeiras (Figura 11). As características que se mostraram diferentes para linhagens dizem respeito ao tubo cloacal das larvas de *Thoropa megatympanum* e à expansão dérmica posterolateral das larvas de *T. saxatilis* (explicado a seguir).

O disco oral das larvas das diferentes espécies é praticamente igual: sem PEPs submarginais, PEPs marginais cônicas ou arredondadas, maxilas queratinizadas em formato de U e comprimidas lateralmente, com duas fileiras de dentes anteriores e três fileiras posteriores, sendo a primeira fileira posterior interrompida (em alguns girinos de *Thoropa miliaris* ela não é interrompida) (Figura 12). Os tubos cloacais possuem bastante variação individual, mas em geral não cobrem as pernas nas espécies do grupo *miliaris* e cobrem as pernas nas espécies do

grupo *petropolitana* (Figura 12). A parede dorsal do tubo cloacal é mais curta do que a parede ventral. No grupo *miliaris* existe variação individual na regularidade e formato da margem da parede ventral (ora arredondada, ora um pouco mais reta, ora regular, ora irregular). Em *T. petropolitana* a parede ventral do tubo cloacal possui uma indentação medial e em *T. lutzi* possui uma borda côncava (Figura 12).

A expansão dérmica posterolateral nos girinos do grupo *petropolitana* é larga e cobre quase todo o corpo, lembrando uma saia ou uma ventosa (Figura 13). Já no grupo *miliaris* é curta ou inexistente (Figura 13). Não a encontramos em nenhum indivíduo de *Thoropa megatympanum* e em alguns indivíduos de *T. miliaris*. Nas outras espécies do grupo *miliaris* ela aparece na parte posterior do corpo, entre o espiráculo e o tubo cloacal. Em um indivíduo de *T. saxatilis*, a encontramos quase completa, assemelhando-se às expansões do grupo *petropolitana* (Figura 13). O espiráculo do gênero é pouco visível, com a parede interna inexistente, o que lhe confere a aparência de um buraco no corpo (Figura 13). No grupo *miliaris* ele se posiciona medialmente à expansão dérmica posterolateral e no grupo *petropolitana* ele fica abaixo da expansão dérmica posterolateral (Figura 13).

Nos girinos de todas as espécies do gênero a nadadeira ventral possui um sulco medial (*sensu* Dias 2018) (Figura 14). Nas espécies do grupo *miliaris* esse sulco ocupa quase todo o comprimento da cauda, desde o tubo cloacal até o final dela. Em *Thoropa petropolitana* esse sulco começa na parte distal da cauda, sendo que no início da cauda a espécie não apresenta nadadeiras. *Thoropa lutzi* possui nadadeiras desde o início da cauda, como as espécies do grupo *miliaris*, mas o sulco começa a partir do meio da nadadeira (Figura 14). A nadadeira dorsal de *Thoropa* é estreita e começa no terço final da cauda, com exceção de *T. megatympanum* que possui uma nadadeira mais larga a partir do meio da cauda (Figura 14).

Tabela 2: Características analisadas em adultos e larvas das espécies de *Thoropa*, com os respectivos estados. As referências das características seguem os seguintes símbolos: † = Duellman (1970); ● = Grant et al. (2017); ◆ = Grant et al. (2006); * = Rebouças et al. (2017); ♠ = Luna et al. (2018); ♣ = Taboada et al. (2013); § = Dias (2018); §§ = Dias (2018) adaptado; ※ = McDiarmid e Altig (1999); ♥ = Colaço (2018). Significado das siglas: PDV = processo dentígero do vômer; AN = almofadas nupciais; PFE = PEPs em formato de espinho; PFC = PEPs em formato de cone; EDP = expansão dérmica posterolateral; SM = sulco medial; TC = tubo cloacal; NA = “não se aplica”.

Característica	Estados					
	<i>T. miliaris</i>	<i>T. megatympanum</i>	<i>T. taophora</i>	<i>T. saxatilis</i>	<i>T. petropolitana</i>	<i>T. lutzi</i>
Adultos						
Formato do focinho em vista dorsal†	elíptico	elíptico	elíptico	elíptico	elíptico	elíptico
Formato do focinho em vista lateral†	oval	oval	oval	oval	elíptico	elíptico
Ocorrência do saco vocal●	ausente	ausente	ausente	ausente	presente	presente
Estrutura do saco vocal●	NA	NA	NA	NA	pareado e lateral	pareado e lateral
Ocorrência da fenda vocal	ausente	ausente	ausente	ausente	presente	presente
Formato da língua	oval/elíptica	cordiforme/elíptica	oval/elíptica	oval/elíptica	elíptica	redomda
Formato da prega supratimpânica	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica
Formato do anel timpânico	circular completo	circular completo	circular completo	circular completo	circular completo	circular completo
Ocorrência da membrana timpânica	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Formato da narina	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica	elíptica
Lábio inferior relativo ao lábio superior	menor	menor	menor	menor	menor	menor
Formato da coana	circular	circular	circular	circular	circular	circular
Sínfise mandibular	única	única	única	única	única	única
Fosseta maxilar	única	única	única	única	única	única
Processo dentígero do vômer	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Posição do PDV em relação às coanas	entre	entre	entre	entre	entre	entre
Continuidade do PDV	descontínuo	descontínuo	descontínuo	descontínuo	descontínuo	descontínuo
Tubérculos no canto posterior da boca	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Menisco	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Tubérculo metacarpal externo	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Tubérculo metacarpal interno◆	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Tubérculos sueranumerários da mão◆	presentes	presentes	presentes	presentes	ausentes	ausentes
Tubérculo subarticulares das mãos	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Comprimento do dedo V◆	passa a pen. art. do dedo IV	passa ou quase alcança a pen. art. do dedo IV	passa a pen. art. do dedo IV	alcança ou quase alcança a últ. art. do dedo IV	passa a pen. art. do dedo IV	quase alcança, alcança ou passa a últ. art. do dedo IV
Comprimento relativo dos dedos II e III◆	II > III	II > III	II > III	II < III	II < III	II < III
Ordem de tamanho dos dedos da mão	III < II < V < IV	III < II < V < IV	III < II < V < IV	II < III < V < IV	II < III ≤ V < IV	II < III < V < IV
Discos digitais◆	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes
Morfologia da AN nos machos♣	PFE	PFE	PFE	PFE	PFE	PFC
AN na articulação metacarpal-falangeal do dedo II dos machos*	presente	presente	presente	presente	presente	presente

Queratinização das maxilas‡	completa	completa	completa	completa	completa	completa
Eixo de maior desenvolvimento das maxilas‡	vertical	vertical	vertical	vertical	vertical	vertical
Fórmula dentária	2(2)/3[1]	2(2)/3(1)	2(2)/3(1)	2(2)/3(1)	2(2)/3(1)	2(2)/3(1)
Sistema de linha lateral	não visível	não visível	não visível	não visível	não visível	não visível
Ocorrência da parede interna do espiráculo‡	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Posicao do espiráculo em relação ao eixo medial longitudinal do corpo‡	abaixo/na mesma linha	abaixo/na mesma linha	abaixo/na mesma linha	abaixo/na mesma linha	abaixo	abaixo
Posição dos olhos‡	dorsal	dorsal	dorsal	dorsal	dorsal	dorsal
Orientação dos olhos‡	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral
Menisco♥	ausente/presente	ausente/presente	ausente/presente	ausente/presente	ausente/presente	ausente/presente
Posição das narinas‡	dorsais	dorsais	dorsais	dorsais	dorsais	dorsais
Orientação das narinas‡	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral	anterolateral
Aro carnososo das narinas‡	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Estrutura da parede ventral do corpo‡	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
EDP (termo de Dias 2018)	ausente/sutil	ausente	estreita	estreita	larga	larga
Extensão da EDP no corpo	NA/posterior	NA	posterior	posterior/completa	completa	completa
Posição do espiráculo relativa à EDP	NA/medial	NA	medial	medial	abaixo	abaixo
Abertura do tubo cloacal‡	oval	oval	oval	oval	oval	oval
Posição do tubo cloacal‡	medial	medial	medial	medial	medial	medial
Direção da abertura do tubo cloacal‡	medial	medial	medial	medial	medial	medial
Ligação da parede dorsal do TC‡‡‡	na base da cauda	na base da cauda	na base da cauda	na base da cauda	na base da cauda	na base da cauda
Ligação das paredes laterais do TC‡‡‡	livres	livres	livres	livres	livres	livres
Formato aproximado da borda da parede dorsal do TC	côncavo	côncavo	côncavo	côncavo	côncavo	côncavo
Formato aproximado da borda da parede ventral do TC	arredondado/reto	arredondado/reto	arredondado/reto	arredondado/reto	identada medialmente	côncavo
Regularidade da borda da parede ventral do TC	regular/irregular	regular/irregular	regular/irregular	regular/irregular	regular	regular
Formato da ponta da cauda‡	acuminada	acuminada	acuminada	acuminada	acuminada	acuminada
Origem da nadadeira dorsal‡	no terço posterior da cauda	posterior à junção do corpo com a cauda	no terço posterior da cauda	no terço posterior da cauda	no terço posterior da cauda	no terço posterior da cauda
Altura relativa das nadadeiras‡‡	abaixo	na linha ou mais alta	abaixo	abaixo	abaixo	abaixo
Extensão do SM da nadadeira ventral na cauda‡	quase completo ou completo	quase completo ou completo	quase completo ou completo	quase completo ou completo	porção distal	porção medial
Coloração da cauda	listras acompanhando os miômeros	listras acompanhando os miômeros	listras acompanhando os miômeros	listras acompanhando os miômeros	em losango	listras acompanhando os miômeros



Figura 6: Detalhes de fendas e sacos vocais em algumas espécies de *Thoropa*. (a) Vista dorsal da cabeça, sem saco vocal, *T. miliaris*, Paraty, RJ (CFBH 30617); (b) dobra muscular no assoalho da boca (seta preta), *T. miliaris*, Domingos Martins, ES (CFBH 32555); (c) sacos vocais pareados (setas pretas), *T. petropolitana*, Magé, RJ (EI 2586); (d) fendas vocais (setas pretas), *T. petropolitana*, Magé, RJ (EI 2586).

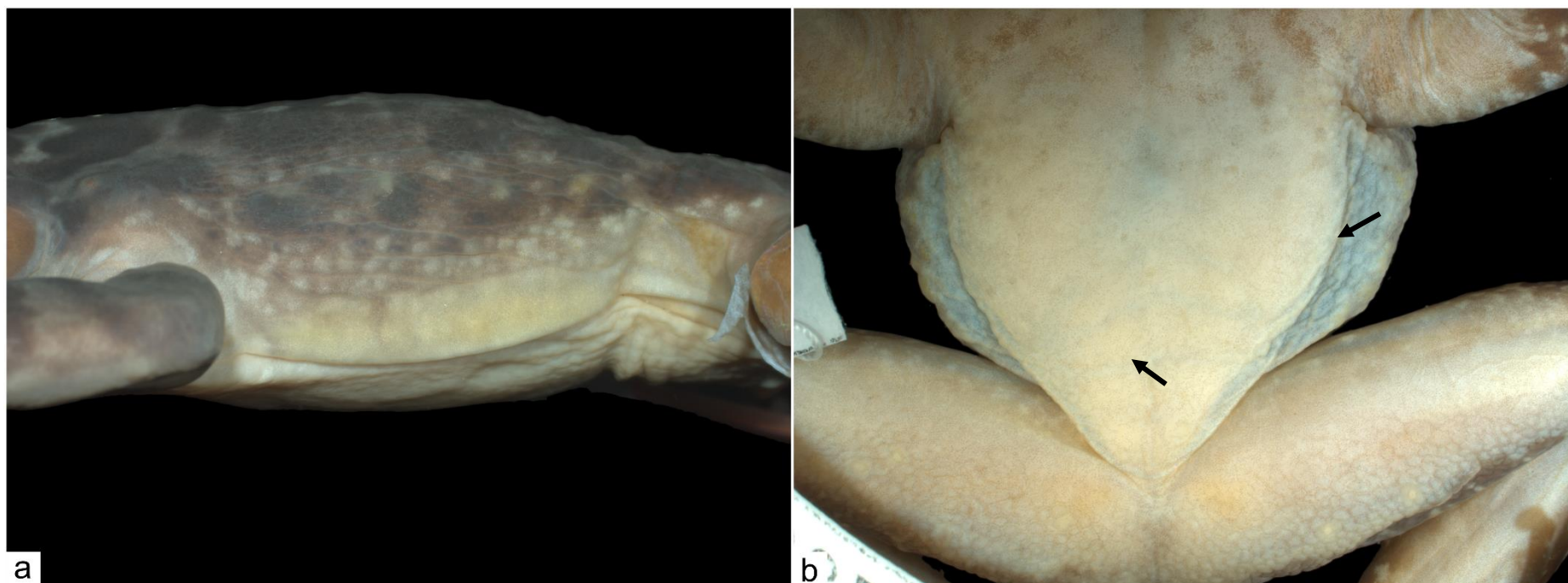


Figura 7: Detalhes do flanco e do abdomen das espécies de *Thoropa*. (a) Vista lateral do corpo, mostrando os grânulos laterais na pele, *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC (MCP 11918); (b) vista ventral do abdomen, com prega discoidal (setas pretas), *T. miliaris*, Domingos Martins, ES (CFBH 32555).

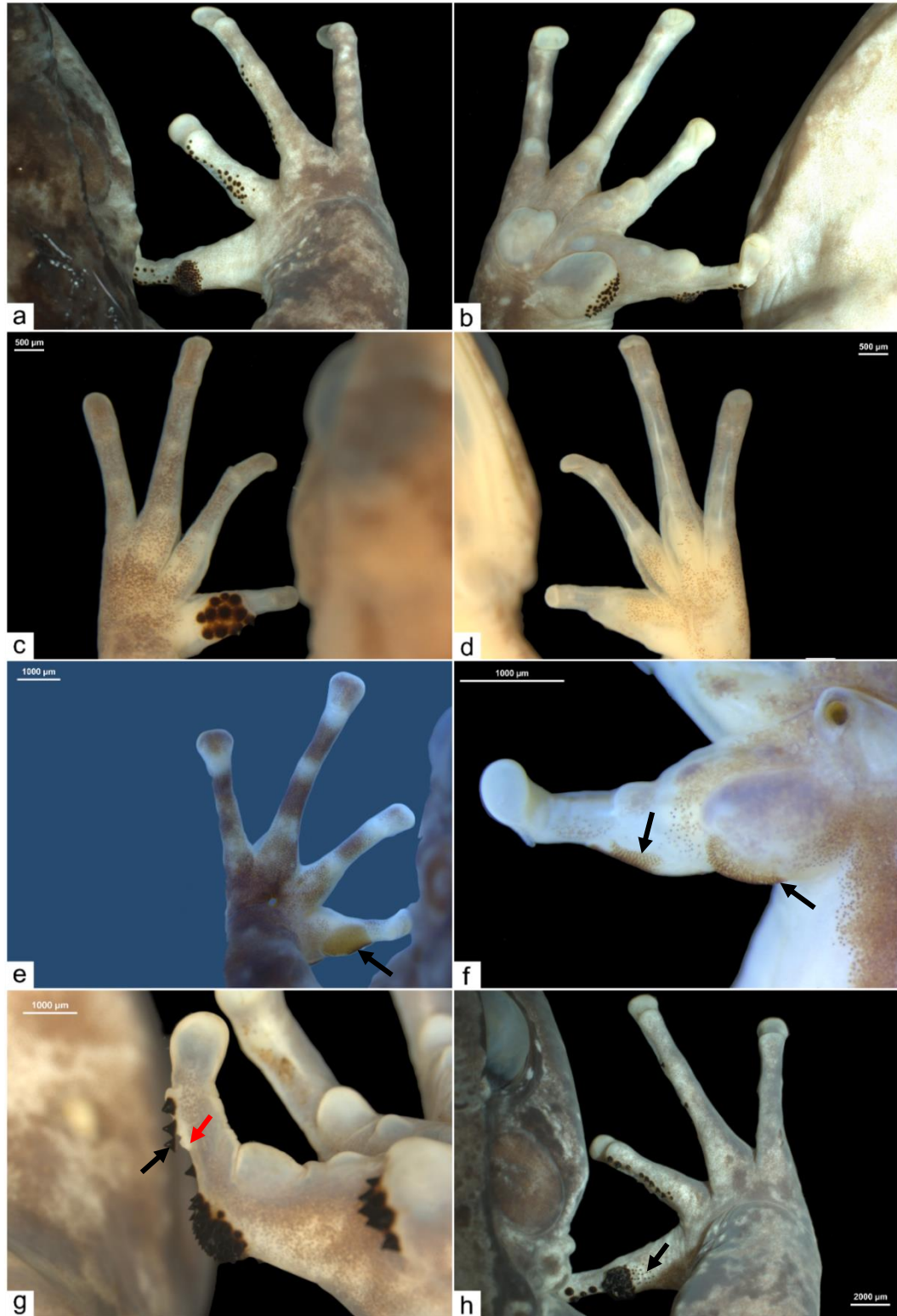


Figura 8: Mãos de algumas espécies de *Thoropa*, com detalhes das almofadas nupciais com projeções epidérmicas PEPres. (a, b) Vistas dorsal e ventral de *T. taophora* de São Sebastião, SP (CFBH 15595) com PEPs na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno e nos dedos II, III e IV; (c, d) vistas dorsal e ventral de *T. petropolitana* de Guapimirim, RJ (EI 9474) mostrando a distribuição das PEPs na espécie; (e, f) vistas dorsal e ventral de *T. lutzi* do Rio de Janeiro, RJ (MZUSP 88241), com as PEPs em formato de cone (setas pretas); (g) estrato córneo escuro solto (seta preta) e estrato granuloso claro exposto (seta vermelha) em PEPs de *T. miliaris* de Paraty, RJ (CFBH 30617); (h) indivíduo de *T. miliaris* de Carangola, MG (CFBH 27292) com PEPs na parte dorsal do metacarpo do dedo II (seta preta).

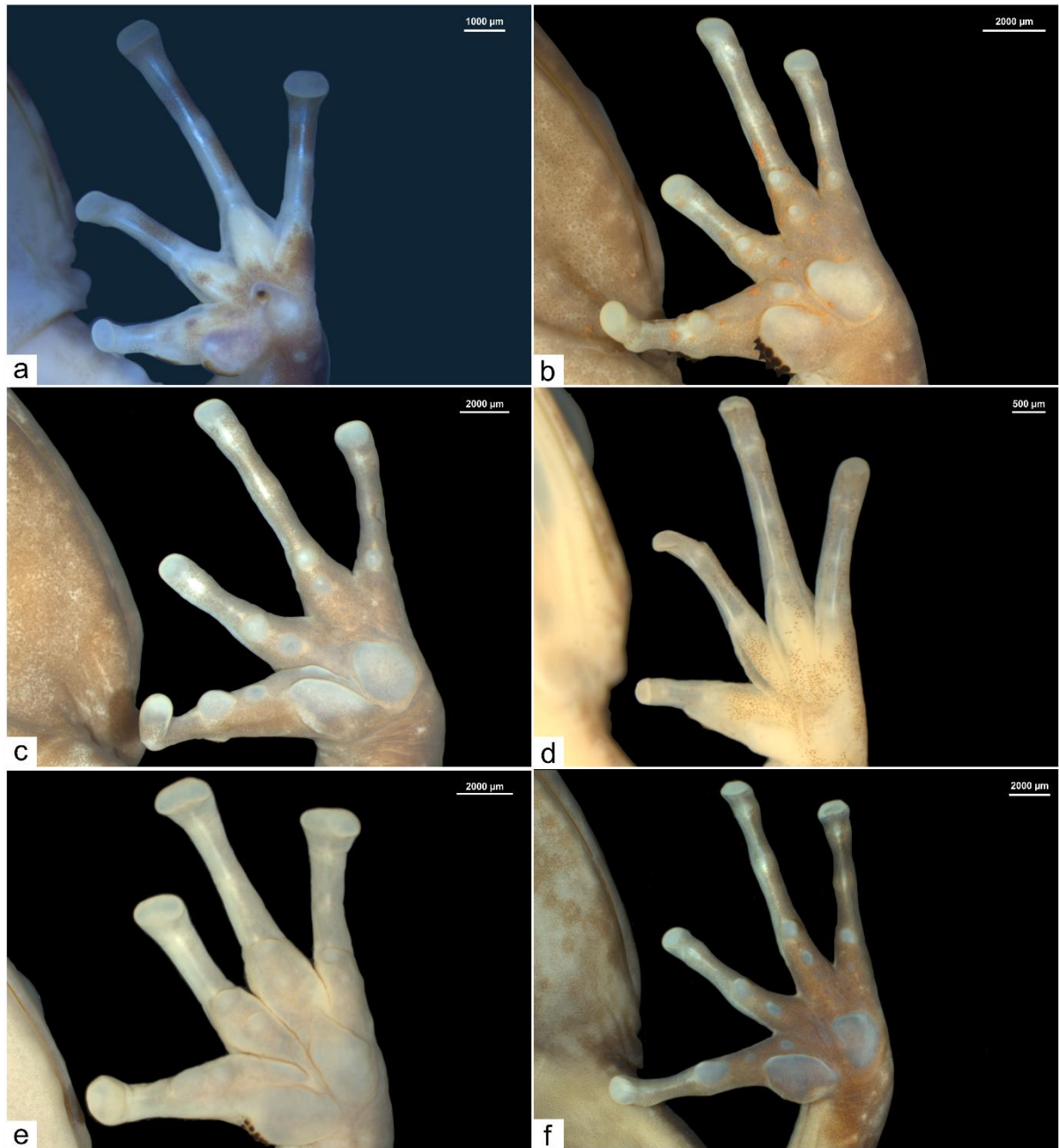


Figura 9: Vistas ventrais das mãos das espécies de *Thoropa*, (a) *T. lutzi*, Rio de Janeiro, RJ (MZUSP 88241); (b) *T. megatympanum*, Grão Mogol, MG (CFBH 10196); (c) *T. miliaris*, Mimoso do Sul, ES (CFBH 25478); (d) *T. petropolitana*, Guapimirim, RJ (EI 9474); (e) *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC (MCP 11918); (f) *T. taophora*, Ubatuba, SP (CFBH 7947).



Figura 10: Vistas ventrais dos pés das espécies de *Thoropa*. (a) *T. lutzi*, Alto Caparaó, MG (MZUSP 57952); (b) *T. megatympanum*, Grão Mogol, MG (CFBH 10196); (c) *T. miliaris*, Paraty, RJ (CFBH 30617), com detalhe para a quilha tarsal (seta preta); (d) *T. petropolitana*, Petrópolis, RJ (MNRJ 23344); (e) *T. taophora*, Ubatuba, SP (CFBH 7947), com detalhe para a quilha tarsal (seta preta); (f) *T. saxatilis*, Timbó do Sul, SC (MCP 11918).

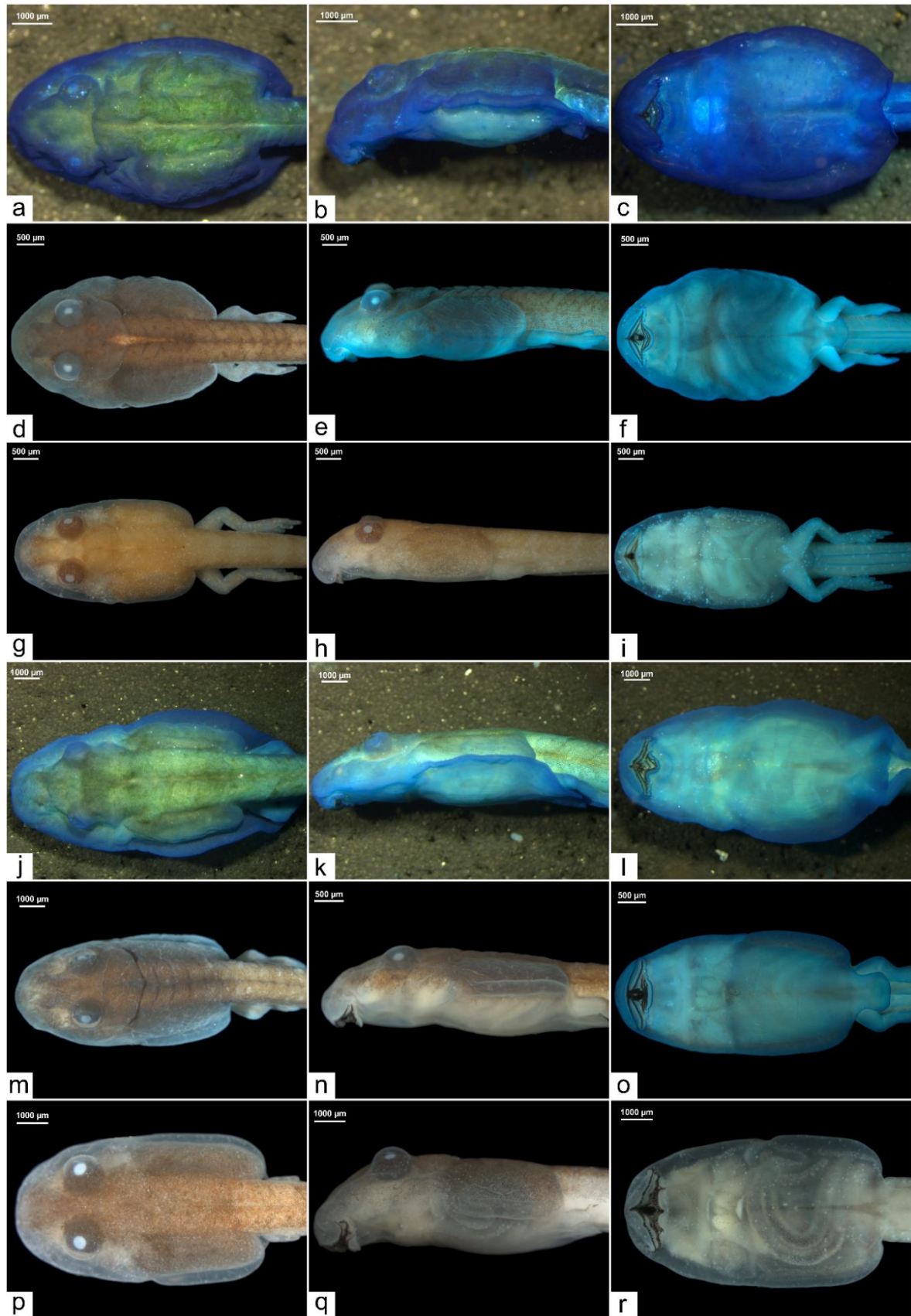


Figura 11: Vistas dorsais, laterais e ventrais das larvas de *Thoropa*. (a, b, c) *T. lutzi*, Rio de Janeiro, RJ (MZUSP 79301); (d, e, f) *T. megatympnum*, Santana do Riacho, MG (CFBH 39845); (g, h, i) *T. miliaris*, Rio de Janeiro, RJ (CFBH 9022); (j, k, l) *T. petropolitana*, Petrópolis, RJ (MZUSP 80015); (m, n, o) *T. saxatilis*, Maquiné, RS (MCP 7870); (p, q, r) *T. taophora*, Iguape, SP (CFBH 42156).

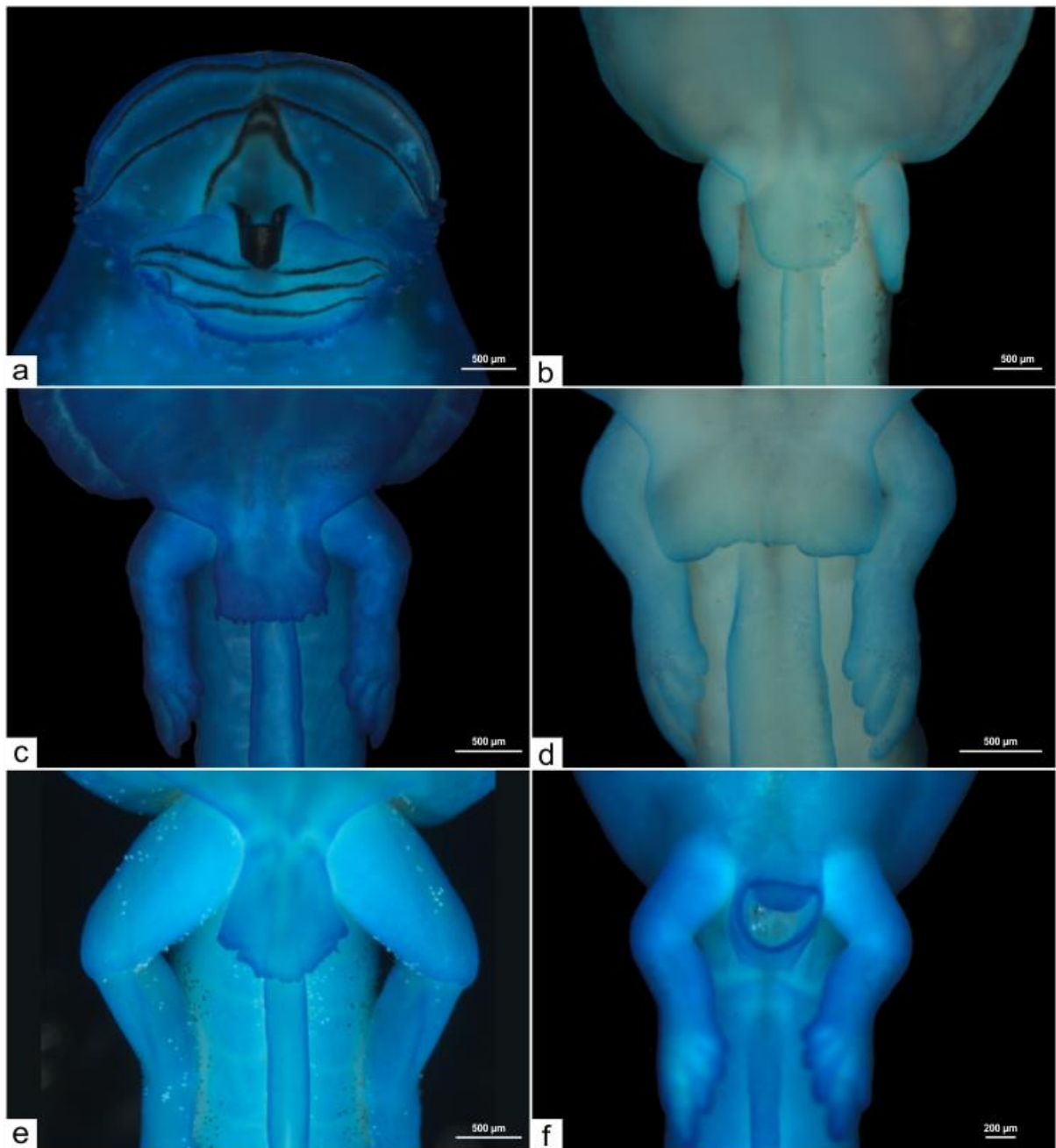


Figura 12: Detalhes da boca e tubo cloacal das larvas de *Thoropa*. (a) *T. miliaris*, Rio de Janeiro, RJ (CFBH 42224); (b) *T. miliaris*, Domingos Martins, ES (CFBH 41089); (c) *T. miliaris*, Ibitirama, ES (ZUEC 23660); (d) *T. saxatilis*, Três Forquilhas, RS (MCP 11933); (e) *T. megatympanum*, Santana do Riacho, MG (CFBH 39845); (f) *T. megatympanum*, Buenópolis, MG (DZSJRP 2416.1).

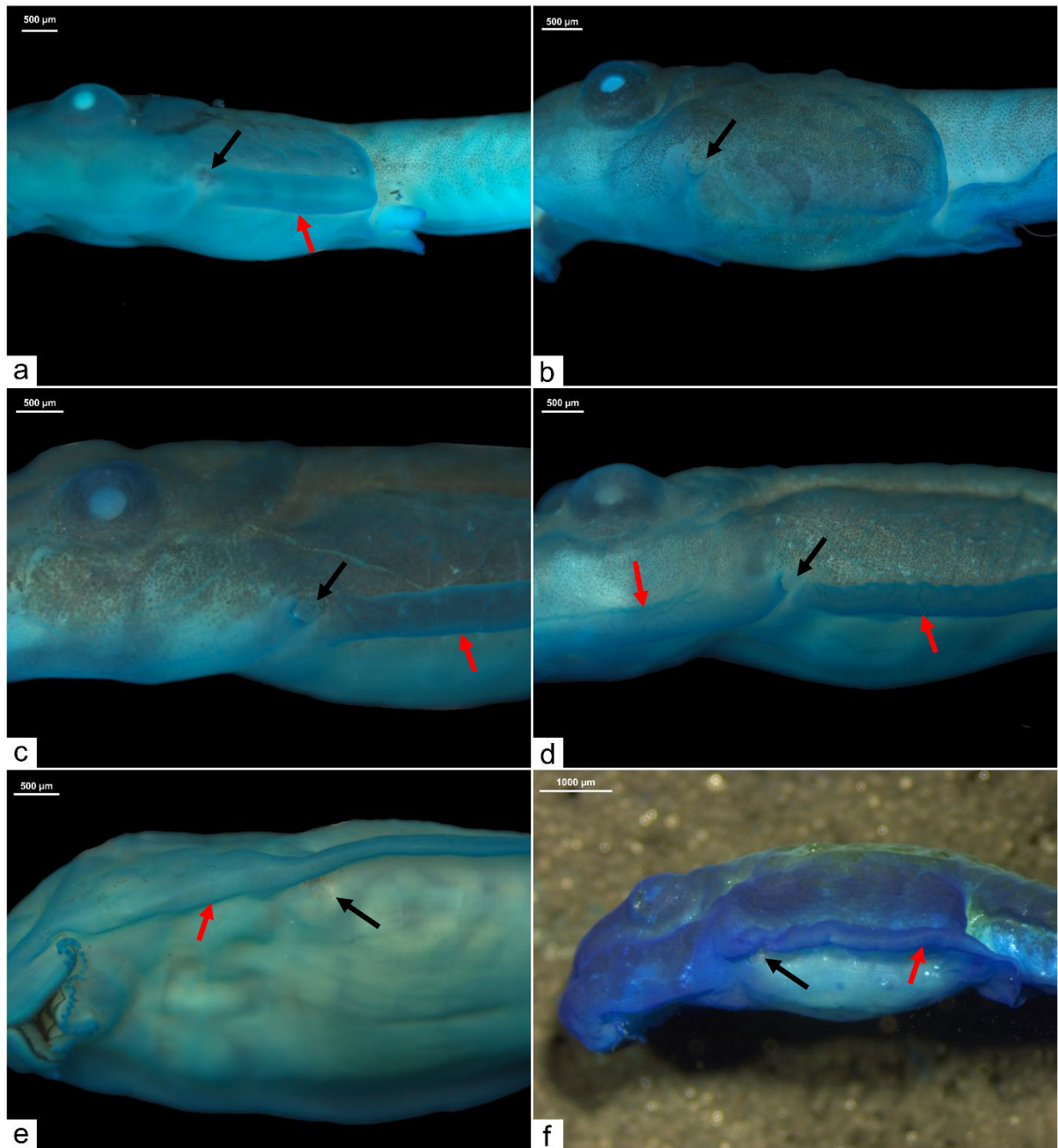


Figura 13: Detalhes do espiráculo (setas pretas) e expansão dérmica posterolateral (setas vermelhas) das larvas de *Thoropa* (a) *T. taophora*, São Sebastião, SP (CFBH 40946); (b) *T. miliaris*, Rio de Janeiro, RJ (CFBH 42223); (c) *T. saxatilis*, Maquiné, RS (MCP 7870); (d) *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC (MCP 12418); (e) *T. petropolitana*, Teresópolis, RJ (CFBH 25709); (f) *T. lutzi*, Rio de Janeiro, RJ (MZUSP 79301).

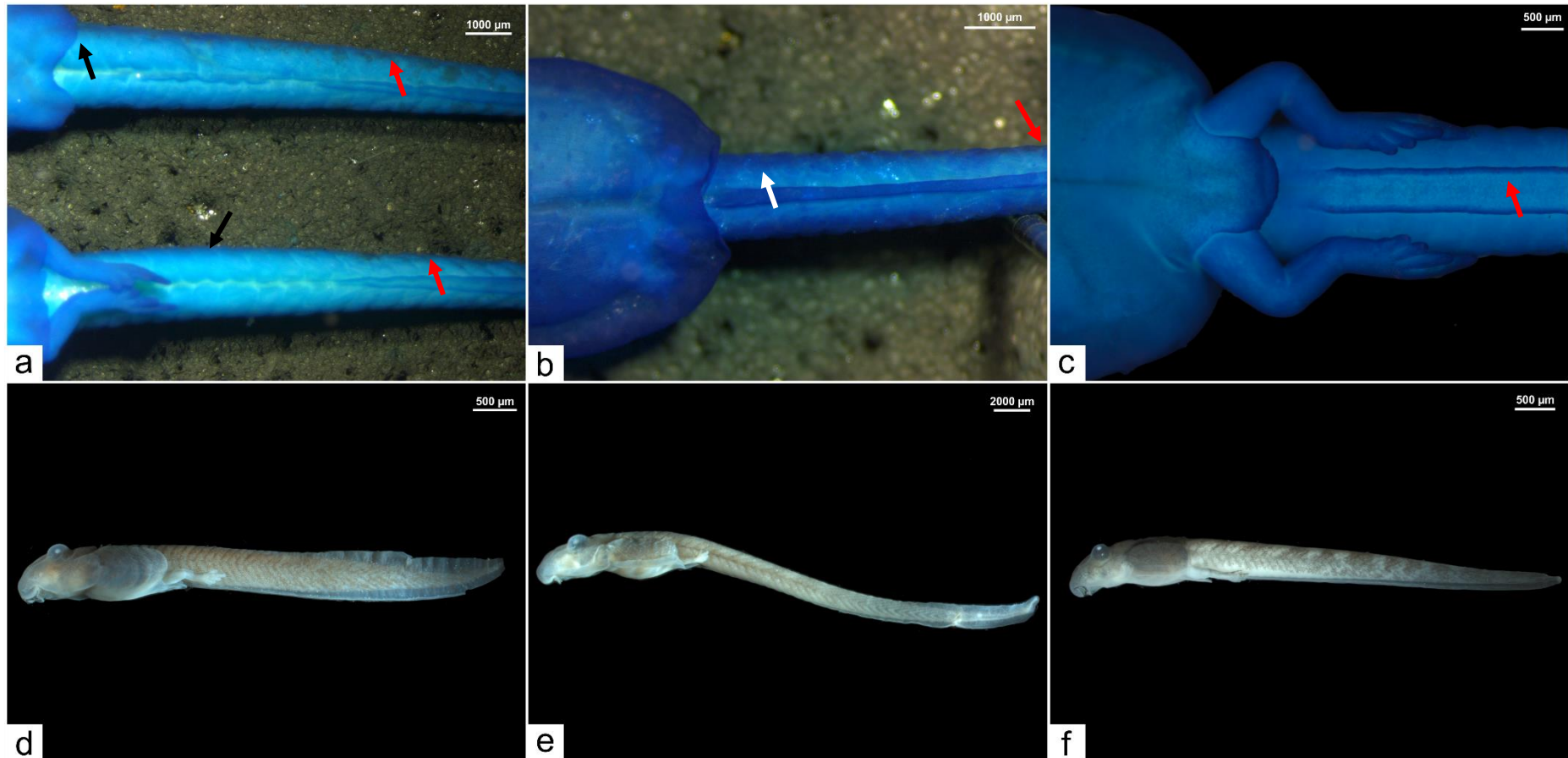


Figura 14: Detalhes das nadadeiras das larvas de *Thoropa*, mostrando (a, b, c) a ausência de nadadeiras (setas pretas), nadadeira sem sulco medial (seta branca) e nadadeiras com sulco medial (setas vermelhas), (a) dois indivíduos de *T. petropolitana*, Teresópolis, RJ (MZUSP 80015); (b) *T. lutzi*, Rio de Janeiro, RJ (MZUSP 79301); (c) *T. taophora*, Mogi das Cruzes, SP (MTTS G-84); (d) *T. megatympanum*, Santana do Riacho, MG (CFBH 39845); (e) *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC (MCP 12418); (f) *T. taophora*, Mogi das Cruzes, SP (MTTS G-84).

Coloração e desenho

Os pós-metamórficos de todas as espécies de *Thoropa* possuem padrões gerais de cor e desenho marmoreados, formando ou não desenhos definidos. Os membros e ventres das espécies são em geral muito parecidos, sendo que as maiores variações no gênero estão nos padrões de cor e desenho dorsais do corpo. Os membros, por exemplo, possuem barras claras e escuras intercaladas na face dorsal. Essas barras podem ser listras simples ou maculadas. Em material fixado a região ventral das espécies de *Thoropa* é em geral clara, ou em alguns exemplares ela é clara com máculas pretas ou cinzas escuro. Algumas espécies possuem manchas irregulares, outras possuem o ventre todo claro e sem manchas e algumas espécies possuem máculas na gula e no peito. Todas também parecem possuir uma faixa transversal na parte dorsal da cabeça, na altura dos olhos ou tímpanos. As espécies do grupo *miliaris* são as que mais possuem variação de desenho dorsal, diferentemente das espécies do grupo *petropolitana* que praticamente não variam. Todas as espécies parecem também possuir uma mancha mais clara no dorso, em geral arredondada, embora possa possuir bordas irregulares.

Existe apenas um registro em vida de *T. petropolitana* e para *T. lutzi* existe apenas registro de exemplares das populações do estado do Espírito Santo (Figura 15), então não pudemos analisar a variação de cor em vida nesse grupo. Baseado em material fixado, as espécies do grupo *petropolitana* não possuem variação no desenho dorsal e são caracterizadas basicamente por um desenho em forma de “X” no dorso, sendo que a parte de cima do “X” se assemelha a um triângulo invertido, cuja base é a faixa transversal supracitada.

Os exemplares de *Thoropa megatympanum* e *T. saxatilis* possuem um padrão um pouco mais marmoreado no dorso, com variação em cores (Figuras 16 e 17) e com manchas irregulares e espalhadas (Figuras 19 e 20). Em *T. miliaris* e *T. taophora* é possível definir desenhos no dorso, em geral em formato de “T”, ou de “H”, ou às vezes formando faixas ou retângulos, todos com variação de cores (Figuras 17 e 18). Esses desenhos são pouco variados em *T. taophora*, ao contrário de *T. miliaris* que inclusive apresenta indivíduos sem desenhos definidos (Figuras 21, 22 e 23).

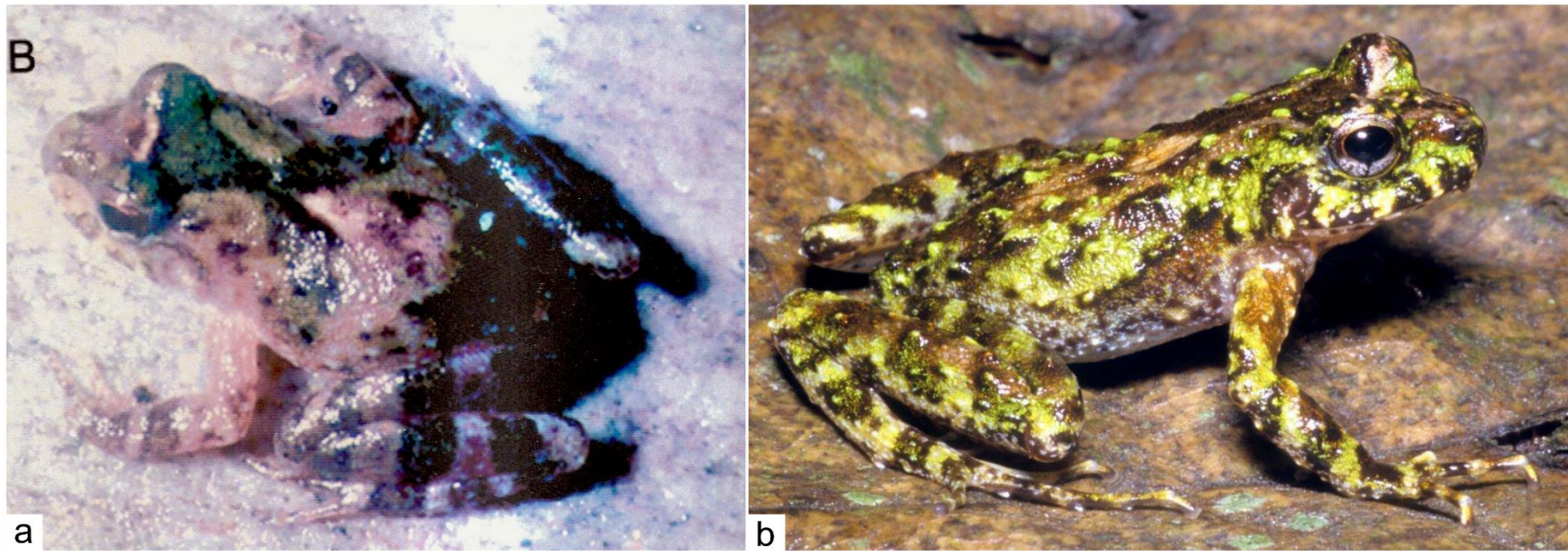


Figura 15: Exemplo de cor e desenho dorsal em exemplares vivos do grupo *petropolitana*. (a) *Thoropa petropolitana*, Magé, RJ, foto de Eugênio Izecksohn; (b) *T. lutzi*, Muniz Freire, ES, foto de João L. Gasparini.

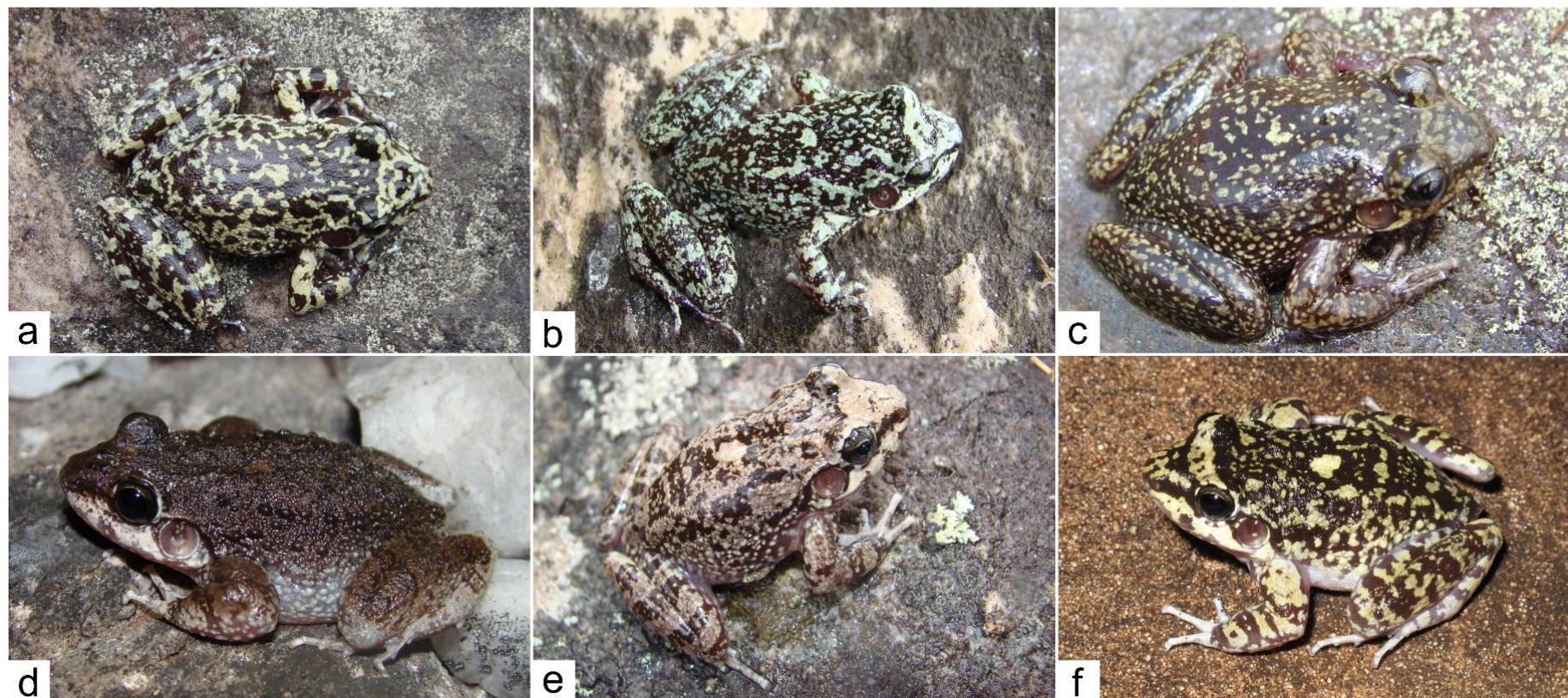


Figura 16: Variação de cor e desenho dorsal de *Thoropa megatympanum*. (a, b) Botumrim, MG, foto de Fernando Leal; (c) Itacambira, MG, foto de Fernando Leal; (d, e) Serra d'Anta, Itacambira, MG, foto de Fernando Leal; (f) Santana do Riacho, MG, foto de Célio F. B. Haddad.

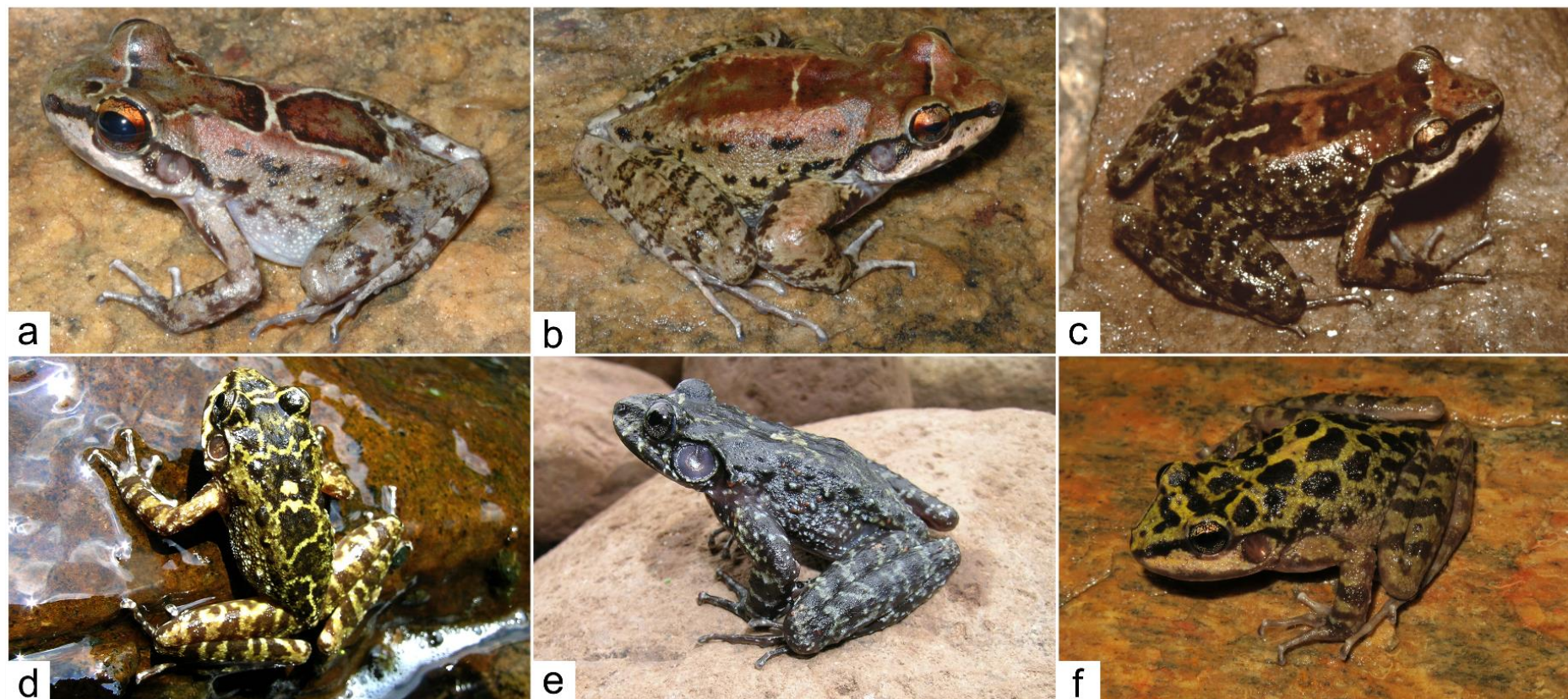


Figura 17: Variação de cor e desenho dorsal de *Thoropa taophora* e *T. saxatilis*. (a, b) *T. taophora*, Ubatuba, SP, fotos de Célio F. B. Haddad; (c) *T. taophora*, Iguape, SP, foto de Célio F. B. Haddad; (d) *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC, foto de Patrick Colombo; (e) *T. saxatilis*, Três Forquilhas, RS, foto de Patrick Colombo; (f) *T. saxatilis*, Timbé do Sul, SC, foto de Célio F. B. Haddad.



Figura 18: Variação de cor e desenho dorsal de *Thoropa miliaris*. (a) MNRJ 84074, Santa Teresa, ES, foto de José P. Pombal Jr.; (b) Santa Teresa, ES, foto de Célio F. B. Haddad; (c) AAG-UFU 6166, Santa Teresa, ES, foto de Thiago Carvalho; (d) AAG-UFU 477, Chiador, MG, foto de Thiago Carvalho; (e, f, g, h) Ibitirama, ES, fotos de Célio F. B. Haddad.

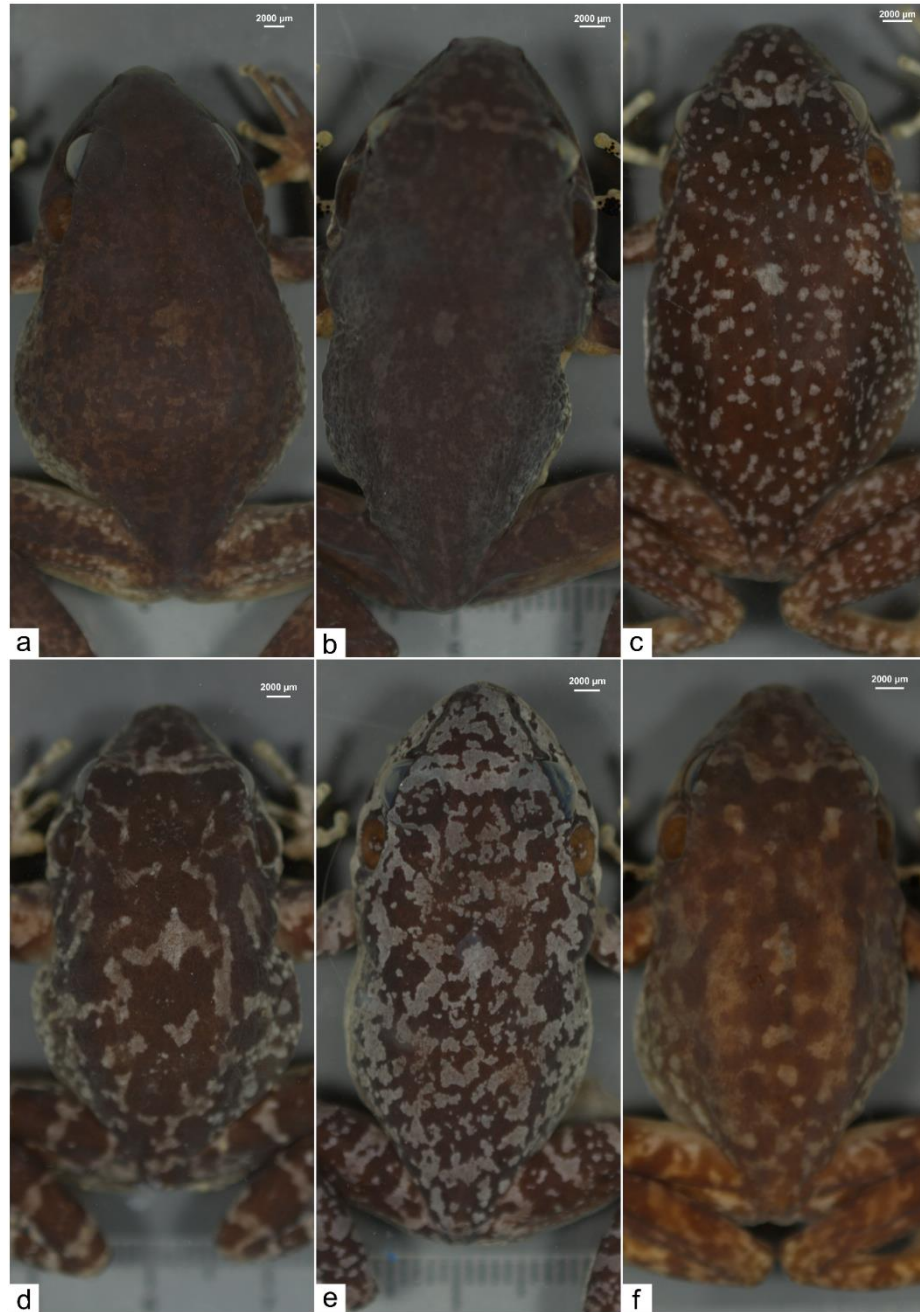


Figura 19: Variação de desenho dorsal de *Thoropa megatympenum*. (a) UFMG 11441, Buenópolis, MG; (b) UFMG 15309, Cristália, MG; (c) UFMG 9351, Itacambira, MG; (d) UFMG 14248, Serra Azul de Minas, MG; (e) UFMG 12209, Botumirim, MG; (f) MCNAM 2069, Santana do Riacho, MG.

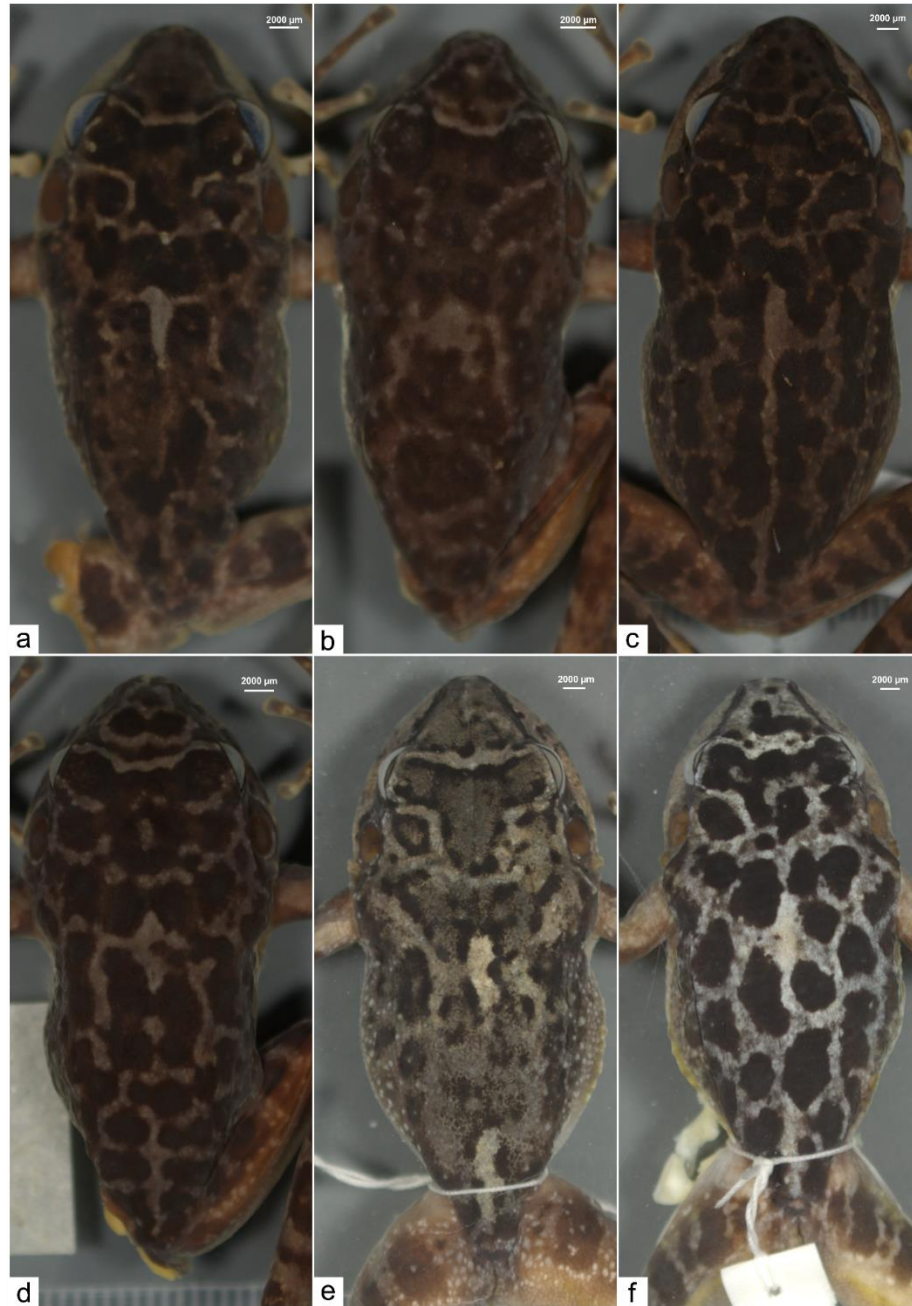


Figura 20: Variação de desenho dorsal de *Thoropa saxatilis*. (a) MCP 11918, Timbé do Sul, SC; (b) MCP 10691, Três Forquilhas, RS; (c) MCP 11916, Timbé do Sul, SC; (d) MCP 10706, Três Forquilhas, RS; (e) CFBH 44455, Timbé do Sul, SC; (f) CFBH 44457, Timbé do Sul, SC.

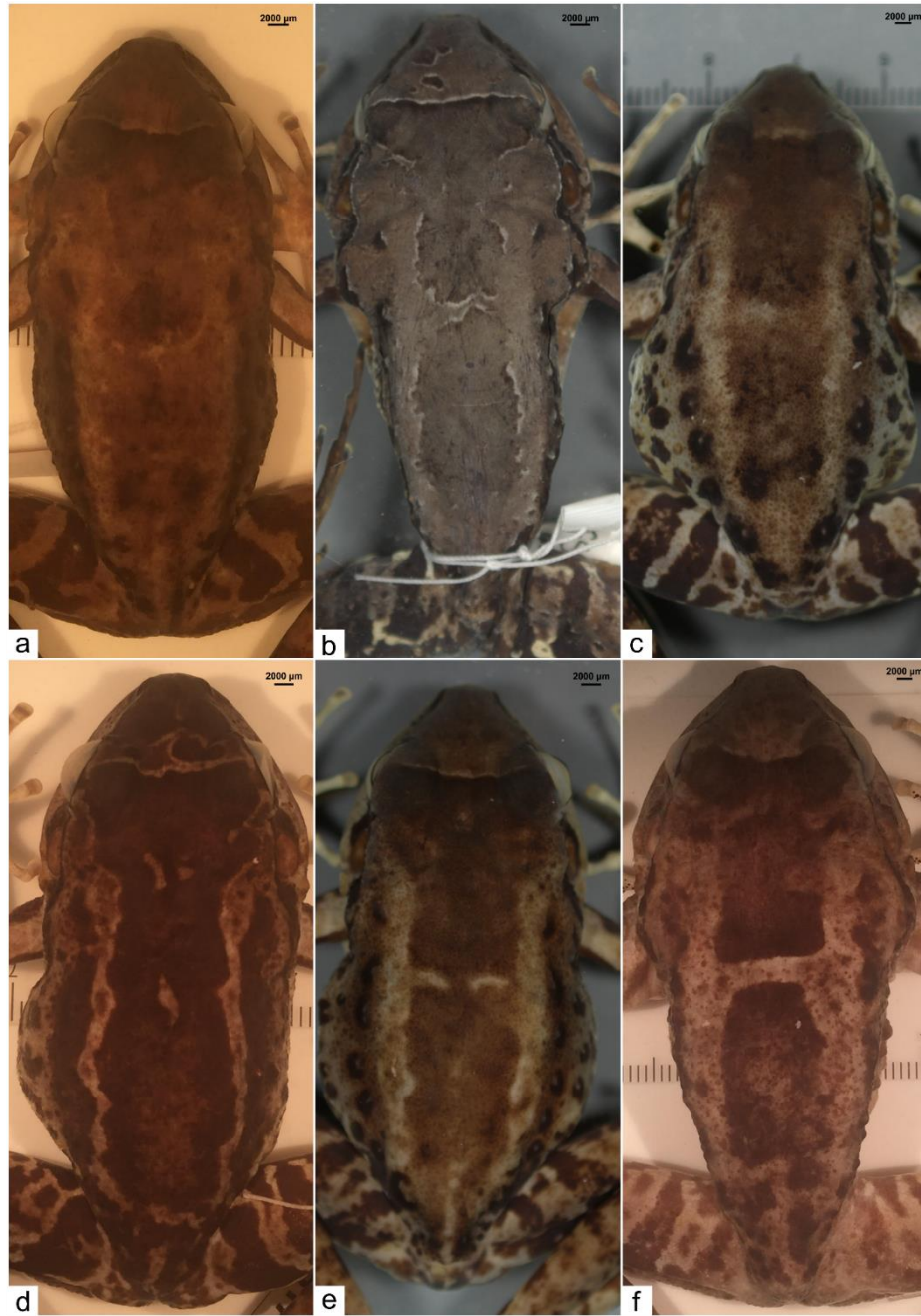


Figura 21: Variação de desenho dorsal em *Thoropa taophora*. (a) CFBH 19707, Caraguatatuba, SP; (b) CFBH 42210, Ubatuba, SP; (c) CFBH 42349, Ubatuba, SP; (d) CFBH 15664, Ubatuba, SP; (e) CFBH 7946, Ubatuba, SP; (f) CFBH 15646, Ubatuba, SP.

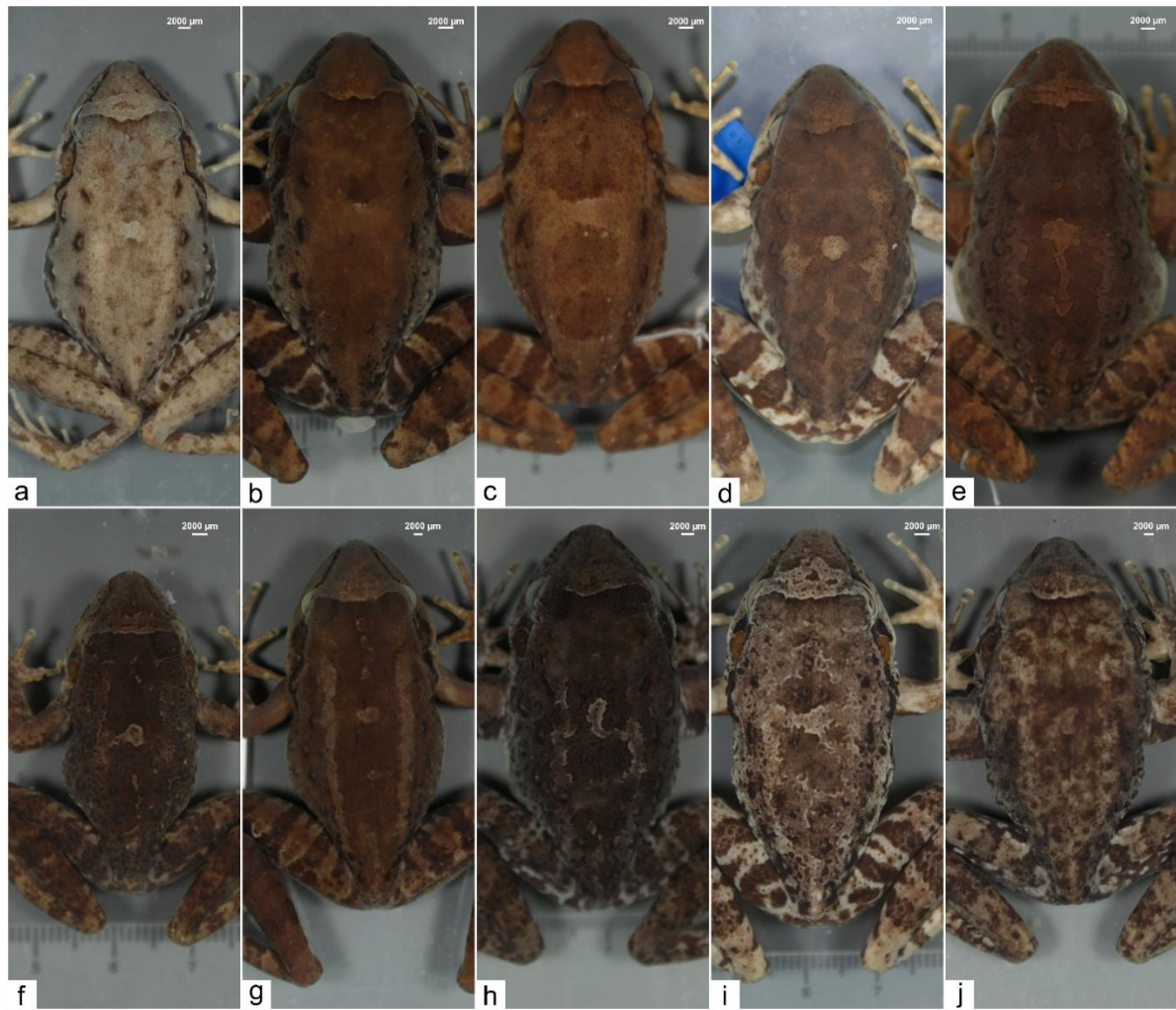


Figura 22: Variação de desenho dorsal de *Thoropa miliaris*. (a) MZUFV 3918, Alto Caparaó, MG; (b) MZUESC 15873, Potiraguá, BA, (c) MZUESC 17424, Domingos Martins, ES; (d) CFBH 42178, Paraty, RJ; (e) CFBH 27364, Santa Maria Madalena, RJ; (f) CFBH 27401, Cachoeiras de Macacu, RJ; (g) MZUFV, Caratinga, MG; (h) UFMG 8353, São Gonçalo do Rio Abaixo, MG; (i) ZUEC 23585, Ibitirama, ES; (j) MNRJ 25995, Muniz Freire, ES.



Figura 23: Variação de desenho dorsal de *Thoropa miliaris*. (a) CFBH 39015, Muriaé, MG; (b) MNRJ 83782, Além Paraíba, MG, (c) MNRJ 26435, Rio de Janeiro, RJ; (d) CFBH 18818, Teresópolis, RJ; (e) MBML 4353, Santa Teresa, ES; (f) UFMG 582, Araponga, MG; (g) CFBH 28069, São Fidélis, RJ; (h) ZUEC 23586, Ibitirama, ES; (i) MZUFV 14987, São Antônio de Pádua, RJ; (j) UFMG 15621, Santa Rita do Itueto, MG.

Morfometria de adultos

Sintetizamos a variação morfométrica de todas as espécies (Tabela 3) com os respectivos intervalos, médias, desvios padrões e quantidades de indivíduos analisados, para machos e fêmeas, apresentadas em gráficos de caixas (Figuras 24 a 29). Como medimos mais indivíduos para analisar CRC, diâmetro relativo do tímpano e espessura relativa dos braços, a quantidade de indivíduos varia para cada análise (Tabela 3). O CRC das espécies do grupo *petropolitana* mostrou-se menor do que o CRC das espécies do grupo *miliaris*, porém não é possível ver diferenças significativas entre as linhagens dentro do grupo *miliaris* (Figura 24). O grupo *petropolitana* também é o único que aparenta ter fêmeas maiores do que os machos, embora exista certa sobreposição (Figura 24).

Tanto no grupo *petropolitana* quanto no grupo *miliaris* os machos adultos apresentam antebraços mais espessos que as fêmeas adultas (Figura 25). Já para os braços, o grupo *petropolitana* não apresenta diferenças significativas (Figura 26). Para o diâmetro do tímpano, notamos que *Thoropa saxatilis* e *T. megatympanum* são as que possuem maiores diâmetros, porém os diâmetros timpânicos de *T. saxatilis* são proporcionalmente maiores quando comparados com o diâmetro ocular do que quando comparados com o comprimento da cabeça (Figuras 27 e 28). A quantidade de PEPs no dedo IV da mão esquerda do grupo *miliaris* possui bastante sobreposição entre as espécies, embora *T. taophora* contenha os indivíduos com as maiores quantidade de PEPs, principalmente na linhagem tao-1 (Figura 29).

A maioria das análises de variância (ANOVA) feitas para os gráficos de caixas mostrou que existe pelo menos um grupo com diferenças significativas entre as médias (Figuras 24 a 29). As exceções foram as análises feitas para os diâmetros do antebraço e do braço das fêmeas analisadas por linhagens (Figuras 25 e 26) e as análises feitas para o diâmetro do braço dos machos analisados por linhagens, tanto sob o critério de macho adulto de Feio et al. (2006) quanto sob o nosso critério de adulto (Figura 26). Os testes par-a-par não planejados de Tukey mostraram muitas diferenças significativas entre grupos nas análises feitas com machos entre espécies sob ambos os critérios de adulto supracitados (Apêndices 10 e 11). Contrariamente, as diferenças entre as médias dos diâmetros dos braços e antebraços de fêmeas e machos mostraram-se não significativas (Apêndice 9).

Tabela 3 (próxima página): Descrição da variação morfométrica das seis espécies de *Thoropa*, para as 15 medidas utilizadas nesse estudo. A coluna “Desc.” refere-se às estatísticas descritivas (intervalo, média, desvio padrão, e tamanho amostral), sendo que: “[]” indica o intervalo (valor mínimo e valor máximo) da amostra; “X” indica a média da amostra; “S” indica o desvio padrão da amostra; “n” indica o tamanho da amostra. Os valores estão apresentados separadamente para fêmeas (♀) e machos (♂).

Med.	Desc.	<i>T. miliaris</i>		<i>T. petropolitana</i>		<i>T. taophora</i>		<i>T. lutzi</i>		<i>T. megalympanum</i>		<i>T. saxatilis</i>	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
CRC	[]	[37.6, 68.11]	[21.21, 99.42]	[19.28, 26.4]	[14.21, 22.87]	[43.83, 66.54]	[23.3, 101.7]	-	[20.6, 27.3]	[32.42, 54.02]	[22.74, 59.47]	[28.07, 51.7]	[25.16, 56.57]
	X ± S n	51.77 ± 7.68 47	50.73 ± 11.81 430	23.31 ± 2.03 11	19.35 ± 1.47 184	59.08 ± 10.39 4	59.7 ± 15.36 104	26.13 1	23.64 ± 1.91 44	42.62 ± 4.74 28	40.35 ± 7.16 241	36.97 ± 7.24 15	39.4 ± 9.44 29
LC	[]	[15.5, 28.23]	[7.22, 43.8]	[7.04, 8.78]	[5.58, 8.32]	[17.59, 26.72]	[8.75, 42.61]	-	[6.95, 10.19]	[14.26, 20.94]	[9.83, 24.51]	[10.87, 18.31]	[10.53, 24.19]
	X ± S n	20.57 ± 3.25 38	20.92 ± 5.41 324	8.16 ± 0.57 11	7.21 ± 0.52 107	23.22 ± 4 4	24.13 ± 6.32 82	8.81 1	8.42 ± 0.89 43	17.89 ± 1.95 25	17.41 ± 3.29 158	14.33 ± 2.11 15	15.86 ± 3.64 29
CC	[]	[14.85, 27.01]	[8.01, 40.69]	[6.68, 9.32]	[5.41, 8.33]	[17.69, 25.82]	[8.85, 39.23]	-	[7.65, 10.8]	[12.19, 19.5]	[9.15, 22.24]	[10.59, 21.3]	[10.05, 23.89]
	X ± S n	19.53 ± 3.15 38	19.87 ± 4.74 324	8.06 ± 0.71 11	7.29 ± 0.55 107	22.51 ± 3.54 4	23.05 ± 5.68 82	9.14 1	8.63 ± 0.87 43	16.24 ± 1.82 25	15.99 ± 2.89 158	14.81 ± 3.2 15	16.14 ± 4.25 29
DT	[]	[3.08, 5.73]	[1.68, 6.95]	[1.14, 1.82]	[0.96, 2.26]	[3.52, 4.67]	[1.86, 7.16]	-	[1.31, 2.31]	[3.3, 5]	[1.87, 6.42]	[2.37, 5.19]	[2.11, 6.68]
	X ± S n	4.14 ± 0.56 38	4.32 ± 0.9 324	1.53 ± 0.23 11	1.45 ± 0.21 107	4.16 ± 0.48 4	4.39 ± 0.94 82	1.85 1	1.84 ± 0.25 43	4.17 ± 0.45 25	4.18 ± 0.83 158	3.4 ± 0.84 15	4.33 ± 1.49 29
DO	[]	[4.3, 8.12]	[2.59, 8.9]	[2.23, 3.01]	[1.7, 2.98]	[5.27, 7.78]	[2.56, 9.15]	-	[2.06, 3.61]	[3.8, 5.49]	[2.88, 5.94]	[2.62, 5]	[2.83, 5.78]
	X ± S n	5.42 ± 0.83 38	5.33 ± 1.02 324	2.59 ± 0.25 11	2.34 ± 0.25 107	6.33 ± 1.05 4	6.1 ± 1.27 82	2.54 1	2.89 ± 0.37 43	4.54 ± 0.49 25	4.4 ± 0.7 158	3.68 ± 0.69 15	4.18 ± 0.81 29
DIO	[]	[3.52, 6.55]	[1.84, 12.07]	[1.62, 2.18]	[1.02, 1.99]	[5.04, 6.39]	[3.49, 10.42]	-	[1.53, 2.67]	[3.35, 5.01]	[2.71, 6.65]	[2.96, 4.63]	[2.06, 6.73]
	X ± S n	5.43 ± 0.9 16	5.07 ± 1.43 182	1.86 ± 0.25 5	1.57 ± 0.22 54	5.71 ± 0.95 2	6.4 ± 1.61 32	2.38 1	1.97 ± 0.28 43	4.57 ± 0.59 7	4.43 ± 0.85 48	3.62 ± 0.51 11	3.75 ± 1.22 20
DIN	[]	[3.36, 5.18]	[1.53, 8.07]	[1.32, 1.97]	[1.1, 2.06]	[3.6, 5.6]	[3.18, 8.77]	-	[1.3, 2.29]	[3.39, 4.15]	[2.4, 4.99]	[2.06, 3.87]	[2.15, 5.23]
	X ± S n	4.17 ± 0.6 16	4.14 ± 1.03 182	1.67 ± 0.25 5	1.5 ± 0.22 54	4.6 ± 1.41 2	5.59 ± 1.46 32	1.94 1	1.71 ± 0.24 43	3.75 ± 0.25 7	3.64 ± 0.64 48	3.04 ± 0.55 11	3.23 ± 0.88 20
DON	[]	[3.99, 6.56]	[1.99, 10.78]	[1.56, 2.11]	[1.09, 2.05]	[4.77, 5.49]	[3.79, 10.29]	-	[1.51, 2.71]	[3.64, 4.86]	[2.46, 5.5]	[2.62, 4.22]	[2.69, 5.78]
	X ± S n	5.12 ± 0.85 16	5.07 ± 1.37 182	1.88 ± 0.23 5	1.64 ± 0.24 54	5.13 ± 0.51 2	6.71 ± 1.45 32	2.25 1	2.11 ± 0.27 43	4.33 ± 0.41 7	4.21 ± 0.68 48	3.54 ± 0.55 11	3.92 ± 0.89 20
DOF	[]	[6.59, 10.31]	[2.87, 17.15]	[2.98, 3.73]	[2.23, 3.42]	[7.94, 11.13]	[6.22, 16.52]	-	[3.05, 4.22]	[6, 7.85]	[4.72, 9.52]	[4.76, 6.92]	[4.29, 9.84]
	X ± S n	8.56 ± 1.23 16	8.41 ± 2.13 182	3.39 ± 0.31 5	2.98 ± 0.26 54	9.54 ± 2.26 2	10.77 ± 2.37 32	3.57 1	3.55 ± 0.31 43	7.19 ± 0.66 7	7.03 ± 1.16 48	5.86 ± 0.76 11	6.5 ± 1.57 20
CP	[]	[19.53, 30.91]	[11.21, 53.7]	[11.08, 14.19]	[8.52, 12.9]	[24.06, 32.2]	[19.52, 50.2]	-	[10.49, 16.3]	[16.36, 20.38]	[11.12, 24.7]	[13.64, 23.67]	[13.45, 33.33]
	X ± S n	25.93 ± 3.7 16	25.31 ± 6.31 182	12.63 ± 1.14 5	10.56 ± 0.98 52	28.13 ± 5.76 2	33.25 ± 6.61 32	13.34 1	12.73 ± 1.19 42	18.84 ± 1.27 7	18.85 ± 2.87 48	18.54 ± 3.37 11	20.9 ± 5.98 20
CM	[]	[10.79, 17.87]	[6.23, 26.69]	[6.86, 7.91]	[4.61, 7.48]	[12.84, 17.98]	[10.47, 28.23]	-	[5.9, 8.35]	[9.74, 12.23]	[7.04, 15.38]	[7.82, 12.85]	[1.8, 18.25]
	X ± S n	13.87 ± 2.08 16	13.61 ± 3.38 182	7.2 ± 0.41 5	5.94 ± 0.55 52	15.41 ± 3.63 2	18.06 ± 4.02 32	1.47 1	7.13 ± 0.59 42	11.19 ± 0.98 7	11.12 ± 1.89 48	10.11 ± 1.65 11	10.97 ± 3.74 20
CT	[]	[21.37, 33.5]	[11.32, 56.88]	[11.73, 14.12]	[8.38, 12.55]	[25.02, 34.83]	[20.45, 56.4]	-	[10.87, 15.89]	[18.39, 23.07]	[12.49, 28.44]	[15.05, 22.93]	[14.22, 37.97]
	X ± S n	27.81 ± 3.89 16	27.06 ± 6.78 182	12.62 ± 1 5	10.72 ± 0.77 54	29.92 ± 6.94 2	35.29 ± 7.35 32	14.45 1	13.22 ± 1.19 41	21.14 ± 1.47 7	20.81 ± 3.23 48	18.63 ± 2.93 11	21.52 ± 6.26 20
CF	[]	[20.35, 31.55]	[9.98, 55.51]	[11.19, 13.88]	[8, 11.88]	[23.26, 34.08]	[19.72, 53.67]	-	[10.87, 15.1]	[18.8, 23.25]	[11.58, 29.03]	[13.96, 22.11]	[14.26, 31.96]
	X ± S n	25.77 ± 3.16 16	25.48 ± 6.55 182	12.26 ± 1.11 5	10.51 ± 0.86 54	28.67 ± 7.65 2	33.3 ± 7.05 32	13.77 1	12.51 ± 1.06 41	21.04 ± 1.77 7	20.52 ± 3.52 48	18.05 ± 2.79 11	20.25 ± 5.22 20
DA	[]	[2.49, 5.85]	[1.69, 13.04]	[1.23, 2.11]	[1.09, 2.28]	[3.1, 5.2]	[1.35, 13.8]	-	[1.19, 2.82]	[2.29, 3.94]	[2, 7.86]	[1.97, 3.26]	[1.9, 6.63]
	X ± S n	3.78 ± 0.8 37	5.4 ± 1.84 324	1.6 ± 0.26 11	1.69 ± 0.23 106	4.51 ± 0.97 4	6.5 ± 2.44 82	1.95 1	1.99 ± 0.33 43	3.09 ± 0.38 25	4.39 ± 1.16 158	2.62 ± 0.43 11	3.43 ± 1.37 21
DB	[]	[3.11, 6.75]	[1.85, 17.99]	[1.47, 2.47]	[1.15, 2.73]	[2.97, 6.7]	[2.07, 22.69]	-	[1.51, 2.74]	[2.74, 4.98]	[1.8, 11.91]	[2.06, 4.01]	[1.99, 7.25]
	X ± S n	4.38 ± 0.82 37	6.64 ± 2.87 324	2.09 ± 0.34 11	1.74 ± 0.25 106	5.49 ± 1.72 4	8.05 ± 3.92 82	2.20 1	2.12 ± 0.32 43	3.64 ± 0.53 25	5.36 ± 2.14 158	3.05 ± 0.54 11	3.65 ± 1.57 21

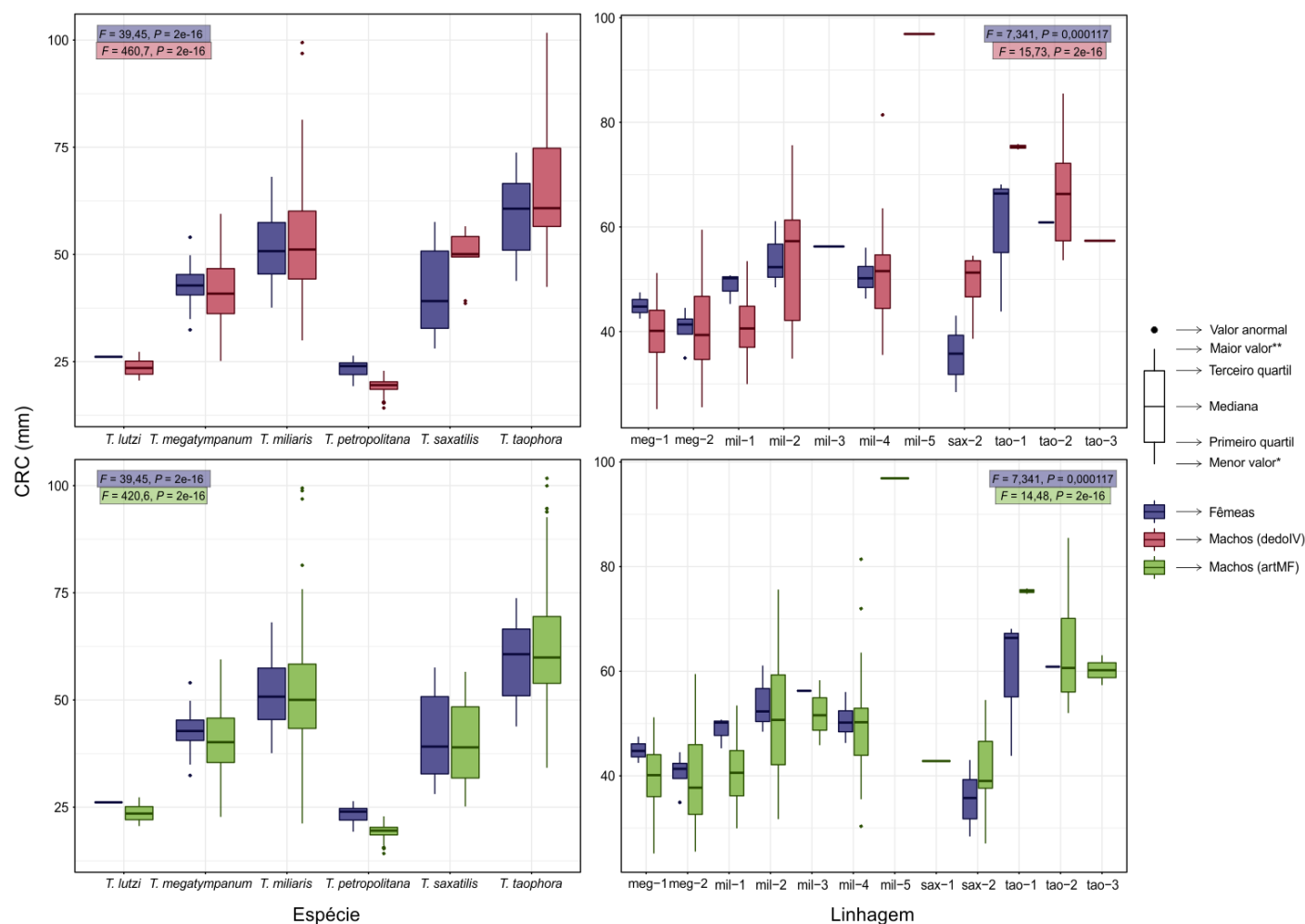


Figura 24: Gráficos de caixas do comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos adultos machos e fêmeas das espécies e linhagens de *Thoropa*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "***" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75. O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

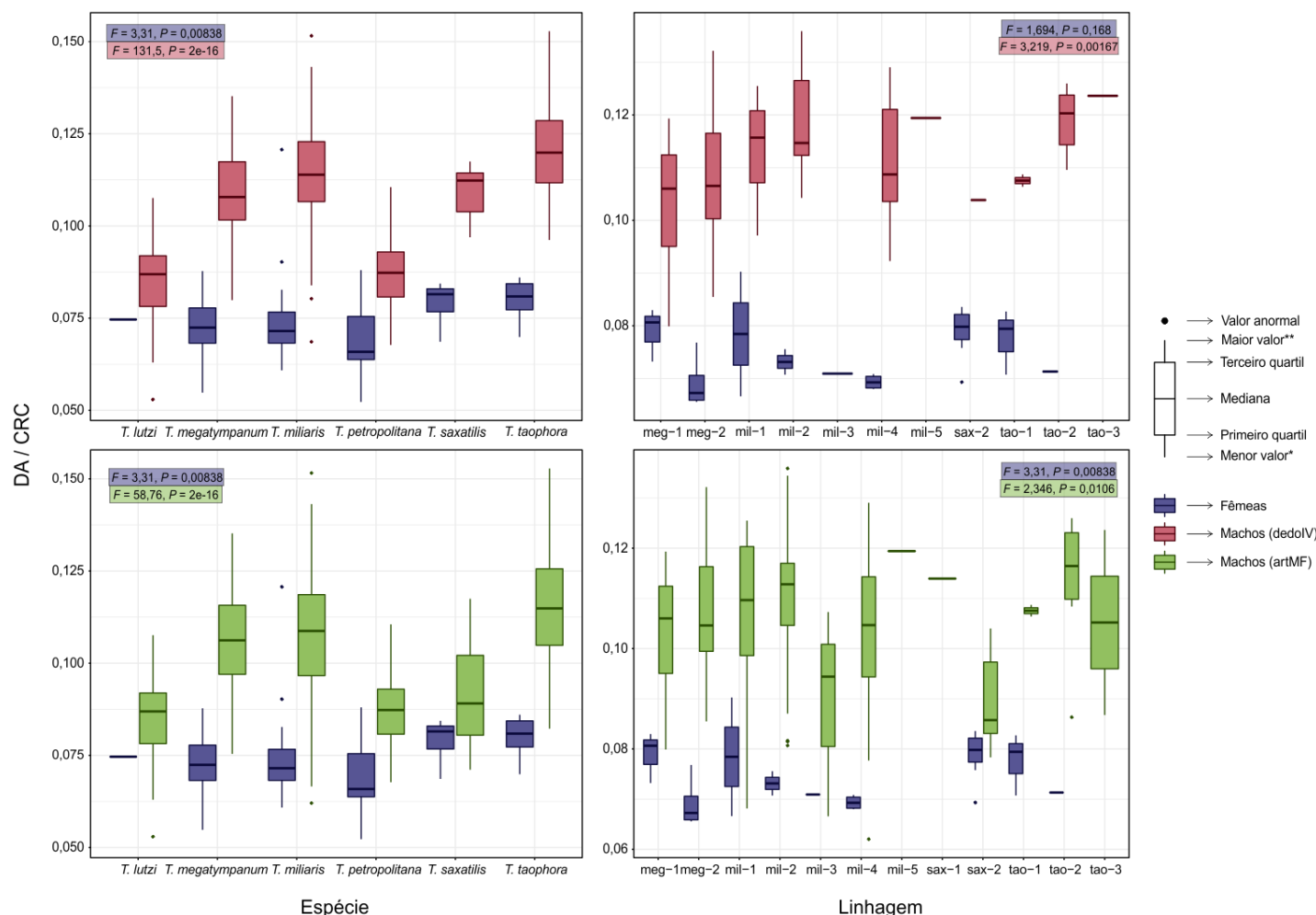


Figura 25: Gráficos de caixas da razão entre diâmetro do antebraço (DA) e comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos adultos machos e fêmeas das espécies e linhagens de *Thoropa*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75. O símbolo "**" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

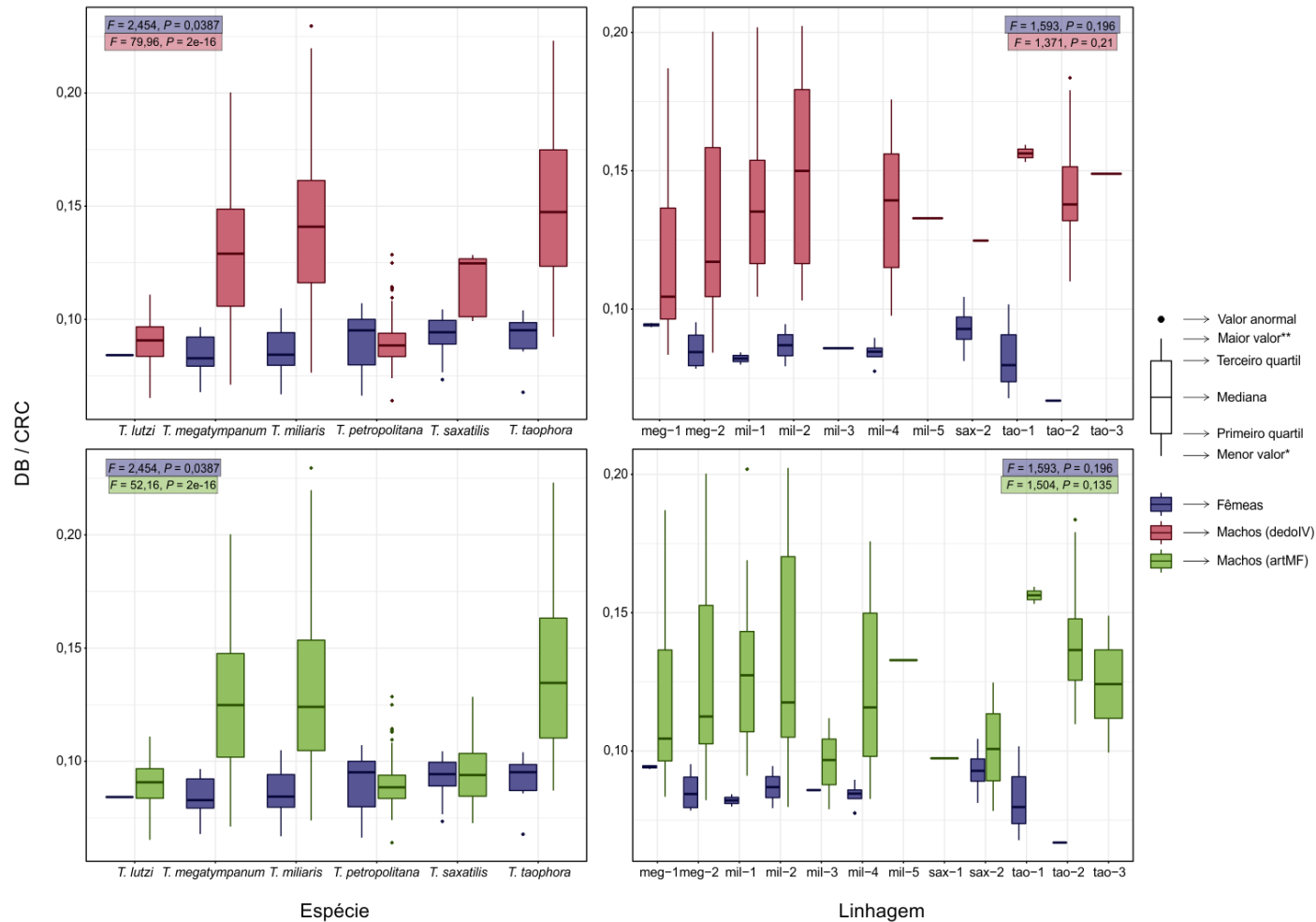


Figura 26: Gráficos de caixas da razão entre diâmetro do braço (DB) e comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos adultos machos e fêmeas das espécies e linhagens de *Thoropa*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "***" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75. O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

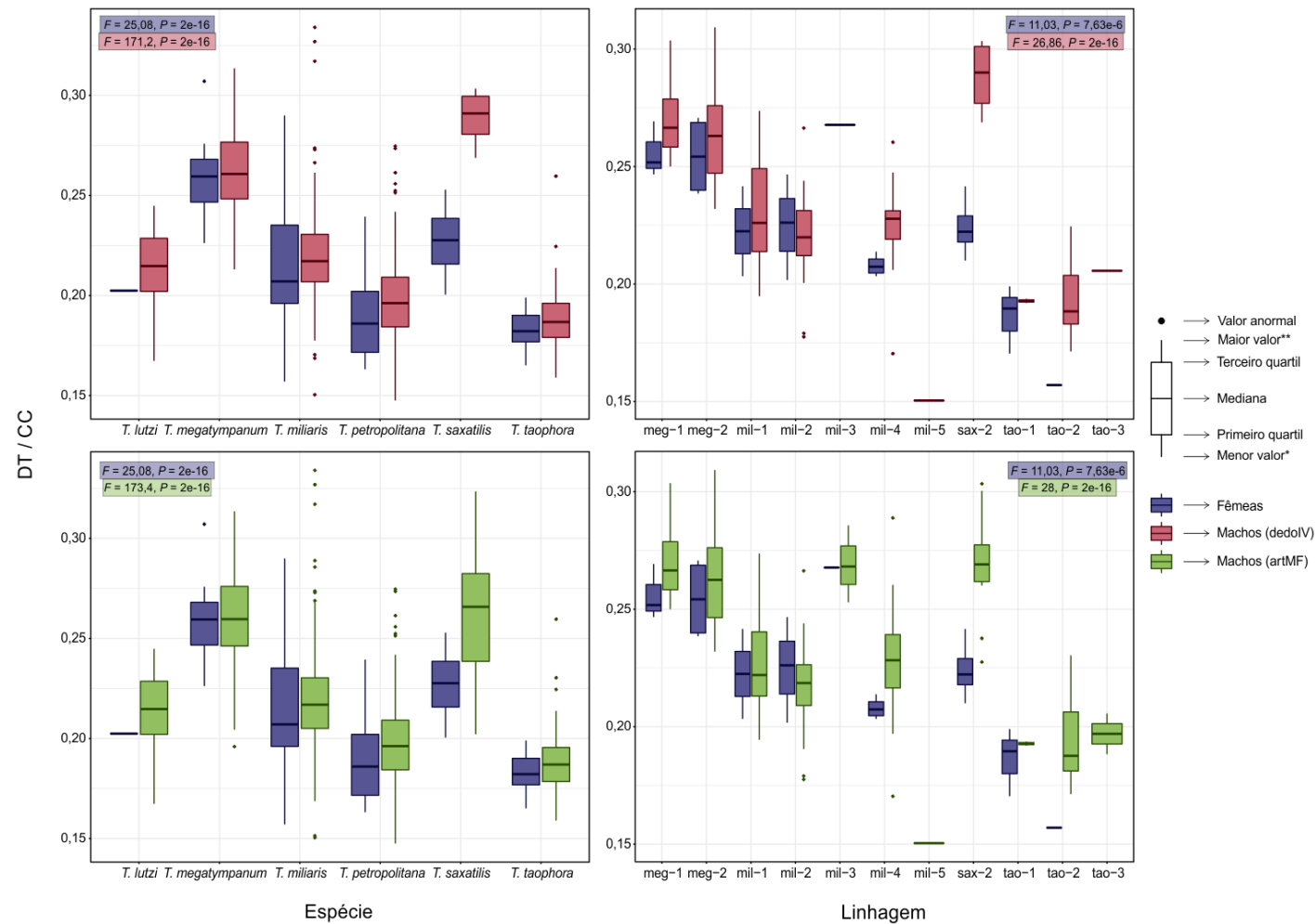


Figura 27: Gráficos de caixas da razão entre diâmetro do tímpano (DT) e comprimento da cabeça (CC) dos indivíduos adultos machos e fêmeas das espécies e linhagens de *Thoropa*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "***" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75. O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

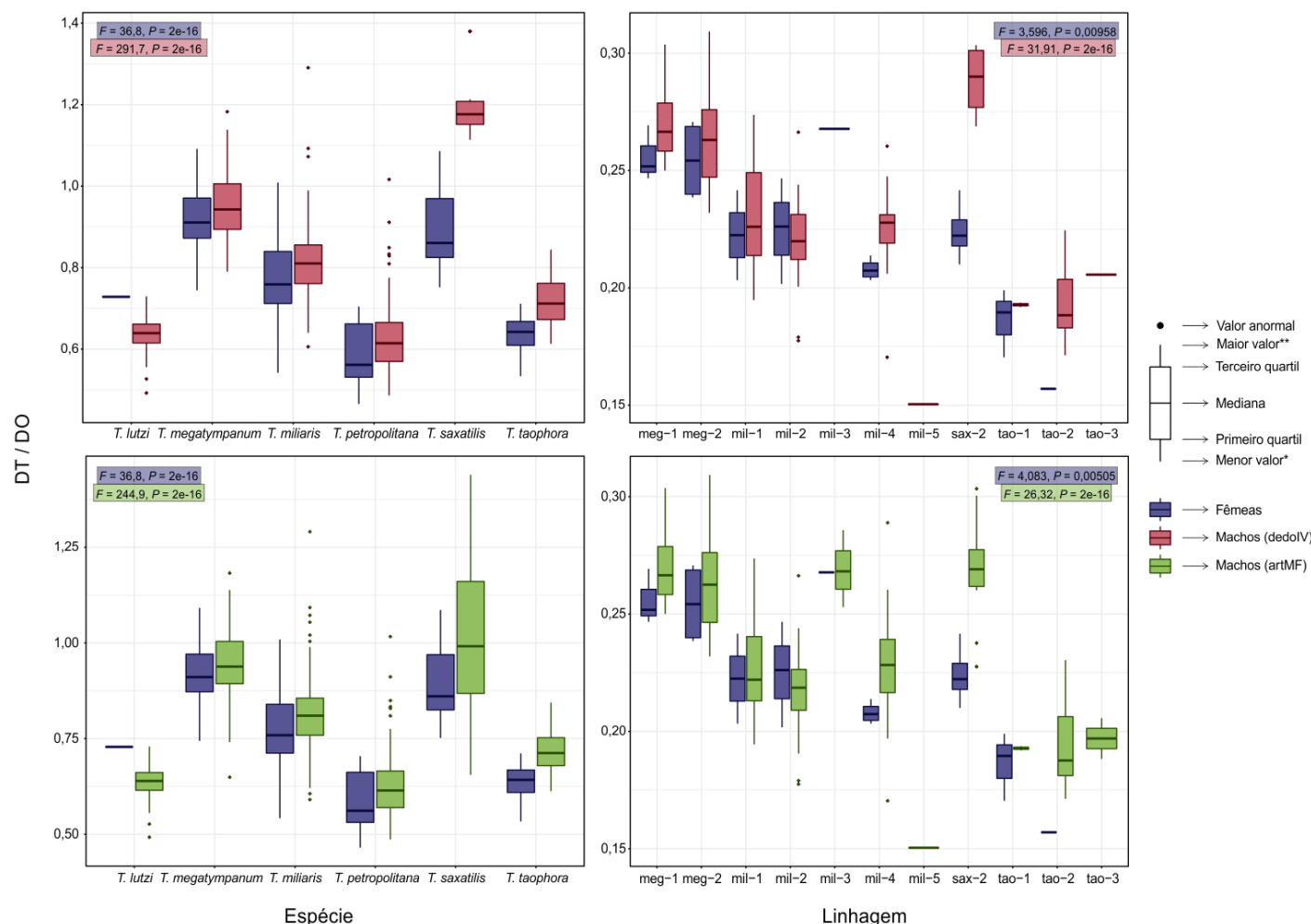


Figura 28: Gráficos de caixas da razão entre diâmetro do úmpano (DT) e diâmetro do olho (DO) dos indivíduos adultos machos e fêmeas das espécies e linhagens de *Thoropa*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "***" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75. O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

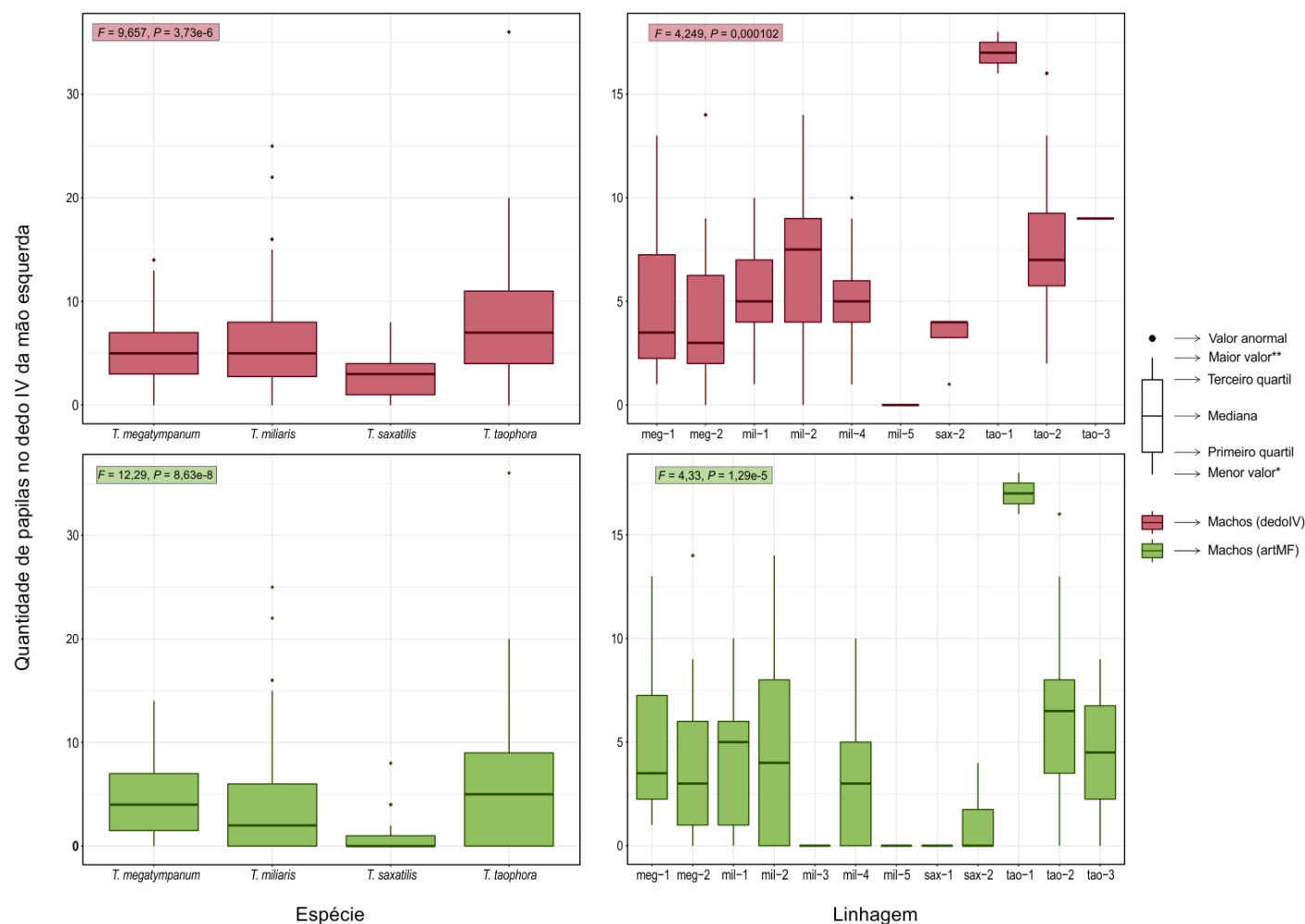


Figura 29: Gráficos de caixas da quantidade de PEPs dos dedos IV da mão esquerda dos machos adultos das espécies e linhagens de *Thoropa* do grupo *miliaris*, com respectivos valores de F e P resultantes da ANOVA. Os machos foram analisados seguindo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006, "dedoIV") e seguindo nosso critério de macho adulto ("artMF"). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O símbolo "***" indica que na presença de valores anormais superiores, a extremidade superior da barra é o maior valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil acima do percentil 75.. O símbolo "*" indica que na presença de valores anormais inferiores, a extremidade inferior da barra é o menor valor dentro de 1,5 vezes o intervalo interquartil abaixo do percentil 25.

Das espécies e linhagens analisadas, apenas *Thoropa lutzi* e a linhagem sax-1 não mostraram uma inversão entre a proporção de largura e o comprimento da cabeça contra o CRC (Tabela 4, Figuras 30 e 31).

Tabela 4: Descrição da variação do comprimento rostro-cloacal (CRC), largura da cabeça (LC) e comprimento da cabeça (CC) de indivíduos das seis espécies de *Thoropa*, sem distinção de sexo e estágio de desenvolvimento, desde que fossem metamorfoseados. A coluna “Desc.” refere-se às estatísticas descritivas (intervalo, média, desvio padrão, e tamanho amostral), sendo que “[]” indica o intervalo (valor mínimo e valor máximo) da amostra; “X” indica a média da amostra; “S” indica o desvio padrão da amostra; “n” indica o tamanho da amostra.

Medida	Desc.	<i>T. miliaris</i>	<i>T. petropolitana</i>	<i>T. taophora</i>	<i>T. lutzi</i>	<i>T. megatypanum</i>	<i>T. saxatilis</i>
CRC	[]	[16.3, 99.42]	[11.08, 26.7]	[19.39, 101.7]	[11.73, 30.03]	[13.34, 63.26]	[18.69, 56.57]
	X ± S	47.01 ± 12.48	19.64 ± 3.01	56.41 ± 14.27	21.33 ± 4.88	39.15 ± 8.52	37.23 ± 9.59
	n	717	193	144	65	291	61
LC	[]	[6.61, 43.8]	[4.33, 9.51]	[7.23, 42.61]	[4.33, 10.77]	[5.41, 25.66]	[7.49, 24.19]
	X ± S	19.37 ± 5.48	7.21 ± 0.99	23.08 ± 6.1	7.66 ± 1.7	16.5 ± 3.65	14.91 ± 3.66
	n	717	193	144	65	291	61
CC	[]	[6.79, 40.69]	[4.35, 9.62]	[7.53, 39.23]	[4.31, 11.27]	[5.81, 23.86]	[6.4, 23.89]
	X ± S	18.57 ± 4.86	7.25 ± 0.96	22.19 ± 5.5	7.87 ± 1.73	15.21 ± 3.26	15.02 ± 4.1
	n	717	193	144	65	291	61

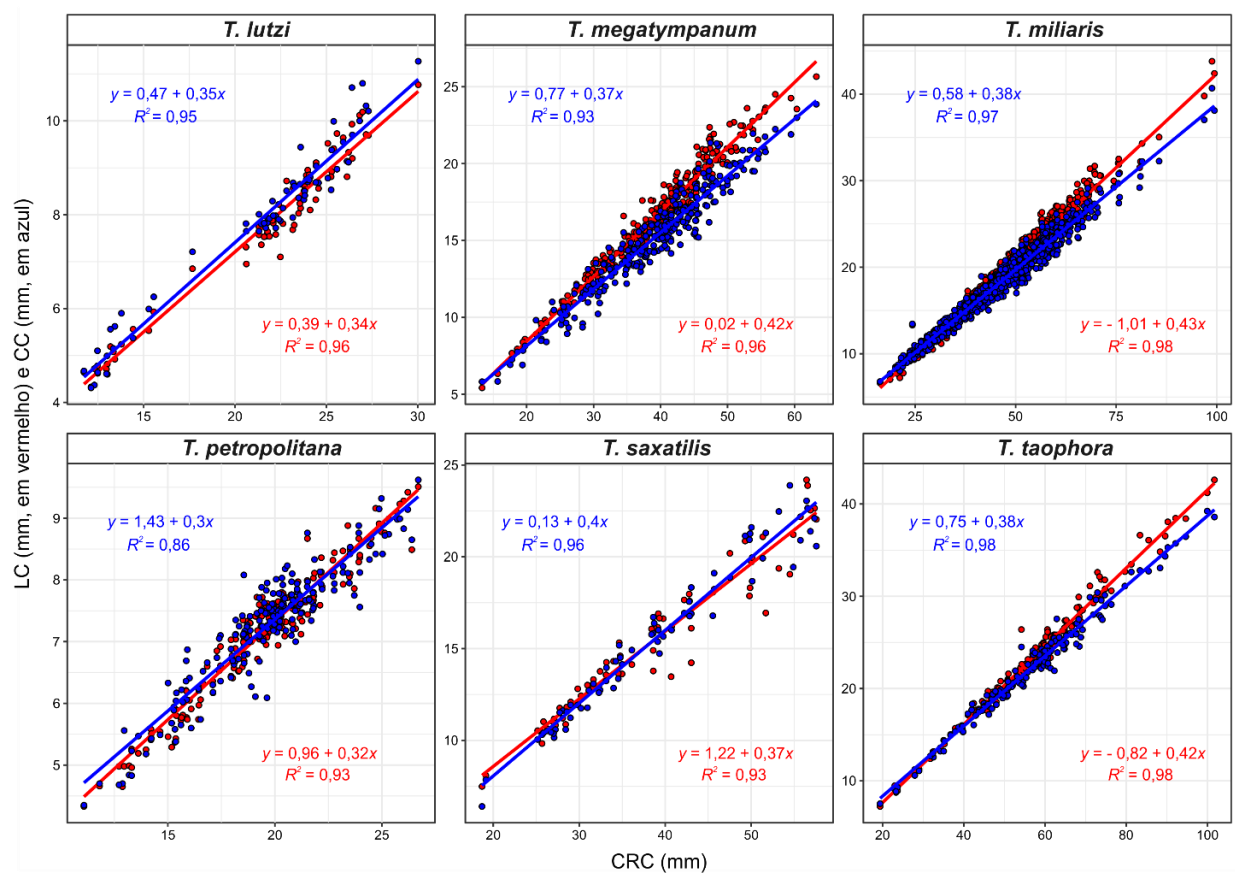


Figura 30: Gráficos de dispersão e retas de regressão linear do comprimento rostro-cloacal (CRC), largura da cabeça (LC, em vermelho) e comprimento da cabeça (CC, em azul) de indivíduos das espécies de *Thoropa*, com respectivas equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2).

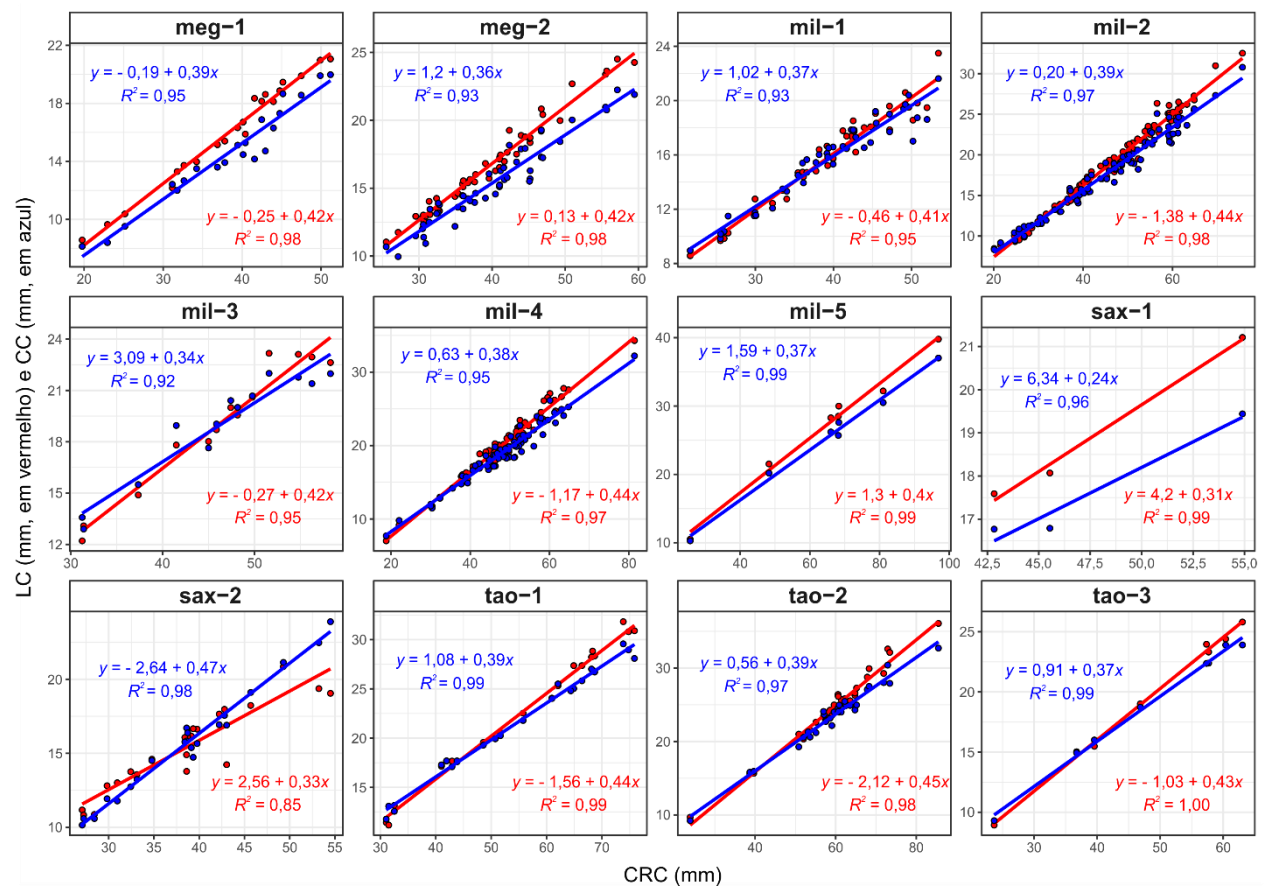


Figura 31: Gráficos de dispersão e retas de regressão linear do comprimento rostral-cloacal (CRC), largura da cabeça (LC, em vermelho) e comprimento da cabeça (CC, em azul) de indivíduos das linhagens de *Thoropa* do grupo *miliaris*, com respectivas equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018).

De forma geral, as análises multivariadas (PCA e LDA) mostraram grande sobreposição morfométrica entre as amostras, tanto para fêmeas quanto para machos adultos (Figuras 32 a 37). Nas análises de PCA por espécies notamos que o grupo *petropolitana* se distingue um pouco do grupo *miliaris*. Especialmente nas análises de componentes principais (PCA), encontramos bastante variação sobre quais seriam as variáveis que mais influenciam cada componente (Tabela 5). Segundo os resultados das análises de discriminante (LDA), é possível discriminar a maior parte das espécies com alto poder de predição (Tabela 6). Nessas análises, o diâmetro do tímpano parece prever a morfologia de *Thoropa megalotympanum* e também da linhagem mil-3 segundo nosso critério de adulto (Apêndice 8). O diâmetro dos olhos e o comprimento das mãos parecem prever a morfologia do grupo *petropolitana*, que inclusive agrupa-se nas duas análises de machos.

Tabela 5: Contribuição das variáveis (razões) em cada um dos dois componentes principais (CP1 e CP2) em cada análise, por espécies e por linhagens, considerando apenas fêmeas adultas, apenas machos adultos segundo o critério da literatura (Feio et al. 2006) (“dedoIV”), e apenas machos adultos segundo nosso critério de adulto (“artMF”). Os valores estão classificados em escala de cinza, sendo os maiores valores mais escuros e os menos valores mais claros. O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tíbia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

Variável	Fêmeas				Machos (dedoIV)				Machos (artMF)			
	Por espécies		Por linhagens		Por espécies		Por linhagens		Por espécies		Por linhagens	
	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2
LC / CRC	-0.3868	0.2681	-0.1725	0.3967	-0.3741	0.0459	0.0873	-0.4189	-0.3901	0.0546	0.1155	0.4514
CC / CRC	-0.3925	-0.0164	-0.3113	0.1608	-0.2370	0.2965	0.3892	-0.0445	-0.2593	0.2815	0.3536	0.1023
DT / CRC	-0.1845	0.3187	0.0048	0.4795	-0.2396	-0.0330	0.0762	0.1964	-0.2459	0.0079	0.1283	-0.0106
DO / CRC	0.0851	-0.0757	0.0491	-0.2524	0.1931	0.1014	0.2193	0.2423	0.1901	0.1252	0.2176	-0.0850
DIO / CRC	-0.3364	0.1952	-0.1042	0.3596	-0.3221	0.0527	0.1052	-0.1447	-0.3348	0.0435	0.1588	0.1075
DIN / CRC	-0.3576	0.0397	-0.3258	0.1776	-0.2871	0.1009	0.2675	-0.2022	-0.2996	0.0890	0.2579	0.3066
DON / CRC	-0.3873	0.0970	-0.3097	0.2482	-0.3254	0.1547	0.3152	-0.2436	-0.3378	0.1733	0.3216	0.1640
DOF / CRC	-0.2387	0.0806	-0.3366	0.1460	-0.3478	0.1875	0.3849	-0.2435	-0.3633	0.2015	0.3722	0.1795
CP / CRC	-0.1757	-0.5357	-0.3759	-0.3048	0.1754	0.4497	0.3280	0.1460	0.1617	0.4668	0.3352	-0.2264
CM / CRC	-0.1720	-0.2467	-0.3763	-0.1722	0.2186	0.3229	0.2166	0.1635	0.2018	0.2742	0.2126	-0.1410
CT / CRC	-0.2205	-0.4642	-0.3334	-0.3091	0.0677	0.5330	0.4218	0.1710	0.0499	0.5344	0.4101	-0.2003
CF / CRC	-0.1988	-0.4317	-0.3640	-0.1666	0.0791	0.4819	0.3509	0.1584	0.0568	0.4663	0.3530	-0.0389
DA / CRC	-0.2303	0.0810	-0.0449	-0.1827	-0.3313	0.0459	0.0071	-0.4628	-0.2881	-0.0741	-0.0721	0.4956
DB / CRC	-0.0734	0.0932	0.1269	-0.0103	-0.3116	-0.0418	-0.0374	-0.4777	-0.2836	-0.1415	-0.0923	0.5054

Tabela 6: Capacidade dos discriminantes lineares (LDA) de prever (“predição”, em %) as fêmeas e machos das espécies e linhagens, com respectivos tamanhos amostrais (“n”). Os machos estão separados segundo ambos os critérios de machos adultos (“dedoIV” de Feio et al. 2006, e “artMF” desse estudo). As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018).

	Fêmeas		Machos (dedoIV)		Machos (artMF)	
	n	predição	n	predição	n	predição
Espécie						
<i>T. lutzi</i>	1	100%	41	85%	42	86%
<i>T. megatympanum</i>	7	85.71%	43	93.02%	49	89.80%
<i>T. miliaris</i>	16	100%	130	92%	176	90%
<i>T. petropolitana</i>	5	100%	51	84%	51	86%
<i>T. saxatilis</i>	11	90.91%	4	100.00%	20	70.00%
<i>T. taophora</i>	11	90.91%	30	60.00%	35	51.43%
Linhagem						
meg-1	3	100%	4	100%	4	100%
meg-2	2	100%	8	100%	8	100%
mil-1	1	100%	16	88%	20	65%
mil-2	1	100%	20	75%	28	57%
mil-3	1	100%	-	-	3	100%
mil-4	1	100%	17	71%	28	79%
mil-5	-	-	1	100%	1	100%
sax-1	-	-	-	-	1	100%
sax-2	7	100%	1	100%	6	100%
tao-1	1	100%	1	100%	1	100%
tao-2	5	100%	12	75%	13	85%
tao-3	-	-	1	100%	2	100%

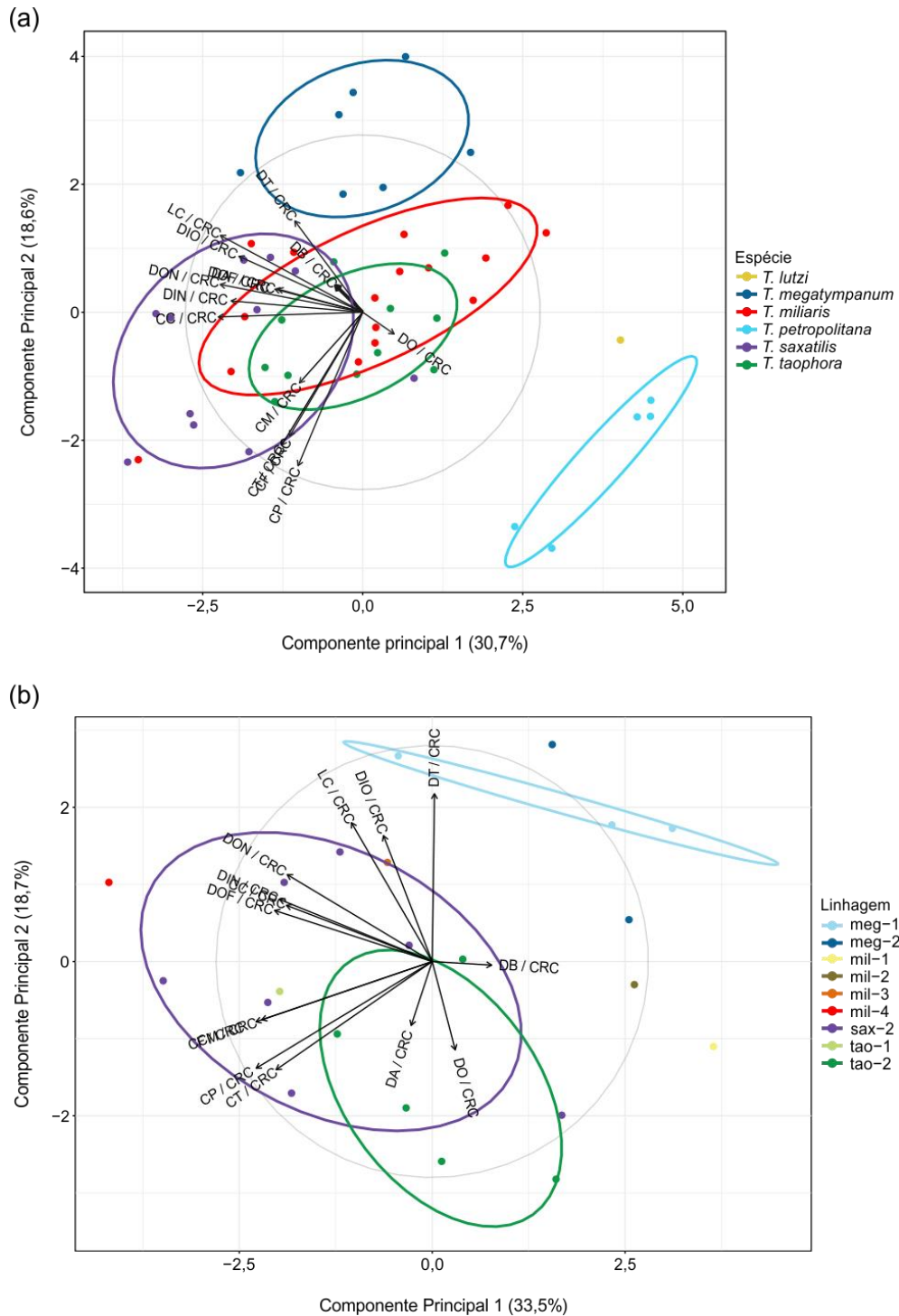


Figura 32: Gráficos das análises de componentes principais das fêmeas adultas das espécies e linhagens de *Thoropa*, considerando 14 variáveis morfométricas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tibia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

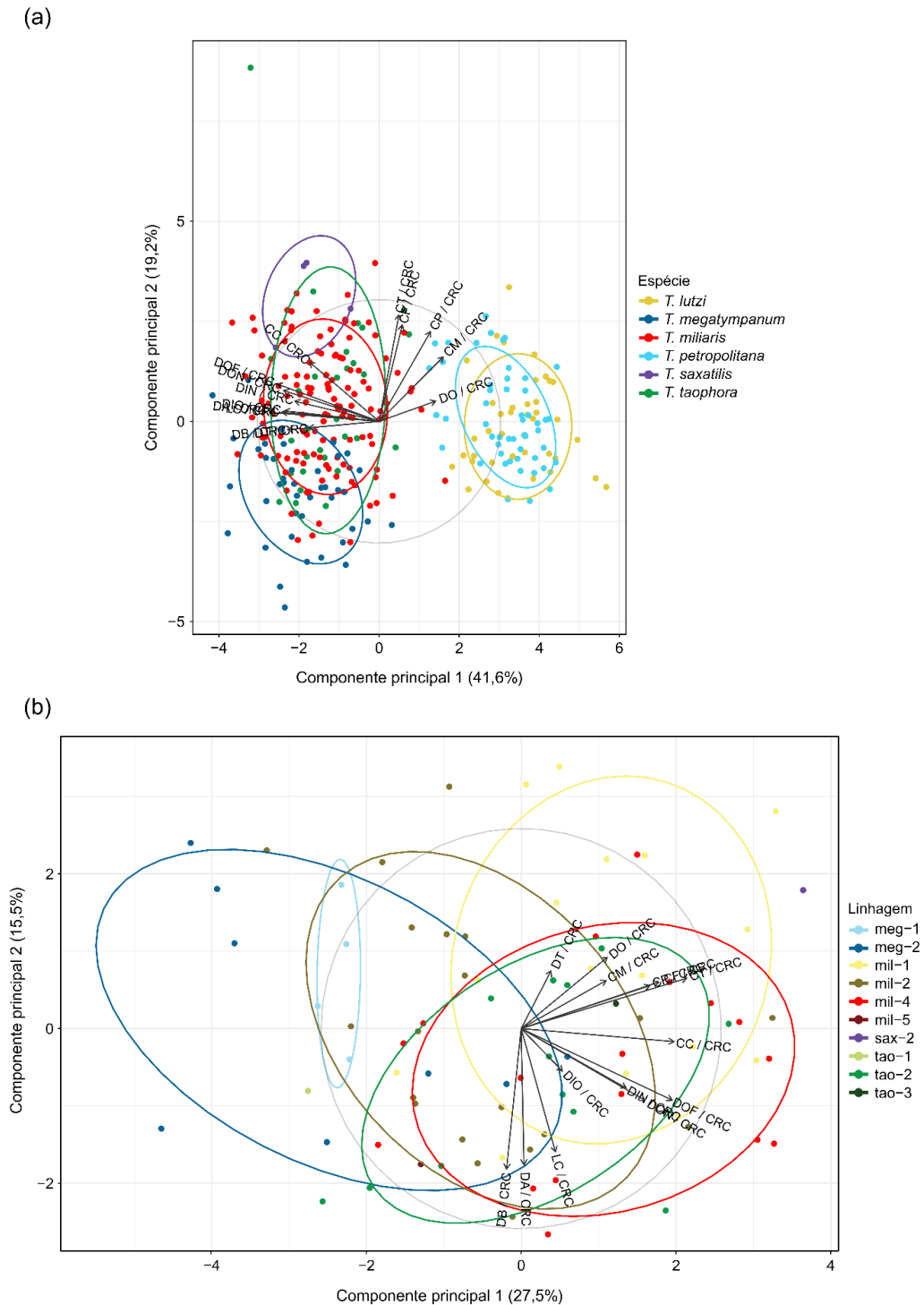
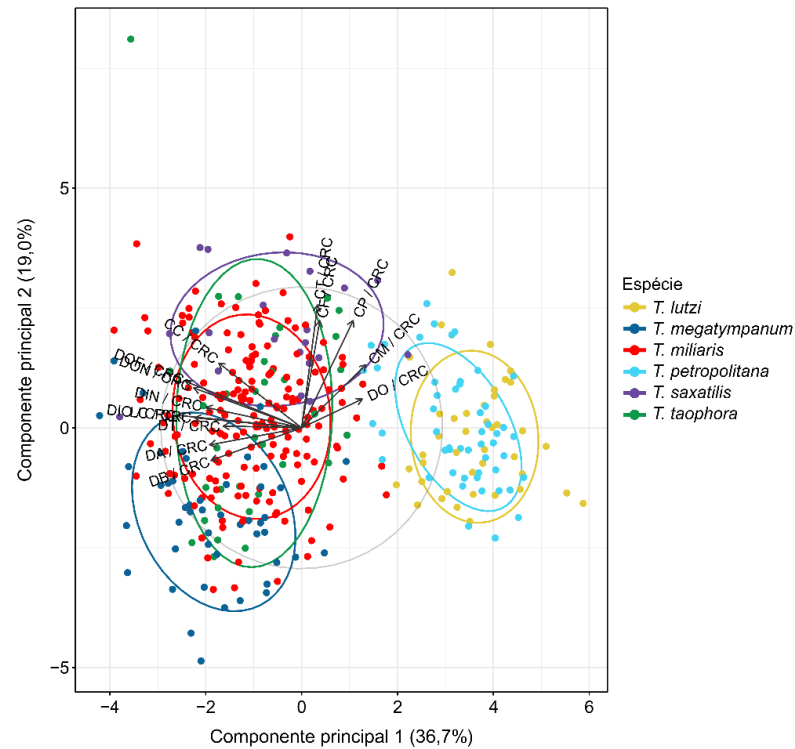


Figura 33: Gráficos das análises de componentes principais dos machos das espécies e linhagens de *Thoropa*, segundo o critério de Feio et al. (2006) de machos adultos, considerando 14 variáveis morfométricas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tíbia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

(a)



(b)

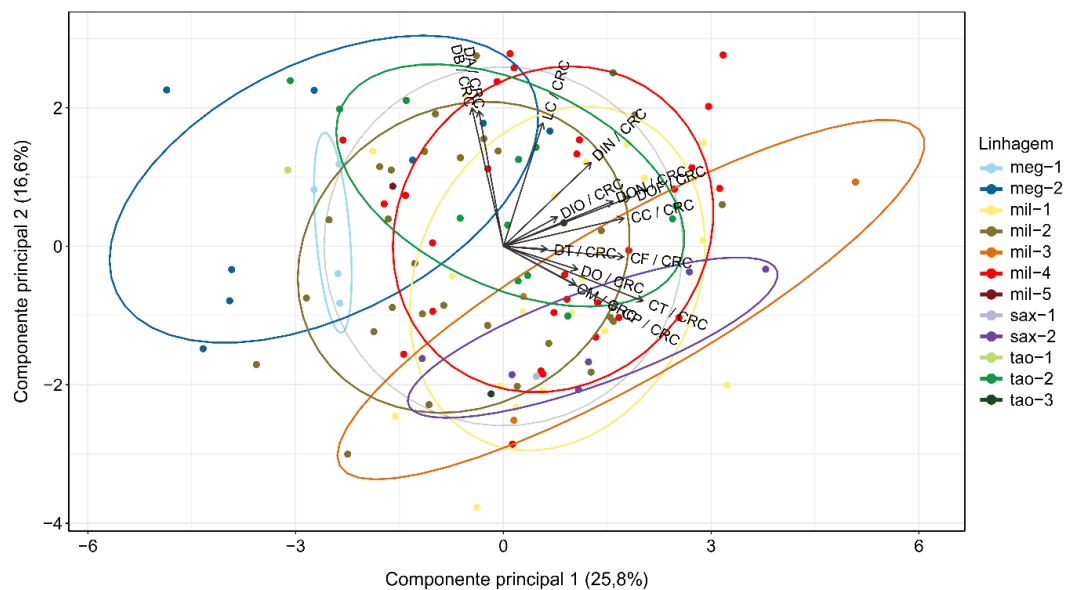


Figura 34: Gráficos das análises de componentes principais dos machos das espécies e linhagens de *Thoropa*, segundo nosso critério de machos adultos, considerando 14 variáveis morfométricas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tíbia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

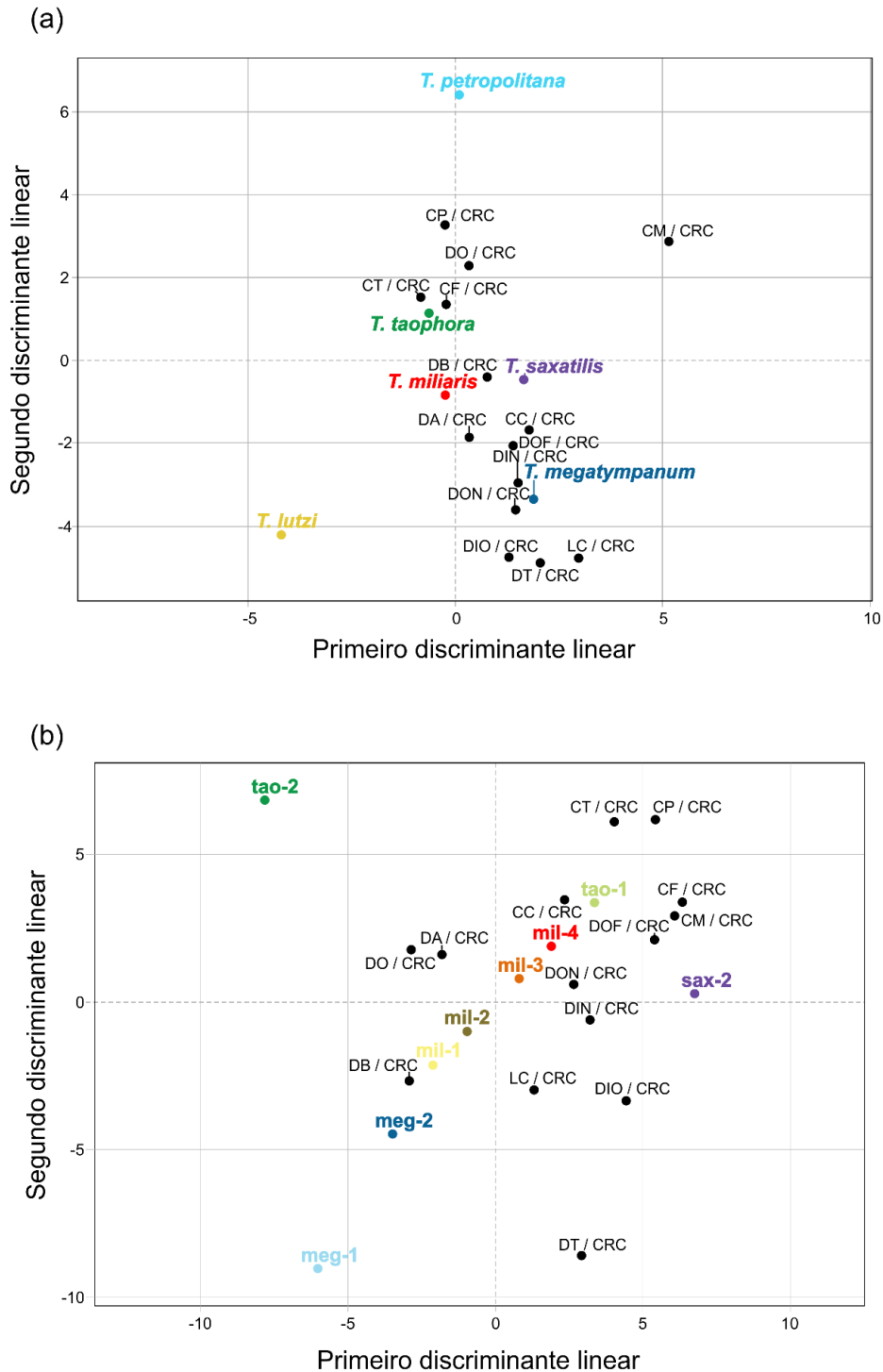


Figura 35: Gráficos das análises de discriminante linear das fêmeas adultas das espécies e linhagens de *Thoropa* considerando 14 variáveis morfológicas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tibia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

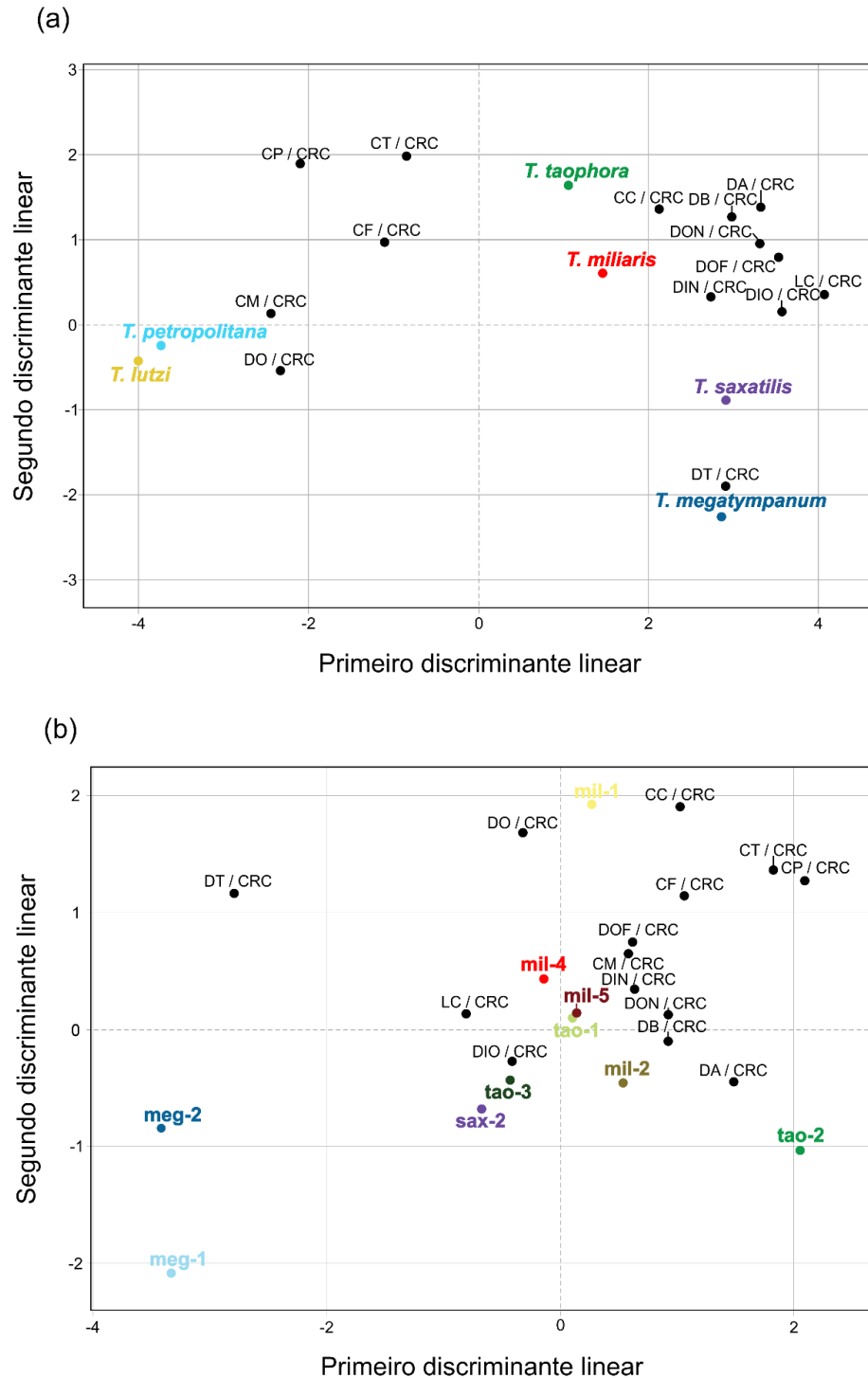


Figura 36: Gráficos das análises de discriminante linear dos machos adultos das espécies e linhagens de *Thoropa*, segundo o critério de Feio et al. (2006) de machos adultos, considerando 14 variáveis morfométricas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tibia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

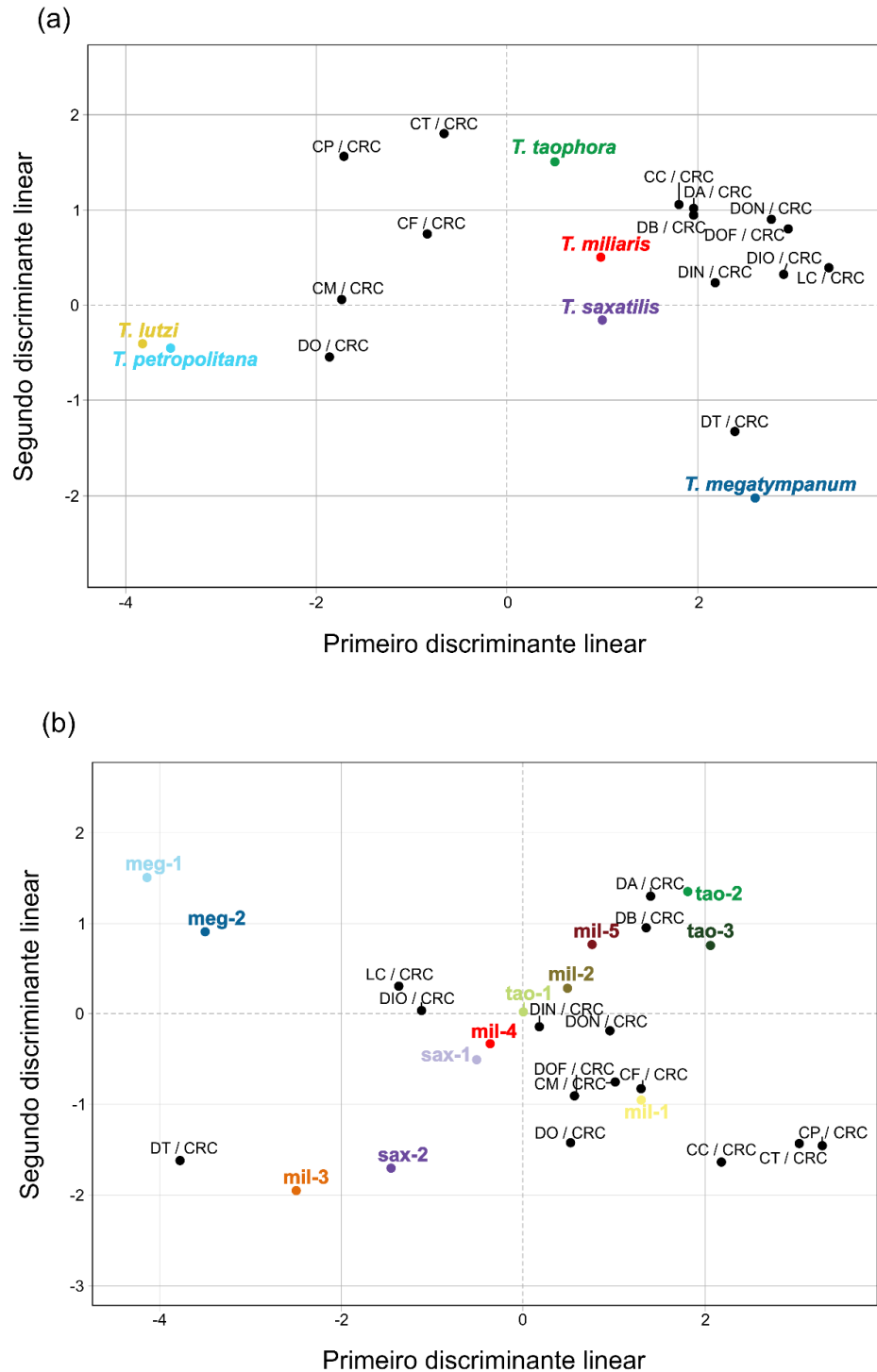


Figura 37: Gráficos das análises de discriminante linear dos machos adultos das espécies e linhagens de *Thoropa*, segundo nosso critério de machos adultos, considerando 14 variáveis morfométricas sem o efeito alométrico. As siglas das linhagens seguem a Figura 2 da Introdução Geral, modificada de Sabbag et al. (2018). O denominador das variáveis é o comprimento rostro-cloacal (CRC), e os numeradores seguem as seguintes siglas: LC = largura da cabeça; CC = comprimento da cabeça; DT = diâmetro do tímpano; DO = diâmetro do olho; DIO = distância interorbital; DIN = distância internasal; DON = distância entre o olho e a narina; DOF = distância entre o olho e o focinho; CP = comprimento do pé; CM = comprimento da mão; CT = comprimento da tibia; CF = comprimento do fêmur; DA = diâmetro do antebraço; DB = diâmetro do braço.

DISCUSSÃO

Nesse estudo analisamos a morfologia geral externa das espécies de *Thoropa*, tanto para verificar a consistência das diagnoses quanto para analisar se a morfologia de algumas das espécies segue a diversidade genética conhecida. No geral, parece existir pouca variação morfológica entre as espécies de *Thoropa*, o que parece refletir o uso de um mesmo tipo de microambiente por todas as espécies do gênero. As diferenças morfológicas mais significativas estão entre o grupo *miliaris* e o grupo *petropolitana*, e entre as duas espécies do grupo *petropolitana*.

Associação às linhagens

A análise do fragmento 16S-ARBR se mostrou uma ferramenta bastante efetiva para a alocação de espécimes às linhagens descritas em Sabbag et al. (2018), sendo que algumas foram validadas no capítulo 1 como possíveis espécies. Comparando com as informações moleculares já publicadas em Sabbag et al. (2018), nossa amostragem estendeu geograficamente as localidades de simpatrias de linhagens dentro do grupo *miliaris*. Por exemplo, encontramos muitas amostras de *Thoropa miliaris* na Cadeia do Espinhaço, que se agrupam principalmente com a linhagem mil-2. Uma única amostra de mil-1 que aparece na Cadeia do Espinhaço é uma *T. megatympanum* de Caeté (MG) e é possível que o agrupamento dela com a linhagem mil-1 decorra de um erro no protocolo molecular, algo que deverá ser verificado no futuro.

Também encontramos duas amostras de *Thoropa taophora* na Serra dos Órgãos, inclusive sintópicas às amostras de *T. miliaris* da linhagem mil-2. Isso não é surpreendente, já que a Serra dos Órgãos faz parte da Serra do Mar e dá continuidade à região de ocorrência de *T. taophora* no estado de São Paulo. A amostra única do leste do estado de Minas Gerais que não pudemos alocar corretamente em *T. miliaris* ou *T. taophora* pode ser apenas uma incerteza de posicionamento, sendo que uma análise filogenética com mais fragmentos mitocondriais pode ajudar nessa questão.

Machos adultos e desenvolvimento das almofadas nupciais

Nossos resultados em geral confirmam a sequência ontogenética de surgimento das PEPs encontrada em estudos anteriores (Bokermann 1965; Feio et al. 2006; Rebouças et al. 2017), porém com algumas diferenças. Para nós, o surgimento das PEPs no dedo III ocorre um pouco antes do surgimento das PEPs na falange proximal do dedo II, que por sua vez parece ser concomitante ao surgimento das PEPs no dedo IV. Além disso, existe outro lugar que parece ser o último no qual aparecerem PEPs, que é no metacarpo do dedo II. Nos indivíduos que

observamos isso, as PEPs do metacarpo são bem menores do que as PEPs dos outros dedos, o que sugere um aparecimento tardio (Figura 8h).

A análise histológica dos testículos mostrou que mesmo indivíduos sem nenhuma PEP, que segundo Rebouças et al. (2017) devem ter menos de um ano de idade, possuem espermatozoides plenamente desenvolvidos. Portanto, um macho de *Thoropa* (pelo menos de *T. taophora*, *T. miliaris* e *T. saxatilis*) sem PEPs seria potencialmente capaz de se reproduzir. Apesar disso, a presença de espermatozoides não indica sucesso reprodutivo, ainda mais para um gênero conhecidamente territorialista (Bokermann 1965; Cocroft e Heyer 1988; Muralidhar et al. 2014). Disputas territoriais e seleção sexual da fêmea são fatores igualmente importantes para definir a capacidade reprodutiva de um macho. Porém, nossos resultados suportam que o critério operacional de macho adulto em *Thoropa* (utilizado para identificar diferenças interespecíficas) deve ser repensado. Se um macho com algumas poucas PEPs já é um macho capaz de se reproduzir, ele deve ser considerado para a identificar espécies.

Morfologia externa de adultos e larvas

O grupo *petropolitana* foi definido por Sabbag et al. (2018) como possuindo espécies com adultos menores, machos sem “espinhos” nos dedos III e IV e larvas com “disco abdominal” largo. Além dessas diferenças, esse grupo também se distingue das outras espécies do gênero pelo padrão de desenho semelhante (Bokermann 1965) e pelo canto (Bokermann 1965; Nunes-de-Almeida et al. 2016a). Essas diferenças já haviam sido apontadas por Feio (2002). Acrescentamos a essas diferenças a presença de fenda vocal (encontrada em ambas as espécies), possivelmente a presença de saco vocal (encontrada por enquanto apenas em *Thoropa petropolitana*) e a posição do espiráculo abaixo da expansão dérmica posterolateral. Caso esse grupo seja monofilético, nem todas essas características possuem potencial de serem sinapomorfias do grupo.

Um exemplo é quanto ao “disco abdominal” das larvas que aqui chamamos de expansão dérmica posterolateral (*sensu* Dias 2018). A existência dessa expansão não é exclusiva do grupo *petropolitana*, mas nas espécies do grupo *miliaris* ela é mais estreita e em geral ocupa apenas parte do corpo. Contudo, não acreditamos que essa expansão larga possa ser algo sinapomórfico do grupo *petropolitana* (caso o grupo seja monofilético), pois essa característica está presente também em larvas de *Cycloramphus* (Nunes-de-Almeida et al. 2016b, chamada de *flap*; Dias et al. *no prelo*). Da mesma maneira, a posição do espiráculo relativa à expansão também pode não ser uma provável sinapomorfia, já que parece estar presente em *Cycloramphus lutzorum*, embora a expansão dérmica de *C. lutzorum* não seja completa como a do grupo *petropolitana*.

O grupo *petropolitana* parece compartilhar algumas características com uma ou outra espécie do grupo *miliaris*. Um exemplo é o formato arredondado de algumas PEPs marginais nas bocas de larvas do grupo *petropolitana*, que também ocorre em *Thoropa miliaris* (Dias 2018). Outro caso é o comprimento relativo dos dedos (dedo II menor do que o dedo III) que também não é exclusivo do grupo *petropolitana*, pois aparece em *Thoropa saxatilis*. Curiosamente, *T. saxatilis* também pode apresentar a expansão dérmica posterolateral quase completa, como no grupo *petropolitana*.

Algumas características que possuem potencial de serem sinapomorfias do grupo *petropolitana* são: a presença de fenda vocal, o padrão de desenho dorsal em forma de “X” e o formato elíptico do focinho em vista lateral. Porém, algumas são características subjetivas (o padrão de desenho dorsal em forma de “X” e o formato elíptico do focinho em vista lateral), difíceis de quantificar e de investigar em termos de homologia primária.

A diferença no padrão da nadadeira dorsal dos girinos de *T. megatympnum* em relação aos girinos de outras espécies pode ser uma adaptação ao ambiente de *T. megatympnum*, que são ambientes mais horizontais e com uma maior vazão de água do que os ambientes ocupados pelas outras espécies. Essa característica de *T. megatympnum* (nadadeiras dorsais um pouco mais largas e começando mais próximas do corpo) pode conferir aos girinos resistência ao maior fluxo de água, como suposto por Pezzuti et al. (2016) para algumas espécies de *Scinax*.

Algumas características morfológicas já eram conhecidas da literatura do gênero. Por exemplo, a ausência de fenda e saco vocal, que já havia sido relatada para as espécies do grupo *miliaris* (Heyer et al. 1990; Cocroft e Heyer 1988; Feio 2002). Da mesma forma, Cochran (1954) sugere que em *Thoropa petropolitana* existam sacos vocais pareados, como encontramos nesse estudo.

Morfometria de adultos

As regressões lineares que fizemos, utilizando tanto jovens quanto fêmeas e machos adultos, para avaliar as diferenças nas taxas de crescimento da largura e do comprimento da cabeça dos indivíduos, mostraram que apenas *T. lutzi* possui taxas sempre maiores para o crescimento do comprimento da cabeça do que para o crescimento da largura da cabeça. Para todas as outras espécies, em algum momento do desenvolvimento a largura da cabeça passa a crescer mais rápido do que o comprimento da cabeça. As mesmas alterações são vistas para as amostras do grupo *miliaris* que foram associadas a clados de Sabbag et al. (2018), embora para alguns clados a quantidade de amostras seja baixa.

Assim, cabeça “mais larga do que longa” ou “mais longa do que larga” para diferenciar espécies congêneres são critérios que devem ser testados quanto ao desenvolvimento antes de serem utilizados como características diagnósticas. Para *Thoropa*, embora seja um padrão visível, não sabemos o que influencia essa mudança nas taxas de crescimento ósseo. Para algumas espécies de *Leptodactylus*, por exemplo, é conhecido que uma das maiores alterações no formato do crânio durante o crescimento de indivíduos metamorfoseados ocorre na parte posterior da cabeça, com o aumento na largura dos ossos da região ótica, e com o crescimento e rotação dos esquamais para uma posição horizontal (Ponssa e Vera Candioti 2012). É possível que o mesmo ocorra em *Thoropa* e, nesse caso, o crescimento e rotação dos esquamais aumentariam a largura da cabeça e consequentemente a inclinação do tímpano.

O comprimento rostro-cloacal das espécies do grupo *petropolitana* é significativamente menor, como esperado, já que essa é uma das diferenças morfológicas do grupo em relação ao grupo *miliaris*. O grupo *petropolitana* também não apresenta dimorfismo sexual acentuado na espessura dos braços em comparação com o dimorfismo sexual encontrado no grupo *miliaris*.

Tanto para *Thoropa megatympanum* quanto para *T. saxatilis*, o tamanho do tímpano é marcante, como salientado nas descrições originais dessas espécies (Caramaschi e Sazima 1984; Cocroft e Heyer 1988). *Thoropa miliaris* possui uma grande variação no diâmetro do tímpano, o que parece ser influenciado principalmente pelo diâmetro do tímpano da linhagem mil-3. A quantidade de PEPs presentes no dedo IV esquerdo para as espécies e linhagens do grupo *miliaris* mostrou uma intensa sobreposição. Porém, a linhagem tao-1 apresentou quantidades muito maiores de PEPs do que todas as outras linhagens. Essa não é, entretanto, a linhagem possível do indivíduo de maior quantidade de PEPs no dedo IV esquerdo (MZUSP 27133, 36 PEPs), que é também o maior indivíduo registrado para o gênero *Thoropa* (CRC = 101,70). Esse indivíduo é da Ilha dos Búzios, Ilhabela, SP, e a linhagem tao-1 é de Ubatuba (SP) e Paraty (RJ). Porém, não possuímos DNA sequenciado dessa população da Ilha dos Búzios, de forma que não podemos ter mais certeza dessa inferência.

Embora a maioria das análises de variância (ANOVA) feitas com os gráficos de caixa estejam indicando diferenças significativas, a sobreposição entre as variáveis amostradas em cada análise questiona o uso da maioria delas para fins de diagnose de espécies ou linhagens. Assim como a ANOVA, os testes HSD de Tukey mostram que apenas os diâmetros dos braços dos machos e os diâmetros dos antebraços e braços das fêmeas não diferem significativamente entre as linhagens. O que deixa dúvidas é porque esses testes que fizemos são testes paramétricos, que talvez não sejam adequados para nossos dados porque eles não se mostraram normais e homocedásticos (Quinn e Keough 2002). Além disso, mesmo que nossos resultados

façam sentido com algumas hipóteses já publicadas, alguns agrupamentos ficaram com números amostrais extremamente baixos (principalmente quando analisados quanto às linhagens), dificultando conclusões sobre os padrões morfométricos de algumas espécies e linhagens.

De acordo com as análises multivariadas, o tímpano pode, em alguns casos, ser um bom critério para separar algumas espécies de *Thoropa*, já que ele discrimina *T. megatympanum* e *T. saxatilis* das outras espécies do gênero. Outro critério que parece discriminar bem as espécies é o comprimento das mãos, que parece definir o grupo *petropolitana*. No geral, entretanto, as análises multivariadas refletem uma dificuldade considerável de distinguir as espécies, com exceção do grupo *petropolitana*. Além disso, as espécies cujas predições da análise de discriminante foram mais altas são as espécies com menor número amostral (fêmeas separadas por linhagens, por exemplo), o que diminui a confiabilidade dos resultados.

CONCLUSÕES

Thoropa é um gênero com características morfológicas bastante conservadas, porém é possível diferenciar morfológicamente dois grupos: o grupo *petropolitana* (*T. lutzi* e *T. petropolitana*) e o grupo *miliaris* (*T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympanum* e *T. saxatilis*). O grupo *petropolitana* possui indivíduos de tamanhos menores, com ausência de PEPs nos dedos III e IV dos machos, com fenda vocal nos machos e larvas com expansão dérmica posterolateral larga e completa, espiráculo abaixo da expansão dérmica posterolateral e sulco medial incompleto na nadadeira ventral. As fêmeas nesse grupo são um pouco maiores do que os machos e o espessamento dos braços e antebraços dos machos em relação às fêmeas é sutil. O grupo *miliaris* possui espécies de tamanhos maiores, sem fendas nem sacos vocais, com PEPs nos dedos III e IV dos machos, larvas com expansão dérmica posterolateral estreita ou ausente, espiráculo na linha da expansão dérmica posterolateral e sulco medial completo na nadadeira ventral. Existe um dimorfismo sexual inverso ao dimorfismo do grupo *petropolitana*, sendo que as fêmeas são um pouco menores do que os machos e os braços e antebraços delas são nitidamente mais finos. Dentro do grupo *petropolitana*, as espécies são facilmente separadas pelas diferenças de tamanho, pelo tipo de PEPs nos dedos dos machos e pelo tubo cloacal e pelo comprimento da nadadeira ventral das larvas. No grupo *miliaris* as espécies são mais difíceis de serem diferenciadas, embora as larvas possuam algumas características que podem ser usadas para diagnose, como extensão da expansão dérmica posterolateral e nadadeira dorsal. Não encontramos nenhuma distinção entre as linhagens conhecidas de *T. miliaris* e *T. taophora*.

Mas as linhagens internas de *T. megatympanum* e *T. saxatilis* apresentaram alguma variação morfológica nas larvas. O surgimento de PEPs é suficiente para identificar machos adultos e, portanto, diagnoses baseadas em tamanho devem ser revistas. Com isso, concluímos que as diagnoses específicas das espécies de *Thoropa* precisam ser revistas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bokermann, W.C.A. 1965. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). An. Acad. Bras. Cienc. 525–537.
- Burgos, M.H., e D.W. Fawcett. 1956. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2:223–254.
- Caramaschi, U., e I. Sazima. 1984. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). Rev. Bras. Zool. 2:139–146.
- Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. Ital. J. Zool. 597.
- Cochran, D.M. 1938. Diagnoses of new frogs from Brazil. Proceeding Biol. Soc. Washingt. 51:41–42.
- Cochran, D.M. 1954. Frogs of Southeastern Brazil. United States Natl. Museum Bull. 1–423.
- Cocroft, R.B., e W.R. Heyer. 1988. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). Proc. Biol. Soc. Washingt. 101:209–220.
- Colaço, G. 2018. Morfologia larval externa, alterações heterocrônicas e tabela de desenvolvimento para *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 65 pp.
- Consolmagno, R.C., G.S. Requena, G. Machado, e C.A. Brasileiro. 2016. Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. Behav. Ecol. Sociobiol. 70:785–795.
- Cope, E.D. 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia s. Salientia. Nat. Hist. Rev. New series:97–120.
- Dias, P.H. dos S. 2018. Evolution of larval characters in Dendrobatoidea Cope, 1865 (Amphibia; Anura; Dendrobatidae and Aromobatidae). Universidade de São Paulo. 342 pp.
- Dias, P.H. dos S., M.F. Vera Candioti, A.F. Sabbag, G. Colaço, A.M.P.T. de Carvalho-e-Silva, e T. Grant. Living on the edge: a review of the semi-terrestrial tadpoles of Cycloramphidae Bonaparte 1850, with the description of the tadpole of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Amphibia; Anura; Cycloramphidae). No prelo
- Duellman, W.E. 1970. The hylid frogs of Middle America - volume 1. Monograph of the Museum of Natural History, The University of Kansas. 1–753 pp.
- Duellman, W.E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Monogr. Museum Nat. Hist. Univ. Kansas 1–2:753.

- Duellman, W.E., e L. Trueb. 1994. Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press, London.
- Fabrezi, M., e P. Alberch. 1996. The carpal elements of anurans. *Herpetologica* 52:188–204.
- Feio, R.N. 2002. Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 217 pp.
- Feio, R.N., e U. Caramaschi. 2002. Contribuição ao conhecimento da herpetofauna do nordeste do estado de Minas Gerais, Brasil. *Phyllomedusa* 1:105–111.
- Feio, R.N., M.F. Napoli, e U. Caramaschi. 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. do Mus. Nac.* 64:41–60.
- Fitzpatrick, S.W., C.A. Brasileiro, C.F.B. Haddad, e K.R. Zamudio. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* 18:2877–2896.
- Giarretta, A.A., e K.G. Facure. 2004. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). *Biota Neotrop.* 4:1–10.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190.
- Grant, T., D.R. Frost, J.P. Caldwell, ... W.C. Wheeler. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 262.
- Grant, T., M. Rada, M. Anganoy-Criollo, A. Batista, P.H. Dias, A.M. Jeckel, D.J. Machado, e J.V. Rueda-Almonacid. 2017. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives revisited (Anura: Dendrobatoidea). *South Am. J. Herpetol.* 12:S1–S90. DOI: <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00017.1>
- Heyer, W.R., e R.I. Crombie. 1979. Natural history notes on *Craspedoglossa stejnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). *J. Washingt. Acad. Sci.* 69:17–20.
- Heyer, W.R., A.S. Rand, C.A.G. da Cruz, O.L. Peixoto, e C.E. Nelson. 1990. Frogs of Boracéia. *Arq. Zool.* 31:231–410.
- Horikoshi, M., Y. Tang, A. Dickey, M. Grenié, R. Thompson, L. Selzer, D. Strbenac, e Kirill Voronin. 2018. Package “ggfortify”. 77.
- Katoh, K., e D.M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772–780.
- Lofts, B. (org.). 1974. Physiology of the Amphibia. 2º ed. Academic Press, New York. 592 pp.
- Luna, M.C., R.W. McDiarmid, e J. Faivovich. 2018. From erotic excrescences to pheromone shots: structure and diversity of nuptial pads in anurans. *Biol. J. Linn. Soc.* 20:1–44. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly048/4996764>
- Lutz, B. 1954. Anfíbios anuros do Distrito Federal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52:155–216.

- Lyra, M.L., C.F.B.B. Haddad, e A.M.L. de Azeredo-Espin. 2017. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Mol. Ecol. Resour.* 17:966–980. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12648>
- McDiarmid, R.W., e R. Altig. 1999. Tadpoles - the biology of anuran larvae. 444.
- Miranda-Ribeiro, A. 1923. Os hylodideos do Museu Paulista. *Rev. do Mus. Paul.* 825–846.
- Muralidhar, P., F.P. De Sá, C.F.B. Haddad, e K.R. Zamudio. 2014. Kin-bias, breeding site selection and female fitness in a cannibalistic Neotropical frog. *Mol. Ecol.* 23:453–463.
- Norris, D.O., e K.H. Lopez (orgs.). 2011. Hormones and reproduction of vertebrates - volume 2: Amphibians. Academic Press, London. 219 pp.
- Nunes-de-Almeida, C.H.L., C.L. Assis, R.N. Feio, e L.F. Toledo. 2016a. Redescription of the advertisement call of five species of *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae), including recordings of rare and endangered species. *PLoS One* 11:1–12.
- Nunes-de-Almeida, C.H.L., K.R. Zamudio, e L.F. Toledo. 2016b. The semiterrestrial tadpole of *Cycloramphus rhyakonastes* Heyer, 1983 (Anura, Cycloramphidae). *J. Herpetol.* 50:289–294.
- Oliveira, C. de, e C.A. Vicentini. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências* 6:79–88.
- Palumbi, S.R., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice, e G. Grabowski. 2002. The simple fool's guide to PCR - version 2.0. 1–45 pp.
- Pezzuti, T.L., I.R. Fernandes, F.S.F. Leite, C.E. De Sousa, P.C.A. Garcia, e D. Rossa-Feres. 2016. The tadpoles of the Neotropical *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae): ecomorphology and descriptions of two new forms. *Zool. Anz.* 261:22–32.
- Ponssa, M.L., e M.F. Vera Candioti. 2012. Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the *Leptodactylus fuscus* group (Anura: Leptodactylidae). *Zoomorphology* 131:349–362.
- Quinn, G.P., e M.J. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, New York. 537 pp.
- R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing.
- Rebouças, R., H.R. da Silva, e D. Sanuy. 2017. Froghood: postmetamorphic development of the rock river frog *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Cycloramphidae). *Acta Zool.* 99:151–157.
- Revelle, W. 2019. Package “psych”. 464.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sanchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, e A. Sanchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34:3299–3302.
- RStudio Team. 2018. RStudio: integrated development for R.
- Sabaj, M.H. 2016. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an online reference. Version 6.5. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol.* Washington, DC 5:802–832.

- Sabbag, A.F. 2013. Filogeografia de *Thoropa* grupo *miliaris* (Anura: Cycloramphidae). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo. 84 pp.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 122:142–156.
- da Silva, A.R., G. Malafaia, e I.P.P. Menezes. 2017. Biotools: an R function to predict spatial gene diversity via an individual-based approach. *Genet. Mol. Res.* 16:1–6. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16029655>
- Spix, J.B. v. 1824. *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae Regis. F. S. Hübschmann, München.*
- Taboada, C., T. Grant, J.D. Lynch, e J. Faivovich. 2013. New morphological synapomorphies for the new world direct-developing frogs (Amphibia: Anura: Terrarana). *Herpetologica* 69:342–357.
- Trauth, S.E., C.S. Thigpen, e M.B. Connior. 2015. Testicular histology and sperm morphometrics of the bird-voiced treefrog, *Hyla avivoca* (Anura: Hylidae), from Arkansas. *J. Ark. Acad. Sci.* 69:101–105.
- Villagra, A.L.I., S.B. Cisint, C.A. Crespo, M.F. Medina, I. Ramos, e S.N. Fernández. 2012. Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. *Histological study. Zygote* 22:291–299.
- Wandolleck, B. 1907. Einige Neue und Weniger Bekannte Batrachier von Brasilien. *Abhandlungen und Berichte des Zool. und Anthropol. Museums zu Dresden* 1–15.
- Watters, J.L., S.T. Cummings, R.L. Flanagan, e C.D. Siler. 2016. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa* 4072:477–495.
- Wickham, H., W. Chang, L. Henry, T.L. Pedersen, K. Takahashi, C. Wilke, K. Woo, e RStudio Team. 2018. Package “ggplot2”. 216. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr406>

CAPÍTULO 3

Designação do neótipo de *Thoropa petropolitana* (Wandolleck, 1907) (Anura: Cycloramphidae)

ABSTRACT

Thoropa is a genus with six valid species (*T. lutzi*, *T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. petropolitana*, *T. saxatilis* and *T. taophora*). Two of those are considered as disappeared and threatened (*T. lutzi* and *T. petropolitana*) and one as threatened (*T. saxatilis*). The holotype of *T. petropolitana* was destroyed in 1945, and since then no new type specimen has been designated. Our study designates a neotype for this species, with a redescription and taxonomic comments. More studies on these threatened and disappeared species are necessary to improve conservation decisions about them.

Keywords: threatened species, Atlantic forest, redescription, taxonomy.

RESUMO

Thoropa é um gênero com atualmente seis espécies válidas (*T. lutzi*, *T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. petropolitana*, *T. saxatilis* e *T. taophora*). Dessas, duas delas são consideradas como desaparecidas e ameaçadas ((*T. lutzi* e *T. petropolitana*) e uma como ameaçada (*T. saxatilis*). O holótipo de *T. petropolitana* foi destruído em 1945 e desde então nenhum novo exemplar-tipo foi designado. Nosso estudo designa um neótipo para essa espécie, com redescrição e comentários taxonômicos. São necessários mais estudos sobre essas espécies ameaçadas e desaparecidas para melhorar as decisões de conservação.

Palavras-chave: espécies ameaçadas, Mata Atlântica, redescrição, taxonomia.

INTRODUÇÃO

Thoropa Cope, 1865 é um gênero de anuros com seis espécies válidas, cinco endêmicas da Mata Atlântica - *T. lutzi* Cochran, 1938, *T. miliaris* (Spix, 1824), *T. petropolitana*

(Wandolleck, 1907), *T. saxatilis* Cocroft e Heyer, 1988 e *T. taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) - e uma espécie de campo rupestre – *T. megatympanum* Caramaschi e Sazima, 1984. Sabbag et al. (2018) separam o gênero em dois grupos morfológicos: grupo *miliaris*, com *T. megatympanum*, *Thoropa miliaris*, *T. saxatilis* e *T. taophora*; e grupo *petropolitana*, com *T. lutzi* e *T. petropolitana*. As espécies contidas no grupo *miliaris* apresentam adultos de médio a grande porte para Anura e as do grupo *petropolitana* apresentam adultos de pequeno porte (Feio 2002). No grupo *miliaris* os machos possuem PEPs nos dedos II, III e IV (numeração dos dedos segundo Fabrezi e Alberch 1996) e no grupo *petropolitana* as PEPs estão concentradas apenas no dedo II (Feio 2002). As larvas do grupo *miliaris* possuem “disco abdominal” reduzido ou inexistente, enquanto que as larvas do grupo *petropolitana* possuem “disco abdominal” largo que passa a lateral do corpo (Feio 2002).

As duas espécies de *Thoropa* do grupo *petropolitana* não são encontradas há pelo menos 40 anos na maior parte das localidades em que eram conhecidas, sendo que *T. petropolitana* não foi registrada em nenhuma outra localidade desde então (Sabbag et al. 2018). Por essa razão estão em categorias de ameaça grave em listas internacionais, nacionais e estaduais (Pimenta et al. 2005; Haddad 2008; Morais et al. 2012). Particularmente, *T. petropolitana* está como “vulnerável” na lista internacional (Carvalho-e-Silva e Peixoto 2004), “em perigo” na lista nacional, “criticamente ameaçada” na lista estadual do Espírito Santo e “em perigo” na lista estadual do Rio de Janeiro (ICMBio 2018).

Thoropa petropolitana era conhecida por se distribuir principalmente na Serra dos Órgãos, no estado Rio de Janeiro (ICMBio 2018), embora existam registros para o estado do Espírito Santo, em Santa Teresa (Feio 2002) e no estado de São Paulo, em Paranapiacaba (Feio 2002; Rossa-Feres et al. 2011). No estado do Rio de Janeiro ocorria nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Nova Friburgo, Tinguá e Mangaratiba (ICMBio 2018).

Histórico taxonômico

A história de *Thoropa petropolitana* começa com Wandolleck (1907) que descreve *Hylodes petropolitanus* através de quatro espécimes adultos (machos e fêmeas), cinco larvas e algumas desovas, todos originários de Petrópolis, coletados por Friedrich Ohaus em 1906, sob o número de registro MKTD D 2037 (Obst 1977) (Figura 1). A espécie foi descrita no gênero *Hylodes* Fitzinger, 1826 pela presença das falanges terminais em “T”, característica típica do que se considerava *Hylodes* na época.

Pouco tempo depois, *Hylodes petropolitanus* Wandolleck, 1907 foi alocado ao gênero *Elosia* Tschudi, 1838 por Boulenger (1909), sob a combinação *Elosia petropolitanus*. Daí em

diante a história da espécie começa a ser muito relacionada à história de outras espécies do gênero *Thoropa*.



Figura 1: Parte da Prancha 1 de Wandolleck (1907), Figuras 9 e 9a até 9f, com setas pretas indicando os desenhos correspondentes ao que se considera atualmente como *Thoropa petropolitana*: (9) vista dorsal da mão de um macho; (9a) vista dorsal do corpo de um macho; (9b) vista interna da boca; (9c) desova; (9d) cabeça em vista lateral de um macho; (9e) girino em vista lateral; (9f) girino em vista dorsal.

Miranda-Ribeiro (1923) considera que existem duas espécies: *Ololygon miliaris* (= *Rana miliaris* Spix, 1824, espécie tipo de *Thoropa* Cope, 1865) e *Ololygon abbreviatus*, essa última com três variedades (i.e., subespécies): *taophora*, *petropolitanus* e *abbreviatus*. Nesse trabalho Miranda-Ribeiro (1923) considera como sinônimo de *Ololygon miliaris* a espécie *Cystignathus discolor* Reinhardt e Lütken, 1862 "1861", descrita para "Provindsen Minas Geraes i Naerheden af Byen Juiz de Fora" (i.e., Juiz de Fora, Minas Gerais). *Ololygon abbreviatus taophora* Miranda-Ribeiro, 1923 é a variedade descrita para a localidade de "Alto da Serra, São Paulo" (Figura 2), que foi posteriormente restringida a "Paranapiacaba, São Paulo" por Bokermann (1966). Nesse mesmo trabalho, Miranda-Ribeiro (1923) considera *Hylodes petropolitanus* como uma variedade de *Ololygon abbreviatus*, incluindo-a na sinonímia de *O. abbreviatus*. E *Ololygon abbreviatus petropolitanus* é a nova combinação para *Hylodes petropolitanus*. Em

seguida, Miranda-Ribeiro (1926) sinonimiza *Ololygon abbreviatus* (e suas variedades) a *O. miliaris*.

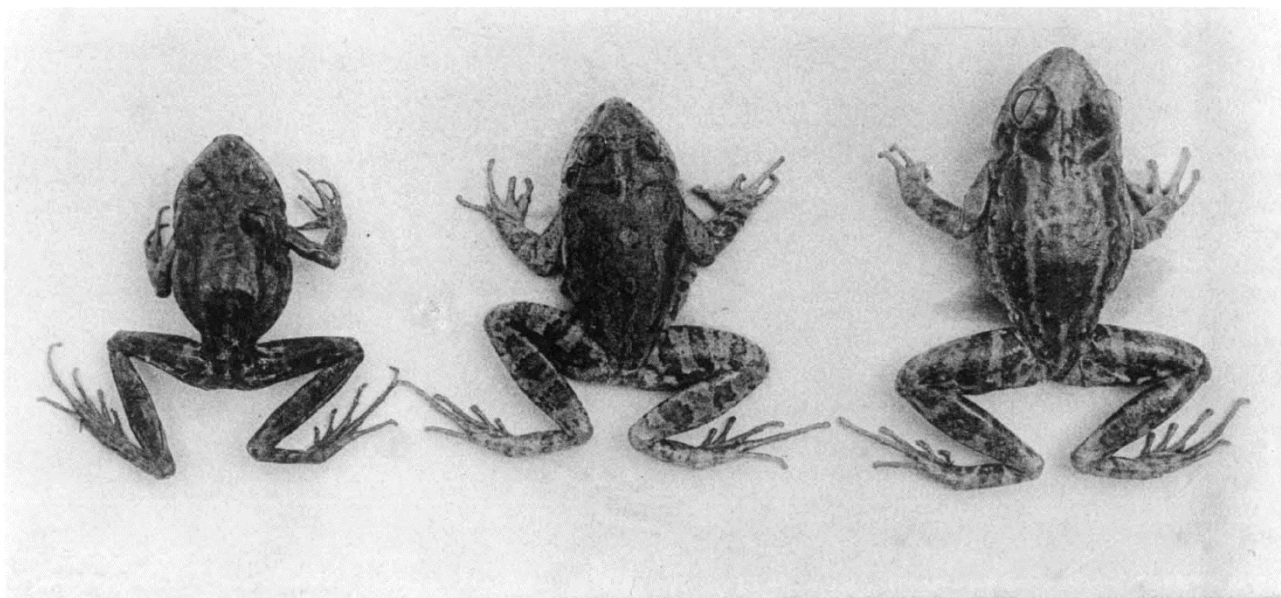


Figura 2: Prancha de Miranda-Ribeiro (1923), terceira página sem numeração após a página 846, com a legenda “*Ololygon abbreviatus* (Spix.)”.

Posteriormente, Müller (1927) transfere *Hylodes petropolitanus* a *Eleutherodactylus* Duméril e Bibron, 1841 sob a nova combinação *Eleutherodactylus petropolitanus*. E paralelamente Noble (1927) transfere *Hylodes petropolitanus* a *Borborocoetes* Bell, 1843 sob a combinação de *Borborocoetes petropolitanus*.

Witte (1930) descreve outra espécie, *Hylodes brienii*, com base em um exemplar (IRSNB 1024) de Itaeté na Bahia (Lang 1990). Cochran (1938) descreve *Thoropa lutzi* com base em um único indivíduo (USNM 97622) do Recreio dos Bandeirantes, no sudoeste da cidade do Rio de Janeiro (o então Distrito Federal).

Lutz (1947) transfere *Hylodes petropolitanus* ao gênero *Thoropa* sob a combinação de *Thoropa petropolitana* e Lutz (1954) considera *T. lutzi* como sinônimo de *T. miliaris*. Cochran (1955 "1954") considera *Borborocoetes* e *Thoropa* como sinônimos do gênero *Eupsophus* Fitzinger, 1843, usando as seguintes combinações: *Eupsophus lutzi*, *E. miliaris* e *E. petropolitanus*. Neste mesmo trabalho considera *Ololygon abbreviatus taophora*, *Eupsophus fuliginosus* Fitzinger, 1861 "1860" e *Hylodes brienii* como sinônimos de *Rana miliaris*. Bokermann (1966) reconhece o gênero *Thoropa* novamente, com três espécies: *T. miliaris*, *T. lutzi* e *T. petropolitanus*.

Acredita-se que os tipos de *Rana miliaris* tenham sido perdidos na Segunda Guerra Mundial (Hoogmoed e Gruber 1983) e que os tipos de *Hylodes petropolitanus* tenham sido

queimados no bombardeio de Dresden, Alemanha (Obst 1977). Em substituição ao holótipo de *Rana miliaris*, existe um neótipo designado por Feio et al. (2006). Entretanto, para *Thoropa petropolitana* isso ainda não foi feito. Assim, nosso objetivo no presente estudo é designar um neótipo para *Hylodes petropolitanus* (atualmente *Thoropa petropolitana*) e apresentar uma redescrição da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes

Para diagnosticar *Thoropa petropolitana* e compará-la com as outras espécies do gênero examinamos material de coleções zoológicas através de visitas e empréstimos, sendo elas: Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil; Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia da USP, São Paulo, SP, Brasil; Coleção do Prof. Dr. Miguel Trefault Rodrigues, USP, São Paulo, SP, Brasil; Coleção Herpetológica do Museu Nacional (incluindo a coleção Adolfo Lutz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Coleção de Anfíbios do Laboratório de Herpetologia da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Ciências Naturais da PUC-MG, Belo Horizonte, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia da UESC, Ilhéus, BA, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia “Adão José Cardoso” da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; Coleção de Anfíbios do Museu de Zoologia João Moojen da UFV, Viçosa, MG, Brasil; Coleção de Anfíbios da UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil; Coleção de Anfíbios Eugenio Izecksohn da UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil; Coleção Herpetológica do Departamento de Zoologia da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Coleção de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brasil; Coleção Zoológica do Museu de Biologia Professor Mello Leitão, Santa Teresa, ES, Brasil; Coleção Científica de Anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil; Division of Amphibians and Reptiles, National Museum of Natural History, Washington, DC, USA; Herpetology Collection, Museum of Zoology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA; Texas Natural History Collections, University of Texas, Austin, TX, USA; Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley, CA, USA; Herpetology Collection, Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA, USA; Amphibian and Reptile Collection, Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA; Section of Herpetology, Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, PA, USA; Herpetology Collection, California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA; Department of Herpetology, American Museum of Natural History, New

York, NY, USA; Coleção do Prof. Dr. Ariovaldo A. Giaretta, UFU, Uberlândia, MG, Brasil. Como não pudemos visitar ou emprestar exemplares de coleções europeias, obtivemos dos curadores e gerentes dessas coleções fotos de *Thoropa* e seus sinônimos, incluindo as coleções: Collection de Vertébrés, Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles, Belgique; Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France; Herpetologische Sammlung, Naturhistorisches Museum Wien, Wien, Österreich; Zoologisk Museum, Københavns Universitet, Københavns, Danmark. Todas as abreviações institucionais seguem Sabaj (2016). Os espécimes examinados de *Thoropa petropolitana* e os espécimes das outras espécies de *Thoropa* utilizados para comparações estão listados no Apêndice 6.

Fizemos duas tentativas de encontrar indivíduos de *Thoropa petropolitana* nos arredores de Petrópolis e Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro (licenças de coleta ICMBio 50280 e 55031). Procuramos em paredões molhados e em cachoeiras da região, mas não tivemos sucesso em nenhuma das tentativas.

Caracteres morfológicos

Analizamos 15 caracteres mensurais utilizando os métodos previamente descritos (Duellman 2001) e redefinidos (Watters et al. 2016), com acréscimos de outras duas medidas (diâmetro do antebraço e diâmetro do braço). Tomamos todas as medidas (em mm) a partir de adultos, com o auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo (precisão de 0,01 mm). As medidas são: comprimento rostro-cloacal (CRC, distância em linha reta do focinho à cloaca, com o exemplar o mais reto possível); largura da cabeça (LC, linha reta no ponto mais largo da cabeça, em geral na altura do ângulo das mandíbulas); comprimento da cabeça (CC, linha reta do focinho até a articulação do quadrado-jugal com o pterigóide na extremidade posterior da mandíbula); diâmetro do tímpano (DT, maior diâmetro do tímpano, incluindo o anel timpânico, medido preferencialmente do lado esquerdo); diâmetro do olho (DO, maior diâmetro do olho, medido preferencialmente do lado esquerdo); distância interorbital (DIO, menor distância entre os olhos); distância internasal (DIN, a menor distância entre as narinas, inserindo o paquímetro na borda interna delas); distância entre o olho e a narina (DON, da margem anterior do olho à margem posterior da narina, medido preferencialmente do lado esquerdo); distância do olho ao focinho (DOF, da margem anterior do olho ao focinho, medido preferencialmente do lado esquerdo); comprimento do pé (CP, da base proximal do tubérculo metatarsal interno até a ponta do maior dedo, medido preferencialmente do lado esquerdo, o mais reto possível); comprimento da mão (CM, da base proximal do tubérculo metacarpal interno até a ponta do maior dedo, medido preferencialmente do lado esquerdo, o mais reto possível); comprimento

da tíbia (CT, do joelho até o calcanhar, medido preferencialmente do lado esquerdo); comprimento do fêmur (CF, da cloaca até o joelho, medido preferencialmente do lado esquerdo e ventralmente); diâmetro do antebraço (DA, com o paquímetro rente à articulação do cotovelo); diâmetro do braço (DB, com o paquímetro rente à inserção do braço no corpo). Utilizamos a numeração dos dedos de II a V (*sensu* Fabrezi e Alberch 1996). Os machos foram identificados pela presença de almofadas nupciais (*nuptial pads*), que em *Thoropa petropolitana* são do tipo “PEPs com formato de espinho” (*spine-shaped papillary*, *sensu* Luna et al. 2018) localizadas nos dedos II das mãos. Elas são, em geral, cobertas por um estrato córneo queratinizado com coloração que varia entre o marrom claro e o preto (Luna et al. 2018). As fêmeas foram identificadas pela presença de óvulos ou ovócitos na cavidade abdominal (visto por fora, sem dissecar o exemplar, ou por dentro se o exemplar já estava aberto). Quando um indivíduo possuía um tamanho semelhante ao tamanho dos machos, porém não possuía PEPs e também não era possível ver óvulos ou ovócitos, consideramos como “possível fêmea”; neste caso não é possível ter certeza, pois pode tratar-se de um macho jovem sem PEPs.

A descrição da morfologia externa do girino é baseada em um girino entre os estágios 39 e 40 (*sensu* Gosner 1960). A terminologia que utilizamos seguiu McDiarmid e Altig (1999) e as características morfológicas das larvas de *Thoropa* seguiram Dias (2018).

Fotografamos o exemplar adulto escolhido para neótipo e outros exemplares e estruturas com uma câmera “Axiocam 506 color” acoplada a um estereomicroscópio Zeiss Discovery V.20. As descrições de padrões de cores de *Thoropa petropolitana* baseiam-se em Feio (2002).

RESULTADOS

Descrição do neótipo de Thoropa petropolitana (Wandolleck, 1907)

Thoropa petropolitana (Wandolleck, 1907)

Hylodes petropolitanus Wandolleck, 1907

Oligon abbreviatus petropolitana (Miranda-Ribeiro 1923)

Oligon abbreviatus petropolitana (Miranda-Ribeiro 1926)

Borborocoetes petropolitanus (Noble 1927)

Eleutherodactylus petropolitanus (Müller 1927)

Hylodes petropolitanus (Lutz 1929)

Thoropa petropolitana (Lutz 1947)

Eupsophus petropolitanus (Cochran 1955 "1954")

Thoropa petropolitana (Bokermann 1966)

Síntipos: quatro exemplares adultos (incluindo machos e fêmeas), cinco larvas e duas desovas (MKTD D 2037), coletados em Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil, supostamente queimados no bombardeio de Dresden em 13 de fevereiro de 1945 (Obst 1977).

Neótipo: macho adulto (MNRJ 23344) coletado em 19 de julho de 1955, na “Estrada Nova para Paty do Alferes”, município de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figuras 3, 4 e 5).

Diagnose: *Thoropa petropolitana* é diagnosticada de seus congêneros pela seguinte combinação de caracteres (a) espécie de tamanho pequeno para o gênero (CRC = 14,21 - 22,87 mm nos machos; CRC = 16,09 – 26,70 mm nas fêmeas; (b) fenda vocal; (c) sacos vocais pareados; (b) tamanho do corpo das fêmeas adultas em média maior do que o dos machos adultos; (c) PEPs localizadas apenas no dedo II, sobre a articulação entre a falange proximal e o metacarpo, com até 21 PEPs; (d) girinos com expansão de pele em torno do abdômen, em forma de “saia”; (e) girinos com nadadeira ventral formando um sulco medial na porção final; (f) girinos com tubo anal preso à nadadeira ventral e à expansão de pele; (g) girinos com desenho dorsal da cauda com uma sucessão de losangos claros.



Figura 3: Vista dorsal do corpo do neótipo aqui proposto para *Thoropa petropolitana*: MNRJ 23344, macho adulto, coletado na “Estrada Nova para Paty do Alferes”, município de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, em 19 de julho de 1955.

Descrição do neótipo: Corpo pequeno para o gênero; cabeça pouco mais larga que longa (4,66 % do CRC); focinho acuminado em vistas dorsal e lateral; narinas laterais, localizadas próximas

à extremidade do focinho; distância internasal 12,24 % da distância interorbital; *canthus rostralis* côncavo; região loreal oblíqua; olhos com sua margem posterior sem contato com a margem anterior do anel timpânico; menisco ocular ausente; membrana palpebral não reticulada; diâmetro do olho 44,84 % da distância interorbital; tímpano visível e arredondado; anel timpânico visível; membrana supratimpânica visível, circundando o tímpano a partir da margem posterior do olho até a borda anterior da inserção do braço no corpo, mas passando levemente por cima do anel timpânico na margem posterior-superior; língua oval, anteriormente presa, lateralmente e posteriormente livre; processos dentígeros dos vômeres presentes, transversais, descontínuos, posicionados entre as coanas; coanas largas e elípticas, amplamente separadas; fendas vocais presentes; saco vocal presente. Em vista ventral, prega discoidal evidente. Presença de um processo denteado único e anterior na mandíbula, com uma fosseta maxilar única na maxila superior, onde o processo denteado da mandíbula se encaixa.

Membro anterior esguio, não hipertrofiado, sem diferença clara entre o diâmetro do braço e antebraço; dedos longos e esguios, extremidades ligeiramente dilatadas; dedos na seguinte ordem de comprimento $II < III < V < IV$ ou $II < III \approx V < IV$; ausência de membranas interdigitais; tubérculos subarticulares simples e arredondados, pouco evidenciados; tubérculos supranumerários não visíveis; calos metacarpais interno e externo ovais; almofada nupcial apenas no dedo II da mão, localizada aproximadamente em cima da articulação, entre a falange proximal e o metacarpo; PEPs da almofada nupcial em tom marrom escuro (ou negro) no ápice e tons mais claros até a base, sendo 12 PEPs na mão direita e 11 PEPs na mão esquerda.

Membro posterior longo e esguio; comprimento da tíbia igual a 55,92 % do CRC; artelhos longos e esguios, com extremidades ligeiramente dilatadas; artelhos na seguinte ordem de comprimento: $I < II < V < III < IV$; ausência de membranas interdigitais; tubérculos subarticulares simples e arredondados, pouco evidenciados; calo metatarsal interno oval; calo metatarsal externo redondo e evidente.

Pele da região dorsal pouco rugosa na parte central, com as rugosidades aumentando conforme se aproxima das laterais; superfície dorsal da pálpebra apresentando alguma rugosidade; região dorsal dos membros com um pouco de rugosidade; região lateral com rugosidade, aparentando serem glândulas verrucosas dispersas e pouco evidentes; a pele da região ventral do corpo, gula, peito e dos membros é lisa.

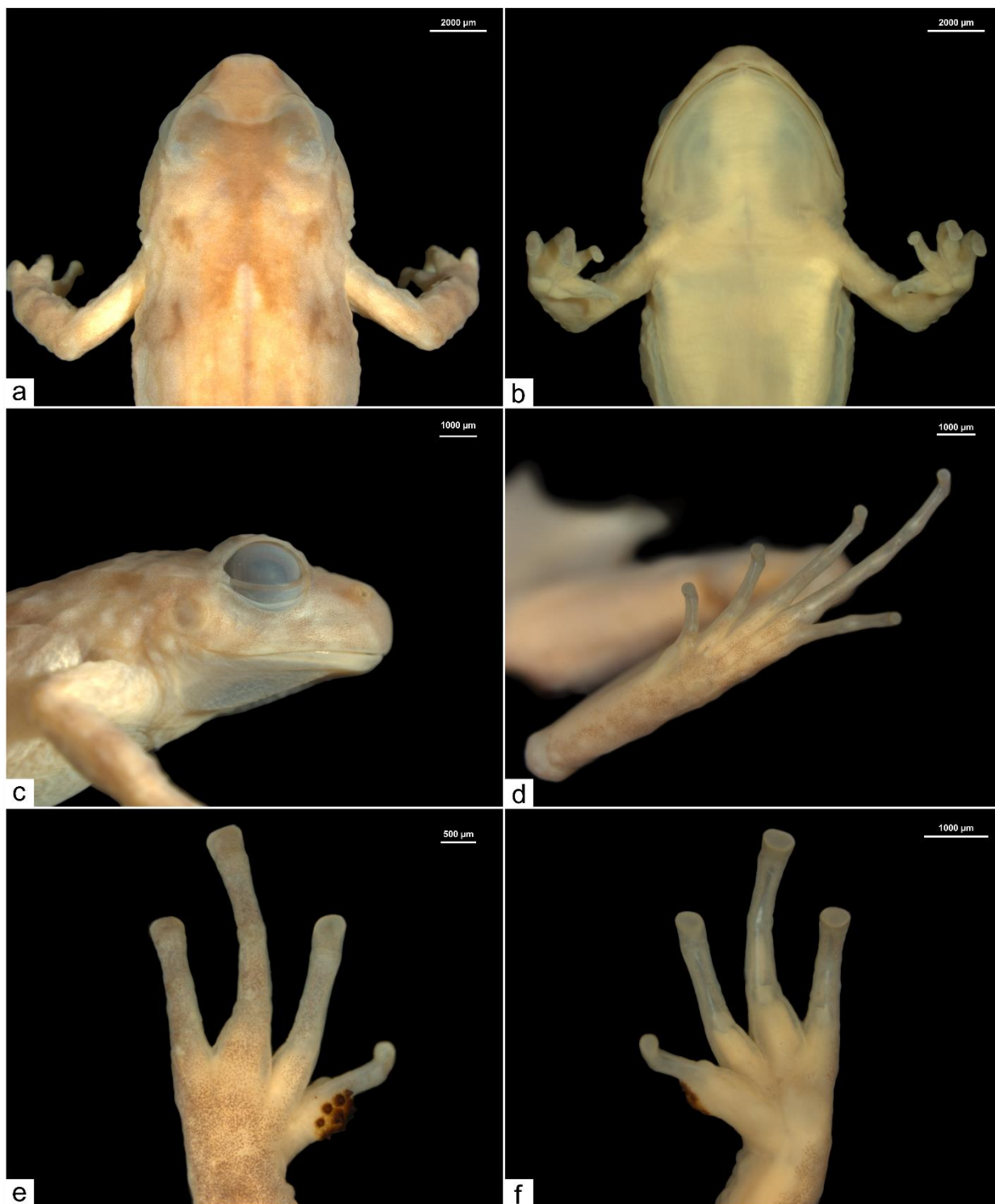


Figura 4: Neótipo aqui proposto para *Thoropa petropolitana* (MNRJ 23344). (a) Vista dorsal da cabeça; (b) vista ventral da cabeça; (c) vista lateral da cabeça; (d) vista ventral do pé esquerdo; (e) vista dorsal da mão esquerda; (f) vista ventral da mão esquerda.



Figura 5: Detalhe da almofada nupcial do dedo II esquerdo do exemplar MNRJ 23344, neótipo aqui proposto para *Thoropa petropolitana*, mostrando coloração marrom do estrato córneo queratinizado, formando PEPs em formato de espinhos.

Medidas do neótipo (em mm): CRC = 18,56; LC = 6,96; CC = 6,65; DT = 1,33; DO = 2,39; DIO = 1,65; DIN = 1,47; DON = 2,04; DOF = 3,13; CP = 10,08; CM = 6,29; CT = 10,38; CF = 9,28; DA = 1,55; DB = 1,44.

Coloração em vida

Como não é possível descrever a coloração em vida do neótipo, a descrição aqui é feita a partir de outros exemplares. A coloração em vida foi primeiramente descrita por Wandolleck (1907), sendo caracterizada por: cor básica da parte dorsal cinza-azulado escuro nos jovens e nos exemplares mais velhos ela fica mais fraca das laterais para a região central do dorso, marmorada de amarelo-acinzentado; faixa ampla cruzando horizontalmente sobre os olhos, conectada a uma listra longitudinal até o meio das costas; lábio superior com quatro faixas claras oblíquas saindo dos olhos; tímpano amarelo-acinzentado, com o mesmo tom do marmorado e maculado das laterais do corpo; a parte dorsal das extremidades dos membros locomotores alterna entre cinza-amarelado e azul-acinzentado, exceto nas falanges; parte ventral do corpo quase totalmente amarelo-esbranquiçada, sendo que máculas marrons irregulares podem existir na cintura peitoral, na lateral e mais frequentemente nas coxas. Adicionalmente, Bokermann (1965) diz também que os exemplares vivos apresentam manchas negras pouco definidas em um fundo esverdeado.

Baseado em um diapositivo de um exemplar vivo fotografado por Eugênio Izecksohn (Figura 6), foi possível fazer uma descrição de coloração em vida. O exemplar provavelmente

está registrado como EI 9474 e foi coletado em 21 de outubro de 1977, nas proximidades do Rio Soberbo, no Parque Estadual da Serra dos Órgãos, provavelmente no município de Guapimirim, RJ. O dorso apresenta uma cor marrom-amarelada clara, com máculas irregulares cinza-amarronzadas dispersas; o focinho é marrom um pouco mais escuro que a cor de fundo do dorso; a pálpebra é esbranquiçada; entre as pálpebras há uma faixa branca, que delimita a base de uma grande mancha marrom escuro triangular que segue até o meio da região dorsal, onde duas manchas marrom-escuro bifurcam lateralmente, deixando evidenciado entre elas uma região esbranquiçada; a prega supra-timpânica é marrom um pouco mais escuro que a cor de fundo do dorso; no terço final do dorso há uma mancha marrom escuro grande; os membros possuem barras transversais bem definidas em marrom escuro.



Figura 6: Única fotografia conhecida de *Thoropa petropolitana* em vida. Foto de Eugênio Izecksohn.

Coloração em álcool

Fixado, o neótipo (MNRJ 23344) está com o fundo amarelo bem claro, com a mancha grande e triangular entre as pálpebras em um tom marrom-claro que dá início a um formato em “X” que vai até o meio das costas, também marrom-claro; o dorso ainda fica com máculas irregulares marrom-claras e dispersas; o focinho é marrom-claro; a pálpebra é esbranquiçada, com prega supra-timpânica marrom-claro. No terço final do dorso, a mancha é marrom-claro e as barras transversais dos membros também são marrom-claro. Todas as regiões ventrais são esbranquiçadas.

Sinonímia de Eupsophus fuliginosus a Thoropa petropolitana

Eupsophus fuliginosus foi sinonimizado a *Eupsophus miliaris* (Cochran 1955 "1954").

Porém, Cocroft e Heyer (1988) consideram que é mais provável que essa espécie seja *T. petropolitana*, pela localidade de coleta, tamanho do adulto, padrão de desenho dorsal, comprimento relativo dos dedos II e III e expansão da ponta dos dedos. Mas não puderam afirmar isso pela ausência de PEPs (obtiveram informações do Museu de História Natural de Viena de que o exemplar com certeza é macho) e pelo padrão de desenho da parte posterior das coxas. Através de fotos do holótipo cedidas por Georg Gassner do NHMW (Museu de História Natural de Viena), supomos que é realmente possível que o exemplar seja de *Thoropa petropolitana* pelo padrão dorsal de desenho (em formato de “X”) e pela presença da prega discoidal bem marcada, mais difícil de ver em juvenis das outras espécies. Pelo tamanho do exemplar (mais de 20 mm, aproximadamente 23 mm segundo Cochran 1955 "1954"), pela ausência de PEPs e por uma informação do autor da espécie (dizendo que o exemplar é uma fêmea), os curadores do NHMW nos informaram que se trata de uma fêmea (Figura 7). Assim, é possível que *E. fuliginosus* Fitzinger, 1861 "1860" seja sinônimo sênior de *T. petropolitana*.



Figura 7: Fotografias do holótipo de *Eupsophus fuliginosus* (NHMW 15847) cedidas pelo Museu de História Natural de Viena.

História natural

As primeiras informações sobre história natural de *Thoropa petropolitana* são dadas na própria descrição de Wandolleck (1907), como uma transcrição da comunicação pessoal dada pelo coletor Friedrich Ohaus. Segundo F. Ohaus, a espécie vive em paredes de granito com uma água corrente mais ou menos rápida; se alimentam de insetos que aparecem ou vivem ali; as desovas são relativamente grandes e são presas sob partes de rochas protuberantes ou entre musgos e hepáticas, de forma a ficarem sempre em contato com a água; as larvas vivem nas paredes de rocha e possuem um disco de sucção na raiz da cauda ou uma almofada de sucção na barriga, com as quais deslizam sobre as pedras e se movimentam muito rapidamente na corrente de água, mostrando resiliência e capacidade de voltar à água; são camufladas com as rochas (Wandolleck 1907).

Bokermann (1965) diz que a “cópula” nunca foi observada e que o fundo esverdeado da pele do dorso dos animais parecia auxiliar no mimetismo com as algas e limo das rochas. Para o autor, os machos da espécie não são territorialistas como *T. miliaris* e cantam junto de muitos outros machos, fêmeas e jovens (Bokermann 1965).

Heyer e Crombie (1979) descrevem a sequência do comportamento reprodutivo, desenvolvimento dos embriões na desova, territorialidade e predação, inclusive com algumas comparações com *Thoropa miliaris*. Cocroft e Heyer (1988) comentam sobre territorialidade da espécie, comparando com outras do gênero.

Canto

Segundo Friedrich Ohaus, a espécie canta como um “pequeno papagaio” (Wandolleck 1907). Bokermann (1965) descreve o canto de *Thoropa petropolitana* como possuindo uma nota única curta e uniforme, com uma dominância leve entre 1500 a 4500 ciclos, com duração de menos de um décimo de segundo. Segundo esse autor, ela pareceria com um estalido repetido a intervalos irregulares que podem variar entre 5 a pouco mais de 10 segundos. Para Lutz (1954), o canto é um estalado. Em um trabalho recente, o canto de *Thoropa petropolitana* foi redescrito juntamente com o canto de outras quatro espécies do gênero e de uma possível nova espécie, com comparações morfométricas (Nunes-de-Almeida et al. 2016).

Variação

O comprimento rostro-cloacal dos machos de *Thoropa petropolitana* varia entre 14,21 e 22,87 mm (n = 184) e o de fêmeas varia entre 19,28 e 26,40 mm (n = 11) (Capítulo 2, Tabela 2).

Nos machos adultos encontramos uma reentrância da pele do assoalho bucal, de cada lado da língua, entre a borda lateral da língua e a maxila inferior (Figura 8). Essas reentrâncias parecem ser aberturas de sacos vocais laterais, segundo a definição de Elias-Costa et al. (2017), separados pelo músculo genióideo (Figura 9).

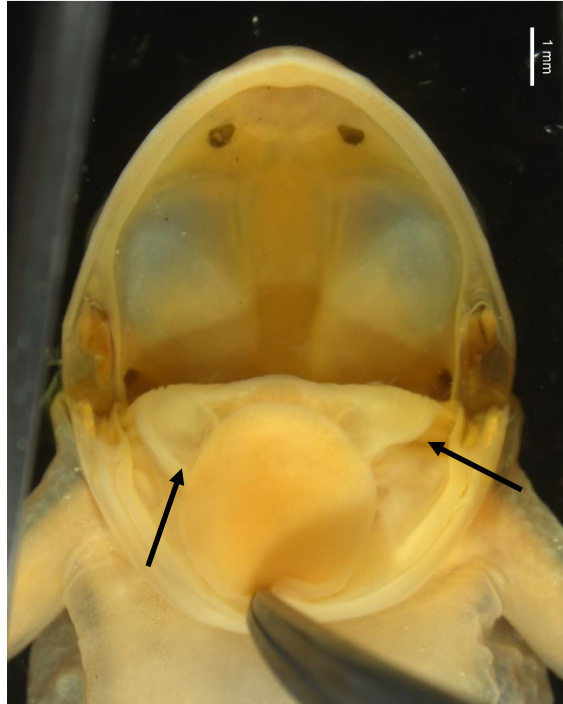


Figura 8: Vista da cavidade bucal de um exemplar macho de *Thoropa petropolitana* (EI 2586), mostrando as fendas vocais no assoalho da boca (setas pretas).



Figura 9: Cabeça em vista ventral de um exemplar macho de *Thoropa petropolitana* (EI 2586), mostrando os sacos vocais duplos e laterais (setas pretas) separados pelo músculo genióideo ao centro.

Na maioria dos indivíduos analisados, os tubérculos subarticulares das mãos e dos pés são difíceis de serem vistos. No entanto, com o uso de um pouco de lugol vemos que aparentemente estão localizados abaixo de todas as articulações dos dedos e artelhos. Da mesma forma, em alguns indivíduos é particularmente difícil ver os tubérculos metacarpais e o tubérculo metatarsal interno.

Entre um indivíduo e outro, as PEPs variam de tamanho, posição, formato específico e nível de queratinização do estrato córneo. Particularmente sobre a coloração escura do estrato córneo, encontramos sete indivíduos com PEPs completamente brancas em alguma das mãos (por exemplo: MNRJ 24152, EI 9483). Outros apresentam uma combinação de PEPs escuras com PEPs brancas ou tons marrons claros (Figura 5). Alguns machos apresentaram PEPs em outros locais da mão, além da articulação metacarpal-falangeal. Um deles é USNM 208609, que possui uma PEP na falange distal do dedo II da mão direita. Outro é o USNM 208610, com duas PEPs na falange distal do dedo II direito e uma na falange distal do dedo II esquerdo e uma PEP em cada tubérculo metacarpal interno (na mão direita e na mão esquerda). A quantidade de PEPs entre os indivíduos varia entre 0 e 21 na mão direita e 0 e 17 na mão esquerda. Entretanto, é possível que existam exemplares com mais PEPs, porque quando as PEPs estavam completamente brancas, tínhamos dificuldade em saber o número exato delas pela dificuldade de contá-las.

Existe variação nos tamanhos dos dedos e artelhos entre os indivíduos. Nas mãos notamos que o dedo III pode ser menor ou aproximadamente igual ao dedo V. Nos pés, o artelho V é menor ou aproximadamente igual ao artelho III.

Larvas

Em vista dorsal, o corpo dos girinos é oval, com o focinho elíptico (Figura 10). Em vista lateral, o corpo é elíptico e deprimido e o focinho também é elíptico (Figura 10). Os olhos são dorsais e direcionados anterolateralmente. As narinas são redondas, dorsais e também direcionadas anterolateralmente, com um aro marginal e sem projeção carnosa na margem sagital.

O espiráculo é sinistro, tubular e lateral, posicionado ventralmente à linha medial do corpo, direcionado posterolateralmente em vista dorsal e dorsalmente em vista lateral. O espiráculo é um orifício na parede abdominal do lado esquerdo, sendo que o corpo forma a parede interna do tubo. Possuem uma expansão dérmica posterolateral (Dias 2018) circundando todo o ventre, como uma “saia”. O espiráculo posiciona-se abaixo dessa expansão dérmica

(Figura 10).

O tubo cloacal é medial, curto, preso dorsalmente na cauda e ventralmente na expansão dérmica, formando uma indentação medial na parede ventral do tubo. Os músculos caudais não alcançam a ponta da cauda. A nadadeira dorsal é curta, reta e inicia-se na metade da cauda; a nadadeira ventral também se inicia após o começo da cauda, sendo modificada em um sulco medial no final. A linha lateral não é visível.

O disco oral é ventral, grande, sem emarginações e circundado por uma fileira única de PEPs marginais arredondadas ou cônicas. Possuem poucas PEPs supranumerárias no assoalho e no teto da boca (Dias 2018). Lábio superior com um grande diastema (Dias 2018). Fórmula dentária: 2/3(1). Bico córneo presente, serrilhado, as duas peças são comprimidas lateralmente formando um “U”, completamente queratinizadas.

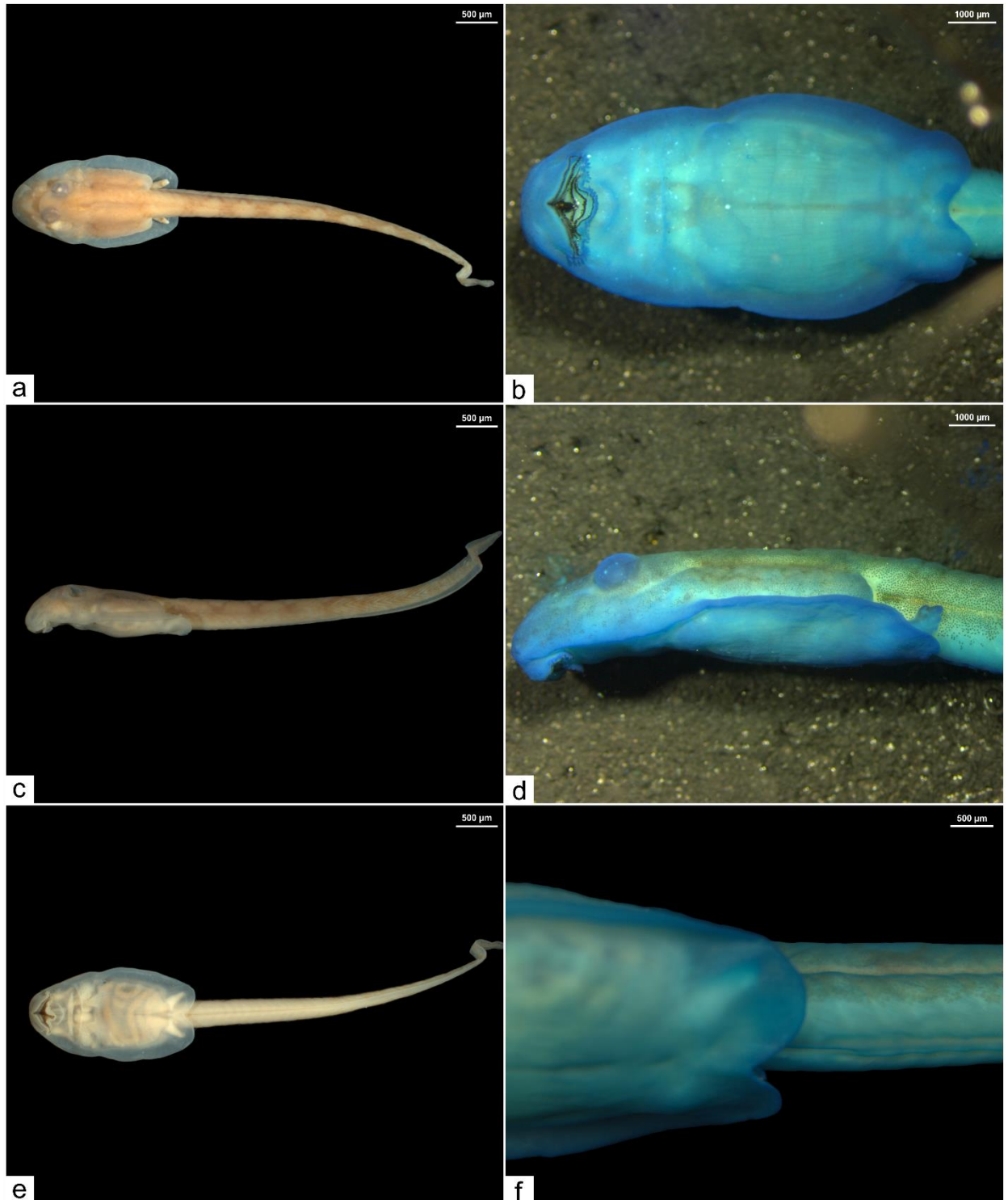


Figura 10: Girinos de *Thoropa petropolitana*. (a) Vista dorsal do espécime inteiro, MNRJ 25709, Petrópolis, RJ; (b) vista lateral do corpo, MNRJ 25709, Petrópolis, RJ; (c) vista ventral do espécime inteiro, MNRJ 25709, Petrópolis, RJ; (d) vista lateral do corpo, MZUSP 80015, Teresópolis, RJ; (e) vista ventral do espécime inteiro, MZUSP 80015, Teresópolis, RJ; (f) parede ventral do tubo cloacal, mostrando a indentação medial, MNRJ 25709, Petrópolis, RJ.

Distribuição geográfica

Os registros de *Thoropa petropolitana* conhecidos são principalmente para a região serrana do estado do Rio de Janeiro. Mantivemos os nomes das localidades como registradas, sem fazer alterações e correções de localidades, mas corrigindo ortografia e abreviando o que parece ser a unidade federativa da união. Traduzimos os registros de coleções do exterior tentando não alterar o significado. A sigla “DF” é para o então Distrito Federal, atualmente parte do município do Rio de Janeiro. São eles: Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ; Alto do Soberbo, Teresópolis, RJ; Nova Friburgo, RJ; Petrópolis, RJ; Paineiras, Serra Carioca, DF; Corcovado, Paineiras, DF; Tijuca, DF; Sumaré, DF; Independência, RJ; Recreio dos Bandeirantes, DF; Guapi, Teresópolis, RJ; Paredões de gnaise na gruta S. Lourenço e estrada real D. Affonso Henriques, no Parque Nacional Serra dos Órgãos, Teresópolis; 57 km do Rio de Janeiro, Petrópolis, RJ; Alto Teresópolis, RJ; Tinguá, RJ; Alto da Serra de Cubatão ou Paranapiacaba, SP; Xerém, RJ; Estrada Nova para Paty do Alferes, Petrópolis, RJ; Granja Comari (ou Cumary), Teresópolis, RJ; Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ; Parque Nacional da Serra dos Órgãos, paredão abrigo 2; Lage exposta entre abrigos 1 e 2 no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Teresópolis, RJ; Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Magé, RJ; Estrada Rio-Petrópolis; Serra dos Órgãos, Magé, RJ; Km 45 Estrada do Center, Petrópolis, RJ; Teresópolis, RJ; Alto Soberbo, Rodovia Rio-Teresópolis, Magé, RJ; Independência, Petrópolis, RJ; Petrópolis, 30 milhas Norte do Rio de Janeiro, RJ; Friburgo; Rodovia Rio-Petropolis, 57 km do Rio de Janeiro, RJ; Beira da rodovia entre Rio de Janeiro e Teresópolis, RJ; Parque Teresópolis, 124 km Nordeste Rio de Janeiro, RJ; Cerca de 5 km Nordeste Alto do Soberbo, Vale da Revolta, Teresópolis, RJ; Serra de Petrópolis, RJ; Proximidades da borda Sudeste, Teresópolis, RJ; Cerca de 4 km nordeste do Alto do Soberbo, Teresópolis, RJ; Parque Nacional da Serra dos Órgãos, 1500 m de altitude, Teresópolis; Rio Juruá, AM; Santa Teresa, ES.

O registro mais antigo da espécie é o da coleta de 1906, descrita por Wandolleck (1907) (MKTD D 2037). O registro mais recente é de 1982, coletado por A. L. Peruchii e E. Izecksohn e tombado no Museu Nacional (MNRJ 61403-61404).

DISCUSSÃO

Nesse estudo, propusemos um neótipo para *Thoropa petropolitana*, descrita por Wandolleck (1907), em razão dos síntipos da espécie terem sido possivelmente destruídos no

bombardeio de Dresden de 1945 (Obst 1977). Também compilamos as informações sobre a espécie disponíveis na literatura, bem como fizemos comparações com as outras espécies conhecidas para o gênero *Thoropa*.

Thoropa petropolitana foi agrupada formalmente com *T. lutzi* no grupo *petropolitana* por Sabbag et al. (2018), mas as semelhanças entre as duas espécies foram citadas em estudos anteriores (Bokermann 1965; Caramaschi e Sazima 1984; Nunes-de-Almeida et al. 2016). Dentre as características de semelhança podemos citar o pequeno porte para o gênero, não possuírem “espinhos” nos dedos III, IV e V e possuírem larvas com disco abdominal largo (Sabbag et al. 2018). Pode-se ainda acrescentar semelhanças no desenho dorsal (em formato de “X”, Bokermann 1965) e no sulco medial da cauda dos girinos como iniciando no meio ou no final da cauda (Dias et al. *no prelo*). Em termos de comportamento reprodutivo as duas espécies já foram também consideradas semelhantes por terem machos não territorialistas (Bokermann 1965), mas um estudo posterior mostrou que os machos de *T. petropolitana* são solitários e defendem território (Heyer e Crombie 1979).

Embora morfologicamente *Thoropa petropolitana* seja mais semelhante a *T. lutzi* dentro do gênero (Sabbag et al. 2018), o padrão de PEPs nas almofadas nupciais de *T. petropolitana* assemelha-se mais às PEPs de *T.* do grupo *miliaris*, em termos de formato, tamanho, padrão de dispersão local e localização no dedo II (na articulação metacarpal-falangeal). Uma exceção para isso é a coloração das PEPs. A maioria dos exemplares de coleção de *Thoropa petropolitana* e *T. lutzi* possui as PEPs com cores mais claras que o preto, em geral entre marrom escuro e marrom claro. Pelo fato de a maioria desses exemplares das duas espécies ser resultado de coletas antigas, pensamos que essa coloração mais clara seja resultado da perda normal de coloração de material fixado e conservado há muitos anos. Porém, essa perda de coloração no estrato córneo pode estar relacionada aos índices de testosterona e possivelmente à estação reprodutiva (Luna et al. 2018), de modo que exemplares coletados fora da estação reprodutiva apresentariam PEPs com perda de coloração e até mesmo PEPs brancas (como é o caso de alguns exemplares que encontramos).

Outro problema que parece ser devido à fixação antiga (e também ao tamanho diminuto dos exemplares) é a dificuldade de ver os tubérculos subarticulares, tubérculos metacarpais e o tubérculo metatarsal interno.

As reentrâncias que indivíduos de *T. petropolitana* possuem no assoalho da boca parecem ser fendas vocais laterais pareadas, que abrem para sacos vocais laterais pareados. Esses sacos vocais pareados foram mencionados por Cochran (1955 "1954"). Apesar disso, alguns autores alegam que *Thoropa petropolitana* não possui fendas nem sacos vocais (Nunes-

de-Almeida et al. 2016).

Como já descrito por outros autores (Bokermann 1965; Cocroft e Heyer 1988; Feio 2002), as fêmeas são um pouco maiores do que os machos, tendo em média 23,31 mm enquanto os machos têm em média 19,35 mm (Capítulo 2, Tabela 2). Existe pouco dimorfismo sexual no diâmetro dos braços e antebraços. Em uma chave de identificação publicada por Cocroft e Heyer (1988), *Thoropa petropolitana* possui adultos com tímpanos entre 60 e 70 % do tamanho dos olhos (semelhante aos nossos resultados: Capítulo 2, Figuras 16 e 17); anel timpânico e prega supratimpânica baixos e indistintos (não consideramos como indistintos, mas são de fato menos marcados do que no grupo *miliaris*); dedo III maior que dedo II (como nossas observações e também conforme apontado por Heyer 1999); e machos com um único agrupamento de PEPs no dedo II (como nossas observações). Embora consideremos que *T. petropolitana* não possui membranas interdigitais, alguns autores consideram que possuem uma membrana discreta na base dos artelhos (Cochran 1955 "1954"; Cocroft e Heyer 1988), o que para nós pareceu apenas uma parte da pele da base dos dedos.

Alguns casos de registros confusos de *T. petropolitana* em coleções e em literatura nos chamam a atenção. O caso mais antigo refere-se a três exemplares coletados por Ernesto Garbe, no Rio Juruá, AM, em dezembro de 1901. Em nossas análises morfológicas concluímos que são exemplares de *T. petropolitana* realmente, sendo uma fêmea ovada, uma possível fêmea (indivíduo sem PEPs) e um macho. Essa coleta foi supostamente feita nas proximidades do município de Eirunepé e é certamente um erro de rotulagem ao considerarmos a história de viagens do Ernesto Garbe e o ambiente especializado de *T. petropolitana*, que não é encontrada nessa região amazônica (Bokermann 1965).

Um outro exemplo de confusão de registro é o caso de exemplares registrados na AL-MN e no MNRJ para “Alto da Serra de Cubatão ou Paranapiacaba, São Paulo”. Esse registro inclui três indivíduos (AL-MN 3578, MNRJ 14607 e 14608) coletados por Alphonse Hoge e Bertha Lutz em dezembro de 1959. Em nossas análises, concluímos que são realmente *Thoropa petropolitana* (três possíveis fêmeas ou machos jovens). Porém, parece difícil que a espécie ocorra nessa região, já que são os únicos exemplares conhecidos e coletas volumosas de *Thoropa* foram feitas na região (Cocroft e Heyer 1988).

Outros casos conhecidos são registros de *Thoropa petropolitana* em Santa Teresa, no estado do Espírito Santo. Um deles é de uma coleta de cinco indivíduos por Augusto Ruschi, em dezembro de 1942, depositados atualmente na CAS (CAS-SUA 11731-11735). Analisamos três deles através de empréstimo de material e concluímos se tratarem realmente de *T. petropolitana*, sendo que dois são muito jovens e o outro é uma possível fêmea ou um macho

jovem. O outro caso de Santa Teresa (ES) é um lote de nove indivíduos abrigados no MZUSP, de uma expedição do Departamento de Zoologia em abril de 1969. Infelizmente não pudemos analisar esse lote por enquanto.

Outro caso refere-se a exemplares registrados de Paineiras, DF, coletados por Bertha Lutz e Doris Cochran em janeiro de 1935 (USNM 97437 até 97441). São três indivíduos jovens, um lote com algumas larvas e uma desova, atualmente registrados no USNM como *T. miliaris*. As larvas são características de *T.* do grupo *miliaris* e os três indivíduos são realmente muito jovens para serem idealmente identificados. Concordamos com a identificação do USNM como *T. miliaris*. Bokermann (1965) e Feio (2002) alegam que Cochran (1955 "1954") considera esses exemplares como sendo de *T. petropolitana*. Porém, isso não fica claro pelo texto de Cochran (1955 "1954"), que parece que cita esses exemplares em todas as descrições (de *Eupsophus miliaris*, *E. Petropolitana* e *E. lutzi*) e, portanto, ficamos na dúvida se ela na verdade está apenas utilizando esses exemplares para comparar os jovens das três espécies.

Outros casos confusos registrados para o município do Rio de Janeiro são dois exemplares de Paineiras, na Serra da Carioca (AL-MN 413-414), alguns de Sumaré (MZUSP 88241-88252) e outro da Tijuca (AL-MN 872). Os dois primeiros são *Thoropa petropolitana* sem dúvidas (Feio 2002). O da Tijuca (AL-MN 872) está em péssimo estado de conservação e pode ser *T. miliaris* (Feio 2002). Infelizmente, não vimos nenhum desses exemplares para confirmações. Os registros USNM 97437- 97441, AL-MN 413-414, MZUSP 88241-88252 e AL-MN 872, do município do Rio de Janeiro, são os únicos conhecidos de *T. petropolitana* de baixa altitude, o que aumenta a dúvida quanto à identificação desses exemplares, já que a espécie parece ocorrer em regiões serranas. Alternativamente, esses exemplares podem ter sido erroneamente rotulados. Apesar disso, *T. lutzi* já foi considerada como sinônimo de *T. miliaris* por falta de caracteres diagnósticos claros na descrição da primeira (Lutz 1954). E *T. petropolitana* era a espécie considerada por co-ocorrer com *T. miliaris* na região do município do Rio de Janeiro. Segundo Lutz (1954) *T. Petropolitana* do município de Rio de Janeiro cantava miando “feito um gatinho”, diferenciando-se da população de Petrópolis que era conhecida por estalar. Baseando-nos nos registros mais frequentes de *T. lutzi* e *T. petropolitana*, e na descrição dos cantos “estalado” e “de gatinho” (Nunes-de-Almeida et al. 2016), concluímos que realmente *T. petropolitana* era da região serrana do estado do Rio de Janeiro e *T. lutzi* ocorria nas redondezas do município do Rio de Janeiro. Dessa forma, nossa hipótese é de que esses registros da baixada fluminense tratam-se de identificações errôneas (já que a maioria é juvenil) ou de erros de rotulagem de material.

A distribuição de *Thoropa petropolitana* restrita e antigamente abundante na Serra dos

Órgãos do Rio de Janeiro sempre chamou a atenção de pesquisadores (Cochran 1955 "1954"; Bokermann 1965; Nunes-de-Almeida et al. 2016). Essa abundância populacional nos paredões da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro (E. Izecksohn, com. pessoal para R. N. Feio) é inclusive confirmada pelos lotes volumosos de coleta. Por exemplo, o MZUSP possui coletas de 50 indivíduos (de 1963), 137 indivíduos (1963), 49 indivíduos (1964), 77 indivíduos (1964) e uma coleta feita com o USNM (em 1977) com indivíduos separados entre as duas coleções (62 indivíduos em cada uma). Pouco tempo depois ela já foi considerada como não sendo mais registrada por diversos pesquisadores e, possivelmente, em declínio populacional (Heyer et al. 1988). Atualmente está incluída em listas de espécies ameaçadas dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, na lista vermelha brasileira e na lista da IUCN (Carvalho-e-Silva e Peixoto 2004; ICMBio 2018). Pela importância dessa espécie para a conservação de anfíbios anuros, alguns estudos têm sido feitos para recuperar DNA de exemplares antigos de coleção (M. L. Lyra, com. pessoal) e para procurar por vestígios de indivíduos na Serra dos Órgãos através de DNA ambiental (C. M. Lopes, com. pessoal). Apesar de serem necessários mais estudos sobre morfologia, osteologia e taxonomia dessas populações de *Thoropa petropolitana*, esses estudos necessitam ser não invasivos, já que o material existe apenas em coleções zoológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bell, T. 1843. Reptiles. P. 51 in The Zoology of the Voyage of the H.M.S. Beagle, Under the Command of Captain Fitzroy, R.N., During the Years 1832 to 1836 - volume 5 (C. Darwin, org.). Smith, Elder and Co., London.
- Bokermann, W.C.A. 1965. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). An. Acad. Bras. Cienc. 525–537.
- Bokermann, W.C.A. 1966. Lista anotada das localidades tipo anfíbios brasileiros. Serviço de Documentação, RUSP, São Paulo. 181 pp.
- Boulenger, C.L. 1909. Reptilia and Batrachia. Zool. Rec. 1–35.
- Caramaschi, U., e I. Sazima. 1984. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). Rev. Bras. Zool. 2:139–146.
- Carvalho-e-Silva, S.P. de, e O.L. Peixoto. 2004. *Thoropa petropolitana*. IUCN Red List Threat. Species
- Cochran, D.M. 1938. Diagnoses of new frogs from Brazil. Proceeding Biol. Soc. Washingt. 51:41–42.

- Cochran, D.M. 1954. Frogs of Southeastern Brazil. United States Natl. Museum Bull. 1–423.
- Cocroft, R.B., e W.R. Heyer. 1988. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). Proc. Biol. Soc. Washingt. 101:209–220.
- Cope, E.D. 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia s. Salientia. Nat. Hist. Rev. New series:97–120.
- Dias, P.H. dos S. 2018. Evolution of larval characters in Dendrobatoidea Cope, 1865 (Amphibia; Anura; Dendrobatidae and Aromobatidae). Universidade de São Paulo. 342 pp.
- Dias, P.H. dos S., M.F. Vera Candioti, A.F. Sabbag, G. Colaço, A.M.P.T. de Carvalho-e-Silva, e T. Grant. Living on the edge: a review of the semi-terrestrial tadpoles of Cycloramphidae Bonaparte 1850, with the description of the tadpole of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Amphibia; Anura; Cycloramphidae). No prelo
- Duellman, W.E. 2001. Hylid frogs of Middle America. Monogr. Museum Nat. Hist. Univ. Kansas 1–2:753.
- Duméril, A.M.C., e G. Bibron. 1841. Erpétologie générale ou histoire naturelle complète des reptiles - volume 8. Librairie Encyclopedique de Roret, Paris. 822 pp.
- Elias-Costa, A.J., R. Montesinos, T. Grant, e J. Faivovich. 2017. The vocal sac of Hylodidae (Amphibia, Anura): phylogenetic and functional implications of a unique morphology. J. Morphol. 278:1506–1516.
- Fabrezi, M., e P. Alberch. 1996. The carpal elements of anurans. Herpetologica 52:188–204.
- Feio, R.N. 2002. Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 217 pp.
- Feio, R.N., M.F. Napoli, e U. Caramaschi. 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq. do Mus. Nac. 64:41–60.
- Fitzinger, L.J.F.J. 1826. Neue Classification der Reptilien, nach ihren Naturlichen Verwandtschaften, nebst einer Verwandtschafts-tafel und einem Vergleichniss der Reptilien Sammlung des K. K. Zoologischgeb Museum's zu Wien. J. G. Heubner, Wien. 1–67 pp.
- Fitzinger, L.J.F.J. 1843. Systema reptilium - fasciculus primus. Braumüller et Seidel, Wien.
- Fitzinger, L.J.F.J. 1860. Die Ausebeute der österreichischen Naturforscher an Säugethieren und Reptilien während der Weltumsegelung Sr. Majestät Fregatte Novare. Sitzungsberichte der Kais. Akad. der Wissenschaften, Math. Cl. 42:383–416.

- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190.
- Haddad, C.F.B. 2008. Uma análise da lista brasileira de anfíbios ameaçados de extinção. P. 287–324 in Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (A.B.M. Machado, G.M. Drummond, e A.P. Paglia, orgs.). Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas.
- Heyer, W.R. 1999. A new genus and species of frog from Bahia, Brazil (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) with comments on the zoogeography of the Brazilian campos rupestres. *Proc. Biol. Soc. Washingt.* 112:19–39.
- Heyer, W.R., e R.I. Crombie. 1979. Natural history notes on *Craspedoglossa stejnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). *J. Washingt. Acad. Sci.* 69:17–20.
- Heyer, W.R., A.S. Rand, C.A.G. da Cruz, e O.L. Peixoto. 1988. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in Southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica* 20:230–235.
- Hoogmoed, M.S., e U. Gruber. 1983. Spix and Wagler type specimens of reptiles and amphibians in the Natural History Museum in Munich (Germany) and Leiden (The Netherlands). *Spixiana* 319–415.
- ICMBio. 2018. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. V-Anfíbios. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília. 131 pp.
- Lang, M. 1990. Annotated catalogue type-specimens herpetological collection Royal Belgian Institute Natural Sciences, Brussels. *Doc. Trav. L'I.R.Sc.N.B.* 59:36.
- Luna, M.C., R.W. McDiarmid, e J. Faivovich. 2018. From erotic excrescences to pheromone shots: structure and diversity of nuptial pads in anurans. *Biol. J. Linn. Soc.* 20:1–44. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly048/4996764>
- Lutz, A. 1929. Taxonomy and biology of the genus *Cycloramphus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 22:17–25.
- Lutz, B. 1947. Trends towards non-aquatic and direct development in frogs. *Copeia* 1947:242–252.
- Lutz, B. 1954. Anfíbios anuros do Distrito Federal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52:155–216.
- McDiarmid, R.W., e R. Altig. 1999. Tadpoles - the biology of anuran larvae. 444.
- Miranda-Ribeiro, A. 1923. Os hylodideos do Museu Paulista. *Rev. do Mus. Paul.* 825–846.
- Miranda-Ribeiro, A. de. 1926. Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arq. do Mus. Nac.* 27:1–248.

- Morais, A.R., R.T. Braga, R.P. Bastos, e D. Brito. 2012. A comparative analysis of global, national, and state red lists for threatened amphibians in Brazil. *Biodivers. Conserv.* 21:2633–2640. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-012-0322-2>
- Müller, P. 1927. Der Neotropische Artenreichtum Als Biogeographisches Problem. *Zool. Meded.* 47:88–110.
- Noble, G.K. 1927. The value of life history data in the study of the evolution of the Amphibia. *Ann. New York Acad. Sci.* 30:31–129.
- Nunes-de-Almeida, C.H.L., C.L. Assis, R.N. Feio, e L.F. Toledo. 2016. Redescription of the advertisement call of five species of *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae), including recordings of rare and endangered species. *PLoS One* 11:1–12.
- Obst, F.J. 1977. Die Herpetologische Sammlung des Staatlichen Museums für Dresden und ihre Typusexemplare. *Zool. Abhandlungen, Staatl. Museum für Tierkd. Dresden* 34:171–186.
- Pimenta, B.V.S., C.F.B. Haddad, L.B. Nascimento, C.A.G. Cruz, e J.P. Pombal-Jr. 2005. Comment on “Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide”. *Science* (80-.). 209:1999b.
- Reinhardt, J.T., e C.F. Lütken. 1862. Bidrag til Kundskab om Brasiliens Padder og Krybdyr Første Afdeling: Paddeme og Ögleme. *Vidensk. Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Foren. i Kjøbenhavn “1861”*. 2:143–242.
- Rossa-Feres, D. de C., R.J. Sawaya, J. Faivovich, J.G.R. Giovanelli, C.A. Brasileiro, L. Schiesari, J. Alexandrino, e C.F.B. Haddad. 2011. Anfíbios do estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. *Biota Neotrop.* 11:0–19.
- Sabaj, M.H. 2016. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an online reference. Version 6.5. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Washington, DC* 5:802–832.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 122:142–156.
- Spix, J.B. v. 1824. *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae Regis*. F. S. Hübschmann, München.
- Tschudi, J.J. 1838. *Classification Der Batrachier, Mit Berücksichtigung Der Fossilen Thiere Dieser Abtheilung Der Reptilien*. (Petitpierre, org.). Neuchatel.

- Wandolleck, B. 1907. Einige Neue und Weniger Bekannte Batrachier von Brasilien. Abhandlungen und Berichte des Zool. und Anthropol. Museums zu Dresden 1–15.
- Watters, J.L., S.T. Cummings, R.L. Flanagan, e C.D. Siler. 2016. Review of morphometric measurements used in anuran species descriptions and recommendations for a standardized approach. *Zootaxa* 4072:477–495.
- Witte, G.F. De. 1930. Liste des reptiles et batraciens récoltés au Brésil par la Mission Massart (1922-1923) et description de sept nouvelles espèces. P. 213–230 in *Une Mission Biologique Belge au Brésil (août 1922-mai 1923) par Jean Massart, Raymond Bouillene, Paul Ledoux, Paul Brien, et Albert Navez (J. Massart, org.)*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Limites entre espécies

Nosso estudo mostrou que dentro do complexo de *Thoropa miliaris* + *T. taophora* existe possivelmente o que é chamado de “diversidade críptica”, que muitos autores já encontraram para outras espécies de anfíbios anuros (Angulo e Icochea 2010; Jungfer et al. 2013; Gehara et al. 2017; Castroviejo-Fisher et al. 2017; Carvalho et al. 2019). A diversidade de espécies do complexo *T. miliaris* + *T. taophora* parece ser críptica porque as unidades evolutivamente significativas que encontramos (mil-1, mil-2, mil-3, mil-4, mil-5 e *T. taophora*) podem ser espécies distintas, mas não possuem diferenças morfológicas externas em adultos ou larvas que possibilitem diferenciá-las.

Uma característica comumente usada para diagnosticar espécies morfolologicamente crípticas de anfíbios anuros é o canto de anúncio (Angulo e Reichle 2008; Carvalho et al. 2019). É possível que as espécies desse complexo de *Thoropa miliaris* + *T. taophora* se diferenciem em nível acústico. O Dr. Thiago Carvalho (UNESP, Rio Claro, SP) analisou preliminarmente quatro gravações de cantos de anúncio de indivíduos de *Thoropa miliaris*: três deles coletados em um mesmo afloramento rochoso em Santa Teresa, ES (AAG-UFU 6166, 6167 e 6168) e um deles gravado em Juiz de Fora, MG (sem exemplar coletado). Dos três indivíduos de Santa Teresa, dois deles pertencem à linhagem mil-1. O outro pertence à linhagem mil-2. O indivíduo de Juiz de Fora (MG) não foi coletado. Os três indivíduos de Santa Teresa possuem papilas completas (na articulação metacarpal-falangeal, no tubérculo metacarpal interno, nos dedos II, III e IV) e são bastante semelhantes morfolologicamente, embora possuam tamanhos diferentes. Segundo o pesquisador, o canto do indivíduo de Juiz de Fora (MG) assemelha-se ao canto de *T. miliaris* gravado no Rio de Janeiro (RJ) e recentemente descrito por Nunes-de-Almeida et al. (2016a) (T. Carvalho, comunicação pessoal). Os outros três cantos de Santa Teresa (ES), embora sejam de linhagens diferentes, aparentemente são muito semelhantes (T. Carvalho, comunicação pessoal). É possível que existam diferenças em aspectos do canto não vistos em análises informais e preliminares que sejam passíveis de serem usadas como diagnoses para as linhagens. Porém, se as semelhanças nos cantos forem confirmadas, essas observações nos trarão a hipótese de que as linhagens de *T. miliaris* se reconhecem ou se isolam reprodutivamente de alguma outra maneira ainda desconhecida.

Por outro lado, populações de *T. megatympanum* e *T. saxatilis* ainda não analisadas ao nível molecular de estrutura genética (como fizemos no primeiro capítulo para *T. miliaris* e *T.*

taophora) possuem alguma variação morfológica no que diz respeito às larvas (na expansão dérmica posterolateral e no tubo cloacal). Da mesma forma, parece possível diferenciar as espécies *T. megatympnum*, *T. saxatilis*, *T. petropolitana* e *T. lutzi* do complexo *T. miliaris* + *T. taophora* utilizando uma combinação de características morfológicas. É possível ainda incluir características osteológicas e miológicas do gênero nas análises. É possível, por exemplo, que existam características osteológicas ou miológicas que diferenciem o grupo petropolitana e o grupo miliaris. Mas imaginamos que dentro do grupo miliaris é pouco provável que existam diferenças em morfologia interna. As características morfológicas externas das espécies e linhagens de *Thoropa* mostraram-se bastante conservadas, o que faz sentido pelo ambiente de vida e desenvolvimento delas ser tão parecido. Possivelmente as pressões seletivas atuantes no gênero estejam forçando a manutenção de características adaptadas às rochas úmidas.

De qualquer maneira, com os dados desse estudo pretendemos rever as diagnoses morfológicas das espécies de *Thoropa* para incluir uma combinação de características que sejam úteis para diferenciar as espécies e linhagens. Junto disso pretendemos fazer uma revisão taxonômica do gênero, e investigar as relações filogenéticas entre as espécies de *Thoropa*, especialmente no que diz respeito ao grupo petropolitana que foi pouco investigado no estudo anterior com filogenia do grupo (Sabbag et al. 2018).

Biogeografia e conservação

Das seis espécies do gênero, três estão em alguma categoria de ameaça, sendo que duas delas (do grupo petropolitana) já são consideradas como desaparecidas pelo menos nas suas localidades tipo. As razões para declínios de anfíbios anuros são muitas (Stuart et al. 2004), mas cada caso pode diferir em razão das particularidades de cada grupo de anuros. Uma característica reprodutiva do grupo petropolitana nos faz pensar se esses animais não são pouco resistentes à ação antrópica e à diminuição do habitat. Essa característica é a quantidade de ovos por desova, que em *T. petropolitana* foi relatada como 16 ovos em uma desova analisada (Heyer e Crombie 1979) e em *T. miliaris* e *T. taophora* foram relatados entre 140 e 1746 ovos, em 57 desovas analisadas (Giaretta e Facure 2004; Consolmagno et al. 2016). Caso essa quantidade diminuta de ovos encontrada por Heyer e Crombie (1979) para *T. petropolitana* seja um padrão para o grupo petropolitana, esses animais possivelmente têm menor sucesso reprodutivo quando comparados ao grupo miliaris.

As espécies do gênero *Thoropa* possuem diversas adaptações comportamentais e morfológicas aos ambientes em que vivem. Embora a característica geral do ambiente seja a

mesma para todas as espécies (rochas com filmes fluidos de água), existem algumas variações nesses ambientes em características como intensidade do fluxo de água, características climáticas, altitude e incidência solar. Pode ser que algumas dessas características ambientais estejam determinando o atual padrão de distribuição das espécies.

Em qualquer mapa de distribuição das espécies é possível notar que elas ocupam locais com alguma associação a montanhas e morros (Feio et al. 2006; Fitzpatrick et al. 2009; Sabbag et al. 2018). Mas não necessariamente estão sempre em altas altitudes, já que *T. miliaris* e *T. taophora* também vivem próximas ao nível do mar. Embora sejam animais de Mata Atlântica ou ecótonos (*campo rupestre*) as espécies não ocorrem em toda a extensão do domínio. Não são encontradas na Mata Atlântica da maioria dos estados do nordeste ao norte da Bahia, nem em fragmentos do bioma no Centro-Oeste. Também não são encontradas no estado do Paraná e em parte do estado de Santa Catarina, mesmo existindo nessas regiões a mesma Serra Geral onde ocorre *T. saxatilis*. Além disso, ainda que sejam espécies de um domínio primariamente florestado, esses animais preferem ambientes ensolarados (Giaretta e Facure 2004; Consolmagno et al. 2016), o que também combina com a distribuição de *T. megatympanum* em campo rupestre na Cadeia do Espinhaço.

Tanto *T. megatympanum* quanto *T. saxatilis* são encontradas com muita frequência associadas a riachos, rios de vazão baixa e cachoeiras, no geral todos permanentes. Por outro lado, muitos locais de ocorrência de *T. miliaris* e *T. taophora* não estão associados a um rio ou riacho. São fluxos por vezes muito finos de água, que se assemelham a nascentes de águas nas rochas. Essas rochas em que vivem as espécies do grupo são principalmente afloramentos rochosos ígneos, formados em basaltos, granitos e mármore (Feio 2002). No interior dessas rochas é comum existirem sistemas aquíferos, que no caso desse tipo de formação rochosa, eles são classificados como aquíferos fissurais (cristalinos) ou cársticos (Martins et al. 2006). Uma das características desses aquíferos é a capacidade de formar acúmulos de água dentro dos afloramentos, que podem encher e transbordar pelas fissuras quando chove, criando um fluxo fino e contínuo de água na superfície do afloramento (Martins et al. 2006; Cardoso et al. 2012). Essas águas podem secar após poucos dias sem chuvas (Giaretta e Facure 2004), provavelmente estimulando nesses animais o surgimento de adaptações típicas dos ambientes temporários, como desenvolvimento embrionário e larval acelerado, altas taxas de migração e resistência a ambientes mais secos. Portanto, imaginamos que a distribuição de *Thoropa* dependa de um somatório de fatores como pluviosidade, temperatura, distribuição de rochas e seus sistemas aquíferos associados. Com nossos dados pretendemos fazer estudos de nichos ecológicos para investigar melhor essas correlações entre as distribuições geográficas e os ambientes. A partir

de modelagem de nicho ecológico e das nossas sequências genéticas, pretendemos também inferir possíveis processos evolutivos que tenham feito parte da história do gênero, através de estudos filogeográficos e de demografia histórica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo, A., e J. Icochea. 2010. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Syst. Biodivers.* 8:357–370.
- Angulo, A., e S. Reichle. 2008. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. *Zool. J. Linn. Soc.* 152:59–77.
- Barth, R. 1956. Observações anatômicas sobre a larva de *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 54:489–497.
- Cardoso, F.B.F., L. Almeida, M.V.C. Gonçalves, F.R. Oliveira, F.S.N. Nascimento, A.N.P. Ferreira, e M.T.P. Gaspar. 2012. Mapa das áreas aflorantes dos aquíferos e sistemas aquíferos do Brasil. P. 1–6 in XVII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVIII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços.
- Carvalho, T.R. de, C.S. Cassini, P.P.G. Taucce, e C.F.B. Haddad. 2019. A new, morphologically cryptic species of *Adenomera* closely related to *Adenomera araucaria* from the Atlantic Forest of Southern Brazil (Anura, Leptodactylidae). *J. Herpetol.* 53:131.
- Castroviejo-Fisher, S., J. Köhler, I. De La Riva, e J.M. Padial. 2017. A new morphologically cryptic species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusidae) from Amazonian forests of northern Peru revealed by DNA sequences. *Zootaxa* 4269:245–264.
- Consolmagno, R.C., G.S. Requena, G. Machado, e C.A. Brasileiro. 2016. Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70:785–795.
- Dias, P.H. dos S. 2018. Evolution of larval characters in Dendrobatoidea Cope, 1865 (Amphibia; Anura; Dendrobatidae and Aromobatidae). Universidade de São Paulo. 342 pp.
- Feio, R.N. 2002. Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 217 pp.
- Feio, R.N., M.F. Napoli, e U. Caramaschi. 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa*

- miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq. do Mus. Nac. 64:41–60.
- Fitzpatrick, S.W., C.A. Brasileiro, C.F.B. Haddad, e K.R. Zamudio. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. Mol. Ecol. 18:2877–2896.
- Gehara, M., A. Barth, E.F. de Oliveira, M.A. Costa, C.F.B. Haddad, e M. Vences. 2017. Model-based analyses reveal insular population diversification and cryptic frog species in the *Ischnocnema parva* complex in the Atlantic forest of Brazil. Mol. Phylogenet. Evol. 112:68–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.04.007>
- Giaretta, A.A., e K.G. Facure. 2004. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). Biota Neotrop. 4:1–10.
- Heyer, W.R., e R.I. Crombie. 1979. Natural history notes on *Craspedoglossa stejnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). J. Washingt. Acad. Sci. 69:17–20.
- Jungfer, K.H., J. Faivovich, J.M. Padial, ... C. F. B. Haddad. 2013. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: *Osteocephalus*): an Amazonian puzzle. Zool. Scr. 42:351–380. DOI: <https://doi.org/10.1111/zsc.12015>
- Martins, A.M., E. Capucci, L.C. Caetano, G. Cardoso, A.B.C. Barreto, A.L.M. Monsorens, A.S. Leal, e P. Vianna. 2006. Hidrogeologia do estado do Rio de Janeiro - síntese do estágio atual do conhecimento. P. 1–17 in XIV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas.
- Nunes-de-Almeida, C.H.L., C.L. Assis, R.N. Feio, e L.F. Toledo. 2016. Redescription of the advertisement call of five species of *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae), including recordings of rare and endangered species. PLoS One 11:1–12.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. Mol. Phylogenet. Evol. 122:142–156.
- Stuart, S.N., J.S. Chanson, N.A. Cox, B.E. Young, A.S.L. Rodrigues, D.L. Fischman, e R.W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science (80-.). 306:1783–1786.
- Wassersug, R.J., e W.R. Heyer. 1983. Morphological correlates of subaerial existence in leptodactylid tadpoles associated with flowing water. Can. J. Zool. 61:761–769.

APÊNDICES

Apêndice 1: *Script* em linguagem Bash para tratamento inicial dos arquivos fasta de loci oriundos da técnica de AHE. O *script* realiza filtragem de arquivos vazios e substituição de eventuais ambiguidades por “N”. Elaborado por Pedro Paulo Goulart Taucce.

```
#!/bin/bash

#substitui ambiguidades por N
for file in *.fasta
do
    #Mostra linhas sem o símbolo > | substitui todos os IUPAC, gaps
    e missing por N | coloca uma linha vazia no começo | coloca uma linha vazia
    depois de cada linha | mostra o arquivo sem a primeira linha, em branco |
    salva um arquivo temporario
    grep -v \> $file | sed "s/[?RYSWKMBDHSVrswkmbdhvn-]/N/g" | sed
    'li\\' | sed 'G' | tail -n +2 > $file.tmp
    #Mostra linhas com o símbolo > | coloca uma linha vazia depois
    de cada linha
    grep \> $file | sed 'G' > $file.tmp2
    #fusiona os dois arquivo temporarios um do lado do outro | tira
    os espaços em branco do começo de cada linha que nao sei de onde apareceu |
    salva um arquivo igualzinho o input mas com "_noiupac" depois do nome
    paste $file.tmp $file.tmp2 | sed -e 's/^\[t\]*//' >
    ${file%.fasta}_noiupac.fasta
    #apaga os dois arquivos temporarios
    rm $file.tmp $file.tmp2
done

#elimina arquivos de sequencias vazias
for file in *_noiupac.fasta
do
    i=$(awk 'NR==2' $file | awk '{ print length($0); }')
    j=$((i-1))
    grep -B 1 "[N]\{$j,\}" $file | grep -v -f - $file >
    ${file%.fasta}_noempty.fasta
done
```


Apêndice 3: Script em linguagem Python para extrair o primeiro sítio de cada arquivo de SNP (*single nucleotide polymorphism*) e codificar as bases extraídas em números inteiros, para montar a matriz de alelos para STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Elaborado por Luiz Carlos Irber Júnior.

```
import argparse
from collections import defaultdict
import os
import sys

parser = argparse.ArgumentParser()
parser.add_argument('-p', '--pos', type=int, default=0)
parser.add_argument('-o', '--output', default='table.txt')
parser.add_argument('inputs', nargs='+')
args = parser.parse_args()

mapping = {
    'A': 1,
    'C': 2,
    'G': 3,
    'T': 4,
    'N': -1,
}

snps = defaultdict(dict)
loci = set()
for inp in args.inputs:
    locus = os.path.splitext(os.path.basename(inp))[0]
    loci.update([locus])
    with open(inp, 'r') as input_data:
        n_taxa, n_loci = [int(i) for i in next(input_data).split()]

        for line in input_data:
            seq_id, seq = line.split()
            snps[seq_id][locus] = seq[args.pos]

path = os.path.dirname(args.output)
try:
    os.makedirs(path)
except OSError:
    if not os.path.isdir(path):
        raise

with open(args.output, 'w') as output:
    sorted_loci = list(sorted(loci))
    output.write('\t'.join(['Taxa'] + sorted_loci) + '\n')
    for id in snps:
        output.write('{}\n'.format(id))
        for locus in sorted_loci:
            if locus in snps[id]:
                #output.write('\t{}\n'.format(snps[id][locus]))
                output.write('\t{}\n'.format(mapping[snps[id][locus]]))
            else:
                output.write('\t-1')
        output.write('\n')
```

Apêndice 4: Matrix Q dos indivíduos para cada um dos dez agrupamentos ($K = 10$), resultante das análises de atribuição com o software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000), com respectivos nomes das espécies e número de registro em coleções e com acrônimos seguindo Sabaj (2016) e clados de Sabbag et al. (2018).

Espécie	Registro	Clado	Q ($K = 10$)									
<i>T. saxatilis</i>	MCP 11918	sax-1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>T. megatympanum</i>	MCNAM 2072*	meg-2	0,001	0,0001	0,9957	0,0001	0,001	0	0,0011	0	0	0,001
<i>T. taophora</i>	CFBH 34898	tao-3	0,0026	0,001	0,0026	0,0014	0,0012	0,001	0,9852	0	0,001	0,004
<i>T. taophora</i>	CFBH 31102	tao-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>T. taophora</i>	MZUSP 143712	tao-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>T. taophora</i>	CFBH 15325	tao-2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27350	mil-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28065	mil-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 70701	mil-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 25984	mil-1	0,001	0,001	0	0,001	0,001	0	0	0	0,995	0,001
<i>T. miliaris</i>	CFBH 29317	mil-1	0,002	0	0	0	0,001	0	0	0	0,996	0,001
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18013	mil-1	0,0019	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,9883	0,0048
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18446	mil-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>T. miliaris</i>	CFBH 41072	mil-2	0,0009	0,001	0	0,9924	0,001	0,0001	0,001	0	0	0,0036
<i>T. miliaris</i>	CFBH 10125	mil-2	0	0	0	0,9985	0	0	0,0005	0	0	0,001
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28054	mil-2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27290	mil-2	0,0252	0	0	0,1722	0,0029	0,001	0,001	0	0,002	0,7957
<i>T. miliaris</i>	CFBH 18431	mil-2	0,001	0	0	0,001	0	0	0,001	0	0,0079	0,9891
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 72832	mil-2	0,0019	0	0	0,001	0	0	0	0	0,0008	0,9963
<i>T. miliaris</i>	CFBH 30707	mil-2	0,001	0	0	0,001	0,001	0,0009	0,001	0	0,0008	0,9943
<i>T. miliaris</i>	CFBH 32133	mil-2	0,001	0	0	0,0011	0,001	0,001	0,001	0	0	0,9949
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 10806	mil-3	0,9912	0	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,001	0,0038
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25473	mil-3	0,9881	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0,001	0,0059
<i>T. miliaris</i>	CFBH 25474	mil-3	0,9942	0	0	0,001	0,001	0,0008	0,001	0	0	0,002
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27292	mil-4	0,001	0	0	0,001	0,9595	0,036	0,001	0	0,0005	0,001
<i>T. miliaris</i>	CFBH 27366	mil-4	0,002	0	0	0	0,5465	0,4494	0,0001	0	0,001	0,001
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 40642	mil-4	0,001	0	0	0,001	0,0328	0,9632	0,001	0	0	0,001
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 14343*	mil-4	0	0	0	0	0,001	0,999	0	0	0	0
<i>T. miliaris</i>	CFBH 31105	mil-4	0	0	0	0	0,001	0,999	0	0	0	0

Apêndice 5: Histogramas 100 % empilhados, resultantes das análises de atribuição, com todos os valores de K testados pelo programa STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000), representando de duas a 15 populações. Acima: K de 2 a 8. Abaixo: K de 9 a 15. O melhor K (K = 10) está sublinhado e em negrito. Esquerda: números de registro das amostras nas coleções, com acrônimos seguindo (Sabaj 2016). Direita: localidade de coleta da amostra (município e unidade federativa).



Apêndice 6: Compilado dos registros de *Thoropa* nas coleções zoológicas consultadas, em planilha de Excel®: https://osf.io/5zw2p/?view_only=0b070dd9fc9c4daf9b2adb961790fbfb (OSF, “Variação morfológica – *Thoropa*”, “Material-examinado.xlsx”). Nesse compilado, os espécimes de *Thoropa* estão com as respectivas informações: nome da espécie como registrada, em ordem alfabética; número do exemplar (acrônimos das coleções zoológicas seguindo Sabaj 2016); nome da espécie como identificamos; localidade, município e unidade federativa de registro. Conferimos e corrigimos dados de localidade a fim de coincidir com eventuais coordenadas fornecidas pelas coleções, e a fim de coincidir informações oficiais, com dados do IBGE (<https://cidades.ibge.gov.br/>) e com um polígono de municípios brasileiros elaborado com dados do IBGE de 2007 (<http://www.gmapas.com>). A coluna “Sexo ou estágio” inclui informações sobre sexo ou estágio de desenvolvimento, sendo: “F” = fêmeas; “M” = machos; “L” = larvas; e “J” = juvenis que não pudemos determinar o sexo. A coluna “AHE” assinala os espécimes utilizados no capítulo 1 para Filogenômica Ancorada. A coluna “Clado” identifica os espécimes associados a cada clado de Sabbag et al. (2018) através do fragmento de 16S-ARBR no capítulo 2. A coluna “Histo” identifica os espécimes machos utilizados para busca de espermatozoides maduros. A coluna “CRC” identifica os espécimes utilizados nos gráficos de caixas do comprimento rostro-cloacal. A coluna “BraTimp” identifica os espécimes utilizados nos gráficos de caixas do diâmetro do braço e antebraço. A coluna “Pap” identifica os espécimes machos utilizados nos gráficos de caixas das papilas do dedo IV da mão esquerda. A coluna “Cabeça” identifica os espécimes utilizados nas regressões lineares da largura e comprimento da cabeça. E a coluna “Multivar” identifica as amostras utilizadas nas análises multivariadas por PCA e LDA. Espécimes em negrito são espécimes de séries-tipo, sendo que “H” indica holótipo, “N” indica neótipo, “Nprop” indica neótipo proposto de *T. petropolitana* (capítulo 3), “P” indica parátipo, “S” indica “sintipo”, “L” indica lectótipo; e “T” indica topótipo. Também ao lado dos nomes das espécies, “♣” indica exemplares com problemas de registro, a maioria de localidades; “*” indica exemplares vistos apenas por fotografias; “●” indica espécimes não analisados e apenas compilados.

Apêndice 7: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre fêmeas e machos das espécies. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Espécie	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO
Fêmeas X Machos (dedoIV)					
<i>T. lutzi</i>	0,2044	0,4039	0,6413	0,6055	0,0824
<i>T. megatympanum</i>	0,2651	0,0000	0,0000	0,2167	0,0965
<i>T. miliaris</i>	0,6264	0,0000	0,0000	0,3508	0,0066
<i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0000	0,9760	0,2469	0,2667
<i>T. saxatilis</i>	0,0256	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000
<i>T. taophora</i>	0,1407	0,0000	0,0000	0,2041	0,0000
Fêmeas X Machos (artMF)					
<i>T. lutzi</i>	0,2044	0,4039	0,6413	0,6055	0,0824
<i>T. megatympanum</i>	0,1035	0,0000	0,0000	0,4381	0,1697
<i>T. miliaris</i>	0,7160	0,0000	0,0000	0,4052	0,0091
<i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0000	0,9760	0,2469	0,2667
<i>T. saxatilis</i>	0,6296	0,0021	0,4340	0,0000	0,0218
<i>T. taophora</i>	0,4424	0,0000	0,0000	0,1816	0,0000

Apêndice 8: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre fêmeas e machos das linhagens. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Linhagem	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO
Fêmeas X Machos (dedoIV)					
meg-1	0,3035	0,0058	0,2198	0,2020	0,1912
meg-2	0,9917	0,0000	0,0136	0,4255	0,8079
mil-1	0,0365	0,0002	0,0142	0,6571	0,9087
mil-2	0,8663	0,0000	0,0199	0,7408	0,4052
mil-3					
mil-4	0,8956	0,0000	0,0003	0,0514	0,4377
mil-5					
sax-1					
sax-2				0,0000	0,0000
tao-1	0,2140	0,0078	0,0111	0,5931	0,6398
tao-2	0,6321	0,0000	0,0060	0,0598	0,1481
tao-3					
Fêmeas X Machos (artMF)					
meg-1	0,3035	0,0058	0,2198	0,2020	0,2020
meg-2	0,8717	0,0000	0,0191	0,4244	0,7393
mil-1	0,0335	0,0247	0,0418	0,8689	0,8599
mil-2	0,6846	0,0017	0,0775	0,5331	0,4369
mil-3	0,6061	0,5218	0,6521	0,9554	0,1985
mil-4	0,9145	0,0002	0,0108	0,0544	0,5797
mil-5					
sax-1					
sax-2		0,0266	0,2566	0,0000	0,0067
tao-1	0,2140	0,0078	0,0111	0,5931	0,6181
tao-2	0,7853	0,0010	0,0084	0,0861	0,1282
tao-3					

Apêndice 9: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre as fêmeas das espécies, par-a-par. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO
<i>T. megatympanum</i> - <i>T. lutzi</i>	0,2610	0,9999	1,0000	0,1713	0,2551
<i>T. miliaris</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0119	1,0000	1,0000	0,9911	0,9954
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. lutzi</i>	0,9992	0,9876	0,9942	0,9954	0,6651
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. lutzi</i>	0,3714	0,9946	0,9534	0,8966	0,4049
<i>T. taophora</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0004	0,9914	0,9569	0,9636	0,9242
<i>T. miliaris</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,9967	0,9999	0,0000	0,0000
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,8547	0,7573	0,0000	0,0000
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,9863	0,1465	0,1348	0,0003	0,9483
<i>T. taophora</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,1265	0,1845	0,0000	0,0000
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. miliaris</i>	0,0000	0,6093	0,8100	0,0140	0,0000
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. miliaris</i>	0,0000	0,2341	0,1398	0,5203	0,0000
<i>T. taophora</i> - <i>T. miliaris</i>	0,0061	0,2025	0,1974	0,0002	0,0001
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0312	0,9619	0,0006	0,0000
<i>T. taophora</i> - <i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0269	0,9718	0,9743	0,7569
<i>T. taophora</i> - <i>T. saxatilis</i>	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000

Apêndice 10: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre os machos das espécies, par-a-par, segundo o critério de macho adulto de (Feio et al. 2006). Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO	NIVESQ
<i>T. megatympanum</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. miliaris</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,3465	0,0000	
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0519	0,7021	1,0000	0,0037	0,9451	
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0000	0,0001	0,3059	0,0000	0,0000	
<i>T. taophora</i> - <i>T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. miliaris</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,8283
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0352	1,0000	0,8337	0,0026	0,0000	0,3667
<i>T. taophora</i> - <i>T. megatympanum</i>	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000
<i>T. petropolitana</i> - <i>T. miliaris</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. miliaris</i>	0,9291	0,8893	0,2575	0,0000	0,0000	0,2102
<i>T. taophora</i> - <i>T. miliaris</i>	0,0000	0,0067	0,4603	0,0000	0,0000	0,0001
<i>T. saxatilis</i> - <i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0006	0,2661	0,0000	0,0000	
<i>T. taophora</i> - <i>T. petropolitana</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0793	0,0000	
<i>T. taophora</i> - <i>T. saxatilis</i>	0,0000	0,2508	0,0813	0,0000	0,0000	0,0008

Apêndice 11: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre os machos das espécies, par-a-par, segundo o nosso critério de macho adulto. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO	NIVESQ
<i>T. megatympanum-T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. miliaris-T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,4585	0,0000	
<i>T. petropolitana-T. lutzi</i>	0,0766	0,8642	1,0000	0,0070	0,9639	
<i>T. saxatilis-T. lutzi</i>	0,0000	0,3705	0,9512	0,0000	0,0000	
<i>T. taophora-T. lutzi</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. miliaris-T. megatympanum</i>	0,0000	0,9535	0,8627	0,0000	0,0000	0,1618
<i>T. petropolitana-T. megatympanum</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. saxatilis-T. megatympanum</i>	0,9995	0,0002	0,0001	0,9973	0,0018	0,0003
<i>T. taophora-T. megatympanum</i>	0,0000	0,0003	0,0237	0,0000	0,0000	0,0392
<i>T. petropolitana-T. miliaris</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
<i>T. saxatilis-T. miliaris</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0088
<i>T. taophora-T. miliaris</i>	0,0000	0,0009	0,1161	0,0000	0,0000	0,0001
<i>T. saxatilis-T. petropolitana</i>	0,0000	0,7822	0,9171	0,0000	0,0000	
<i>T. taophora-T. petropolitana</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0574	0,0000	
<i>T. taophora-T. saxatilis</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Apêndice 12: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre as fêmeas das linhagens, par-a-par. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO
meg-2-meg-1	0,9872	0,4945	0,9173	1,0000	0,9997
mil-1-meg-1	0,9966	1,0000	0,8237	0,2740	0,8950
mil-2-meg-1	0,6688	0,9740	0,9880	0,2338	0,7930
mil-3-meg-1	0,7855	0,9569	0,9936	0,9980	0,9999
mil-4-meg-1	0,9374	0,5104	0,8222	0,0077	0,8426
sax-2-meg-1	0,3930	1,0000	1,0000	0,0695	0,9982
tao-1-meg-1	0,1376	1,0000	0,7996	0,0003	0,0448
tao-2-meg-1	0,3993	0,9674	0,1989	0,0002	0,1876
mil-1-meg-2	0,7016	0,7008	0,9999	0,2662	0,6076
mil-2-meg-2	0,1474	0,9970	1,0000	0,2163	0,4131
mil-3-meg-2	0,3767	1,0000	1,0000	0,9945	0,9932
mil-4-meg-2	0,3535	1,0000	1,0000	0,0049	0,4404
sax-2-meg-2	0,9044	0,2746	0,9002	0,0484	0,8679
tao-1-meg-2	0,0129	0,6657	1,0000	0,0001	0,0085
tao-2-meg-2	0,1222	1,0000	0,5944	0,0002	0,0806
mil-2-mil-1	0,9753	0,9915	0,9996	1,0000	1,0000
mil-3-mil-1	0,9722	0,9788	1,0000	0,2637	0,9995
mil-4-mil-1	1,0000	0,7146	1,0000	0,9563	1,0000
sax-2-mil-1	0,0797	1,0000	0,8089	1,0000	0,9828
tao-1-mil-1	0,4642	1,0000	1,0000	0,1957	0,6991
tao-2-mil-1	0,7239	0,9846	0,8665	0,0307	0,8035
mil-3-mil-2	1,0000	1,0000	1,0000	0,2580	0,9988
mil-4-mil-2	0,9981	0,9976	1,0000	0,8298	1,0000
sax-2-mil-2	0,0052	0,9516	0,9918	1,0000	0,9388
tao-1-mil-2	0,9667	0,9948	0,9999	0,0745	0,6132
tao-2-mil-2	0,9833	1,0000	0,6230	0,0141	0,7781
mil-4-mil-3	0,9947	1,0000	1,0000	0,0306	0,9997
sax-2-mil-3	0,0788	0,9396	0,9964	0,1536	1,0000
tao-1-mil-3	0,9999	0,9849	1,0000	0,0024	0,5508
tao-2-mil-3	0,9997	1,0000	0,8156	0,0007	0,6383
sax-2-mil-4	0,0129	0,2887	0,7696	0,6992	0,9676
tao-1-mil-4	0,6275	0,6817	1,0000	0,5852	0,4094
tao-2-mil-4	0,8436	1,0000	0,6913	0,0922	0,6644
tao-1-sax-2	0,0003	1,0000	0,7582	0,0242	0,0425
tao-2-sax-2	0,0176	0,9540	0,1731	0,0076	0,2615
tao-2-tao-1	1,0000	0,9896	0,7805	0,7073	1,0000

Apêndice 13: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre os machos das linhagens, par-a-par, segundo o critério de macho adulto de (Feio et al. 2006). Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO	NIVESQ
meg-2-meg-1	1,0000	0,9485	0,9858	0,9803	1,0000	0,9996
mil-1-meg-1	1,0000	0,2474	0,8209	0,0000	0,0000	1,0000
mil-2-meg-1	0,0094	0,0072	0,1258	0,0000	0,0001	0,9932
mil-4-meg-1	0,0239	0,5735	0,8482	0,0000	0,0005	1,0000
mil-5-meg-1	0,0000	0,8920	1,0000	0,0000	0,3783	0,9076
sax-2-meg-1	0,8118	1,0000	1,0000	0,8677	0,0000	0,9920
tao-1-meg-1	0,0001	1,0000	0,8159	0,0000	0,0004	0,0013
tao-2-meg-1	0,0000	0,0150	0,5623	0,0000	0,0000	0,6909
tao-3-meg-1	0,7237	0,6771	0,9926	0,0498	0,0742	0,9909
mil-1-meg-2	1,0000	0,7392	0,9963	0,0000	0,0000	0,9943
mil-2-meg-2	0,0002	0,0239	0,2963	0,0000	0,0000	0,4771
mil-4-meg-2	0,0006	0,9887	0,9991	0,0000	0,0000	0,9996
mil-5-meg-2	0,0000	0,9853	1,0000	0,0000	0,2883	0,9621
sax-2-meg-2	0,7829	1,0000	1,0000	0,3044	0,0000	0,9998
tao-1-meg-2	0,0000	1,0000	0,9656	0,0001	0,0001	0,0001
tao-2-meg-2	0,0000	0,0673	0,9181	0,0000	0,0000	0,0833
tao-3-meg-2	0,7293	0,8935	0,9997	0,1090	0,0459	0,9538
mil-2-mil-1	0,0039	0,9792	0,9767	0,8894	0,9991	0,9972
mil-4-mil-1	0,0110	0,9967	1,0000	0,9994	0,9552	1,0000
mil-5-mil-1	0,0000	1,0000	1,0000	0,0041	1,0000	0,8758
sax-2-mil-1	0,8662	0,9938	1,0000	0,0000	0,0000	0,9781
tao-1-mil-1	0,0001	0,9978	0,9983	0,2350	0,6133	0,0013
tao-2-mil-1	0,0000	0,9667	1,0000	0,0001	0,0530	0,7175
tao-3-mil-1	0,7724	0,9960	1,0000	0,9628	0,9846	0,9939
mil-4-mil-2	0,9999	0,3697	0,8167	0,9944	0,9999	0,9154
mil-5-mil-2	0,0003	1,0000	0,9999	0,0184	0,9999	0,7011
sax-2-mil-2	0,9989	0,9382	0,9980	0,0000	0,0000	0,7550
tao-1-mil-2	0,0347	0,9290	1,0000	0,6314	0,3507	0,0038
tao-2-mil-2	0,0048	1,0000	0,9999	0,0041	0,0019	0,9717
tao-3-mil-2	1,0000	0,9999	1,0000	0,9990	0,9377	0,9996
mil-5-mil-4	0,0001	0,9984	1,0000	0,0073	0,9990	0,9150
sax-2-mil-4	1,0000	0,9996	1,0000	0,0000	0,0000	0,9932
tao-1-mil-4	0,0166	1,0000	0,9943	0,3702	0,2196	0,0004
tao-2-mil-4	0,0005	0,4539	0,9984	0,0001	0,0002	0,3397
tao-3-mil-4	0,9997	0,9693	1,0000	0,9894	0,8776	0,9839
sax-2-mil-5	0,0003	0,9861	1,0000	0,0000	0,0000	0,9978
tao-1-mil-5	0,6506	0,9944	0,9997	0,7361	0,9947	0,0047
tao-2-mil-5	0,0426	1,0000	1,0000	0,5192	0,9968	0,4431
tao-3-mil-5	0,0780	1,0000	1,0000	0,5822	0,9999	0,7162
tao-1-sax-2	0,0359	1,0000	0,9972	0,0000	0,0000	0,0006
tao-2-sax-2	0,0558	0,9189	0,9998	0,0000	0,0000	0,3341
tao-3-sax-2	0,9980	0,9346	0,9999	0,0078	0,0000	0,8982
tao-2-tao-1	0,9314	0,9043	0,9999	1,0000	1,0000	0,0355
tao-3-tao-1	0,8426	0,9553	1,0000	0,9999	1,0000	0,6850
tao-3-tao-2	0,9969	1,0000	1,0000	0,9998	1,0000	1,0000

Apêndice 14: *P*-valores dos testes *a posteriori* de HSD de Tukey, feitos para os gráficos de caixas entre os machos das linhagens, par-a-par, segundo o nosso critério de macho adulto. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Par	CRC	DA / CRC	DB / CRC	DT / CC	DT / DO	NIVESQ
meg-2-meg-1	1,0000	0,9999	0,9997	0,9927	1,0000	0,9985
mil-1-meg-1	1,0000	0,9999	0,9983	0,0000	0,0000	0,9999
mil-2-meg-1	0,0234	0,9694	0,9457	0,0000	0,0001	0,9998
mil-3-meg-1	0,6891	0,9326	0,9932	1,0000	0,9990	0,6046
mil-4-meg-1	0,0562	1,0000	1,0000	0,0000	0,0004	0,9246
mil-5-meg-1	0,0000	0,9952	1,0000	0,0000	0,5614	0,9731
sax-1-meg-1	1,0000	0,9999	1,0000			0,9731
sax-2-meg-1	1,0000	0,7007	0,9920	1,0000	0,5862	0,2885
tao-1-meg-1	0,0001	1,0000	0,9016	0,0001	0,0001	0,0056
tao-2-meg-1	0,0000	0,6101	0,8740	0,0000	0,0000	0,9965
tao-3-meg-1	0,1564	1,0000	1,0000	0,0002	0,0004	1,0000
mil-1-meg-2	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
mil-2-meg-2	0,0000	0,9988	0,9982	0,0000	0,0000	1,0000
mil-3-meg-2	0,5455	0,6499	0,8748	1,0000	0,9986	0,8429
mil-4-meg-2	0,0001	0,9937	1,0000	0,0000	0,0000	0,9994
mil-5-meg-2	0,0000	0,9993	1,0000	0,0000	0,4996	0,9965
sax-1-meg-2	1,0000	1,0000	0,9985			0,9965
sax-2-meg-2	1,0000	0,1424	0,6863	0,9993	0,2927	0,5052
tao-1-meg-2	0,0000	1,0000	0,9749	0,0002	0,0000	0,0003
tao-2-meg-2	0,0000	0,7480	0,9826	0,0000	0,0000	0,4110
tao-3-meg-2	0,0958	1,0000	1,0000	0,0005	0,0001	1,0000
mil-2-mil-1	0,0026	0,9999	1,0000	0,9691	0,9728	1,0000
mil-3-mil-1	0,7079	0,6812	0,8347	0,0255	0,0020	0,8228
mil-4-mil-1	0,0084	0,9980	0,9997	1,0000	0,7949	0,9988
mil-5-mil-1	0,0000	0,9995	1,0000	0,0154	1,0000	0,9948
sax-1-mil-1	1,0000	1,0000	0,9970			0,9948
sax-2-mil-1	1,0000	0,2090	0,6453	0,0000	0,0000	0,5464
tao-1-mil-1	0,0001	1,0000	0,9904	0,5190	0,4731	0,0008
tao-2-mil-1	0,0000	0,8907	0,9994	0,0004	0,0031	0,7119
tao-3-mil-1	0,1576	1,0000	1,0000	0,7125	0,6749	1,0000
mil-3-mil-2	1,0000	0,3945	0,6490	0,0018	0,0106	0,7753
mil-4-mil-2	1,0000	0,6684	0,9205	0,5061	1,0000	0,9906
mil-5-mil-2	0,0001	1,0000	1,0000	0,0426	1,0000	0,9938
sax-1-mil-2	0,9989	1,0000	0,9900			0,9938
sax-2-mil-2	0,0473	0,0337	0,3090	0,0000	0,0000	0,3465
tao-1-mil-2	0,0188	1,0000	0,9975	0,8228	0,1627	0,0005
tao-2-mil-2	0,0013	0,9888	1,0000	0,0046	0,0000	0,5409
tao-3-mil-2	0,9713	1,0000	1,0000	0,9376	0,3021	1,0000
mil-4-mil-3	1,0000	0,8955	0,9505	0,0357	0,0218	0,9609
mil-5-mil-3	0,0018	0,7972	0,9963	0,0000	0,3760	1,0000
sax-1-mil-3	0,9994	0,9390	1,0000			1,0000
sax-2-mil-3	0,7918	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
tao-1-mil-3	0,1824	0,9618	0,5804	0,0024	0,0003	0,0001
tao-2-mil-3	0,6708	0,1527	0,5430	0,0000	0,0000	0,1602
tao-3-mil-3	0,9976	0,9867	0,9972	0,0056	0,0007	0,9777
mil-5-mil-4	0,0001	0,9932	1,0000	0,0079	0,9999	0,9995
sax-1-mil-4	0,9997	0,9998	0,9996			0,9995

sax-2-mil-4	0,1087	0,4797	0,8729	0,0000	0,0000	0,8782
tao-1-mil-4	0,0099	1,0000	0,9343	0,3450	0,1002	0,0001
tao-2-mil-4	0,0001	0,1955	0,8553	0,0000	0,0000	0,0885
tao-3-mil-4	0,9313	1,0000	1,0000	0,5370	0,2022	1,0000
sax-1-mil-5	0,0025	1,0000	0,9996			1,0000
sax-2-mil-5	0,0000	0,7242	0,9982	0,0000	0,1113	1,0000
tao-1-mil-5	0,7361	0,9999	1,0000	0,8184	0,9739	0,0171
tao-2-mil-5	0,0252	1,0000	1,0000	0,6051	0,9740	0,8324
tao-3-mil-5	0,0537	0,9996	1,0000	0,7173	0,9914	0,9981
sax-2-sax-1	1,0000	0,9098	1,0000			1,0000
tao-1-sax-1	0,1455	1,0000	0,9172			0,0171
tao-2-sax-1	0,5447	1,0000	0,9771			0,8324
tao-3-sax-1	0,9214	1,0000	0,9999			0,9981
tao-1-sax-2	0,0001	0,9210	0,5253	0,0001	0,0000	0,0000
tao-2-sax-2	0,0000	0,0067	0,2526	0,0000	0,0000	0,0071
tao-3-sax-2	0,2119	0,9706	0,9987	0,0003	0,0000	0,9896
tao-2-tao-1	0,8616	0,9999	0,9998	1,0000	1,0000	0,0275
tao-3-tao-1	0,8828	1,0000	0,9963	1,0000	1,0000	0,0527
tao-3-tao-2	1,0000	0,9984	1,0000	1,0000	1,0000	0,9994

Apêndice 16: LDA das fêmeas por linhagens. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Linhagem	meg-1	meg-2	mil-1	mil-2	mil-3	mil-4	sax-2	tao-1	tao-2	R ²	P
n	3	2	1	1	1	1	7	1	5		
Predições corretas (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
LC / CRC	0,42	0,41	0,39	0,39	0,41	0,42	0,41	0,4	0,41	0,39	1
CC / CRC	0,39	0,39	0,37	0,37	0,38	0,4	0,39	0,4	0,4	0,46	1
DT / CRC	0,1	0,09	0,08	0,09	0,1	0,09	0,09	0,08	0,07	0,85	< 0,001
DO / CRC	0,11	0,1	0,11	0,11	0,12	0,1	0,1	0,12	0,12	0,61	0,494
DIO / CRC	0,11	0,11	0,1	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,09	0,55	0,074
DIN / CRC	0,09	0,09	0,07	0,07	0,09	0,1	0,09	0,08	0,09	0,42	1
DON / CRC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,11	0,12	0,1	0,11	0,1	0,37	1
DOF / CRC	0,17	0,17	0,16	0,17	0,18	0,18	0,17	0,18	0,17	0,68	0,163
CP / CRC	0,42	0,45	0,47	0,49	0,48	0,58	0,56	0,55	0,52	0,83	0,002
CM / CRC	0,26	0,25	0,24	0,25	0,28	0,29	0,3	0,29	0,28	0,7	0,022
CT / CRC	0,48	0,5	0,5	0,52	0,53	0,61	0,55	0,57	0,55	0,63	0,124
CF / CRC	0,48	0,48	0,49	0,49	0,52	0,59	0,55	0,53	0,51	0,72	0,037
DA / CRC	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,62	0,399
DB / CRC	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,07	0,09	0,6	0,092

Apêndice 17: LDA dos machos adultos, segundo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006), analisados por espécies. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Espécie	<i>T. lutzi</i>	<i>T. megatympanum</i>	<i>T. miliaris</i>	<i>T. petropolitana</i>	<i>T. saxatilis</i>	<i>T. taophora</i>	R ²	P
n	41	43	130	51	4	30		
Predições corretas (%)	85%	93,02%	92%	84%	100,00%	60,00%		
LC / CRC	0,36	0,43	0,42	0,37	0,43	0,42	0,74	< 0,001
CC / CRC	0,37	0,38	0,4	0,38	0,41	0,39	0,32	< 0,001
DT / CRC	0,08	0,1	0,09	0,07	0,12	0,08	0,59	< 0,001
DO / CRC	0,12	0,11	0,11	0,12	0,1	0,11	0,27	< 0,001
DIO / CRC	0,08	0,11	0,1	0,08	0,11	0,1	0,57	< 0,001
DIN / CRC	0,07	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,37	< 0,001
DON / CRC	0,09	0,1	0,1	0,08	0,11	0,11	0,54	< 0,001
DOF / CRC	0,15	0,17	0,17	0,15	0,18	0,17	0,58	< 0,001
CP / CRC	0,54	0,46	0,52	0,55	0,59	0,53	0,44	< 0,001
CM / CRC	0,3	0,27	0,28	0,31	0,31	0,29	0,3	< 0,001
CT / CRC	0,56	0,51	0,56	0,55	0,61	0,56	0,3	< 0,001
CF / CRC	0,53	0,5	0,53	0,54	0,56	0,53	0,13	< 0,001
DA / CRC	0,09	0,11	0,11	0,09	0,11	0,12	0,57	< 0,001
DB / CRC	0,09	0,13	0,14	0,09	0,12	0,14	0,47	< 0,001

Apêndice 18: LDA dos machos adultos, segundo o critério de macho adulto de Feio et al. (2006), analisados por linhagens. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Linhagem	meg-1	meg-2	mil-1	mil-2	mil-4	mil-5	sax-2	tao-1	tao-2	tao-3	R ²	P
n	4	8	16	20	17	1	1	1	12	1		
Predições corretas (%)	100%	100%	88%	75%	71%	100%	100%	100%	75%	100%		
LC / CRC	0,42	0,43	0,42	0,41	0,43	0,41	0,42	0,41	0,42	0,42	0,17	0,027
CC / CRC	0,35	0,38	0,41	0,39	0,41	0,38	0,43	0,39	0,39	0,39	0,55	< 0,001
DT / CRC	0,1	0,1	0,09	0,09	0,09	0,06	0,13	0,08	0,08	0,08	0,63	< 0,001
DO / CRC	0,11	0,11	0,12	0,1	0,11	0,07	0,11	0,1	0,11	0,11	0,43	< 0,001
DIO / CRC	0,11	0,11	0,1	0,1	0,1	0,12	0,11	0,1	0,11	0,09	0,13	0,266
DIN / CRC	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,1	0,2	0,023
DON / CRC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,23	0,005
DOF / CRC	0,17	0,17	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,16	0,18	0,17	0,25	0,003
CP / CRC	0,47	0,46	0,54	0,53	0,52	0,53	0,6	0,49	0,53	0,55	0,52	< 0,001
CM / CRC	0,29	0,27	0,3	0,29	0,28	0,27	0,32	0,28	0,29	0,32	0,15	0,385
CT / CRC	0,52	0,51	0,57	0,56	0,56	0,55	0,59	0,5	0,56	0,58	0,46	< 0,001
CF / CRC	0,53	0,49	0,54	0,54	0,54	0,51	0,58	0,47	0,53	0,58	0,39	< 0,001
DA / CRC	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11	0,12	0,1	0,11	0,12	0,12	0,19	0,196
DB / CRC	0,12	0,13	0,13	0,15	0,14	0,13	0,12	0,16	0,14	0,15	0,12	0,09

Apêndice 19: LDA dos machos adultos, segundo o nosso critério de macho adulto, analisados por espécies. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Espécie	<i>T. lutzi</i>	<i>T. megatympanum</i>	<i>T. miliaris</i>	<i>T. petropolitana</i>	<i>T. saxatilis</i>	<i>T. taophora</i>	R ²	P
n	42	49	176	51	20	35		
Predições corretas (%)	86%	89,80%	90%	86%	70,00%	51,43%		
LC / CRC	0,36	0,43	0,42	0,37	0,42	0,42	0,69	< 0,001
CC / CRC	0,37	0,39	0,4	0,38	0,4	0,39	0,29	< 0,001
DT / CRC	0,08	0,1	0,09	0,07	0,1	0,08	0,51	< 0,001
DO / CRC	0,12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11	0,24	< 0,001
DIO / CRC	0,08	0,11	0,1	0,08	0,1	0,1	0,5	< 0,001
DIN / CRC	0,07	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,31	< 0,001
DON / CRC	0,09	0,1	0,1	0,08	0,11	0,11	0,52	< 0,001
DOF / CRC	0,15	0,17	0,17	0,15	0,18	0,17	0,56	< 0,001
CP / CRC	0,54	0,47	0,52	0,55	0,57	0,53	0,41	< 0,001
CM / CRC	0,3	0,27	0,28	0,31	0,3	0,29	0,2	< 0,001
CT / CRC	0,56	0,51	0,56	0,55	0,58	0,56	0,29	< 0,001
CF / CRC	0,53	0,5	0,53	0,54	0,55	0,53	0,13	< 0,001
DA / CRC	0,09	0,11	0,11	0,09	0,09	0,12	0,32	< 0,001
DB / CRC	0,09	0,12	0,13	0,09	0,1	0,14	0,33	< 0,001

Apêndice 20: LDA dos machos adultos, segundo o nosso critério de macho adulto, analisados por linhagens. Valores em azul são valores menores do que 95 %.

Linhagem	meg-1	meg-2	mil-1	mil-2	mil-3	mil-4	mil-5	sax-1	sax-2	tao-1	tao-2	tao-3	R ²	P
n	4	8	20	28	3	28	1	1	6	1	13	2		
Predições corretas (%)	100%	100%	65%	57%	100%	79%	100%	100%	100%	100%	85%	100%		
LC / CRC	0,42	0,43	0,41	0,41	0,42	0,42	0,41	0,41	0,42	0,41	0,42	0,41	0,11	0,302
CC / CRC	0,35	0,38	0,41	0,39	0,41	0,4	0,38	0,39	0,4	0,39	0,4	0,38	0,41	< 0,001
DT / CRC	0,1	0,1	0,09	0,09	0,11	0,09	0,06	0,1	0,1	0,08	0,08	0,08	0,52	< 0,001
DO / CRC	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,07	0,12	0,11	0,1	0,11	0,11	0,33	< 0,001
DIO / CRC	0,11	0,11	0,1	0,1	0,11	0,11	0,12	0,09	0,11	0,1	0,11	0,09	0,16	0,176
DIN / CRC	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,21	0,002
DON / CRC	0,1	0,1	0,11	0,1	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,14	0,056
DOF / CRC	0,17	0,17	0,18	0,17	0,19	0,18	0,18	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17	0,2	0,007
CP / CRC	0,47	0,46	0,54	0,53	0,54	0,52	0,53	0,59	0,58	0,49	0,53	0,55	0,52	< 0,001
CM / CRC	0,29	0,27	0,29	0,29	0,28	0,28	0,27	0,32	0,32	0,28	0,29	0,31	0,21	0,003
CT / CRC	0,52	0,51	0,58	0,56	0,58	0,56	0,55	0,58	0,57	0,5	0,56	0,58	0,4	< 0,001
CF / CRC	0,53	0,49	0,53	0,53	0,55	0,54	0,51	0,49	0,54	0,47	0,53	0,56	0,24	< 0,001
DA / CRC	0,11	0,11	0,11	0,11	0,09	0,1	0,12	0,11	0,09	0,11	0,12	0,11	0,19	0,022
DB / CRC	0,12	0,13	0,13	0,14	0,1	0,12	0,13	0,1	0,1	0,16	0,14	0,12	0,15	0,168

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Feio, R.N., M.F. Napoli, e U. Caramaschi. 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq. do Mus. Nac. 64:41–60.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, e P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959.
- Sabaj, M.H. 2016. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an online reference. Version 6.5. Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Washington, DC 5:802–832.
- Sabbag, A.F., M.L. Lyra, K.R. Zamudio, C.F.B. Haddad, R.N. Feio, F.S.F. Leite, J.L. Gasparini, e C.A. Brasileiro. 2018. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. Mol. Phylogenet. Evol. 122:142–156.

ANEXO 1



Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest

Ariadne F. Sabbag^{a,*}, Mariana L. Lyra^a, Kelly R. Zamudio^b, Célio F.B. Haddad^a, Renato N. Feio^c, Felipe S.F. Leite^d, João Luiz Gasparini^{e,f}, Cinthia A. Brasileiro^g

^a Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia and Centro de Aquicultura (CAUNESP), 13506-900 Rio Claro, São Paulo, Brazil

^b Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

^c Departamento de Biologia Animal, Museu de Zoologia João Moojen, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^d Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, 35690-000 Florestal, Minas Gerais, Brazil

^e Laboratório de Vertebrados Terrestre, Universidade Federal do Espírito Santo, 29932-540 São Mateus, Espírito Santo, Brazil

^f Grupo de História Natural de Vertebrados, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

^g Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Paulo, 09972-270 Diadema, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anurans
Cycloramphidae
Genetic diversity
Molecular markers
Thoropa

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic coastal forest is one of the most heterogeneous morphoclimatic domains on earth and is thus an excellent region in which to examine the role that habitat heterogeneity plays in shaping diversification of lineages and species. Here we present a molecular phylogeny of the rock frogs of the genus *Thoropa* Cope, 1865, native to the Atlantic forest and extending to adjacent *campo rupestre* of Brazil. The goal of this study is to reconstruct the evolutionary history of the genus using multilocus molecular phylogenetic analyses. Our topology reveals 12 highly supported lineages among the four nominal species included in the study. Species *T. saxatilis* and *T. megatympenum* are monophyletic. *Thoropa taophora* is also monophyletic, but nested within *T. miliaris*. Populations of *T. miliaris* cluster in five geographically distinct lineages, with low support for relationships among them. Although all 12 lineages are geographically structured, some *T. miliaris* lineages have syntopic distributions with others, likely reflecting a secondary contact zone between divergent lineages. We discuss a biogeographic scenario that best explains the order of divergence and the distribution of species in Atlantic forest and adjacent areas, and outline the implications of our findings for the taxonomy of *Thoropa*.

1. Introduction

The Brazilian Atlantic forest is a highly complex and heterogeneous morphoclimatic and phytogeographic domain (Ab'Saber, 1977). It is a global biodiversity hotspot (Mittermeier et al., 1998; Morellato and Haddad, 2000; Silva and Casteleti, 2003) and high habitat heterogeneity, resulting from topographic complexity and large latitudinal range, is one of the main reasons proposed for its high biological diversity (Ribeiro et al., 2009; Rodríguez et al., 2015). Therefore, the Atlantic forest is an excellent region to examine how heterogeneous habitats contribute to diversification (Rodríguez et al., 2015). Habitat heterogeneity has a potentially large effect on amphibian diversification, due to their low vagility and often specialized habitat preferences (Rodríguez et al., 2015). Indeed, the Atlantic forest is home to more than 500 frog species (Haddad et al., 2013; Toledo et al., 2014), accounting for 8.1% of the world's known anuran diversity. More than

75% of Atlantic forest anurans are endemic to the domain (Haddad et al., 2013) and many of these endemic species inhabit montane environments (Cruz and Feio, 2007; Haddad et al., 2013).

Rock frogs in the genus *Thoropa* Cope, 1865, belong to the family Cycloramphidae (*sensu* Frost, 2017) and include the following six species endemic to Brazil: *T. miliaris* (Spix, 1824), *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923), *T. lutzi* (Cochran, 1938), *T. megatympenum* Caramaschi and Sazima, 1984, and *T. saxatilis* (Cocroft and Heyer, 1988). All species of the genus, except *T. megatympenum*, inhabit rocky seashores, wet rocky outcrops, and boulders and waterfalls in montane rocky streams of the Atlantic forest (Bokermann, 1965; Cocroft and Heyer, 1988; Feio et al., 2006). *Thoropa megatympenum* inhabits the Atlantic forest-Cerrado and Atlantic forest-Caatinga ecotones (Caramaschi and Sazima, 1984) in the same kinds of habitats as its congeners. *Thoropa* species have specialized breeding requirements. Males are typically territorial and exhibit parental care of

* Corresponding author.

E-mail address: ariadne.sabbag@gmail.com (A.F. Sabbag).

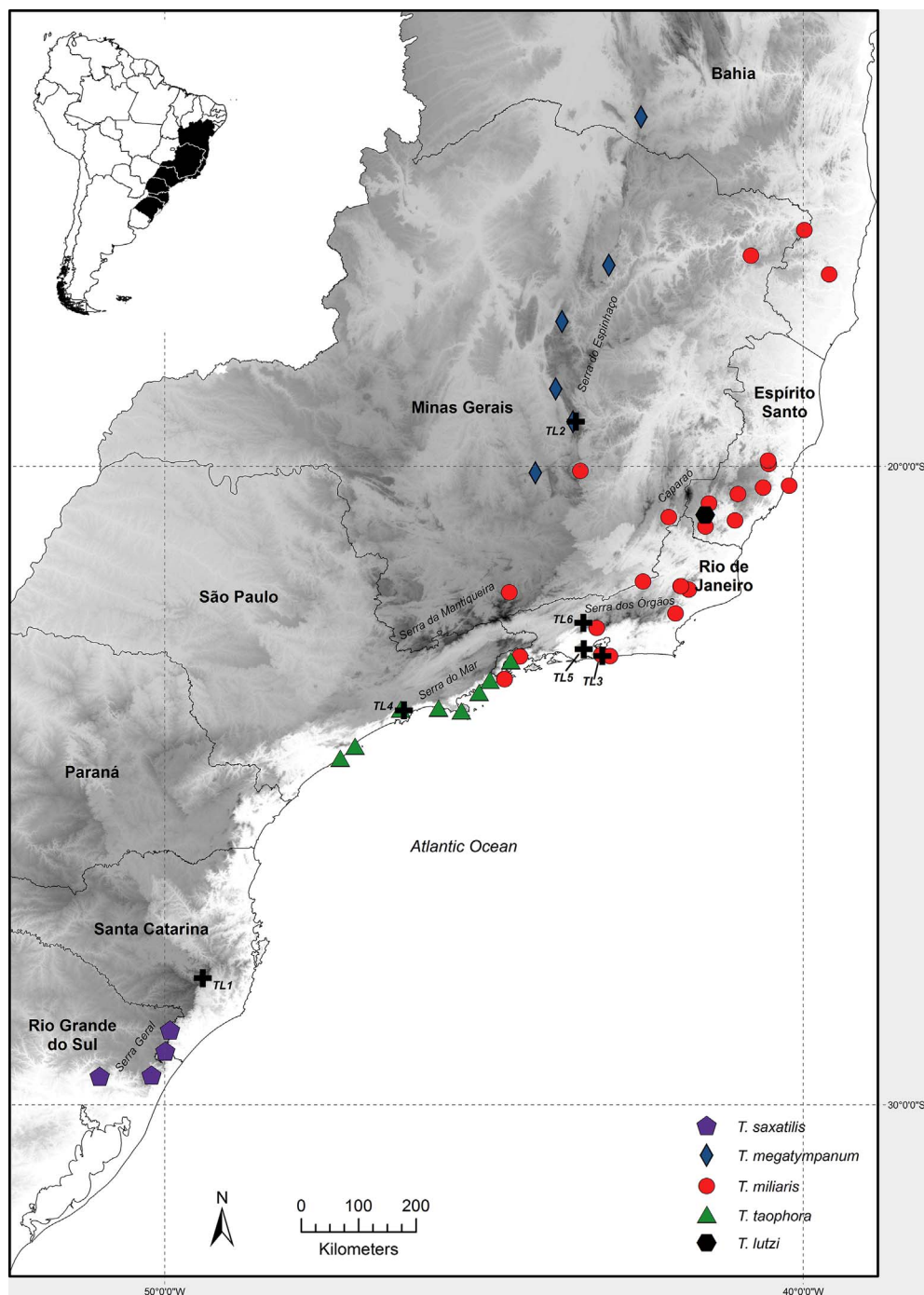


Fig. 1. Collection localities for *Thoropa* samples included in this study. Black crosses labelled TL1–TL6 indicate type localities of *T. saxatilis*, *T. megatympenum*, *T. miliaris*, *T. taophora*, *T. lutzi* and *T. petropolitana*, respectively. Elevation is shown in gray scale ranging from white (0–50 m above the sea level) to black (3900–3950 m above sea level).

egg clutches (Giaretta and Facure, 2004; Muralidhar et al., 2014; Consolmagno et al., 2016), which are deposited on rocks in freshwater seeps or at the humid rocky margins of shallow rivulets (Barth, 1956; Bokermann, 1965; Rocha et al., 2002). Tadpoles are exotrophic and semiterrestrial, hatching and developing in the water seeps (Barth, 1956; Bokermann, 1965).

A phylogeographic study of *Thoropa miliaris* and *T. taophora* showed that populations of the southern *T. taophora* are monophyletic, and nested within the northern *T. miliaris*, and inferred a north to south expansion and differentiation within these two species (Fitzpatrick et al., 2009). The relationships of these two species to the others in the genus and the mechanisms potentially contributing to their

diversification are still unknown. In this study we reconstruct a multi-locus phylogeny for populations of all available species within the genus *Thoropa*.

Our specific goals are to (1) describe the spatial distribution and genetic diversity of species and cryptic lineages within the genus; (2) infer the phylogenetic relationships of *Thoropa* species using mitochondrial and nuclear markers and date divergences among species and lineages; and (3) test for monophyly of the genus *Thoropa* and each of the nominal species within the genus. We discuss our results in the context of a biogeographic scenario that best explains the order of divergence and the current distribution of species in Atlantic forest and adjacent areas.

2. Material and methods

2.1. Taxon sampling and data matrix assembly

The genus *Thoropa* is subdivided in two groups, based on morphological characters: the *T. petropolitana* group, with *T. petropolitana* and *T. lutzi*, and the *T. miliaris* group, with *T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympnum*, and *T. saxatilis* (Feio, 2002). The *Thoropa petropolitana* group is characterized by small adults (up to 30 mm), males with nuptial spines only on finger II (numbers of fingers *sensu* Fabrezi and Alberch, 1996), and tadpoles with a large abdominal disc surpassing the lateral edge of the body and posterior portion of the abdomen (Feio, 2002). In contrast, species in the *Thoropa miliaris* group have medium to large (more than 35 mm) adult body sizes, males with nuptial spines on fingers II, III, and IV (numbers of fingers *sensu* Fabrezi and Alberch, 1996), and tadpoles with reduced abdominal disc (Feio, 2002). Although these characteristics have been highlighted as important differences between the two groups (Cocroft and Heyer, 1988), group monophyly and the relationships among all nominal species have not yet been established.

Species of the *Thoropa miliaris* group are common in their preferred habitats throughout their range. *Thoropa miliaris* and *T. taophora* occur in the Atlantic forest of southeastern Brazil: *T. miliaris* has a broader distribution in the states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, and Rio de Janeiro (Frost, 2017), occurring from rocky seashores to 1500 m above sea level, while *T. taophora* is restricted to eastern mountains and coastal areas in the state of São Paulo (Feio et al., 2006). *Thoropa megatympnum* occurs in the Serra do Espinhaço mountain range in the states of Minas Gerais and Bahia, where they are found in *campo rupestre* (rupestrine grasslands, *sensu* Silveira et al., 2015) at the ecotone between the Atlantic forest and Cerrado (Caramaschi and Sazima, 1984). *Thoropa saxatilis* is the species with the southernmost distribution, occurring in the Serra Geral mountain range, in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Cocroft and Heyer, 1988).

Species of the *Thoropa petropolitana* group are far less common. *Thoropa petropolitana* was known from mountain sites (more than 700 m above the sea level) in the Serra dos Órgãos, state of Rio de Janeiro, and *T. lutzi* was known to occur in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo (Bokermann, 1965). *Thoropa petropolitana* has not been recorded for more than 40 years and *T. lutzi* disappeared from the state of Rio de Janeiro, but can still be found in Parque Nacional do Caparaó and in the municipalities of Alegre and Muniz Freire, state of Espírito Santo (Feio, 2002; J.L. Gasparini pers. obs.).

We sampled throughout the distributions of *Thoropa saxatilis*, *T. megatympnum*, *T. miliaris*, and *T. taophora* (Fig. 1), including topotypic specimens of *T. miliaris* (municipality of Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro), *T. megatympnum* (Serra do Cipó, municipality of Santana do Riacho, state of Minas Gerais), and *T. taophora* (Paranapiacaba, municipality of Santo André, state of São Paulo). We were unable to find topotypic specimens of *T. saxatilis* (road from municipality of Bom Jardim da Serra to municipality of Lauro Müller, state of Santa Catarina), and the closest locality sampled was from the municipality of Timbé do Sul (state of Santa Catarina, around 60 km in straight line to the type locality). We also included one tissue sample of a small juvenile stored directly in 100% ethanol, identified morphologically as *T. lutzi*, collected in municipality of Alegre, state of Espírito Santo (Fig. 1). We did not include topotypic specimens of *T. lutzi* (Recreio dos Bandeirantes, municipality of Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro) or any specimens of *T. petropolitana* (municipality of Petrópolis, state of Rio de Janeiro) because no other tissue samples are available for those two rare species.

We gathered tissue samples from herpetological collections and from our own field efforts, and supplemented those with sequences obtained from GenBank. During field trips, we collected liver, muscle tissue, or toe clips, stored in 100% ethanol at -20°C . Voucher specimens for most of the samples are deposited in Brazilian collections

(Appendix A.1). Tissue samples without voucher specimens are archived in the tissue collection of Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo state (CFBH-T) and at Cornell University (Ithaca, NY, USA).

2.2. Laboratory protocols

We assembled two multilocus matrices for analyses at two scales, one to analyze genetic diversity and phylogenetic relationships between species within the genus *Thoropa* (herein called matrix A) and the other to test the monophyly of the genus (matrix B). Matrix A included five gene fragments for 46 individuals of the *Thoropa miliaris* group (*T. megatympnum*, *T. miliaris*, *T. saxatilis*, and *T. taophora*) and four Cycloramphidae species (*Cycloramphus boraceiensis*, *C. dubius*, *C. eleutherodactylus*, and *Zachaeus parvulus*) plus *Proceratophrys boiei* as out-group taxa. We rooted this tree with *P. boiei* (Appendix A.1). In contrast, matrix B included ten gene fragments for 13 samples from the four species of *T. miliaris* group (*T. megatympnum*, *T. miliaris*, *T. saxatilis*, and *T. taophora*), the single sample of *T. lutzi* from the state of Espírito Santo, and 33 species as outgroups (Appendix A.2). Outgroups for both matrices were chosen based on phylogenies published by Frost et al. (2006), Grant et al. (2006), Pyron and Wiens (2011), Fouquet et al. (2013), Blotto et al. (2013), Faivovich et al. (2014), and Castroviejo-Fisher et al. (2015).

We used the Qiagen DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen Inc.) to extract total DNA, following the manufacturer's protocol. Extracted DNA was used directly (or diluted to 0.5–1 ng/μl in Mili-Q® water) for amplifications. For matrix A, we PCR amplified three mitochondrial and two nuclear gene fragments: the 3' fragment of the ribosomal gene encoding 16S rRNA amplified with primers 16Sar-L and 16Sbr-H (Palumbi et al., 1991) (16S-ARBR), a fragment of the gene encoding NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2), the 5' region of the gene encoding cytochrome c oxidase subunit 1 (COI), a fragment of the intron 1 of the fibrinogen A alpha polypeptide gene (FGA), and a fragment of the recombination activating gene 1 (RAG1). For matrix B we used eight mitochondrial and three nuclear DNA fragments: 12S rRNA (12S), tRNA-Val, 16S rRNA (16S), tRNA-Leu1, NADH dehydrogenase the subunit 1 (ND1), tRNA-Ile, COI, RAG1, a fragment of the proopiomelanocortin gene (POMC) and a fragment of exon 1 of the rhodopsin gene (RHO) (Supplementary Material SI.1). PCR reaction conditions are in Supplementary Material SI.2. We purified positive amplicons and sequenced them in both directions using BigDye v.3.1® (Applied Biosystems) sequencing kits at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), Centro de Estudos de Insetos Sociais (UNESP, Rio Claro, SP, Brazil), or at the Cornell University Genomics Facility (Ithaca, NY, USA). We cleaned sequences, removed primer sequences, and built consensus sequences for each fragment and each individual using Sequencher v.4.5 (Gene Codes). We aligned sequences of each fragment separately with the software Muscle (Edgar, 2004) implemented in MEGA v.6 (Tamura et al., 2013), using default parameters (gap open penalty: -400 ; gap extend penalty: 0; maximum iterations: 8; clustering method: UPGMB). We translated the coding genes (ND1, ND2, COI, POMC, RAG1, and RHO) to verify the absence of frameshifts and premature stop codons.

2.3. Phylogenetic inferences and genetic diversity

For phylogenetic inferences using matrix A, we conducted four different analyses: one concatenating mitochondrial and nuclear fragments (16S-ARBR, ND2, COI, FGA, and RAG1), a second including only the mitochondrial fragments (16S-ARBR, ND2, and COI), and one for each nuclear fragment (FGA and RAG1). For phylogenetic inferences using matrix B we conducted a single analysis with all gene fragments concatenated. Concatenated matrices were built in Mesquite v.3.03 (Maddison and Maddison, 2015). We estimated the best-fit nucleotide evolution model for each gene fragment (or codon position) and the best partition strategy using Bayesian Information Criterion (BIC;

Schwarz, 1978) in PartitionFinder v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012).

We inferred phylogenies using MrBayes v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with 100 million generations, two parallel runs, and eight Markov chains for each run. The priors were unlinked for all partitions, and as follows: Dirichlet distribution prior for state frequencies and substitution rates; uniform distribution prior for gamma shape and for the proportion of invariable sites; variable partition rates; and branch lengths unconstrained. Trees were sampled each 1000 generations and the first 25% of trees were discarded as burn-in. Analyses were run at the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). To diagnose convergence of the runs, we used four criteria: the standard deviation of split frequencies (SDSF) lower than 0.01; the Potential Scale Reduction Factor (PSRF+) close to 1.0; a stable plot of the generations versus the log likelihood values; and examination of the output log in Tracer v.1.6 (Rambaut et al., 2014; Ronquist et al., 2005). We inferred a 50% majority rule consensus tree and considered posterior clade probabilities (PP) higher than 0.95 as indicative of strong nodal support (Alfaro et al., 2003; Erixon et al., 2003). We visualized and edited trees in FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

To identify significantly divergent lineages in our tree, we used geographic concordance, node support, branch lengths, and the tree topology. To calculate average genetic distances within and between species and within and between lineages for two fragments used in matrix A (16S-ARBR and COI), we used uncorrected *p*-distance with pairwise deletion and 1000 replicates of bootstrap in software MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

2.4. Coalescent-based species tree

We reconstructed a coalescent-based species tree using *Beast (Heled and Drummond, 2010), and estimated time to the most recent common ancestor (t_{MRC}), in the software BEAST v.2.3 (Bouckaert et al., 2014). We prepared the input file with the BEAUti utility, using only the 35 terminal taxa from matrix A that possessed all five gene fragments sequenced (Appendix A.1).

We used the package bModelTest (Bouckaert, 2015) to find the best models of nucleotide evolution for each gene fragment, partitioned or not by codon positions, for each data set. BEAST v.2.3 runs the *Beast analysis concomitantly with nucleotide substitution model selection through the bModelTest package. Lineages were assigned as “species” in a mapping file (required by BEAUti) following the phylogenetic tree inferred using matrix A. We performed the analysis without outgroup, and including sites with missing data. The best partition scheme did not include partition by codon, and each fragment was set for an independent nucleotide evolution model. We used strict clock for 16S-ARBR and ND2, and lognormal relaxed clock (Drummond et al., 2006) for COI, FGA, and RAG1. We also adopted the Yule speciation process and unchecked the function “fix mean substitution rates” for each gene partition. Rates of nucleotide evolution were set to “estimate”, except for ND2 fragment, to which we applied the instantaneous rate of 0.00957 base changes per lineage per million years (Crawford, 2003).

The best-fitting parameters were established after preliminary searches including different datasets (with and without outgroups and sites with missing data), best model of molecular clock rate variation, best tree model prior, and best partition schemes. Performance and accuracy were checked in Tracer v.1.6 (Rambaut et al., 2014) and an analysis was considered reliable if all ESS values were higher than 200 (Rambaut et al., 2014). Final analyses included one run of 100 million generations, sampled each 10 000 generations. The final maximum clade credibility tree was generated with TreeAnnotator v.2.3 (Bouckaert et al., 2014), discarding 10% as burn-in and using median node heights.

3. Results

3.1. Phylogenetic inferences and genetic diversity

For matrix A, including the outgroup, the mitochondrial concatenated alignment consisted of 2288 bp, the alignment of FGA was 535 bp long, the alignment of RAG1 was 429 bp long, and the total concatenated alignment (mitochondrial and nuclear) consisted of 3252 bp. For matrix B, also including outgroups, the mitochondrial concatenated alignment consisted of 4330 bp and the total concatenated alignment (mitochondrial and nuclear) consisted of 5576 bp. The models of nucleotide substitution found for the fragments through BIC (Schwarz, 1978) and the best partition scheme are shown in Supplementary Material SI.3, for both matrices. The number of partitions identified by PartitionFinder v.1.1.1 was eight both for matrix A and matrix B.

3.1.1. Diversity of the *Thoropa miliaris* group

The Bayesian consensus tree inferred from the concatenated (mitochondrial + nuclear) dataset of matrix A showed that *Thoropa* species form a monophyletic group in relation to the outgroup species, with high PP values (Fig. 2). The other trees (mitochondrial, FGA, and RAG1) also recovered *Thoropa* as monophyletic (Supplementary Material SI.4, SI.5, and SI.6). The nuclear gene trees recovered only *T. saxatilis* as monophyletic. The species *Thoropa megatympanum*, *T. saxatilis*, and *T. taophora* were recovered as monophyletic in all concatenated phylogenetic analyses (mitochondrial + nuclear, and only mitochondrial). However, *Thoropa miliaris* was recovered as paraphyletic in relation to *T. taophora*, and populations of this species clustered in five well supported cryptic lineages (Fig. 2).

Thoropa saxatilis included two well supported and distinct lineages, both distributed in the slopes of the Serra Geral: sax-1, a northern lineage from municipality of Timbó do Sul in the state of Santa Catarina; and sax-2, a southern lineage distributed throughout the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Fig. 3), approximately 40 km distant from each other. *Thoropa megatympanum* included two well supported lineages (meg-1 and meg-2; Fig. 2) distributed in the northern and southern portions of Serra do Espinhaço, respectively (Fig. 3). The topotype (from Santana do Riacho, Minas Gerais state) belongs to the southern meg-2 lineage.

Thoropa miliaris is composed of five well-supported lineages, although paraphyletic in their relationship to *T. taophora* (Fig. 2): lineage mil-1, distributed in southern Espírito Santo state; lineage mil-2, distributed in montane regions of the states of Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo and Rio de Janeiro; lineage mil-3, distributed in central and southern regions of Espírito Santo; lineage mil-4, located in northern Serra dos Órgãos in the state of Rio de Janeiro; and lineage mil-5 distributed primarily in the state of Rio de Janeiro, including coastal populations and the topotype sample of *T. miliaris* (Fig. 3). Finally, *Thoropa taophora* is composed of three lineages: tao-1, distributed in the northern coastal regions of the state of São Paulo; tao-2, distributed in southern coastal regions of the state of São Paulo, and including the topotype specimen of *T. taophora*; and tao-3, from Estação Ecológica Juréia-Itatins, a coastal site in southern São Paulo state.

We found five localities where lineages of *T. miliaris* were syntopic (Santa Maria Madalena, Rio de Janeiro state; Santa Teresa, Cachoeiro do Itapemirim, and Domingos Martins, Espírito Santo state; Carangola, Minas Gerais state) and one region of syntopy of lineages mil-5 of *T. miliaris* and tao-1 of *T. taophora* (Paraty, Rio de Janeiro state) (Fig. 2).

According to our analyses, the deepest phylogenetic split separates *Thoropa saxatilis* from all other *Thoropa*, with *T. megatympanum* forming the sister lineage to five lineages of *T. miliaris* plus *T. taophora* (Fig. 2). Both nuclear fragments and the concatenated analyses recovered the same results. *Thoropa miliaris* and *T. taophora* form a complex of poorly resolved populations. Lineages mil-1 and mil-2 are sister lineages (PP = 92), and combined form the sister taxon (PP = 100) to the

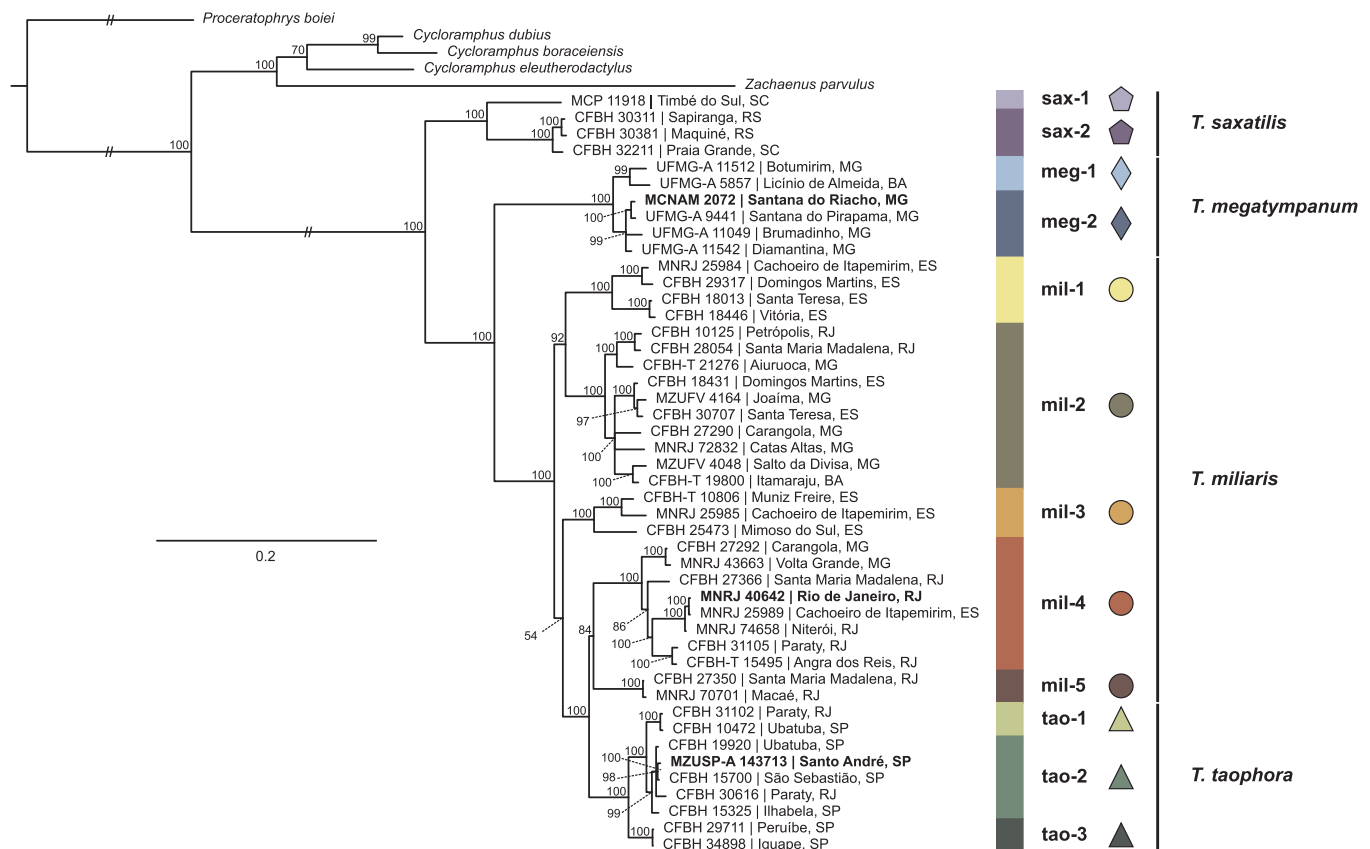


Fig. 2. Phylogeny of *Thoropa* species based on concatenated (mitochondrial + nuclear) dataset (matrix A) and Bayesian Inference (50% majority rule consensus). Numbers at each node represent posterior probabilities. Terminals in bold represent topotype specimens for *T. megatympanum*, *T. miliaris*, and *T. taophora*. The symbol // indicates branch lengths that are not to scale. Samples CFBH 30,616 and CFBH 31,105 were identified as *Thoropa miliaris* because of their collection locality (Paraty, Rio de Janeiro), but belong to *T. taophora*, thus we renamed them. The codes BA, MG, ES, RJ, SP, SC, RS refer to the states of Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul, respectively.

remaining lineages (mil-3 + mil-4 + mil-5 + *T. taophora*). Mil-3, in turn, is the sister lineage of mil-4 + mil-5 + *T. taophora*, again with low support (PP = 69, Fig. 2). Mil-4 + mil-5 + *T. taophora* form a well-supported clade (PP = 100).

The average genetic distances found between pairwise species ranged from 4.4 to 8.1% for 16S-ARBR and 13.5 to 17% for *COI* (Table 1). The intraspecific genetic distances ranged from 1.1 to 3.1% for 16S-ARBR and from 3.5 to 11.4% for *COI*. The genetic distances among lineages varied from 1.1 to 9.4% for 16S-ARBR and from 3.7 to 17.8% to *COI* (Table 1). Within lineages they varied from 0.0 to 2.0% for 16S-ARBR and from 0.2 to 9.7% to *COI* (Table 1).

3.1.2. Monophyly of the genus *Thoropa*

The Bayesian consensus tree from the concatenated (mitochondrial and nuclear) analysis of matrix B showed that the genus *Thoropa* is not monophyletic, as *T. lutzi* was recovered as the sister lineage of *Cycloramphus* + *Zachaeus* with high PP support (Fig. 4). The *Thoropa miliaris* group is monophyletic, and the sister taxon of this clade is composed of *Cycloramphus* + *Zachaeus* + *T. lutzi*. Within the *T. miliaris* group, most of the relationships were recovered with PP higher than in the analyses of matrix A. The only node with low PP was the node uniting mil-5 and *T. taophora* (78%). The families Aromobatidae, Batrachylidae, Bufonidae, Centrolenidae, Ceratophryidae, Cycloramphidae, Dendrobatidae, Hylidae, Hylodidae, Leptodactylidae, Odontophrynidae and Rhinodermatidae were each recovered as monophyletic. Alsodidae is the only family not recovered as monophyletic, because *Limnomedusa macroglossa* was recovered as the sister taxon of Odontophrynidae.

3.2. Coalescent-based species tree

The *Beast species tree showed a similar topology to the matrix A phylogeny based on concatenated data, but with differences in PP (Fig. 5). The best-fit models of nucleotide evolution inferred by bModelTest are in SI.7. The topology recovered the two lineages of *Thoropa saxatilis* (sax-1 + sax-2) form the sister group to the remaining species; two lineages of *T. megatympanum* (meg-1 + meg-2) form the sister group to *T. miliaris* + *T. taophora*; mil-3 as the sister lineage to the other four lineages of *T. miliaris* + *T. taophora*; mil-1 as the sister lineage of mil-2, mil-5, mil-4, and *T. taophora*; mil-2 as the sister lineage of mil-5; mil-2 + mil-5 form the sister group to mil-4 and *T. taophora*; tao-1 as the sister lineage to tao-2; and tao-1 + tao-2 as the sister group to tao-3.

Estimates of times to the most common ancestor (t_{MRCA}) showed that divergences within *Thoropa* span a large timeframe, ranging from the Oligocene to the Pleistocene (Fig. 5). The common ancestor of the four species dates to the Oligocene. The common ancestor between the two lineages of *Thoropa megatympanum* and the common ancestor among the three lineages of *T. taophora* date to the Pliocene-Pleistocene, and the common ancestor of tao-1 and tao-2 dates to the Pleistocene.

4. Discussion

This is the broadest phylogenetic study of species in the genus *Thoropa* published to date. Additionally, the inclusion of the single available sample of *T. lutzi* raised doubts about the monophyly of the genus (see discussion below). Combined, the trees derived from mitochondrial and nuclear markers resolve relationships within *Thoropa* at different levels of divergence. The mitochondrial tree showed the

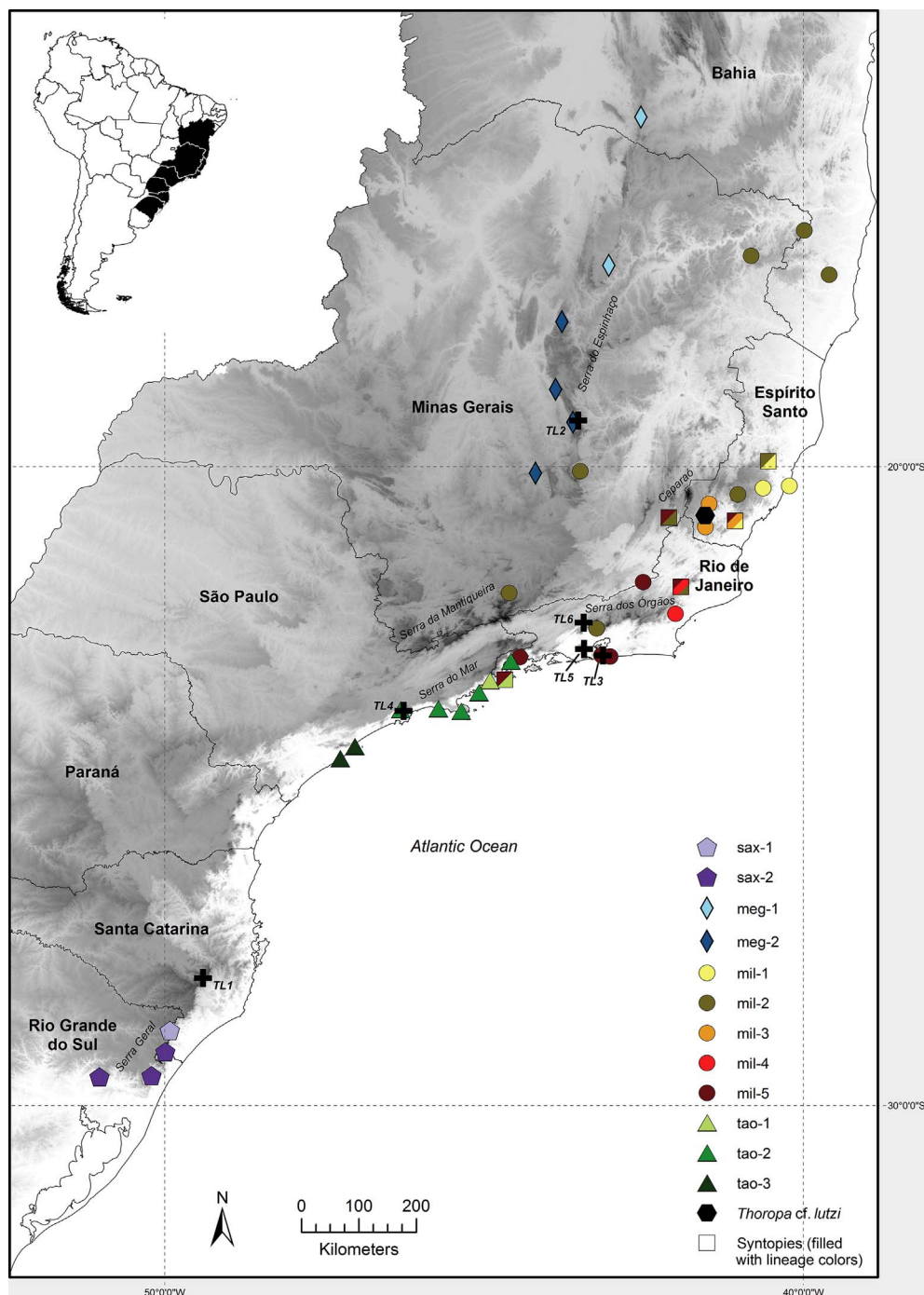


Fig. 3. Distribution of *Thoropa* samples, in different Brazilian states, identified to species (symbols) and to lineage (colors). Symbols labelled TL1–TL6 indicate type localities of *T. saxatilis*, *T. megatympanum*, *T. miliaris*, *T. taophora*, *T. lutzi* and *T. petropolitana*, respectively. Black crosses represent type localities not sampled in this study. Localities where lineages occur in syntopy are represented by squares and multiple colors. Elevation is shown in gray scale ranging from white (0–50 m above the sea level) to black (3900–3950 m above sea level). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

monophyly of *T. saxatilis*, *T. megatympanum*, *T. taophora*, and also showed a paraphyletic *T. miliaris* with respect to *T. taophora*. The nuclear markers alone revealed well supported deeper divergences within the genus, especially the early split of *T. saxatilis* and *T. megatympanum* from other *Thoropa*.

4.1. Biogeography of diversification in *Thoropa*

Our data indicate that diversification of *Thoropa* began with a north-south split (between *T. saxatilis* and the other species). The distributional gap between *T. saxatilis* and the most southern locality of *T.*

taophora (Peruíbe and Iguape, state of São Paulo) as well as its ancient separation from other species in the group corroborate this observation. This split was followed by a west-east division, with the separation between *T. megatympanum* and the complex *T. miliaris* + *T. taophora*. This pattern of diversification corroborates the hypothesis of allopatric speciation of *Thoropa* species from a widespread ancestor proposed by [Cocroft and Heyer \(1988\)](#), although the speciation events were older than they postulated. Subsequently, the diversification of *T. miliaris* + *T. taophora* extended to the coast, in a process that likely included both vicariance and dispersal. Despite the long process of diversification of lineages, the distribution of *Thoropa* species is still

Table 1

Average uncorrected *p*-distances (percentage, with standard errors in parentheses), within species (diagonal) and between species (below diagonal), and within lineages (diagonal) and between lineages (below diagonal), calculated from 16S-ARBR and COI fragments. (a) Within and between species for 16S-ARBR fragment. (b) Within and between species for COI fragment. (c) Within and between lineages for 16S fragment. (d) Within and between lineages for COI fragment.

(a) 16S-ARBR fragment, by species													
Species	N	<i>T. saxatilis</i>			<i>T. megatympanum</i>			<i>T. miliaris</i>			<i>T. taophora</i>		
<i>T. saxatilis</i>	4	2.0 (0.4)											
<i>T. megatympanum</i>	6	8.1 (1.0)			1.2 (0.3)								
<i>T. miliaris</i>	27	6.7 (0.9)			6.4 (0.8)			3.1 (0.5)					
<i>T. taophora</i>	9	7.4 (1.0)			7.4 (0.9)			4.4 (0.7)			1.1 (0.3)		
(b) COI fragment, by species													
Species	N	<i>T. saxatilis</i>			<i>T. megatympanum</i>			<i>T. miliaris</i>			<i>T. taophora</i>		
<i>T. saxatilis</i>	4	6.6 (0.8)											
<i>T. megatympanum</i>	6	14.6 (1.2)			3.9 (0.5)								
<i>T. miliaris</i>	24	16.3 (1.2)			16.0 (1.1)			11.4 (0.9)					
<i>T. taophora</i>	7	17.0 (1.2)			15.9 (1.3)			13.5 (1.0)			3.5 (0.5)		
(c) 16S-ARBR fragment, by lineage													
Lineage	N	sax-1	sax-2	meg-1	meg-2	mil-1	mill-2	mil-3	mil-4	mil-5	tao-1	tao-2	tao-3
sax-1	1	–											
sax-2	3	3.7 (0.9)	0.3 (0.2)										
meg-1	2	9.4 (1.4)	7.2 (1.0)	1.1 (0.4)									
meg-2	4	9.4 (1.4)	7.9 (1.1)	1.7 (0.5)	0.7 (0.3)								
mil-1	4	7.8 (1.2)	7.8 (1.1)	7.3 (1.0)	7.1 (1.0)	2.0 (0.4)							
mil-2	10	7.0 (1.2)	6.6 (1.1)	6.0 (0.9)	6.6 (1.0)	3.6 (0.6)	1.3 (0.3)						
mil-3	3	8.0 (1.3)	6.5 (1.1)	5.5 (0.8)	5.9 (0.9)	4.4 (0.8)	3.3 (0.6)	1.9 (0.4)					
mil-4	2	6.7 (1.2)	5.9 (1.0)	6.0 (1.0)	6.3 (1.0)	3.9 (0.8)	3.0 (0.6)	3.1 (0.7)	0.2 (0.2)				
mil-5	8	7.1 (1.1)	6.0 (0.9)	6.0 (0.9)	6.3 (0.9)	4.0 (0.7)	3.8 (0.6)	4.0 (0.7)	2.5 (0.6)	1.6 (0.4)			
tao-1	2	8.2 (1.2)	7.1 (1.1)	6.8 (0.9)	7.3 (1.0)	5.6 (0.9)	4.4 (0.8)	4.2 (0.8)	3.4 (0.8)	4.6 (0.8)	0.0 (0.0)		
tao-2	5	7.5 (1.2)	7.4 (1.1)	7.1 (1.0)	7.4 (1.0)	5.6 (0.9)	4.3 (0.7)	4.6 (0.8)	3.4 (0.7)	4.4 (0.8)	1.1 (0.4)	0.5 (0.2)	
tao-3	2	7.2 (1.1)	7.6 (1.1)	7.5 (1.1)	8.1 (1.1)	5.0 (0.8)	4.0 (0.7)	4.8 (0.8)	3.2 (0.7)	4.2 (0.8)	2.0 (0.6)	1.7 (0.5)	0.0 (0.0)
(d) COI fragment, by lineage													
Lineage	N	sax-1	sax-2	meg-1	meg-2	mil-1	mil-2	mil-3	mil-4	mil-5	tao-1	tao-2	tao-3
sax-1	1	–											
sax-2	3	10.7 (1.1)	2.5 (0.5)										
meg-1	2	15.2 (1.5)	14.7 (1.3)	4.4 (0.8)									
meg-2	4	15.0 (1.5)	14.3 (1.4)	5.4 (0.7)	1.8 (0.4)								
mil-1	3	16.4 (1.4)	16.3 (1.4)	16.9 (1.5)	16.8 (1.5)	5.7 (0.7)							
mil-2	9	17.0 (1.4)	16.5 (1.3)	15.5 (1.3)	15.8 (1.4)	11.5 (1.1)	6.8 (0.6)						
mil-3	2	15.3 (1.4)	17.3 (1.4)	15.9 (1.2)	16.4 (1.3)	13.2 (1.0)	14.1 (1.1)	9.7 (1.2)					
mil-4	2	15.7 (1.5)	16.6 (1.3)	15.7 (1.3)	16.8 (1.4)	12.9 (1.2)	13.9 (1.3)	13.0 (1.2)	0.5 (0.3)				
mil-5	8	15.3 (1.3)	15.8 (1.3)	16.3 (1.3)	15.5 (1.3)	13.2 (1.1)	13.4 (1.1)	13.3 (1.1)	12.3 (1.1)	5.3 (0.6)			
tao-1	2	16.2 (1.5)	17.8 (1.3)	17.4 (1.5)	17.4 (1.5)	15.4 (1.3)	14.2 (1.2)	13.2 (1.2)	12.0 (1.3)	11.9 (1.1)	0.2 (0.2)		
tao-2	4	16.7 (1.5)	17.2 (1.4)	15.5 (1.4)	15.8 (1.5)	15.1 (1.3)	14.7 (1.2)	13.4 (1.1)	12.4 (1.2)	12.6 (1.1)	3.7 (0.7)	1.0 (0.3)	
tao-3	1	14.3 (1.4)	16.2 (1.5)	13.8 (1.3)	13.9 (1.3)	15.2 (1.5)	13.3 (1.2)	11.8 (1.2)	10.7 (1.4)	11.4 (1.1)	6.8 (0.9)	6.3 (1.0)	–

highly associated with rocky seashores or wet rocky outcrops near mountain formations, which indicates that this habitat preference is probably the ancestral state for the genus. The deep diversification times found for *Thoropa* species are similar to those found in many other South American amphibians, beginning in late Oligocene and continuing through the early Pliocene (Rull, 2008). Similar temporal patterns were found in *Adenomera* (Fouquet et al., 2014) and *Leptodactylus* (Fouquet et al., 2013).

The disjunct distribution of *Thoropa saxatilis* in relation to other species in this genus may be explained by paleogeographic changes to the landscape during the Miocene and Pliocene (Rull, 2008). *Thoropa saxatilis* and *T. megatympanum* have remained largely geographically isolated from all other species, except for a small contact zone between *T. megatympanum* and *T. miliaris* (mil-2), in Catas Altas, Minas Gerais state, and other known localities in the Espinhaço mountain range in Minas Gerais state (Feio et al., 2006). These cases of syntopy seem to represent secondary contact of *T. miliaris* and *T. megatympanum*

following the west-east vicariance.

Populations of *Thoropa miliaris* and *T. taophora* show a more complex scenario of diversification. Given the largely allopatric geographic distributions of *T. miliaris* lineages and *T. taophora*, and the parphyly of *T. miliaris*, we also consider vicariance for the split between the two forms, followed by secondary contact of lineages in some localities where the species are syntopic. This posterior contact may have occurred naturally, following past expansion and retraction hypothesized for Atlantic forest due to climatic oscillations (Carnaval and Moritz, 2008). Another possibility for syntopic distributions of *T. miliaris* lineages is anthropogenic mediated migration, but this latter hypothesis can only be ruled out after we have a better understanding of the geographic distributions of lineages. The split between *Thoropa miliaris* lineages and *T. taophora* occurred sometime between 15.5 and 4.0 million years in the late Miocene or early Pliocene (Fig. 5). However, this split was not accompanied by morphological change, as *T. miliaris* and *T. taophora* do not have any diagnostic morphological phenotypes

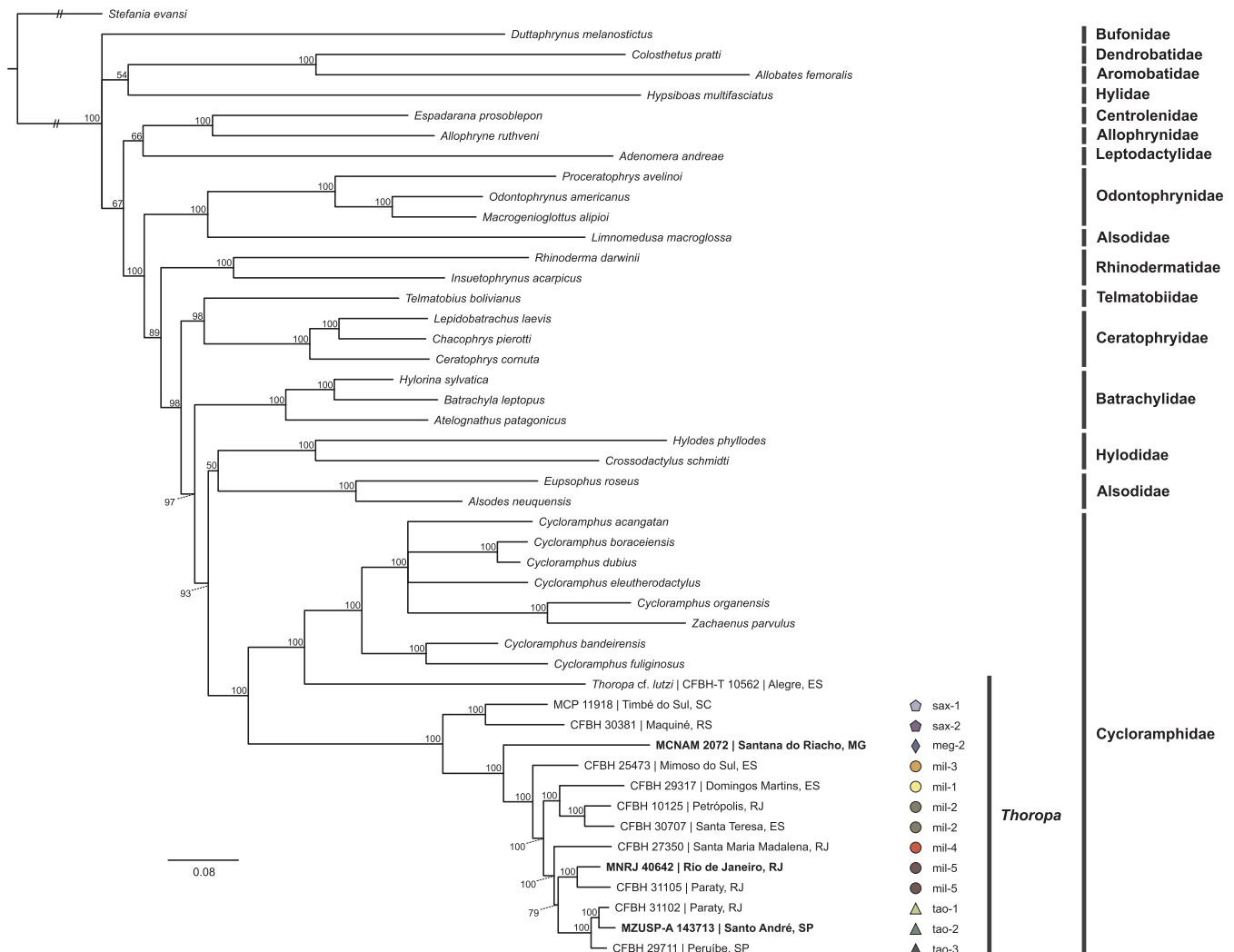


Fig. 4. Phylogeny based on concatenated (mitochondrial + nuclear) dataset (matrix B) and Bayesian Inference (50% majority rule consensus) for *Thoropa* species and outgroups. Numbers at each node represent clade posterior probabilities. The branches leading to *Stefania evansi* are not to scale. Sample CFBH 31105 was identified as *Thoropa miliaris* because of its collection locality (Paraty, Rio de Janeiro), but it has been renamed *T. taophora*. The codes MG, ES, RJ, SP, SC, RS refer to the states of Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul, respectively. Color coded lineages of *Thoropa* are as shown in Fig. 3. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Feio et al., 2006).

The more recently derived lineages of *Thoropa miliaris* + *T. taophora* complex (mil-5, tao-1, tao-2, and tao-3) include populations that reach the coast of Brazil and inhabit rocky seashores. Seashores are an odd environment for an amphibian and few species are known to tolerate high-salinity habitats (Abe and Bicudo, 1991; Gordon et al., 1961; Romsper and McClanahan, 1981). Nonetheless, the two lineages have evolved to occupy saline microhabitats and although these populations live in hostile environments, they are locally abundant (Bokermann, 1965; Brasileiro et al., 2010).

Additionally, *Thoropa saxatilis*, *T. megatympanum*, and *T. taophora* may also be experiencing ongoing diversification as our topology showed geographical structure within these species (sax-1 and sax-2; meg-1 and meg-2; tao-1, tao-2, and tao-3). The north-south divergence in *T. taophora* was identified by Fitzpatrick et al. (2009), with the possibility of a southern São Paulo refugium forming the third lineage (“Juréia” = tao-3; Carnaval et al., 2009). Our data including the four *Thoropa* species corroborate that the distribution of habitats may play an important role in genetic connectivity or discontinuity of lineages and species (Fitzpatrick et al., 2009).

4.2. On the monophyly of *Thoropa*

Although Cycloramphidae was recovered as a monophyletic family, its relationships with the other families remain poorly resolved, as found in previous studies (Grant et al., 2006; Pyron and Wiens, 2011; Fouquet et al., 2013; Blotto et al., 2013; and Faivovich et al., 2014). Clearly, the higher-level systematics of Athesphatanura needs further study.

The inclusion of a sample of *T. lutzi* resulted in the potential paraphyly of the genus *Thoropa* (Figs. 2 and 4), with the single *T. lutzi* sample more closely related to *Cycloramphus* plus *Zachaenus* than to other members of the genus *Thoropa*. The position of this sample in the phylogeny raises interesting questions about the phylogenetic relationships of these three genera. For example, an externally non-visible tympanum is a synapomorphy for *Cycloramphus* + *Zachaenus* (Verdade, 2005), and in our sample of *T. lutzi*, the tympanum is visible. This indicates that this feature might have two independent origins in Cycloramphidae and is thus not a synapomorphy for *Cycloramphus*, or that the Cycloramphidae ancestor had a visible tympanic membrane but it was lost in *Cycloramphus* + *Zachaenus*.

We cannot discard the possibility that our sample of *Thoropa lutzi* is not *T. lutzi sensu stricto*, because we did not analyze samples from *T. lutzi*

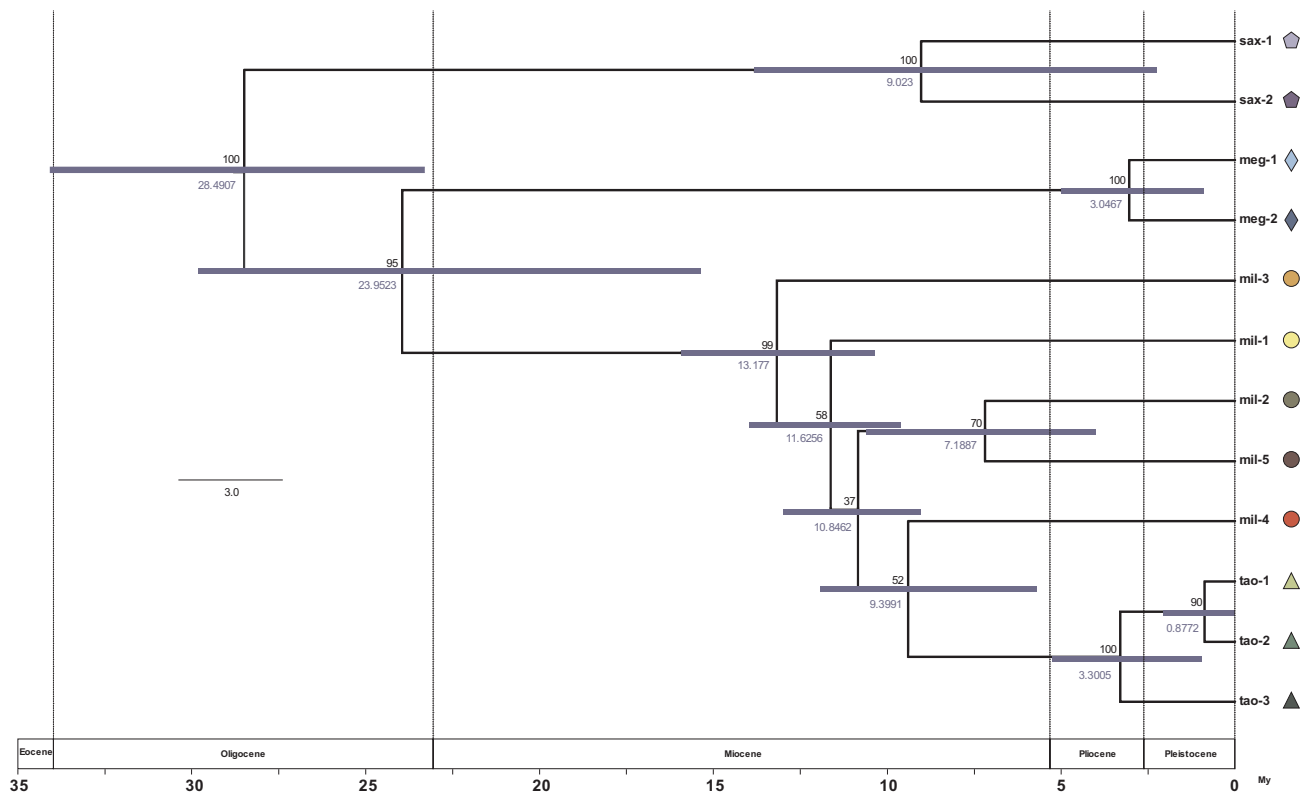


Fig. 5. Topology inferred from coalescent species tree analysis treating each lineage of *Thoropa* as distinct population, with respective t_{MRCA} for each node. Numbers above nodes indicate posterior probabilities, and numbers below nodes indicate average t_{MRCA} (in millions of years – “My”). Blue bars indicate standard deviations of t_{MRCA} .

type locality. Feio (2002) studied the morphology of a population from municipality of Muniz Freire (state of Espírito Santo), near the Alegre population we sampled, and found some morphological differences from the type series of *T. lutzi*. To test these relationships, we need more extensive sampling, with systematic analyses of molecular and morphological features, to infer the probable synapomorphies of *Thoropa*. Meanwhile, we recommend that this sample be designated as *Thoropa* cf. *lutzi*, until we can further clarify its taxonomic position.

4.3. Paraphyly and taxonomic considerations in *Thoropa*

Previous studies on the underestimation of diversity of frog species revealed thresholds of uncorrected p -distances that could be used to recognize “candidate species”, based on the most commonly used barcode gene fragments for amphibians (16S-ARBR and COI) (e.g., Vences et al., 2005a; Vences et al., 2005b; Fouquet et al., 2007). For 16S-ARBR, a threshold of 5% (Vences et al., 2005a) or 3% (Fouquet et al., 2007) of divergence have been used, while for COI the proposed threshold is 10% (Vences et al., 2005b). These levels of sequence divergence between lineages might correspond to different species and not merely intraspecific genetic variation.

If we analyze the four recognized species in our study, every value calculated for 16S-ARBR is higher than 3% (threshold *sensu* Fouquet et al., 2007), and only one value (4.4%, between *Thoropa miliaris* and *T. taophora*) is slightly smaller than 5% (threshold *sensu* Vences et al., 2005a). Thus, in general, the four nominal species are well supported, although *T. miliaris* and *T. taophora* might be considered synonyms if the threshold for 16S-ARBR is considered strictly. Our data show some evidence of deep intraspecific divergences within species. When comparing lineages within each species, they all differ genetically by less than 3% (*sensu* Fouquet et al., 2007) and less than 5% (*sensu* Vences et al., 2005a) for 16S-ARBR, and less than 10% for COI, with one exception. The genetic distance of COI among lineages within *T. miliaris* is slightly higher at 11.4%, which could indicate that *T. miliaris* contains

high internal diversity and represents a species complex.

With respect to genetic distances between species estimated from the 16S-ARBR fragment, our values (4.4–8.1) are similar to those found in studies of *Proceratophrys* (1–11%, Dias et al., 2013), *Osteocephalus* (0.6–6.1%, Jungfer et al., 2013), *Physalaemus* (1.2–11.7%, Lourenço et al., 2015), *Ceratophryidae* (0.4–7.2%, Faivovich et al., 2014), and *Oreobates* (2.8–11.7%, Padial et al., 2008). For the COI fragment, our between-species values (13.5–17.0) are higher than the values published for species of *Alsodes* and *Eupsophus* (Blotto et al., 2013). Thus, species delimitation in *Thoropa* is well defined, even considering the *T. miliaris* + *T. taophora* complex.

Lineages of *Thoropa miliaris* and *T. taophora* may represent an ongoing diversification in this species complex, with *T. miliaris* being a “paraphyletic species” (see Hörandl and Stuessy, 2010; Schmidt-Lebuhn, 2012; Stuessy and Hörandl, 2014 for discussion). In a review of the occurrence of paraphyly and polyphyly in animal phylogenies of mitochondrial DNA, Funk and Omland (2003) found 21.3% of amphibian topologies exhibiting paraphyly or polyphyly. Similarly, 22% of Amazonia-Guianas amphibians exhibit a paraphyletic topology in phylogenies (Fouquet et al., 2007). Even with high genetic distances, the existence of syntopy between lineages of *Thoropa miliaris* and *T. taophora* makes it difficult to infer species limits. Moreover, the *T. miliaris* + *T. taophora* complex has high phenotypic variation (Feio et al., 2006), precluding unambiguous diagnosis of species lineages, because of extensive morphometric and morphological overlap found in the OTUs (Feio et al., 2006). *Thoropa miliaris* and *T. taophora* surely represent a species complex, and this lineage needs further study, with a focus on systematics and population genetics.

Combined, our analyses underscore the high genetic diversity of lineages endemic to the Atlantic forest and adjacent regions. The high degree of geographic isolation among species and lineages and the relatively old age of these divergence events indicate that high habitat heterogeneity and a dynamic history of climatic change have structured diversification in this genus. Our study shows the importance of

inferring these spatial processes to clarify taxonomy and species diversity, and the processes that might threaten species conservation in tropical biomes.

Acknowledgements

We thank G. Pontes (MCP), P. C. A. Garcia (UFMG), H. E.-D. Zaher, T. Grant and C. Mello (MZUSP), J. P. Pombal Jr., and N. Gonzaga (MNRJ), M. Solé and E. Silva (MZUESC) for facilitating tissue donations. We thank P. Colombo, N. C. Pupin, A. T. de Carvalho e Silva, K. Ceron, H. Morrinho, M. Jordani, A. Mendes, L. A. Fusinato, F. Centro, M. W. Faria, C. S. Cassini, V. G. D. Orrico, T. H. Condez, A. N. Figueiredo, J. P. de Côrtes, B. v. M. Berneck, J. A. Passamani, A. Diogo, G. Sobrinho (IBAMA – ES), A. P. L. S. Almeida, W. Santos (Fazenda Recanto da Mata), R. Kautsky, S. L. Mendes, M. Musso, F. Musso, J. E. Simon, P. L. V. Peloso, R. Zorzal, J. Aragon and B. Becacici for help with field trips. We thank F. Brusquetti, M. T. C. Thomé, C. T. O. Brunes, B. Blotto, F. R. do Amaral, K. Pellegrino, V. G. D. Orrico, C. P. A. Prado, B.

v. M. Berneck, C. M. Lopes, and D. Baêta for help with analyses and constructive review of the manuscript, P. Lemes for map editions, and L. C. Irber Jr. for computational help. This research benefitted from resources of the Center for Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of the São Paulo State University (UNESP) and the Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil). Field collections license provided by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-SISBIO number 30181-1).

Fundings

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil [grants #08/50928-1 and #13/50741-7]; by FAPESP/Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza [grant #2014/50342-8]; by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil [grants #564955/2010-8 and #302518/2013-4].

Appendix A

Appendix A.1. Samples of *Thoropa* and outgroup species used in this study (matrix A), with accession numbers, collection localities (“simplified locality, municipality, state” or “municipality, state”), coordinates, GenBank accession numbers, and lineage membership. Samples in bold are topotype specimens. Asterisks indicate samples used in [Fitzpatrick et al. \(2009\)](#). Crosses indicate samples used also in matrix B, and full circles indicate samples used in coalescent species tree analysis. Samples originally recorded as *T. miliaris*, but considered as *T. taophora* because of their topology position, are shown with superscript “a”. Voucher specimens are deposited in Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo (CFBH); Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (MNRJ); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo (MZUSP); Museu de Zoologia João Moojen de Oliveira, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (MZUFV); Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (UFMG); Museu de Ciências Naturais, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais (MCNAM); and Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (MCP). Collection abbreviations follow [Sabaj Pérez \(2014\)](#). Appendix A.2. Samples of *Thoropa* and outgroup species used in this study (matrix B) sorted by family, with collection numbers and GenBank accession numbers. Samples in bold are *Thoropa* topotype specimens. Samples originally recorded as *T. miliaris*, but considered as *T. taophora* because of their topology position, are shown with superscript “a”. Voucher specimens are deposited in Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo (CFBH); Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (MNRJ); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo (MZUSP); and Museu de Ciências e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (MCP). Collection abbreviations follow [Sabaj Pérez \(2014\)](#).

Species	Accession number	Collection locality	Latitude	Longitude	GenBank Accession Numbers				Clade
					16S-ARBR	ND2	COI	FGA	
<i>T. megatymppanum</i> ●	UFMG-A 5857	Alto da Serra Sete Quedas, Lício de Almeida, BA	– 14.524367	– 42.539996	MG799589	MG799712	MG799624	MG799666	MG799754 meg-1
<i>T. megatymppanum</i> ●	UFMG-A 11512	Serra de Botumirim, Botumirim, MG	– 16.848186	– 43.042217	MG799588	MG799711	MG799623	MG799665	MG799753 meg-1
<i>T. megatymppanum</i> ●	UFMG-A 11542	Parque Nacional das Sempres Vivas, Diamantina, MG	– 17.729290	– 43.777300	MG799592	MG799715	MG799629	MG799670	MG799759 meg-2
<i>T. megatymppanum</i> ●	UFMG-A 9441	Fechados, Santana do Pirapama, MG	– 18.786483	– 43.875649	MG799590	MG799714	MG799627	MG799668	MG799757 meg-2
<i>T. megatymppanum</i> † ●	MCNAM 2072	Parque Nacional da Serra do Cipó, Santana do Riacho, MG	– 19.301725	– 43.604122	MG799575	MG799713	MG799626	MG799667	MG799756 meg-2
<i>T. megatymppanum</i>	UFMG-A 11049	Cachoeira da Ostra, Serra do Rola Moça, Brumadinho, MG	– 20.099472	– 44.191089	MG799591	–	MG799628	MG799669	MG799758 meg-2
<i>T. miliaris</i> ●	MZUFV 4048	Fazenda Alto Cariri, Salto da Divisa, MG	– 16.300000	– 39.983333	MG799603	MG799727	MG799641	MG799682	MG799770 mil-2
<i>T. miliaris</i>	MZUFV 4164	Fazenda Ramaiana, Joalima, MG	– 16.700000	– 40.816667	MG799604	–	MG799642	–	MG799771 mil-2
<i>T. miliaris</i>	CFBH-T 19800	Serra Grande, ao lado da Pedra do Monte do Pescoço, Itamaraju, BA	– 16.993250	– 39.594500	MG799605	MG799718	–	–	– mil-2
<i>T. miliaris</i> *	CFBH 18013	Estação Biológica Santa Lúcia, Santa Teresa, ES	– 19.965074	– 40.540466	GQ174578	GQ174987	MG799633	MG799674	MG799763 mil-1
<i>T. miliaris</i> † ●	CFBH 30707	Reserva Biológica Augusto Ruschii, Nova Lombardia, Santa Teresa, ES	– 19.911944	– 40.549444	MG799579	MG799728	MG799643	MG799683	MG799772 mil-2
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 72832	Cascatona, RPPN Santuário do Caraça, Catas Altas, MG	– 20.070500	– 43.489111	MG799602	MG799726	MG799640	MG799681	MG799769 mil-2
<i>T. miliaris</i> *	CFBH 18446	Morro da Gamela, Vitória, ES	– 20.302083	– 40.218333	GQ174617	GQ175017	MG799634	MG799675	MG799764 mil-1
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH 18431	Pedra Azul, Domingos Martins, ES	– 20.435333	– 41.021500	MG799598	MG799722	MG799636	MG799677	MG799766 mil-2
<i>T. miliaris</i> †	CFBH 29317	Panels, Domingos Martins, ES	– 20.335556	– 40.628056	MG799577	–	MG799632	MG799673	MG799762 mil-1
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH-T 10806	Sítio Recanto da Mata, Muniz Freire, ES	– 20.582222	– 41.473611	MG799593	MG799716	MG799630	MG799671	MG799760 mil-3
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH 27290	Cachoeira próxima à Pedra Dourada, Caminho da Luz, Carangola, MG	– 20.796000	– 42.105633	MG799599	MG799723	MG799637	MG799678	MG799767 mil-2
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH 27292	Cachoeira próxima à Pedra Dourada, Caminho da Luz, Carangola, MG	– 20.796000	– 42.105633	MG799606	MG799729	MG799644	MG799684	MG799773 mil-5
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 25984	Parque Municipal Pico do Itabira, Cachoeiro de Itapemirim, ES	– 20.848906	– 41.067800	MG799595	–	–	–	– mil-1
<i>T. miliaris</i>	MNRJ 25985	Parque Municipal Pico do Itabira, Cachoeiro de Itapemirim, ES	– 20.848906	– 41.067800	MG799594	–	–	–	– mil-3
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 25989	Parque Municipal Pico do Itabira, Cachoeiro de Itapemirim, ES	– 20.848906	– 41.067800	MG799610	MG799733	MG799649	MG799688	MG799778 mil-5
<i>T. miliaris</i> † ●	CFBH 25473	Cachoeiro de Itapemirim, ES	– 20.946197	– 41.531441	MG799576	MG799717	MG799631	MG799672	MG799761 mil-3
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 43663	Barra Pontões, 650 m de altitude, Mimoso do Sul, ES	– 21.805881	– 42.508008	MG799608	MG799731	MG799647	MG799686	MG799776 mil-5
<i>T. miliaris</i> † ●	CFBH 27350	Margem esquerda do Rio Paraíba do Sul, Volta Grande, MG	– 21.879250	– 41.918617	MG799582	MG799736	MG799652	MG799691	MG799781 mil-4
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH 27366	Parque Estadual do Desengano, Morumbeca, Santa Maria Madalena, RJ	– 21.930467	– 41.792500	MG799607	MG799730	MG799645	MG799685	MG799774 mil-5
<i>T. miliaris</i>	CFBH 28054	Parque Estadual do Desengano, trilha para o pico do Desengano, Santa Maria Madalena, RJ	– 21.880310	– 41.916910	MG799600	MG799724	MG799638	MG799679	– mil-2

<i>T. miliaris</i> ●	CFBH-T 21276	Rio Aiuruoca, Aiuruoca, MG	–21.975390	–44.603540	MG799601	MG799725	MG799639	MG799680	MG799768	mil-2
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 70701	Parque Natural Municipal Fazenda Atalaia, Macaé, RJ	–22.304600	–41.999997	MG799612	MG799737	MG799653	MG799692	MG799782	mil-4
<i>T. miliaris</i> † ●	CFBH 10125	Estrada Rio de Janeiro-Petrópolis, km 86, 718m, Petrópolis, RJ	–22.533350	–43.233840	MG799578	MG799721	MG799635	MG799676	MG799765	mil-2
<i>T. miliaris</i> †	MNRJ 40642	Pista Cláudio Coutinho, Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ	–22.952931	–43.157719	MG799580	MG799719	MG799646	–	MG799775	mil-5
<i>T. miliaris</i> ●	MNRJ 74658	Pedra de Itacoatiara, Itacoatiara, Niterói, RJ	–22.973539	–43.025100	MG799609	MG799732	MG799648	MG799687	MG799777	mil-5
<i>T. miliaris</i> ●	CFBH-T 15495	Paredão de pedra na Rodovia Rio-Santos (BR-101), km 487, Angra dos Reis, RJ	–22.981302	–44.436654	MG799611	MG799735	MG799651	MG799690	MG799780	mil-5
<i>T. miliaris</i> † ●	CFBH 31105	Costão rochoso da praia das Laranjeiras, Trindade, Paraty, RJ	–23.334416	–44.676563	MG799581	MG799734	MG799650	MG799689	MG799779	mil-5
<i>T. saxatilis</i> † ●	MCP 11918	Cascata da Corina, Serra da Rocinha, Serra Velha, Timbé do Sul, SC	–28.828690	–49.915585	MG799573	MG799707	MG799619	MG799661	MG799749	sax-1
<i>T. saxatilis</i> ●	CFBH 32211	Cachoeira da Onça, Praia Grande, SC	–29.160000	–49.988333	MG799587	MG799710	MG799622	MG799664	MG799752	sax-2
<i>T. saxatilis</i> † ●	CFBH 30381	Cascata da Forqueta, Distrito de Barra do Ouro, Maquiné, RS	–29.534364	–50.203171	MG799574	MG799709	MG799621	MG799663	MG799751	sax-2
<i>T. saxatilis</i> ●	CFBH 30311	Reserva da Família Lima, entre a 3a e a 4a cachoeiras, Sapiranga, RS	–29.552869	–51.016900	MG799586	MG799708	MG799620	MG799662	MG799750	sax-2
<i>T. taophora</i> ^a	CFBH 30616	Paredão de pedra na Rodovia Rio-Santos (BR-101), próximo a Tarituba, Paraty, RJ	–23.047222	–44.577028	MG799616	–	–	–	–	tao-2
<i>T. taophora</i> † ^a ●	CFBH 31102	Trilha para a praia das Laranjeiras, Trindade, Paraty, RJ	–23.332247	–44.679728	MG799584	MG799740	MG799655	MG799695	MG799785	tao-1
<i>T. taophora</i> * ●	CFBH 10472	Ilha Redonda, Praia Almada, Ubatuba, SP	–23.351944	–44.904444	GQ174553	GQ174960	MG799656	MG799696	MG799786	tao-1
<i>T. taophora</i> ●	CFBH 19920	Ilha Anchieta, Ubatuba, SP	–23.541367	–45.074647	MG799615	MG799741	MG799657	MG799697	MG799787	tao-2
<i>T. taophora</i> †	MZUSP-A 143713	Cachoeira da Pedra Lisa, Parque N. M. Nascentes de Paranapiacaba, Santo André, SP	–23.804944	–46.301000	MG799585	MG799720	MG799658	MG799698	–	tao-2
<i>T. taophora</i> * ●	CFBH 15325	Ilha de São Sebastião, Parque Estadual de Ilhabela, Ilhabela, SP	–23.831111	–45.352778	GQ174590	GQ174990	MG799660	MG799700	MG799789	tao-2
<i>T. taophora</i> ●	CFBH 15700	Ilha As Ilhas, São Sebastião, SP	–23.789444	–45.710314	MG799617	MG799742	MG799659	MG799699	MG799788	tao-2
<i>T. taophora</i> † ●	CFBH 29711	Estação Ecológica Juréia-Itatins, Núcleo Arpoador, Peruíbe, SP	–24.382886	–47.018247	MG799583	MG799738	MG799654	MG799693	MG799783	tao-3
<i>T. taophora</i>	CFBH 34898	Cachoeira do Pocinho, Iguape, SP	–24.571933	–47.248519	MG799613	MG799739	–	MG799694	MG799784	tao-3
<i>C. boracietensis</i>	–	–	–	–	KJ961570	–	KJ961550	MG799703	KJ961590	–
<i>C. eleutherodactylus</i>	–	–	–	–	KU495190	–	MG799625	MG799704	MG799755	–
<i>C. dubius</i>	–	–	–	–	GQ174585	MG799743	–	–	–	–
<i>P. boiei</i>	–	–	–	–	KU495468	EU017781	KU494675	MG799702	MG799790	–
<i>Z. parvulus</i>	–	–	–	–	KU495619	–	KU494826	MG799701	MG799791	–

Species	Family	GenBank Accession numbers											
		12S	tRNA-Vol	16S	tRNA-Leu	ND1	tRNA-Ile	COI	POMC	RAG1	RHO		
<i>Allophryne ruthveni</i>	Allophrynidae	AY843564	AY843564	AY843564	AY819458	AY819458	–	–	AY819077	EU663432	AY844538		
<i>Alsodes neuquensis</i>	Alsodidae	AY843565	AY843565	AY843565	JX204017	JX204017	JX204017	JX204017	KP295561	AY844362	AY844539		
<i>Eupsophus roseus</i> / <i>E. calcaratus</i>	Alsodidae	AY843587	AY843587	AY843587	JX204054	JX204054	JX204054	DQ502852	KC604074	–	AY844560		
<i>Linnomedusa macroglossa</i>	Alsodidae	AY843689	AY843689	AY843689	–	–	–	KC593345	KP295579	AY844471	AY844682		
<i>Allobates femoralis</i>	Aromobatidae	AY364543	AY364543	AY364543	HQ290951	HQ290951	HQ290951	DQ502811	HQ290831	DQ503327	DQ503215		
<i>Atelognathus patagonicus</i>	Batrachylidae	AY843571	AY843571	AY843571	–	–	–	–	KP295562	AY844368	AY844545		
<i>Batrachyla leptopus</i>	Batrachylidae	AY843572	AY843572	AY843572	JX204029	JX204029	JX204029	JX203910	KP295563	AY844369	AY844546		
<i>Hylorina sylvatica</i>	Batrachylidae	JX204222	JX204222	JX204222	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Dutaphrynus melanostictus</i>	Bufo	AY458592	AY458592	AY458592	AY458592	AY458592	AY458592	AY458592	DQ158317	EU712821	DQ283967		
<i>Espadarana prosoblepon</i>	Centrolenidae	JX564857	JX564857	JX564857	JX564857	JX564857	JX564857	FJ766591	AY819085	EU663453	AY364404		
<i>Ceratophrys cornuta</i>	Ceratophryidae	KP295608	KP295608	KP295608	KP295542	KP295542	KP295542	KP295688	KP295567	KP295589	KP295708		
<i>Chacophrys pierotii</i>	Ceratophryidae	KP295621	KP295621	KP295621	KP295551	KP295551	KP295551	–	KP295573	KP295597	KP295716		
<i>Lepidobatrachus laevis</i>	Ceratophryidae	KP295631	KP295631	KP295631	KP295556	KP295556	KP295556	KP295699	KP295576	KP295599	KP295720		
<i>Cyclorhamphus acangatan</i>	Cyclorhamphidae	HQ634162	–	FJ685683	–	–	–	–	–	FJ685103	KF214198		
<i>Cyclorhamphus bandeirensis</i>	Cyclorhamphidae	HQ634161	–	HQ634166	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Cyclorhamphus boraceiensis</i>	Cyclorhamphidae	DQ283097	DQ283097	DQ283097	–	–	–	DQ502856	–	DQ503357	DQ283813		
<i>Cyclorhamphus dubius</i>	Cyclorhamphidae	–	–	GQ174585	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Cyclorhamphus eleutherodactylus</i>	Cyclorhamphidae	HQ634160	–	KU495190	–	–	–	MG799625	–	MG799755	–		
<i>Cyclorhamphus fuliginosus</i>	Cyclorhamphidae	HQ634158	–	HQ634163	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Cyclorhamphus organensis</i>	Cyclorhamphidae	HQ634159	–	HQ634164	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Thoropa cf. luzi</i> (CFBH-T 10,562)	Cyclorhamphidae	MG799706	MG799572	MG799572	MG799572	MG799572	–	–	–	MG799748	MG799802		
<i>Thoropa megatympanum</i> (MCNAM 2072)	Cyclorhamphidae	MG799575	MG799575	MG799575	MG799575	MG799575	MG799575	MG799626	–	MG799756	MG799793		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 29,317)	Cyclorhamphidae	MG799577	MG799577	MG799577	MG799577	MG799577	MG799577	MG799632	MG799745	MG799762	MG799795		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 30,707)	Cyclorhamphidae	MG799579	–	MG799579	MG799579	MG799579	MG799579	MG799643	–	MG799772	MG799797		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 25,473)	Cyclorhamphidae	MG799576	MG799576	MG799576	MG799576	MG799576	MG799576	MG799631	–	MG799761	MG799794		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 27,350)	Cyclorhamphidae	MG799582	MG799582	MG799582	MG799582	MG799582	MG799582	MG799652	MG799747	MG799781	MG799799		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 10,125)	Cyclorhamphidae	MG799705	MG799578	MG799578	MG799578	MG799578	MG799578	MG799635	MG799746	MG799765	MG799796		
<i>Thoropa miliaris</i> (MNRJ 40,642)	Cyclorhamphidae	MG799580	MG799580	MG799580	–	–	–	MG799646	–	MG799775	–		
<i>Thoropa miliaris</i> (CFBH 31,105)	Cyclorhamphidae	MG799581	MG799581	MG799581	MG799581	MG799581	MG799581	MG799650	–	MG799779	MG799798		
<i>Thoropa saxatilis</i> (MCP 11,918)	Cyclorhamphidae	MG799573	MG799573	MG799573	MG799573	MG799573	MG799573	MG799619	MG799744	MG799749	–		
<i>Thoropa saxatilis</i> (CFBH 30,381)	Cyclorhamphidae	MG799574	MG799574	MG799574	MG799574	MG799574	MG799574	MG799621	–	MG799751	MG799792		
<i>Thoropa taophora</i> (CFBH 31,102) ^a	Cyclorhamphidae	MG799584	MG799584	MG799584	MG799584	MG799584	MG799584	MG799655	–	MG799785	MG799801		
<i>Thoropa taophora</i> (MZUSP-A 143,713)	Cyclorhamphidae	MG799585	MG799585	MG799585	–	–	–	MG799658	–	–	–		
<i>Thoropa taophora</i> (CFBH 29,711)	Cyclorhamphidae	MG799583	MG799583	MG799583	–	–	–	MG799654	–	MG799783	MG799800		
<i>Zachaeus parvulus</i>	Cyclorhamphidae	KC593362	KC593362	KC593362	–	–	–	–	–	–	–		
<i>Colostethus pratti</i>	Dendrobatidae	HQ290969	HQ290969	HQ290969	HQ290969	HQ290969	HQ290969	DQ502865	HQ290847	DQ503361	KP295708		
<i>Stefania evansi</i>	Hemiphractidae	AY843767	AY843767	AY843767	AY819490	AY819490	–	–	AY819108	DQ679307	AY844755		
<i>Hypsiboa multifasciatus</i>	Hylidae	AY843648	AY843648	AY843648	GQ366299	GQ366299	GQ366299	JN970762	GQ366036	AY844436	AY844633		
<i>Crossodactylus schmidti</i>	Hylodidae	AY843579	AY843579	AY843579	JX204031	JX204031	JX204031	DQ502738	HQ290828	DQ503298	AY844552		
<i>Hylodes phyllodes</i>	Hylodidae	DQ283096	DQ283096	DQ283096	–	–	–	DQ502873	–	DQ503367	DQ503253		
<i>Adenomera andreae</i>	Leptodactylidae	KC520683	KC520683	KC520683	HQ290944	HQ290944	HQ290944	KC520689	KC604061	KC604037	KC604094		
<i>Macrogenioglottus alipioi</i>	Odontophrynidae	KC593360	KC593360	KC593360	KC593353	KC593353	KC593353	–	–	KC593355	KC593357		
<i>Odontophrynus americanus</i>	Odontophrynidae	AY843704	AY843704	AY843704	JX204059	JX204059	JX204059	JX203939	JX298141	FJ685706	AY844695		

<i>Proceratophrys avelinoi</i>	KP295643	-	-	-	FJ685711	KF214204
<i>Insetophrynus acarpicus</i>	JX204223	-	-	-	JX204088	JX204152
<i>Rhinoderma darwini</i>	DQ283324	JX564891	JX564891	DQ502858	KP295584	AY364403
<i>Telmatobius bolivianus/T. sibiricus/T. truebae</i>	JF703234	JF703234	JF703234	JF703234	AY819097	AY583344
						AY844757

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.01.017>.

Abbe, A.S., Bicudo, J., 1991. Adaptations to salinity and osmoregulation in the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). Zool. Anz. 227, 313–318.

Ab'Saber, A.N., 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. Geomorfologia 52, 1–22.

Alfaro, M.E., Zoller, S., Lutzoni, F., 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. Mol. Biol. Evol. 20, 255–266.

Barth, R., 1956. Observações anatômicas sobre a larva de *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 54, 489–497.

Blotto, B.L., Nuñez, J.J., Basso, N.G., Úbeda, C.A., Wheeler, W.C., Faivovich, J., 2013. Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* + *Eupsophus* clade (Anura: Alsodidae), with comments on the supposed paraphyly of *Eupsophus*. Cladistics 29, 113–131.

Bokermann, W.C.A., 1965. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). An. Acad. Bras. Ciênc. 37, 525–537.

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput. Biol. 10, e1003537.

Bouckaert, R., 2015. bModelTest: Bayesian site model selection for nucleotide data. <http://biorxiv.org/content/biorxiv/early/2015/06/11/020792.full.pdf> (accessed 04-22-2016).

Brasileiro, C.A., Martins, M., Sazima, I., 2010. Feeding ecology of *Thoropa taophora* (Anura: Cycloramphidae) on a rocky seashore in Southeastern Brazil. South Am. J. Herpetol. 5, 181–188.

Caramaschi, U., Sazima, I., 1984. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). Rev. Bras. Zool. 2, 139–146.

Carnaval, A.C., Moritz, C., 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. J. Biogeogr. 35, 1187–1201.

Carnaval, A.C., Hieckerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., Moritz, C., 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. Science 323, 785–789.

Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., De la Riva, I., Pombal Jr, J.P., Silva, H.R., Rojas-Runjaic, F.J.M., Medina-Méndez, E., Frost, D.R., 2015. Phylogenetic systematics of egg-brooding frogs (Anura: Hemiphractidae) and the evolution of direct development. Zootaxa 4004, 1–75.

Cochran, D.M., 1938. Diagnoses of new frogs from Brazil. P. Biol. Soc. Wash. 51, 41–42.

Cocroft, R.B., Heyer, W.R., 1988. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia, Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). P. Biol. Soc. Wash. 101, 209–220.

Consolmagno, R.C., Requena, G.S., Machado, G., Brasileiro, C.A., 2016. Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. Behav. Ecol. Sociobiol. 70, 785–795.

Cope, E.D., 1865. Sketch of the primary groups of Batrachia Salientia. Nat. History Rev., New Series 5, 97–120.

Crawford, A.J., 2003. Relative rates of nucleotide substitution in frogs. J. Mol. Evol. 57, 636–641.

Cruz, C.A.G., Feio, R.N., 2007. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. In: Nascimento, L.B., Oliveira, M.E. (Eds.), Herpetologia no Brasil II. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, pp. 117–126.

Dias, P.H.S., Amaro, R.C., Carvalho-e-Silva, A.M.P.T., Rodrigues, M.T., 2013. Two new species of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Atlantic forest, with taxonomic remarks on the genus. Zootaxa 3682, 277–304.

Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biol. 4, 699–710.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl. Acids Res. 32, 1792–1797.

Erixon, P., Svennblad, B., Britton, T., Oxelman, B., 2003. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. Syst. Biol. 52, 665–673.

Fabrezi, M., Alberch, P., 1996. The carpal elements of anurans. Herpetologica 52, 188–204.

Faivovich, J., Nicoli, L., Blotto, B.L., Pereyra, M.O., Baldo, D., Barrionuevo, J.S., Fabrezi, M., Wild, E.R., Haddad, C.F.B., 2014. Big, bad and beautiful: phylogenetic relationships of the horned frogs (Anura: Ceratophryidae). South Am. J. Herpetol. 9, 207–227.

Feio, R.N., 2002. In: Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 217 PhD thesis.

Feio, R.N., Napoli, M.F., Caramaschi, U., 2006. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescoberta de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq. Mus. Nac. 64, 41–60.

Fitzpatrick, S.W., Brasileiro, C.A., Haddad, C.F.B., Zamudio, K.R., 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. Mol. Ecol. 18, 2877–2896.

Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., Gemmell, N.J., 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA

- analyses. PLoS One 2, e1109.
- Fouquet, A., Blotto, B.L., Maronna, M.M., Verdade, V.K., Juncá, F.A., De Sá, R., Rodrigues, M.T., 2013. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 445–457.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., DeSá, 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. *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 297, 370.
- Frost, D.R., 2017. *Amphibian Species of the World: an online reference*. Version 6.0. *Am. Mus. Nat. Hist.* <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia> (access 08-21-2016).
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol.* 34, 397–423.
- Gene Codes Corporation. Sequencher® version 4.5. Ann Arbor, MI, USA. <http://www.genecodes.com> (access 04-25-2016).
- Giaretta, A.A., Fature, K.G., 2004. Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). *Biota Neotrop.* 4, 1–9.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., 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). *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 299, 262.
- Gordon, M.S., Schmidt-Nielsen, K., Kelly, H.M., 1961. Osmotic regulation in the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). *J. Exp. Biol.* 38, 659–678.
- Haddad, C.F.B., Toledo, L.F., Prado, C.P.A., Loebmann, D., Gasparini, J.L., Sazima, I., 2013. *Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology*. Anolisbooks, São Paulo, SP, Brazil, pp. 544.
- Heled, J., Drummond, A.J., 2010. Bayesian Inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570–580.
- Hörandl, E., Stuessy, T.F., 2010. Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon* 59, 1641–1653.
- Jungfer, K.-H., Faivovich, J., Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., Lyra, M., Berneck, B.V.M., Iglesias, P.P., Kok, P.J.R., MacCulloch, R.D., Rodrigues, M.T., Verdade, V.K., Gastello, C.P.T., Chaparro, J.C., Valdujo, P.H., Reichle, S., Moravec, J., Gvozdič, V., Gagliardi-Urrutia, G., Ernst, R., De la Riva, I., Means, D.B., Lima, A.P., Señaris, J.C., Wheeler, W.C., Haddad, C.F.B., 2013. Systematics of spiny-backed treefrogs (Hylidae: *Osteocephalus*): an Amazonian puzzle. *Zool. Scr.* 42, 351–380.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.
- Lourenço, L.B., Targueta, C.P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P.C.A., Andrade, G.V., Haddad, C.F.B., Recco-Pimentel, S.M., 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 92, 204–216.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.03. <http://mesquiteproject.org> (access 04-25-2016).
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, USA. pp. 1–8.
- Miranda-Ribeiro, A., 1923. Os hylodídeos do Museu Paulista. *Revista do Museu Paulista* 13, 825–846.
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Thomsen, J.B., Fonseca, G.A.B., Olivieri, S., 1998. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.* 12, 516–520.
- Morellato, L.P.C., Haddad, C.F.B., 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic forest. *Biotropica* 32, 786–792.
- Muralidhar, P., De Sá, F.P., Haddad, C.F.B., Zamudio, K.R., 2014. Kin-bias, breeding site selection and female fitness in a cannibalistic Neotropical frog. *Mol. Ecol.* 23, 453–463.
- Padial, J.M., Chaparro, J.C., De la Riva, I., 2008. Systematics of *Oreobates* and the *Eleutherodactylus discoidalis* species group (Amphibia, Anura), based on two mitochondrial DNA genes and external morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* 152, 737–773.
- Palumbi, S.R., Martin, A., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. <http://palumbi.stanford.edu/SimpleFoolsMaster.pdf> (access 04-25-2016). 45 pp.
- Pyrón, R.A., Wiens, J.J., 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 543–583.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014. Tracer v.1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (access 04-25-2016).
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M., 2009. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* 142, 1141–1153.
- Rocha, C.F.D., Van Sluys, M., Bergallo, H.G., Alves, M.A.S., 2002. Microhabitat use and orientation to water flow direction by tadpoles of the leptodactylid frog *Thoropa miliaris* in southeastern Brazil. *J. Herpetol.* 36, 98–100.
- Rodríguez, A., Börner, M., Pabijan, M., Gehara, M., Haddad, C.F.B., Vences, M., 2015. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. *Evol. Ecol.* 29, 765–785.
- Romspert, A.P., McClanahan, L.L., 1981. Osmoregulation of the terrestrial salamander, *Ambystoma tigrinum*, in hypersaline media. *Copeia* 1981, 400–405.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Van der Mark, P., 2005. MrBayes 3.1 Manual. 69 pp.
- Rull, V., 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol. Ecol.* 17, 2722–2729.
- Sabaj Pérez, M.H., 2014. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an online reference. Version 5.0. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. <http://www.asih.org/> (access 04-25-2016).
- Schmidt-Lebuhn, A.N., 2012. Fallacies and false premises – a critical assessment of the arguments for the recognition of paraphyletic taxa in botany. *Cladistics* 28, 174–187.
- Schwarz, G., 1978. Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461–464.
- Silva, J.M.C., Casteleti, C.H.M., 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic forest of Brazil. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.), *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. CABS and Island Press, Washington, pp. 43–59.
- Silveira, F.A.O., Negreiros, D., Barbosa, N.P.U., Buisson, E., Carmo, F.F., Carstensen, D.W., Conceição, A.A., Cornelissen, T.G., Echternacht, L., Fernandes, G.W., Garcia, Q.S., Guerra, T.J., Jacobi, C.M., Lemos-Filho, J.P., Le Stradic, S., Morellato, L.P.C., Neves, F.S., Oliveira, R.S., Schaefer, C.E., Viana, P.L., Lambers, H., 2015. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant Soil* 403, 129–152.
- Spix, J.B.v., 1824. *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae Regis*. München: F. S. Hübschmann.
- Stuessy, T.F., Hörandl, E., 2014. The importance of comprehensive phylogenetic (evolutionary) classification – a response to Schmidt-Lebuhn's commentary on paraphyletic taxa. *Cladistics* 30, 291–293.
- Tamura, K., Stecher, G., Perterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Toledo, L.F., Becker, C.G., Haddad, C.F.B., Zamudio, K.R., 2014. Rarity as an indicator of endangerment in neotropical frogs. *Biol. Conserv.* 179, 54–62.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R., 2005a. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* 2, 5.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M., Vieites, D.R., 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos. Trans. R. Soc. B* 360, 1859–1868.
- Verdade, V.K., 2005. *Relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros Cyclorhamphus Tschudi 1838 e Zachaenus Cope 1866 (Anura, Leptodactylidae)*. PhD thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, 170 pp.
- Wandolke, B., 1907. Einige neue und weniger bekannte Batrachier von Brasilien. *Abhandlungen und Berichte des Zoologischen und Anthropologisch-Ethnographischen Museums zu Dresden*. 11, pp. 1–15.