

Bárbara Fernandes Zaidan

**Sistemática Filogenética de *Physalaemus*
Fitzinger (Anura: Leptodactylidae)
combinando dados moleculares e morfológicos**



**BELO HORIZONTE
2019**

Capa: Aparato hiolaringeal de *Physalaemus signifer* (UFMG 4961)



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Zoologia



Sistemática Filogenética de *Physalaemus* Fitzinger (Anura: Leptodactylidae) combinando dados moleculares e morfológicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Zoologia.

Orientador: Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia

BELO HORIZONTE

2019

- 043 Zaidan, Bárbara Fernandes.
Sistemática Filogenética de *Physalaemus* Fitzinger (Anura: Leptodactylidae) combinando dados moleculares e morfológicos [manuscrito] / Bárbara Fernandes Zaidan. - 2019.
- 167 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.
1. Zoologia - Teses. 2. Filogenia. 3. Leptodactylidae - Teses. 4. Morfologia (Animais). I. Garcia, Paulo Christiano de Anchieta. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.
- CDU: 591



ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Bárbara Fernandes Zaidan

Ao segundo dia do mês de outubro do ano de dois mil e dezenove, às quatorze horas, na Universidade Federal de Minas Gerais, teve lugar a defesa de Doutorado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria da Doutoranda Bárbara Fernandes Zaidan intitulada: "**Sistemática filogenética de *Physalaemus Fitzinger (Anura: Leptodactylidae)* utilizando dados moleculares e morfológicos**". Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para a candidata para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Fernando Araújo Perini, Hélio Ricardo da Silva, Luciana Bolsoni Lourenço, Rachel Montesinos Martins Pereira, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata.

Após a arguição, apenas os Srs. Examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: o trabalho foi:

- Aprovado sem alterações
 Aprovado com alterações (observações em anexo)
 Reprovado

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 02 de outubro de 2019.

Comissão Examinadora	Assinatura
Prof. Dr. Fernando Araújo Perini	
Prof. Dr. Hélio Ricardo da Silva	
Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço	
Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia (Orientador)	
Profa. Dra. Rachel Montesinos Martins Pereira	

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram e contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse possível.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Garcia, por ter aceitado o desafio.

À CAPES, pelos 36 meses de bolsa.

Aos curadores das coleções e colaboradores, que cederam grande parte do material utilizado na tese, tornando este trabalho possível mesmo em um momento de recursos tão escassos. Obrigada, Célio Haddad e Nadya Pupin (CFBH), Claudio Nicoletti (INMA), Julián Faivovich e Santiago Nenda (MACN), Luís Felipe Toledo (ZUEC).

À Luciana Bolsoni Lourenço, pelas sequências moleculares gentilmente cedidas.

À Rachel Montesinos, pelas enriquecedoras discussões sobre caracteres, ajuda com análises e por sempre aparecer com uma palavra amiga de apoio quando precisei.

Ao Igor pela ajuda com a remoção da pele de diversos exemplares e principalmente por ser meu maior companheiro de discussões filosóficas sobre sistemática, codificação de caracteres e anatomia. Sua paixão por morfologia é inspiradora!

Ao Rafael Mol por me ajudar com a troca de soluções nos dias que não pude comparecer ao laboratório e pela valiosa ajuda com as referências. E pelos brownies.

Aos colegas de laboratório: Carol, Dani, Igor, Fifi, Rafael, Henrique, Rachel, Johnny, Prezza, Raíla, Mol, Samuel, Jean, Brenda por tornarem essa jornada tão mais leve e divertida. Como vocês fazem falta!

À Carol Oswald por ter sido minha companheira de representação discente, de chororô, de fofocas e de alegrias.

Ao Rafael Magalhães, pelos ótimos conselhos, explicações e pela cópia do office e pelos lanches que salvaram minha vida!

Ao Callithra, Pedrão e Prezza (loja maravilhoja), por toda a ajuda intelectual e apoio emocional.

Ao Johnny, por ser uma inspiração do que ser quando crescer. Obrigada pelas ótimas discussões, dicas e pela calma inabalável.

Ao Felipe de Freitas, por ter me apoiado e me dado condições de sobreviver ao período sem bolsa do doutorado. Melhor companheiro de viagens!

Aos meus amigos da vida, pelo apoio incondicional. A vida sem vocês seria triste. Agradecimento especial à Vero, por ter acompanhado meus dramas desde o começo e sempre ter me dado um ombro amigo e uma palavra amorosa de apoio. À Fer, que é uma pessoa maravilhosa, com uma sensibilidade ímpar. À Marla por ser uma amiga e confidente tão especial de áudios de 7 minutos. Ao Zé por toda a companhia e por entender a ausência (“não vou nem te convidar pra não te tentar”). À Carina, pelo carinho. Aos melhores-amigos-vizinhos, Mayra e Vivi Pepê, que são sempre companhias excelentes e me cederam tantas vezes ombros e ouvidos. À turma do Gartic, Lelets, Tampa, Vezão, Rafa, Ello, Pannain, Pepelli, André, por ser um lugar de apoio incondicional, para partilhar alegrias e derrotas. À turminha Boca de Leite, Paloma, Mário, Joel, Henrique, Marla, Zé, Mayra, Lívio, Pedro, a melhor fonte de informações, zoeira séria, e stickers.

À galera da bio, por proporcionar momentos maravilhosos, e por me ensinar que eu sou ótima do jeitinho que eu sou. Em especial à Isa, Natashinha, Tânia (companheirassas!), Bocão, Daniel, Bernardinho Zé Lelé, Fazza, Livi, Jarbas e Totas. Vocês são incríveis!

Ao Cristiano Loureiro e Lucas Pannain pelas dicas valiosas de Photoshop e Illustrator. Pannain, obrigada por sempre atender imediatamente aos meus chamados desesperados.

À Bianca Berneck e Marcus Thadeu Santos pela excelente companhia de campo e colaborações.

À Camilla Queiroz, pela ajuda com questões da coleção, e pela boa vontade e disponibilidade. Também a todos os estagiários da coleção Herpetológica da UFMG, por toda ajuda.

Aos meus pais, que nunca deixaram que nada faltasse. Sem esse apoio não conseguiria chegar onde cheguei.

À minha querida irmã e amiga, que gerou o serzinho mais incrível do planeta.

A toda minha querida família.

À Bárbara Faleiro, por ser uma amiga incrível. Sempre companheira e com uma boa vontade incomparável.

Ao George Harrison, meu companheiro de aventuras, que nunca permitiu que me sentisse sozinha. À Sabrina e ao Rogério, por serem os seres mais amassáveis do mundo!

Ao Darrel Frost e colaboradores, pelo site incrível de compilação de dados.

À Alexandra Elkabyan, ao Aaron Swartz e a todos aqueles que dedicaram a vida para que a ciência e a informação fossem acessíveis a todos.

RESUMO

Physalaemus é um gênero neotropical de Leptodactylidae composto por 48 espécies, sendo o maior da subfamília Leiuperinae. Recentemente, a primeira análise filogenética foi realizada para testar as relações entre as espécies do gênero, usando apenas dados moleculares. O presente estudo foi desenvolvido para revisar a sistemática de *Physalaemus* através de uma análise de evidência total com o maior número possível de espécies, acrescentando caracteres morfológicos potencialmente informativos aos clados inferidos. Além disso, avaliar os efeitos da adição de caracteres fenotípicos em uma análise com caracteres predominantemente moleculares, e investigar a história evolutiva de alguns caracteres morfológicos. Minha análise de evidência total incluiu 200 caracteres morfológicos e dados moleculares de genes mitocondriais e nucleares para 39 espécies descritas e uma nova espécie de *Physalaemus*, 7 de outros Leiuperinae, representando todos os demais gêneros dessa subfamília, e 10 espécies das outras subfamílias de Leptodactylidae. Duas análises foram realizadas para atingir os objetivos principais, uma utilizando apenas dados moleculares e outra concatenando os dados moleculares e morfológicos (análise de evidência total), ambas sob os mesmos parâmetros, utilizando o critério de Máxima Parcimônia. Todos os grupos de *Physalaemus* propostos por Lourenço *et al.* (2015) foram recuperados com alto suporte em ambas as análises. Os dados morfológicos melhoraram a resolução de vários clados, uma vez que a árvore de consenso estrito da análise utilizando apenas dados moleculares apresentou mais politomias quando comparada à árvore de consenso estrito da análise de Evidência Total, e sinapomorfias morfológicas foram encontradas suportando todos os clados recuperados. As relações entre os grupos de espécies de *Physalaemus* ainda necessitam elucidação.

ABSTRACT

Physalaemus is a Neotropical genus of Leptodactylidae composed by 48 species, being the largest genera in the subfamily Leiuperinae. Recently, the first phylogenetic analysis was performed to test the relationships among the species within the genus, using only molecular data. The present study was designed to review the systematics of *Physalaemus*, by performing a total evidence analysis representing as many species as possible, adding to the inferred clades potentially informative morphological characters. Also, to evaluate the effects of the addition of phenotypic characters in an analysis with predominantly molecular characters, and investigate the evolutionary history of some morphological characters. My total evidence analysis included 200 morphological characters and molecular data from mitochondrial and nuclear genes for 39 described species and one new species of *Physalaemus*, 7 of other Leiuperinae, representing all the remaining genus of this subfamily, and 10 species of the other Leptodactylidae subfamilies. Two analyses were performed in order to accomplish the main goals, one using only molecular data and another concatenating the molecular and morphological data (total evidence analysis), both under the same parameters with the Maximum Parsimony criterion. All of the groups proposed by Lourenço *et al.* (2015) were recovered with high support in both analyses. The morphological data improved the resolution of several clades, as the strict consensus tree from the analysis using only molecular data presented more polytomies when compared to the the strict consensus tree of the Total Evidence analysis, and several morphological synapomorphies supported all recovered clades. Although, the relationships among the *Physalaemus* groups of species remain to be elucidated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Saco vocal em machos de A: <i>Physalaemus centralis</i> UFMG 3737 B: <i>Physalaemus bokermanni</i> (UFMG 7169).....	15
Figura 2. Vista dorsal das calosidades nupciais em Leptodactylidae A: <i>Leptodactylus petersii</i> (UFMG 12685) B: <i>Crossodactylodes itambe</i> (UFMG 14032) C: <i>Paratelmatobius cardosoi</i> (CFBH 31094) D: <i>Physalaemus nattereri</i> (UFMG 2342).....	19
Figura 3. Vista ventral das asperezas nupciais em machos de A: <i>Physalaemus cicada</i> (UFMG 7830) B: <i>Physalaemus camacan</i> (CFBH 2121) e C: <i>P. nattereri</i> (UFMG 2342).....	22
Figura 4. Membrana timpânica externa em <i>Leptodactylus mystacinus</i> (UFMG 3275)....	24
Figura 5. Tubérculos na pálpebra de <i>Physalaemus moreirae</i> (UFMG 2715), macho.....	25
Figura 6. Vista lateral de A: <i>Paratelmatobius cardosoi</i> (MZUSP 21317) B: <i>Physalaemus santafecinus</i> (MACN 45265) e <i>Engystomops petersi</i> (MZUSP 62048).	26
Figura 7. Vista ventral da mão de <i>Pseudopaludicola mystacalis</i> (UFMG 2797), macho.....	26
Figura 8. Coxa e tíbia de <i>Paratelmatobius cardosoi</i> (UFMG 21317), macho.	27
Figura 9. Vista ventral do pé e tarso de <i>Physalaemus albifrons</i> (UFMG 6150), macho....	29
Figura 10. Vista ventral da coxa, pé e tarso de <i>Physalaemus lisei</i> (UFMG 2679), macho.....	30
Figura 11. Zoom da pele dorsal de <i>Engystomops petersi</i> (MZUSP 62048).	31
Figura 12. Ventre de <i>Physalaemus carrizorum</i> (UFMG 9875), macho.	34
Figura 13. Glândulas inguinais de <i>Physalaemus nattereri</i> (UFMG 2372), macho, em A: vista externa e B: vista interna.	35
Figura 14. Vista ventral de <i>Physalaemus lateristriga</i> (UFMG 10176). A pele da metade direita foi seccionada e estendida para visualização das glândulas internamente.	37

Figura 15. Região gular de <i>Engystomops petersi</i> (MZUSP 62051), evidenciando as macroglândulas inframandibulares.	38
Figura 16. Vista lateral de <i>Physalaemus feioi</i> (UFMG 12847), fêmea.	39
Figura 17. Região posterodorsal de <i>Physalaemus lateristriga</i> (UFMG 9836), macho.	40
Figura 18. Músculos gulares de <i>Physalaemus moreirae</i> (UFMG 9478), macho. A: camada superficial, B: segunda camada (mm. submentalis, intermandibularis e interhyoideus retirados), C: terceira camada (mm. geniohyoideus medialis e lateralis retirados), D: m. sternohyoideus esquerdo retirado.	44
Figura 19. Músculos gulares de <i>Physalaemus lisei</i> (UFMG 2679), macho. A: camada superficial B: segunda camada (mm. submentalis, intermandibularis e interhyoideus retirados) C: terceira camada (mm. geniohyoideus medialis e lateralis retirados) D: mm. sternohyoideus retirados.	47
Figura 20. Porção posterior do hoide de <i>Physalaemus biligonigerus</i> (ZUEC 20457), macho. Músculos gulares removidos, exceto omohyoideus.	48
Figura 21. Músculos da região posterodorsal de <i>Physalaemus kroyeri</i> (UFMG 4825).	50
Figura 22. Membros inferiores direitos de <i>Physalaemus lisei</i> (UFMG 2679), macho.	51
Figura 23. Visceras de <i>Physalaemus lisei</i> (UFMG 2679), vista ventral.	56
Figura 24. Região anterodorsal do crânio de A: <i>Physalaemus erythros</i> (UFMG 14939), B: <i>Physalaemus maculiventris</i> (CFBH 26731) e C: <i>Physalaemus maximus</i> (UFMG 9623).....	61
Figura 25. Crânio de <i>Physalaemus maculiventris</i> (CFBH 26731), macho, vista ventral.	63
Figura 26. Detalhes do aparato auditivo de A: <i>Physalaemus obtectus</i> (MNMA 6060) e B: <i>Physalaemus atlanticus</i> (CFBH 4311) em vista dorsolateral.....	66
Figura 27. Crânio de <i>Physalaemus biligonigerus</i> (ZUEC 11469) em vistas A: dorsal e B: ventral.	69

Figura 28. Detalhes do crânio de A: <i>Physalaemus spiniger</i> (CFBH 6330) e <i>Physalaemus moreirae</i> (UFMG 20314), vista ventral.	71
Figura 29. Crânio de <i>Physalaemus riograndensis</i> (UFMG 20194) em vista ventral.	74
Figura 30. Mandíbula e aparato hiolaringeal de <i>Physalaemus biligonigerus</i> (ZUEC 11469), mostrando a laringe em vista dorsal e ventral, respectivamente.....	77
Figura 31. Mandíbula e aparato hiolaringeal de <i>Physalaemus signifer</i> (UFMG 4961). ...	78
Figura 32. Detalhes dos epicoracoides e esterno de <i>Physalaemus deimaticus</i> (UFMG 16771).	81
Figura 33. Cintura peitoral de <i>Physalaemus biligonigerus</i> (UFMG 18539) em vista ventral, com todas as partes flexionadas para o plano ventral.	82
Figura 34. Coluna axial de <i>Physalaemus biligonigerus</i> (ZUEC 11469) em vista dorsal..	84
Figura 35. Falanges terminais de A: <i>Pseudopaludicola falcipes</i> (UFMG 2781), B: <i>Crossodactylodes itambe</i> (UFMG 14036) e C: <i>Physalaemus biligonigerus</i> (ZUEC 11469).	85
Figura 36. Úmero de <i>Physalaemus atlanticus</i> (CFBH 4311) vista A: medial e B: dorsal.....	87
Figura 37: Consenso estrito das 39 árvores mais parcimoniosas (9821 passos), somente com dados moleculares. Os números correspondem valores de suporte de bootstrap. L1 linhagem 1, L2 linhagem 2, L3 linhagem 3. Os estados brasileiros estão representados pelas siglas oficiais, BR Brasil, AR Argentina UR Uruguai.	90
Figura 38: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas (10821 passos) da matriz de evidência total. Os números correspondem valores de suporte de bootstrap. Os estados brasileiros estão representados pelas siglas oficiais, BR Brasil, AR Argentina UR Uruguai.....	91

Figura 39. Mapeamento dos estados do caráter 116: dentes maxilares em Leiuperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.	98
Figura 40. Mapeamento dos estados do caráter 36: tubérculo tarsal, em Leiuperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.	99
Figura 41. Mapeamento dos estados do caráter 21: extensão máxima da calosidade nupcial de machos na falange em <i>Physalaemus</i> . As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica falta de dados para o clado.	100
Figura 42. Mapeamento dos estados do caráter 137: confluência dos foramens proótico e oculomotor em <i>Physalaemus</i> . As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica falta de dados para o clado.	101
Figura 43. Mapeamento dos estados do caráter 52: formato das macroglândulas inguinais em vista externa em <i>Physalaemus</i> . As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados não aplicáveis ou faltantes.	102
Figura 44. Mapeamento dos estados do caráter 130: diâmetro máximo do ânulo timpânico em relação ao comprimento da órbita em <i>Physalaemus</i> . As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados não aplicáveis.	103
Figura 45. Mapeamento dos estados do caráter 63: linha vertebral urostilar em Leiuperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.	104
Figura 46. Mapeamento dos estados do caráter 31: formato do tubérculo metatarsal interno em Leiuperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.....	107
Figura 47. Mapeamento dos estados do caráter 49: ocelos inguinais em <i>Physalaemus</i> . As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados faltantes.	110

Figura 48. Mapeamento dos estados do caráter 20: calosidade nupcial em machos, uma das sinapomorfias não-ambíguas que suportam o grupo de *Physalaemus olfersii* na topologia da árvore de consenso da AET. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade. As linhas hachuradas indicam falta de informação.111

Figura 49. Mapeamento dos estados do caráter 20: divisão medial do xifisterno incompleta, uma das sinapomorfias não-ambíguas que suportam o grupo de *Physalaemus olfersii* na topologia da árvore de consenso da AET. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade. As linhas hachuradas indicam falta de informação.111

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
Lista de Figuras	XI
CAPÍTULO 1 - Sistemática Filogenética de <i>Physalaemus</i> Fitzinger (Anura: Leptodactylidae) combinando dados moleculares e morfológicos	
INTRODUÇÃO	1
HISTÓRICO TAXONÔMICO DE LEPTODACTYLIDAE	3
<i>Physalaemus</i> Fitzinger.....	4
OBJETIVOS	5
MATERIAL E MÉTODOS	7
SELEÇÃO DE TÁXONS	7
Grupo interno.....	7
Grupo externo.....	8
AMOSTRAGEM DE CARACTERES MORFOLÓGICOS	9
AMOSTRAGEM DE CARACTERES MOLECULARES	10
ANÁLISES FILOGENÉTICAS	11
RESULTADOS	13
DESCRIÇÃO DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS	13
Morfologia externa	14
Miologia	41
Osteologia.....	57
ANÁLISES FILOGENÉTICAS	88
DISCUSSÃO	96
Clado de <i>Physalaemus signifer</i>	96

Grupo de <i>Physalaemus signifer</i>	100
Grupo de <i>Physalaemus deimaticus</i>	101
Clado de <i>Physalaemus cuvieri</i>	103
Grupo de <i>Physalaemus cuvieri</i>	105
Grupo de <i>Physalaemus biligonigerus</i>	107
Grupo de <i>Physalaemus gracilis</i>	108
Grupo de <i>Physalaemus olfersii</i>	109
Comentários sobre alguns caracteres diagnósticos não codificados	112
CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	116
APÊNDICE I: Lista de espécimes analisados	125
APÊNDICE II: Números de acesso do GenBank	135
CAPÍTULO 2 - Osteological description of <i>Physalaemus biligonigerus</i> species group	
ABSTRACT	139
INTRODUCTION	140
MATERIAL AND METHODS	141
RESULTS	143
DISCUSSION	153
ACKNOWLEDGMENTS	156
LITERATURE CITED	156
APPENDICES	160

CAPÍTULO 1

Sistemática Filogenética de *Physalaemus* Fitzinger (Anura: Leptodactylidae) combinando dados moleculares e morfológicos

INTRODUÇÃO

Leptodactylidae Werner é uma família de anfíbios anuros distribuída em toda região neotropical (Frost 2019). Atualmente, é composta por três subfamílias: Leptodactylinae, Leiuperinae e Paratelmatobiinae (sensu Pyron & Wiens 2011). Leiuperinae é um grupo neotropical, composto pelos gêneros *Edalorhina* Jimenez de la Espada, *Engystomops* Jimenez de la Espada, *Physalaemus* Fitzinger, *Pleurodema* Tschudi e *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro (sensu Pyron & Wiens 2011). A subfamília compreende 99 espécies de rãs de pequeno tamanho, com pelo menos quatro modos reprodutivos, sendo os ninhos de espuma utilizados por todas as espécies de *Edalorhina*, *Engystomops* e *Physalaemus* conhecidas até o momento (Grosso *et al.* 2019). *Physalaemus* é o gênero com maior número de espécies da subfamília, com 48 espécies distribuídas em toda a América do Sul (Frost 2019).

A taxonomia da família têm sofrido diversas mudanças nas últimas décadas à luz de recentes análises filogenéticas, sobretudo com dados moleculares (Frost *et al.* 2006, Grant *et al.* 2006, Pyron & Wiens 2011, Faivovich *et al.* 2012, Fouquet *et al.* 2013, de Sá *et al.* 2014, Lourenço *et al.* 2015), e um breve histórico taxonômico da família Leptodactylidae e do gênero *Physalaemus* são apresentados a seguir.

HISTÓRICO TAXONÔMICO DE LEPTODACTYLIDAE

Lynch (1971) foi o primeiro a apresentar uma revisão sistemática ampla da família Leptodactylidae, utilizando caracteres externos e internos de morfologia, além de

algumas características ecológicas e comportamentais de espécies de todos os gêneros até então alocados na família. Ele reconheceu quatro subfamílias neotropicais: Ceratophrynae, Elosiinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. A subfamília Leptodactylinae agrupou dez gêneros: *Barycholos* Heyer, *Edalorhina*, *Hydrolaetare* Gallardo, *Leptodactylus* Fitzinger, *Limnomedusa* Fitzinger, *Lithodytes* Fitzinger, *Paratelmatoobius* Lutz & Carvalho, *Physalaemus*, *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*.

Heyer (1975), em sua análise sobre as relações filogenéticas de Leptodactylidae, reforçou os agrupamentos internos em Leptodactylinae proposto por Lynch (1971), adicionando à subfamília, os gêneros *Adenomera* Steindachner e *Vanzolinius* Heyer. Ainda, o autor retirou *Barycholos* da subfamília e o realocou para Eleutherodactylinae, e considerou *Paratelmatoobius* como pertencente aos Grypscines, tribo que abrigava dez gêneros de riacho do sul do Brasil: *Craspedoglossa* Santae-Catharinae Müller, *Crossodactylodes* Cochran, *Crossodactylus* Duméril & Bibron, *Cycloramphus* Tschudi, *Hylodes* Fitzinger, *Megaelosia* Miranda-Ribeiro, *Paratelmatoobius*, *Scythrophrys* Lynch, *Thoropa* Cope e *Zachaenus* Cope. Nesse estudo, 5 espécies de *Physalaemus* foram analisadas e o gênero foi considerado monofilético, tendo como grupo irmão *Pleurodema* ou *Pseudopaludicola*.

Em tempos mais recentes, Frost *et al.* (2006) analisou as relações de Leptodactylidae combinando os caracteres anatômicos comparativos, principalmente larvais, levantados por Haas (2003) com sequências moleculares. Nesse estudo, encontraram a família Leptodactylidae parafilética e polifilética em relação a todos os táxons de Hyloidea, exceto Heleophrynidae Noble e Sooglossidae Noble. Então, restringiram a família Leptodactylidae a onze gêneros: *Edalorhina*, *Engystomops*,

Eupemphix Steindachner, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* (considerando *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius* como sinônimos de *Leptodactylus*), *Paratelmatoobius*, *Physalaemus*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola*, *Scythrophrys* e *Somuncuria* Lynch, tendo como grupo-irmão a família Centrolenidae. Posteriormente, Grant *et al.* (2006) particionaram a família Leptodactylidae, como proposta por Frost *et al.* (2006), em Leptodactylidae e Leiuperidae, ficando a primeira restrita a apenas quatro gêneros (*Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*), sendo os demais alocados na família Leiuperidae, recém-proposta.

Pyron & Wiens (2011), em uma análise molecular, encontraram Leptodactylidae parafilética em relação a Leiuperidae, já que *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* foram recuperados mais proximamente relacionados aos leiuperídeos que aos leptodactilídeos. Para resolver o problema taxonômico, os autores expandiram a família Leptodactylidae para incluir novamente todos os leiuperídeos, reconhecendo três subfamílias de Leptodactylidae: Leptodactylinae, agrupando os gêneros *Adenomera*, *Leptodactylus*, *Lithodytes* e *Hydrolaetare*; Leiuperinae, agrupando os gêneros *Eladorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Physalaemus*, *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*, e Paratelmatoobiinae, para agrupar *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*. Este agrupamento foi reforçado por Fouquet *et al.* (2013), que incluíram, ainda, os gêneros *Rupirana* Heyer e *Crossodactylodes* Cochran na subfamília Paratelmatoobiinae.

***Physalaemus* Fitzinger**

Lynch (1970), reuniu os gêneros *Engystomops* e *Eupemphix* em *Physalaemus*, reconhecendo quatro grupos de espécies baseados caracteres morfológicos externos e osteológicos: **grupo de *Physalaemus biligonigerus***, composto por *P. biligonigerus*

(Cope), *P. fuscomaculatus* (Steindachner) (atualmente sinônimo de *P. marmoratus*) (Reinhardt & Lütken), *P. nattereri* (Steindachner) e *P. santafecinus* Barrio, com um maior tamanho em relação às demais espécies desse gênero, pele lisa a levemente granulosa, primeiro dedo da mão não mais longo que o segundo, tubérculo tarsal interno não alongado, tubérculos metatarsais comprimidos e dilatados, glândulas inguinais distintas em formato de disco, glândulas parotoides ausentes e dentes pré-maxilares e maxilares presentes (exceto em *P. nattereri*); **grupo de *P. pustulosus***, composto por *P. freibergi* (Donoso-Barros), *P. petersi* Jiménez de la Espada, *P. pustulosus* (Cope), com tamanho moderado, pele tuberculada, primeiro dedo da mão mais longo que o segundo, tubérculo tarsal interno alongado exceto *P. freibergi*, e *P. pustulosus*), tubérculo metatarsal pequeno não comprimido, glândulas inguinais ausentes, glândulas parotoides proeminentes e glândulas no flanco presentes, dentes maxilares e pré-maxilares presentes (exceto em *P. pustulatus*); **grupo de *P. signifer*** composto por *P. maculiventris* (Lutz), *P. nanus* (Boulenger), *P. obtectus* Bokermann, *P. olfersii* (Lichtenstein & Martens) e *P. signifer* (Girard), com tamanho pequeno a moderado, pele lisa, primeiro dedo da mão mais longo que o segundo, sem tubérculo metatarsal interno, glândulas inguinais pequenas a grandes, glândulas parotoides ausentes, dentes maxilares e pré-maxilares ausentes; **grupo de *P. cuvieri***, composto por *P. aguirrei* Bokermann, *P. albifrons* (Spix), *P. albonotatus* (Steindachner), *P. barrioi* Bokermann, *P. centralis* Bokermann, *P. cicada* Bokermann, *P. cuvieri* Fitzinger, *P. ephippifer* (Steindachner), *P. evangelistai*, *P. fernandezae*, *P. esenefae* (sinônimo de *P. fischeri* (Boulenger)), *P. gracilis* (Boulenger), *P. henselii* (Peters), *P. kroyeri* (Reinhardt & Lütke), *P. jordanensis* Bokermann, *P. riograndensis* Milstead, *P. soaresi* Izecksohn e *P. ternetzi* Miranda-Ribeiro, caracterizado por tamanho pequeno a moderado, corpo liso a verrugoso, primeiro dedo da mão menor que o segundo,

tubérculo metatarsal interno presente, tubérculo metatarsal pequeno não-comprimido (exceto em *P. albifrons*), glândulas inguinais presentes ou ausentes (exceto *P. aguirrei*, que possui glândulas inguinais desenvolvidas), glândulas parotóides ausentes, e presença de dentes maxilares e pré-maxilares. Apesar da divisão proposta, Lynch (1970) ressaltou que o arranjo de algumas espécies nesses grupos tornava-os heterogêneos em certo nível. Cannatella & Duellman (1984) revisaram o grupo de *Physalaemus pustulosus*, incluindo quatro espécies e definiram-no por quatro caracteres: presença de glândulas parotóides, glândulas elípticas no flanco, pele verrugosa e processo dentífero no vômer. Tárano & Ryan (2002) comentam que análises preliminares de *Physalaemus* sugeriram que o gênero *Physalaemus* consistiria em dois grupos monofiléticos, o grupo de *P. pustulosus* e um clado com todas as demais espécies do gênero. Considerando a necessidade revisão dos grupos de espécies de *Physalaemus*, além da inclusão de diversas espécies descritas e redescritas, Nascimento *et al.* 2005 realizaram uma revisão taxonômica fenética do gênero, utilizando caracteres de morfometria, morfologia externa, e osteologia. A partir de suas análises, propuseram a revalidação dos gêneros *Engystomops*, para agrupar as espécies do grupo de *Physalaemus pustulosus*, e *Eupemphix* para acomodar a espécie *E. nattereri*, além de redefinirem a divisão do gênero em sete grupos: **grupo de *P. cuvieri*** (com nove espécies: *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae* Cruz & Pimenta, *P. fischeri*, e *P. kroyeri*); **grupo de *P. signifer*** (com dez espécies: *P. atlanticus* Haddad & Sazima, *P. bokermanni* Cardoso & Haddad, *P. caete* Pombal & Madureira, *P. crombiei* Heyer & Wolf, *P. maculiventris*, *P. moreirae* (Miranda-Ribeiro), *P. nanus*, *P. obtectus*, *P. signifer*, e *P. spiniger* (Miranda-Ribeiro)); **grupo de *P. albifrons*** (com quatro espécies: *P. albifrons*, *P. biligonigerus*, *P. fuscomaculatus* (= *P. marmoratus*), e *P. santafecinus*); **grupo de *P. deimaticus*** (com três

espécies: *P. erythros* Caramaschi, Feio & Guimarães-Neto, *P. deimaticus* Sazima & Caramaschi, 1988, e *P. rupestris* Caramaschi, Carcerelli & Feio, 1991); **grupo de *P. gracilis*** (com cinco espécies: *P. barrioi*, *P. evangelistai*, *P. gracilis*, *P. jordanensis*, e *P. lisei* (Braun & Braun); **grupo de *P. henselii*** (com três espécies: *P. fernandezae*, *P. henselii*, e *P. riograndensis* e **grupo de *P. olfersii*** (com quatro espécies: *P. aguirrei*, *P. maximus* Feio, Pombal & Caramaschi, *P. olfersii*, e *P. soaresi*). Faivovich *et al.* 2012, em uma análise desenhada para testar as relações internas em *Pleurodema*, consideraram *Eupemphix* sinônimo júnior de *Physalaemus*.

Recentemente, Lourenço *et al.* (2015) fizeram, pela primeira vez, uma extensa análise das relações filogenéticas dentro do gênero *Physalaemus*, utilizando caracteres moleculares. Nesse trabalho, reconheceram dois grandes clados: o clado de *Physalaemus signifer*, e o clado de *P. cuvieri*. O clado de *Physalaemus signifer*, contendo as espécies: *P. atlanticus*, *P. bokermanni*, *P. cacaman*, *P. crombiei*, *P. deimaticus*, *P. erythros*, *P. maculiventris*, *P. moreirae*, *P. nanus*, *P. obtectus*, *P. rupestris*, *P. signifer*, *P. spiniger*, e ainda, *P. nattereri*. O clado de *Physalaemus cuvieri* foi recuperado com baixo suporte, incluindo todas as demais espécies, divididas em cinco grupos: o grupo de *P. biligonigerus*, grupo de *P. cuvieri*, grupo de *P. henselii*, grupo de *P. gracilis* e grupo de *P. olfersii*. O grupo de *Physalaemus gracilis* foi idêntico ao proposto por Nascimento *et al.*, 2005. O grupo *Physalaemus henselii* composto por *P. fernandezae* e *P. henselii*, recuperado como grupo irmão das demais espécies do clado. O grupo de *Physalaemus olfersii*, composto por *P. olfersii*, *P. soaresi*, *P. maximus*, *P. feioi* e *P. lateristriga*. O grupo *P. biligonigerus*, composto por *P. biligonigerus*, *P. marmoratus*, *P. santafecinus* e *P. riograndensis*. O grupo de *P. cuvieri* diferiu do proposto por Nascimento *et al.*, 2005 apenas pela inclusão de *P. albifrons* e exclusão de *P. cicada*. *Physalaemus cuvieri* foi

inferido como parafilético em relação a *P. ephippifer* e foram encontradas diferentes linhagens dentre indivíduos atualmente tratados como *P. cuvieri*, indicando se tratar de um complexo de espécies.

As relações intragenéricas nunca foram analisadas do ponto de vista filogenético utilizando caracteres morfológicos. Dessa forma, mostra-se necessário um estudo que inclua caracteres moleculares e morfológicos para elucidar as relações intragenéricas em *Physalaemus*, propondo sinapomorfias morfológicas que suportem os clados.

OBJETIVOS

O trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo principal analisar comparativamente a morfologia das espécies de *Physalaemus*, com isso, acrescentar a inferências de relacionamento caracteres potencialmente informativos provenientes de complexos anatômicos relativamente pouco explorados para o grupo, além de avaliar os efeitos de uma matriz de caracteres fenotípicos em uma análise com caracteres predominantemente moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

SELEÇÃO DE TÁXONS

Grupo interno

Trinta e nove, das 48 associadas ao gênero *Physalaemus* (Frost 2019), além de uma espécie em descrição (Leal *et al.* 2019, no prelo) foram utilizadas para reconstruir a história filogenética do gênero com base em caracteres de morfológicos e moleculares. Exemplares das espécies não disponíveis na Coleção Herpetológica da UFMG foram

solicitados a diversas coleções (Apêndice I). Códigos das coleções são: CFBH= Coleção de Anfíbios Célio Baptista Haddad, MACN = Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", MZUSP = Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, UFMG = Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais, ZUEC = Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas. Optei por incluir na análise apenas espécies que possuíam sequências moleculares, e, portanto, nem todas as espécies que foram codificadas na matriz morfológica foram incluídas da análise de evidência total, devido à indisponibilidade de recursos para sequenciamento molecular. Para amostragem de duas espécies raras em coleções, *P. moreirae* e *P. maculiventris*, foi realizada uma expedição de campo em dezembro de 2017, no Parque das Neblinas, Mogi das Cruzes e Bertioga, São Paulo, na qual obtivemos êxito apenas na coleta da primeira espécie citada.

Grupo externo

O grupo externo foi escolhido para testar a monofiletismo de *Physalaemus* e a relação entre as espécies do gênero. Para isso, incluí exemplares de espécies dos demais gêneros de Leptodactylidae baseada nas hipóteses filogenéticas de Pyron & Wiens 2011, Fouquet *et al.* 2013 e Lourenço *et al.* 2015, restringida por dois critérios (1) disponibilidade de dados no GenBank e (2) disponibilidade de espécimes para estudos morfológicos. Assim, foram incluídas espécies dos gêneros: *Edalorhina*, *Engystomops*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola* (Leiuperinae), *Adenomera*, *Leptodactylus* (Leptodactylinae), *Paratelmatobius*, *Crossodactylodes*, *Scythrophrys* e *Rupirana* (Paratelmatobiinae). A árvore foi enraizada em *Zachaenus parvulus*, e outra espécie da família Cycloramphidae, *Cycloramphus boraceiensis* foi incluída na análise. O

monofiletismo do clado composto pelas duas espécies de Cycloramphidae foi forçado na árvore. Os Apêndices I e II apresentam a lista completa do material analisado neste estudo.

AMOSTRAGEM DE CARACTERES MORFOLÓGICOS

Um total de 200 caracteres foram codificados, representando quatro sistemas independentes: morfologia externa, vísceras, musculatura e osteologia. Do total, 169 foram codificados primariamente por mim, e o restante foram retirados ou modificados da literatura, conforme tabela abaixo:

Tabela 1: Sistemas de caracteres utilizados neste estudo. Para cada sistema, está especificada a quantidade de caracteres codificada para cada fonte (entre parênteses, o número dos caracteres correspondentes na matriz de caracteres apresentada a seguir) e as principais referências em que me baseei para codificação dos caracteres de cada sistema.

Sistema	Fonte		Referências
	Este trabalho	Literatura	
Morfologia externa	53 caract.	11 caract. (5-12, 17, 20, 22)	Liu 1935, Lynch 1971, Trueb & Duellman 1986, Grant <i>et al.</i> 2006, de Sá <i>et al.</i> 2014, Rodrigues 2016
Miologia	14 caract.	11 caract (72-79, 81, 83, 87)	Tyler 1971, Heyer 1975, Burton 1998, 2004, Verdade 2005
Vísceras	9 caract.	2 caract. (98, 99)	Duellman & Trueb 1986, Grant <i>et al.</i> 2006, Franco-Belussi <i>et al.</i> 2009, Franco-Belussi <i>et al.</i> 2012, Franco-Belussi <i>et al.</i> 2013
Osteologia	93 caract.	7 caract. (111, 113, 115, 126, 148, 163, 172)	Trewavas 1933, Lynch 1971, Trueb 1973, 1993, Fabrezi 1992, 1993, Silva 1998, Burton 1998, Grant <i>et al.</i> 2006, Ponssa 2008, 2010, de Sá <i>et al.</i> 2014

Para codificação dos caracteres, foi seguida a proposta de Sereno (2007), considerando os caracteres como propriedades das espécies, observadas em organismos, expressadas como variáveis independentes, com estados mutuamente exclusivos. O estado “ausente” de um caráter está sendo considerado apenas para caracteres neomórficos.

Terminologias das estruturas dos adultos seguiram: Duellman (1970, 2001), para morfologia externa; Tyler (1971) e Burton (1998, 2004), para miologia; Lynch (1971) Trueb (1973), Fabrezi (1992, 1993, 2001) e Fabrezi & Alberch (1996), para osteologia. Para dissecação e análise dos caracteres musculares e osteológicos, os exemplares foram diafanizados com uso de tripsina de acordo com a metodologia descrita por Dingerkus & Uhler (1977), com modificações mínimas, sendo o processo interrompido antes da digestão pela tripsina para observação da musculatura (Barrasso *et al.* 2012). A matriz foi editada no software Mesquite v.3.15 (Maddison & Maddison 2018).

AMOSTRAGEM DE CARACTERES MOLECULARES

Para estudos moleculares, utilizei sequências provenientes dos genes mitocondriais 12S e 16S ribossomais, e a região tRNA-val, além do gene RAG-1 nuclear, foram tirados do GenBank ou gentilmente cedidos pela Dra. Luciana Bolsoni Lourenço. Ao todo, 63 sequências mitocondriais (12S e 16S) de *Physalaemus* foram utilizadas, além de 7 sequências de outros representantes de Leiuperinae, 6 sequências de representantes de Paratelmatobiinae, além sequências de 2 espécies da família Cycloramphidae. A maior parte das sequências foi utilizada por Lourenço *et al.* (2015), em sua extensa análise do gênero. Para a maioria das espécies, uma sequência mitocondrial (12S e 16S) foi utilizada. Para *Physalaemus cuvieri*, sequências de todas as linhagens encontradas por Lourenço *et*

al. (2015) foram incluídas. Para a inclusão de sequências de RAG-1, adotei uma postura conservadora, utilizei, quando disponíveis, sequências apenas dos mesmos indivíduos para os quais obtive sequências de H1, a fim de evitar inferências de monofiletismo das espécies. Todas as sequências utilizadas neste estudo estão listadas no Apêndice II. Para evitar *soft polytomies* resultantes da falta de informações filogenéticas (Maddison 1989), não foram incluídas na análise de evidência total espécies para as quais não havia dados moleculares.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os dados morfológicos foram codificados para cada indivíduo e dados de todos os indivíduos de uma espécie foram concatenados para ter a espécie como terminal. Para caracteres polimórficos, foram codificados todos os estados de cada caráter encontrados para a espécie.

As sequências moleculares foram alinhadas utilizando o Muscle (Edgar 2004) plugin no software AliView (Larsson 2014) nos parâmetros *default* do programa, sendo o alinhamento melhorado duas vezes com o comando *refine*. As sequências mitocondriais e nucleares foram concatenadas no SequenceMatrix (Vaidya *et al.* 2011).

Para análise de evidência total, sequências de cada espécime foram tratadas como terminal. Os dados morfológicos de cada espécie foram duplicados para cada terminal molecular da mesma espécie, seguindo a proposição de Grant *et al.* (2006) para evitar otimizações ambíguas provenientes de entradas faltantes (*missing entries*). Nenhum terminal quimérico foi utilizado.

O método filogenético escolhido foi a parcimônia, um método não-probabilístico, não-paramétrico de inferência, que maximiza o poder explanatório minimizando a quantidade de passos (eventos evolutivos) e de suposições sobre o processo de evolução do caráter necessários para explicar a evidência (Kluge & Grant 2006, Grant & Kluge 2009). A escolha deste método filogenético se deu devido à utilização de caracteres morfológicos na análise e por sua menor demanda em esforço computacional. Ao escolher um só método, considere que a comparação entre diferentes métodos é imprecisa e questionável, e a realização de diversas análises pode levar ao viés da escolha da melhor árvore. A análise de evidência total dos dados moleculares e morfológicos concatenados foi realizada no software TNT v.1.1 (Goloboff *et al.* 2003). Os *gaps* foram tratados como um quinto estado de caráter, a fim de serem considerados como inserções e deleções de nucleotídeos. As árvores mais parcimoniosas foram inferidas através de buscas heurísticas realizadas utilizando as buscas tradicionais combinadas com as novas tecnologias (*Ratchet* (Nixon 1999), *Tree Drifting* (Goloboff 1999), *Sectorial Searches* (Goloboff 1999) e *Tree Fusing* (Goloboff 1999)). Para estas análises, utilizei o *default* do programa para estes algoritmos, com 1000 replicações, retendo 100 árvores por replicação. As buscas foram feitas com o critério de colapso de nós de comprimento mínimo zero (“minimum length”). Os valores de *bootstrap* foram calculados para os ramos da árvore de consenso estrito inferida na análise com 1000 pseudoréplicas, utilizando a busca tradicional (*traditional search*) no TNT, sem critério de colapso de nós (“none”). Uma análise com apenas os dados moleculares foi realizada sob os mesmos parâmetros da análise de evidência total, para testar os efeitos da falta de uma fonte de dados. Nenhuma alteração foi feita na base de dados moleculares em relação à análise de evidência total, para permitir uma comparação confiável. A análise dos caracteres foi feita

baseada nos resultados da análise de evidência total como a hipótese filogenética que melhor explica a evidência, pois a análise de todos os dados disponíveis maximiza o poder explanatório (Grant & Kluge 2003).

Para a otimização dos caracteres, foi utilizado o programa Winclada ver. 1.00.08 (Nixon 2002). Foram considerados como sinapomorfias, caracteres não-ambíguos com relação ao tipo de otimização (ACCTRAN/DELTRAN) na árvore de consenso da AET. O Winclada indica com círculos pretos, caracteres sinapomórficos que ocorrem exclusivamente no clado em questão, e com círculos vazados, os que ocorrem também em outros clados.

RESULTADOS

DESCRIÇÃO DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS

A evidência morfológica observada neste estudo incluiu 200 caracteres de adultos maduros (machos e fêmeas), divididos em quatro sistemas:

- Morfologia externa: caracteres 1-64
- Miologia: caracteres 65-88
- Vísceras: caracteres 89-100
- Osteologia: caracteres 101-200

Abaixo, listo os 200 caracteres incluídos na análise de evidência total da filogenia de *Physalaemus*. Visando a padronização, toda a informação apresentada foi levantada por observação direta, devido às variações encontradas em comparação às descrições, diagnoses e trabalhos morfológicos consultados. Quando relevante, incluí uma discussão sobre a determinação dos estados e a variação encontrada nas espécies analisadas. A

discussão completa da variação dos estados de caráter nas espécies analisadas foi realizada junto à apresentação da árvore filogenética. As figuras apresentadas são ilustrativas e não correspondem a proporções reais.

1-64: Morfologia externa

As características morfológicas externas, apesar de apresentarem grande variação e grandes taxas de convergência evolutiva, são úteis na determinação das espécies. Para a análise filogenética, inclui caracteres comumente utilizados nas descrições, diagnoses e análises filogenéticas das espécies de Leptodactylidae, apesar de várias destas características terem se mostrado polimórficas após análise de vários exemplares da mesma espécie.

1-3: Saco Vocal

Em Anura, os sacos vocais estão presentes na maioria das espécies e são produtos da interação de três elementos: pele gular, musculatura superficial submandibular e mucosa interna (Tyler 1971, Targino *et al.* 2019). A variação miológica é abordada na sessão de miologia.

1. Saco vocal em machos

0 ausente

1 presente

2. Saco vocal em machos: visibilidade

0 visível externamente (Figura 1)

1 não visível externamente

Considerações: O saco vocal externo consiste numa modificação tegumentar que pode variar de forma e posição em Anura. A pele no saco vocal externo é fina e elástica, podendo esticar-se em dimensão semelhante ao tamanho do indivíduo. Liu (1935) classifica os sacos vocais dos anuros em subgular único, subgular par e lateral par. Nos Leptodactylidae, o saco vocal, quando presente, é sempre subgular único, variando seu grau de distinção (Figura 1). O estado 1 foi considerado apenas para os indivíduos machos nos quais a pele na região gular era completamente esticada e sem dobras, semelhantemente à de fêmeas da mesma espécie.

3. Saco vocal externo em machos: grau de distinção

0 distinto (Figura 1A)

1 discreto, pouco distinto (Figura 1B)

Considerações: O saco vocal externo pode ser muito visível externamente, mesmo desinflado (Figura 1A), ou quase indistinto, são evidenciadas apenas discretas dobras nas porções posterolaterais da gula (Figura 1B).

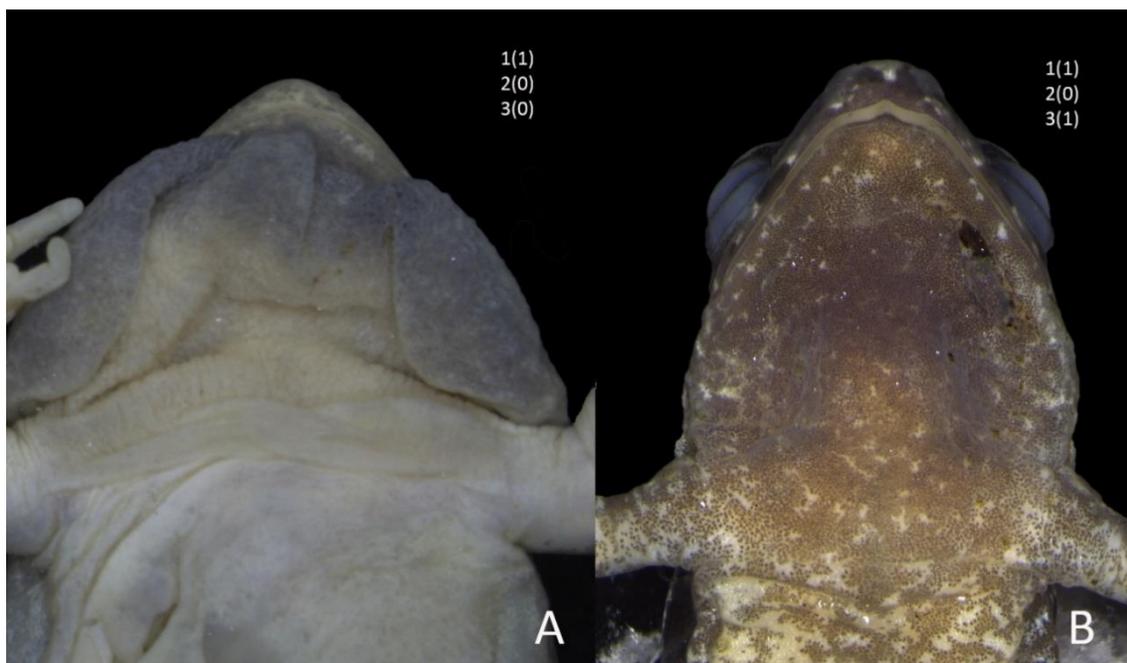


Figura 1. Saco vocal em machos de A: *Physalaemus centralis* (UFMG 3737) B: *Physalaemus bokermanni* (UFMG 7169).

5-12: Projeções tegumentares nas margens de dedos e artelhos

A contagem dos dedos das mãos é apresentada de II a V, seguindo Fabrezi & Alberch (1996). Os caracteres a seguir seguem a proposta de Grant *et al.* (2006), que considera as projeções tegumentares em cada margem de cada dígito como independentes. No presente estudo, não encontrei variação entre a margem pré-axial e pós-axial dos dígitos, mas observei variação na presença de fímbrias entre os diferentes dígitos. Em algumas espécies, os dedos II e III não apresentaram fímbria, enquanto os dedos IV e V apresentaram fímbria reduzida. A variação das projeções tegumentares nos artelhos é similar à dos dedos, e o artelho I varia conforme os artelhos II e III. Dessa forma, visando incluir toda a variação encontrada com o menor número de caracteres, propus abordar apenas a variação de dois dedos (III e IV) e dois artelhos (III e IV).

Codifiquei além da presença e ausência de projeções tegumentares nos artelhos, o grau de desenvolvimento. Defini como membrana a projeção tegumentar cuja largura em sua base é consideravelmente maior que a largura na margem da falange distal do dígito. Por não ter evidências contrárias, considerei as fímbrias como homólogas às membranas, e, portanto, foram incluídas como estados do mesmo caráter.

Os caracteres de fímbrias são de difícil utilização para *Physalaemus*, pois quando presentes nas mãos, são muito reduzidas, e podem sofrer influência da fixação dos exemplares. Membranas interdigitais desenvolvidas nos dedos das mãos não estão presentes em nenhuma das espécies analisadas, e essa variação foi incluída apenas nos caracteres de artelhos.

5. Mão, dedo III, margem pré-axial, fímbria

0 ausente ou indistinta (Figura 12)

1 presente (Figura 7)

6. Mão, dedo III, margem pré-axial, fímbria: grau de desenvolvimento

0 reduzida (Figura 7)

1 desenvolvida

7. Mão, dedo IV, margem pré-axial, fímbria

0 ausente ou indistinta (Figura 12)

1 presente (Figura 7)

8. Mão, dedo IV, margem pré-axial, fímbria: grau de desenvolvimento

0 reduzida (Figura 12)

1 desenvolvida

9. Pé, artelho III, margem pré-axial, projeção tegumentar

0 ausente ou indistinta

1 presente (Figura 9)

10. Pé, artelho III, margem pré-axial, projeção tegumentar: grau de desenvolvimento

0 fímbria pouco desenvolvida (Figura 10)

1 fímbria moderadamente desenvolvida (Figura 9)

2 membrana desenvolvida, dobrando-se sobre o dedo

11. Pé, artelho IV, margem pré-axial, projeção tegumentar

0 ausente ou indistinta

1 presente (Figura 9)

12. Pé, artelho IV, margem pré-axial: grau de desenvolvimento

0 fímbrias pouco desenvolvidas (Figura 10)

1 fímbrias moderadamente desenvolvidas (Figura 9)

2 membrana desenvolvida, dobrando-se sobre o dedo

13. Pé, extremidade do artelho III: dilatação

0 ausente

1 presente

Considerações: Considerei como dilatação quando a largura na extremidade distal do artelho era maior que a largura no seu comprimento.

14-23: Calosidade nupcial

As calosidades nupciais são formadas por espessamentos de epiderme e derme associadas, com ou sem a presença de glândulas nupciais, sendo relacionadas à otimização do amplexo, aos embates entre machos e à produção de feromônios (Rodrigues 2016). As calosidades nupciais estão presentes na superfície do dedo II de

machos adultos da maior parte das espécies de leptodactilídeos, mas apresentam diversas variações no grupo. A tentativa de estabelecimento de homologias é difícil para esta estrutura, pois, apesar de se localizarem em regiões semelhantes, as calosidades nupciais podem apresentar formas muito diferentes. Heyer (1975) propôs três estados de caráter para abordar a variação na família: ausência da calosidade sobre o dedo II; calosidade marrom ou negra em forma de asperezas; presença de calosidade em forma de um ou dois espinhos cornificados. Aqui, são propostos 10 caracteres concordantes com a proposta de Heyer (1975), na tentativa de incluir toda a variação encontrada nas espécies estudadas.

14. Calosidade nupcial sobre o dedo II em machos (CN)

0 ausente

1 presente

15. CN: forma

0 lisa

1 grandes espinhos (Figura 2A)

2 pequenos espinhos (Figura 2B)

3 asperezas (Figura 2C)

Considerações: As calosidades nupciais na superfície do dedo II variam amplamente em Anura. Considerei o estado liso para as calosidades que consistem em apenas uma elevação dérmica na região, sem formação de projeções ou ornamentos.

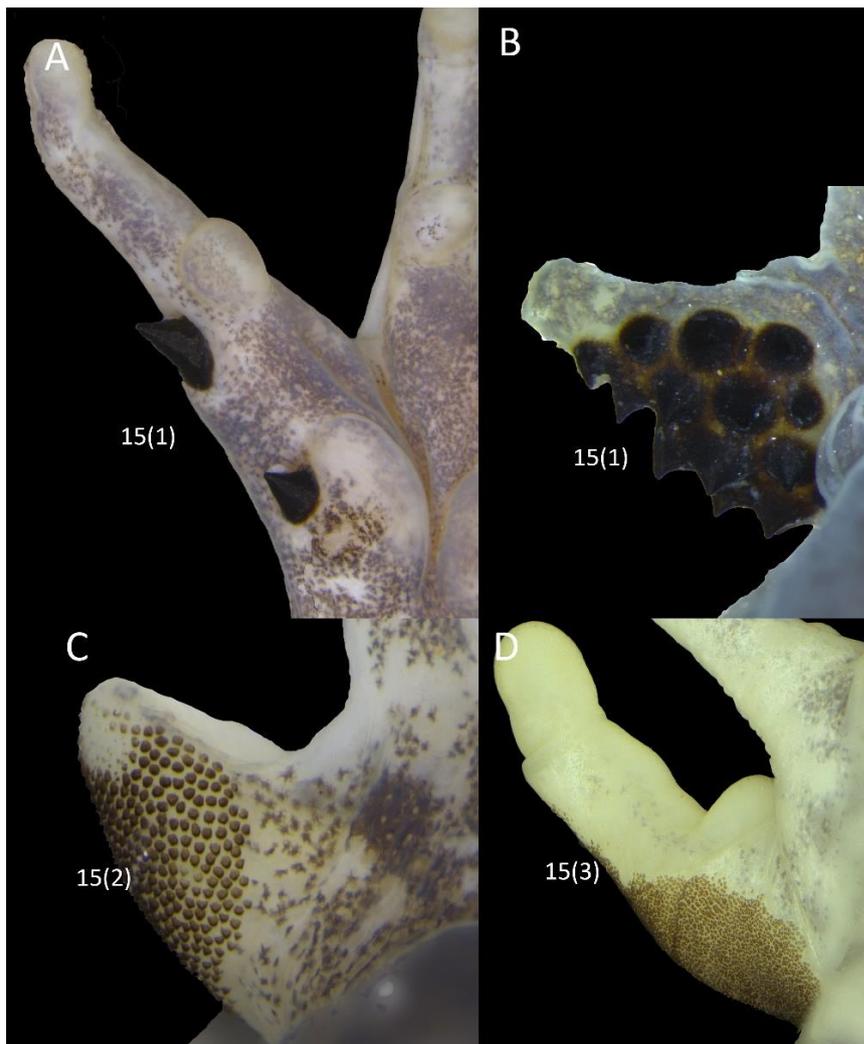


Figura 2. Calosidades nupciais em Leptodactylidae A: *Leptodactylus petersii* (UFMG 12685) vista ventrolateral, B: *Crossodactylodes itambe* (UFMG 14032) C: *Paratelmatoobius cardosoi* (CFBH 31094) D: *Physalaemus nattereri* (UFMG 2342), vistas dorsais. Fotos por Igor Rodrigues.

16. CN: posição em relação ao eixo dorsoventral

0 lateral (Figura 2A)

1 dorsolateral (Figura 2C, D, E)

Considerações: As calosidades nupciais estão posicionadas dorsolateralmente em relação ao eixo dorsoventral do corpo em *Physalaemus*. Com relação aos demais Leptodactylidae analisados, as espécies de *Pseudopaludicola*, *Paratelmatoobius* e

Rupirana cardosoi também compartilham esse posicionamento, mesmo que tenham calosidades nupciais de diferentes formas (asperezas, pequenos espinhos e grandes espinhos, respectivamente), o que indica que este posicionamento independe da forma.

17. CN: divisão

0 ausente (Figura 2 B, C)

1 presente (Figura 3A, B, C)

Considerações: As asperezas e pequenos espinhos podem aparecer em agrupamentos ininterruptos (Figuras 2B, C e 7) ou podem ser interrompidos do fim do calo metacarpal interno à porção distal do metacarpo (Figura 2D e 3A, B, C). Os grandes espinhos podem apresentar-se fusionados entre si, sem epiderme individualmente circundado cada espinho, ou em uma estrutura única, indivisa (Figura 2B). Caráter 1 de Rodrigues (2016).

18. CN cobrindo a região carpal (proximal) do dedo

0 ausente

1 presente (Figura 3 A, B, C)

Considerações: A extensão das calosidades nupciais é variável nos grupos analisados (Figura 3). As calosidades nupciais em forma asperezas, como encontradas em todos os *Physalaemus* cobrem a região carpal em todas as espécies analisadas. Na forma de espinhos, a calosidade nupcial pode cobrir ou não a região carpal.

19. CN cobrindo alguma região do calo metacarpal interno

0 ausente

1 presente (Figura 2A, 3A, B, C)

Considerações: Devido à difícil delimitação do calo metacarpal interno, optei por considerar que o estado 1 se aplica a todas as espécies nas quais as calosidades nupciais cobrem ao menos a porção proximal ou lateral do calo. Em alguns espécimes, a CN cobre o calo metacarpal quase em sua totalidade, mas observei variação intraespecífica na dimensão da cobertura, e, portanto, optei por não codificar essa variação.

20. CN na falange

0 ausente (Figura 3A)

1 presente (Figura 3B, C)

Considerações: Diversas espécies analisadas têm sua calosidade nupcial cobrindo alguma porção da falange, embora a extensão máxima da cobertura varie. 3 estados discretos foram codificados e parecem refletir bem essa variação em *Physalaemus*. Caráter 2 de Rodrigues (2016).

21. CN: extensão máxima na falange

0 porção da falange proximal (Figura 3B)

1 toda a falange proximal (Figura 3C)

2 falange distal

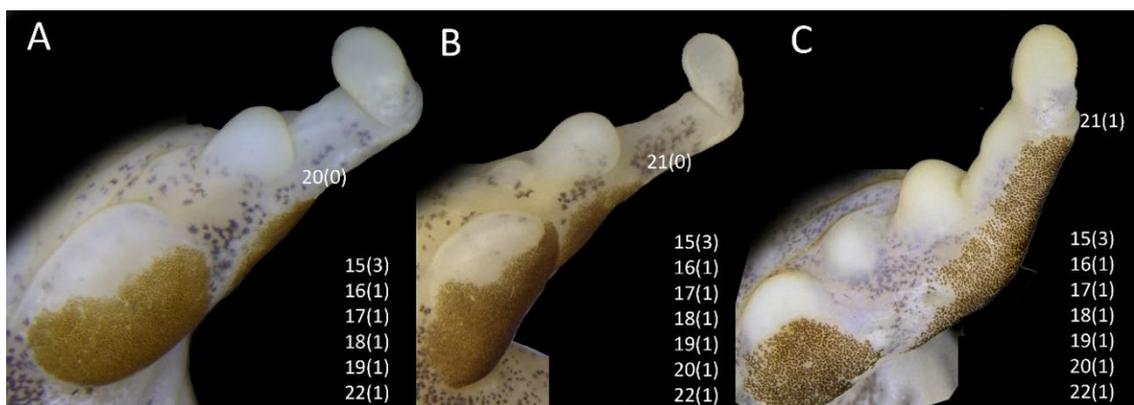


Figura 3. Vista ventral das asperezas nupciais em machos de A: *Physalaemus cicada* (UFMG 7830) B: *Physalaemus camacan* (CFBH 2121) e C: *P. nattereri* (UFMG 2342).

22. CN: presença de queratinização

0 ausente

1 presente (Figura 3)

Considerações: A presença de alto índice de queratinização nos calos nupciais é geralmente associado à firmeza do amplexo em ambientes aquáticos e à luta entre machos na disputa por fêmeas (Rodrigues 2016). Todas as espécies estudadas apresentaram queratinização nas calosidades nupciais. Em algumas espécies, a queratinização não é escura, mas preferi não codificar esta variação, pois observei que em exemplares antigos ou mal fixados a queratina pode clarear. Similar ao caráter 4 de Rodrigues (2016).

23. Calosidade nupcial em fêmeas

0 ausente

1 presente

Considerações: Apesar de ser presente em espécies de alguns gêneros de Anura, nenhuma fêmea das espécies analisadas apresentou calosidade nupcial.

24. Membrana timpânica externa

0 ausente

1 presente (Figura 4)

Considerações: A visibilidade externa do tímpano varia de acordo com a cobertura tegumentar sobre a estrutura. Nos *Leptodactylus*, o tímpano é visível externamente devido a uma modificação externa da pele na região timpânica, que forma uma fina membrana transparente que considerei como membrana timpânica externa (Figura 4). Essa estrutura não corresponde à membrana timpânica caracterizada por Pereyra *et al.* (2016) como “um

disco de pele altamente diferenciada, fina e não-glandular, cujas margens são conectadas ao ânulo timpânico”, se referindo a uma estrutura subtegumentar.



Figura 4. Membrana timpânica externa em *Leptodactylus mystacinus* (UFMG 3275).

25-45: Textura da pele

Considero textura da pele modificações dérmicas externas como pregas, tubérculos e grânulos.

25. Tubérculos na pálpebra

0 ausente

1 presente (Figura 5)

Considerações: Algumas espécies de *Physalaemus* possuem tubérculos na região palpebral, que se destacam da textura dorsal, predominantemente lisa. Em *Engystomops*, os tubérculos estão presentes em toda a região dorsal, se estendendo pela região palpebral, sendo, portanto, indistintos da textura dorsal. Para ambos os casos, o estado presente foi considerado.

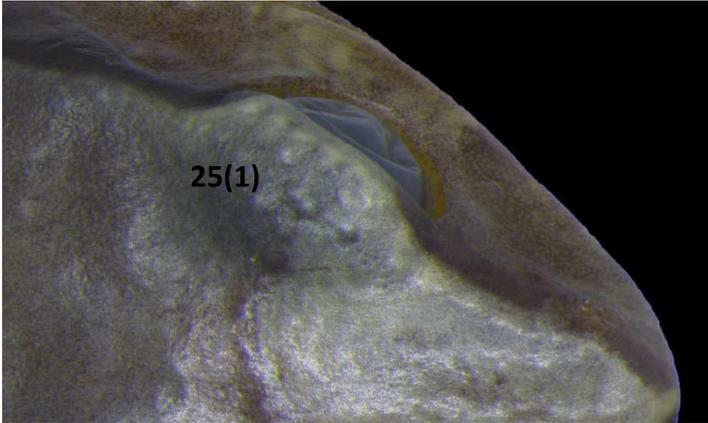


Figura 5. Tubérculos na pálpebra de *Physalaemus moreirae* (UFMG 2715), macho.

26-27: Prega supratimpânica

A maior parte das espécies estudadas possui uma prega acima do local que corresponde ao tímpano, o qual, na maioria das espécies, não é visível externamente. O grau de desenvolvimento da prega supratimpânica varia de forma contínua nas espécies estudadas, e três estados foram propostos de forma a incluir essa variação (Figura 6).

26. Prega supratimpânica

0 ausente (Figura 6A)

1 presente (Figura 6B, C)

27. Prega supratimpânica: grau de desenvolvimento

0 fracamente desenvolvida

1 moderadamente evidente, sem fim bem definido (Figura 6B)

2 muito evidente, alcançando a região axilar (Figura 6C)

Considerações: A prega supratimpânica varia de forma contínua nas espécies estudadas. Estes três estados foram propostos de forma a incluir essa variação (Figura 6).



Figura 6. Vista lateral de A: *Paratelmatobius cardosoi* (MZUSP 21317) B: *Physalaemus santafecinus* (MACN 45265) e *Engystomops petersi* (MZUSP 62048).

28. Tubérculo antebraquial

0 ausente

1 presente (Figura 7)

Considerações: Essa característica foi observada por Miranda Ribeiro (1926) em sua breve descrição do gênero *Pseudopaludicola*, e utilizada por Lobo (1995) em sua análise filogenética morfológica que incluiu, além de nove espécies de *Pseudopaludicola*, onze espécies de *Physalaemus*.

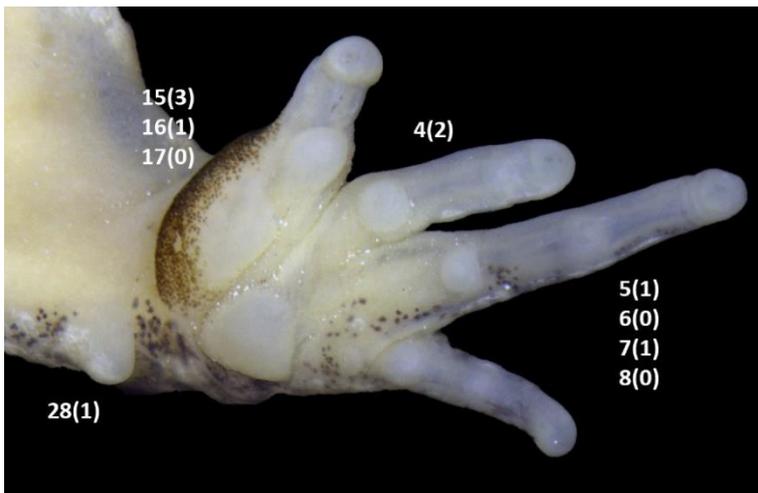


Figura 7. Vista ventral da mão de *Pseudopaludicola mystacalis* (UFMG 2797), macho.

29. Pregas transversais sobre as tíbias

0 ausente

1 presente (Figura 8)

Considerações: Algumas espécies de Leptodactylidae possuem dobras dérmicas transversais destacadas na região dorsal tibial (Figura 8).



Figura 8. Coxa e tíbia de *Paratelmatobius cardosoi* (UFMG 21317), macho.

30. Tubérculo metatarsal interno: queratinização

0 ausente

1 presente (Figura 9)

31. Tubérculo metatarsal interno: formato

0 elíptico (altura maior que largura) (Figura 10)

1 semicírculo (largura e altura aprox. iguais) (Figura 9)

Considerações: Duas formas básicas de tubérculos metatarsais internos foram encontradas nas espécies analisadas: elíptica, na qual a altura máxima é

consideravelmente maior que a largura máxima, e semicircular, na qual a altura e largura máximas são aproximadamente iguais.

32. Prega metatarsal externa

0 ausente

1 presente

Considerações: A prega metatarsal, quando presente, se origina na margem pós-axial do artelho V e segue na margem externa do metatarso até a altura do calo metatarsal externo (Grant *et al.* 2006).

33-37: Prega tarsal

A prega tarsal é uma estrutura dérmica que se estende obliquamente ao longo da superfície plantar do tarso (Grant *et al.* 2006). Em *Physalaemus*, é variável a presença de prega tarsal distinta, e seu grau de desenvolvimento e extensão também são variáveis (Figura 9).

33. Prega tarsal

0 ausente ou indistinta

1 presente (Figura 9, 10)

34. Prega tarsal: grau de desenvolvimento

0 rudimentar (Figura 9)

1 moderadamente desenvolvida (Figura 10)

2 muito desenvolvida

35. Prega tarsal: extensão

0 atingindo até metade do comprimento do tarso (Figura 10)

1 atingindo mais que a metade do comprimento do tarso

36. Tubérculo tarsal

0 ausente ou indistinto

1 presente (Figura 10)

Considerações: Grant *et al.* (2006) consideraram a prega tarsal e o tubérculo tarsal como uma estrutura única, sendo o tubérculo um espessamento da prega na sua porção proximal. Nas espécies analisadas, o tubérculo tarsal se mostrou independente da prega tarsal, e, portanto, codifiquei como caracteres distintos.

37. Segundo tubérculo tarsal

0 ausente

1 presente (Figura 9)

Considerações: Em alguns indivíduos, observei a presença de um segundo tubérculo tarsal conspícuo. Não houve variação intraespecífica nos indivíduos analisados.



Figura 9. Vista ventral do pé e tarso de *Physalaemus albifrons* (UFMG 6150), macho.

38. Pele da superfície ventral do pé, textura

0 lisa (Figura 9)

1 com tubérculos (Figura 10, 12)

Considerações: Algumas espécies de *Physalaemus* possuem tubérculos supranumerários na região ventral dos pés (Figura 10).

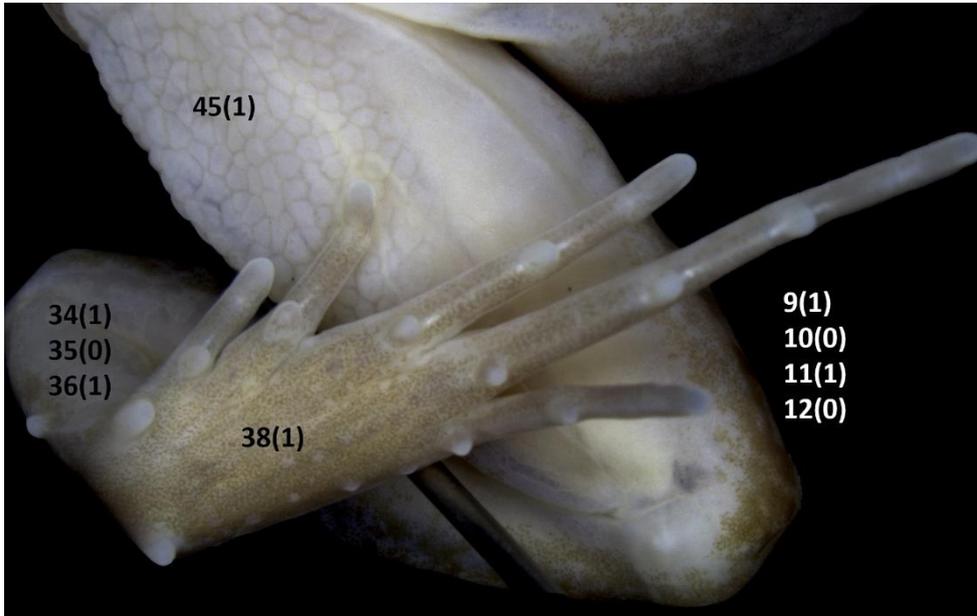


Figura 10. Vista ventral da coxa, pé e tarso de *Physalaemus lisei* (UFMG 2679), macho.

39. Pele da superfície dorsal do tarso, textura

0 lisa

1 com tubérculos

40-42: Textura da pele dorsal

A textura da pele no dorso varia de forma contínua nos *Physalaemus*. Grant *et al.* (2006) codificaram a textura da pele dorsal como um caráter em quatro estados: ausente, granular posteriormente, fortemente granular e espiculada. Não consegui observar variação na estrutura entre espículas e grânulos. Por este motivo, decidi considerar ambos como grânulos, até que estudos histológicos sejam feitos.

40. Pele dorsal, textura

0 predominantemente lisa (Figura 17)

1 predominantemente granulosa (Figura 11)

Considerações: Encontrei grande variação intraespecífica quanto à presença de grânulos dispersos e muito pouco numerosos no dorso, e, com isso, preferi agrupar espécies com o dorso liso ou levemente granuloso no mesmo estado. O estado 1 foi considerado quando presentes numerosos grânulos dérmicos em todo o dorso. Pregas longitudinais no dorso foram consideradas outro caráter.

41. Pele dorsal, grânulos, densidade

0 baixa, grânulos muito espaçados

1 alta, grânulos recobrimo praticamente toda a região dorsal (Figura 11)

Considerações: Os grânulos, quando presentes em todo o dorso, podem se apresentar em grande densidade (Figura 11) ou em baixa densidade.

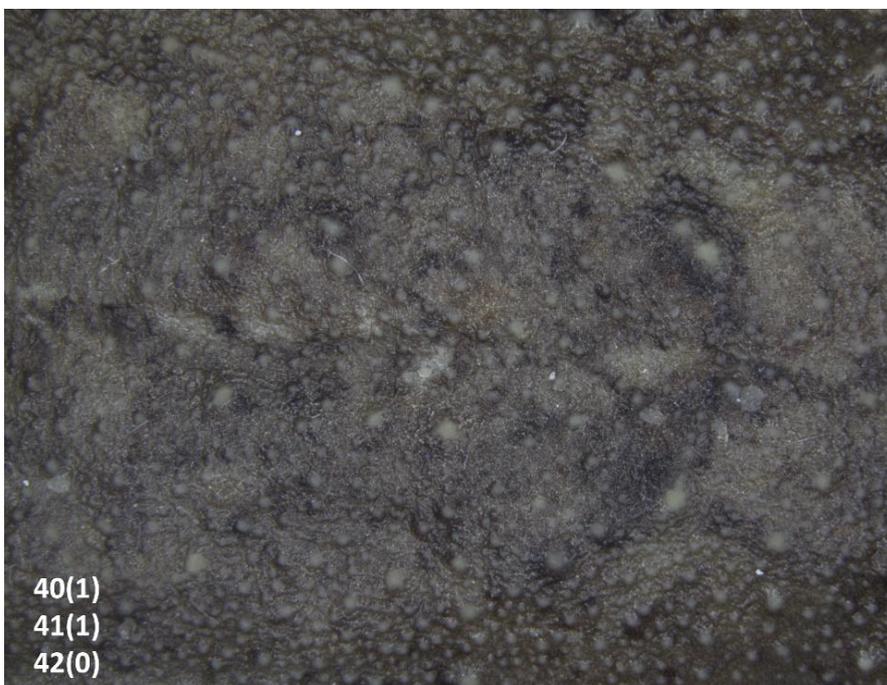


Figura 11. Detalhe da pele dorsal de *Engystomops petersi* (MZUSP 62048).

42. Pele dorsal, grânulos, queratinização

0 ausente (Figura 11)

1 presente

Considerações: Algumas espécies analisadas possuem queratinização na região mais superficial dos grânulos.

43. Pele dorsal, pregas longitudinais

0 ausente

1 presente

44. Pele na região ventral do abdômen, textura

0 lisa

1 granulosa

45. Pele ventral da coxa, textura

0 predominantemente lisa

1 predominantemente granulosa (Figura 10)

Considerações: A região ventral da coxa pode ser predominantemente lisa, ou predominantemente granulosa (Figura 17). Em alguns espécimes, observei que a região mais cranial é lisa, mas os dois terços posteriores são granulosa, enquanto em outros toda a região ventral da coxa é granulosa. Devido à variação intraespecífica, e à possível interferência da fixação, considerei ambas as situações no estado 1. Em poucas espécies de *Physalaemus* observei a pele ventral da coxa predominantemente lisa.

46. Prega peitoral

0 ausente

1 presente (Figura 12)

47. Prega abdominal

0 ausente

1 presente (Figura 12)

48. Ocelos próximos à região cloacal

0 ausentes

1 presentes

Considerações: Observei em algumas espécies a presença de um par de ocelos próximos à região cloacal, contrastantes do colorido dorsal. Pouca variação intraespecífica foi encontrada para essa característica.

49. Ocelos inguinais

0 ausentes

1 presentes

Considerações: As glândulas inguinais podem ou não estar associadas à ocelos, manchas escuras e contrastantes (Figura 13).

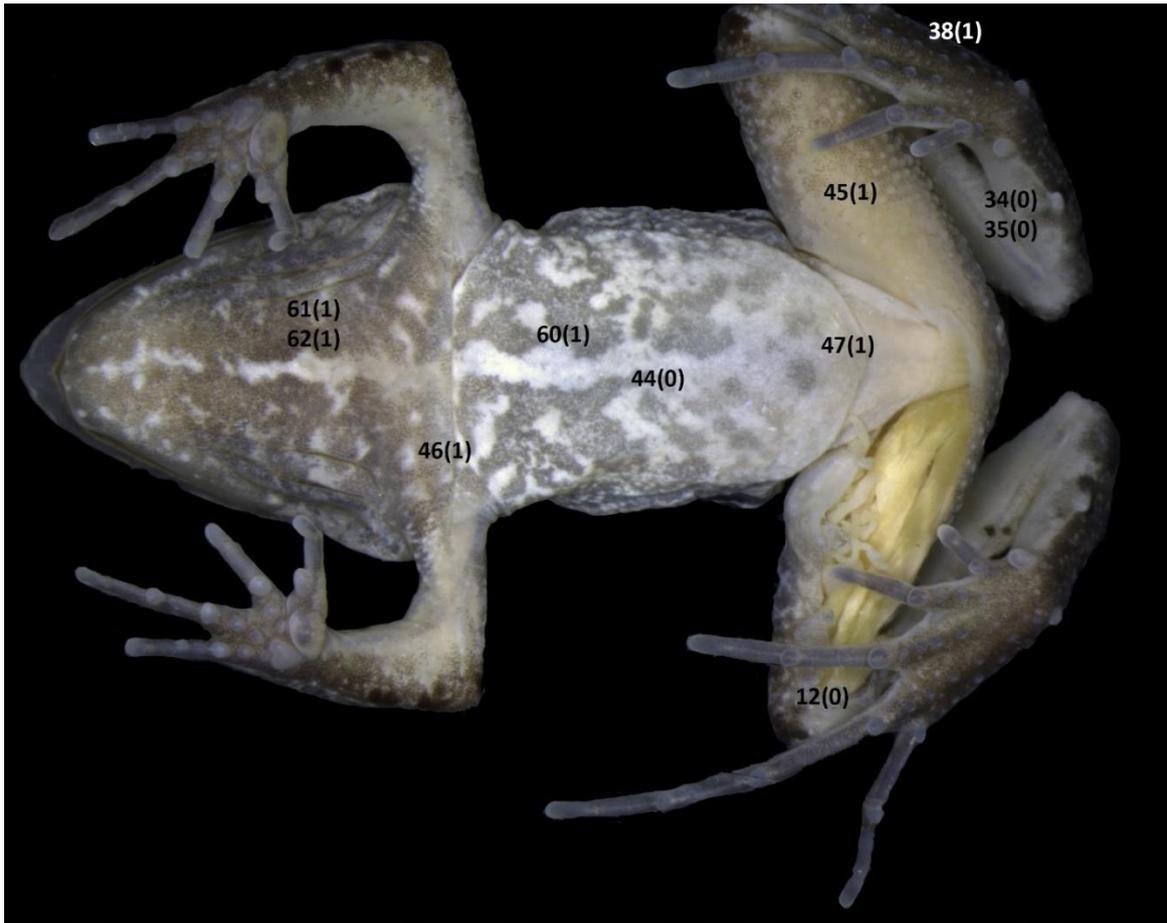


Figura 12. Ventre de *Physalaemus carrizorum* (UFMG 9875), macho.

50-57: Glândulas

Os anfíbios possuem no tegumento glândulas mucosas, relacionadas à respiração, reprodução e balanço de água, e as glândulas serosas ou granulares, relacionadas à produção de toxinas usadas na defesa (Duellman & Trueb 1986, Toledo & Jared 1995). Ambas as glândulas podem formar macroglândulas. Glândulas inguinais e parotóides são exemplos de macroglândulas serosas.

50-52: Glândulas inguinais

Lenzi-Mattos *et al.* (2005) analisaram a estrutura histológica e histoquímica das glândulas inguinais de *Physalaemus nattereri* e constataram que são morfologicamente semelhantes às glândulas serosas do resto da pele, exceto por suas dimensões maiores. Por serem importantes características diagnósticas, codifiquei, além da presença, sua distinção e formato, em vista externa.

50. Macroglândulas inguinais

0 ausente

1 presente

51. Macroglândulas inguinais: visibilidade em vista externa

0 indistinguíveis

1 evidentes

52. Macroglândulas inguinais: formato em vista externa

0 redondas, protuberância discreta

1 globulares, grande protuberância

2 discoidais, achatadas

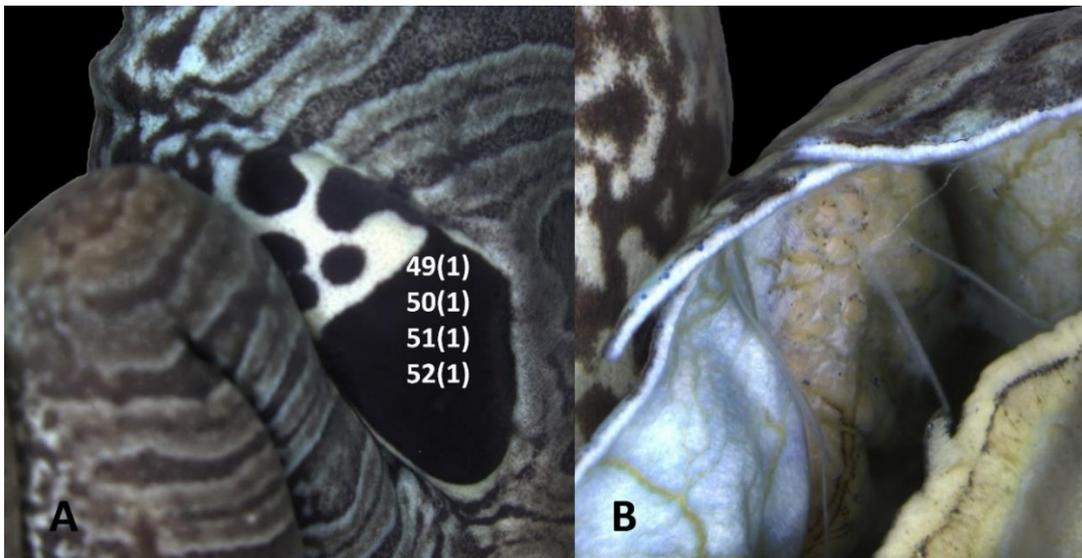


Figura 13. Glândulas inguinais de *Physalaemus nattereri* (UFMG 2372), macho, em A: vista externa e B: vista interna.

53. Macroglândulas parotoídes

0 ausente

1 presente

Considerações: As macroglândulas parotoídes são aglomerações glandulares localizadas na região pós-orbital e supratimpânica (Antoniazzi *et al.* 2013) relacionadas diretamente à defesa contra a predação. Devido à localização e função, separo as macroglândulas parotoídes da faixa glandular dorsolateral, que consiste em aglomeração glandular mais discreta que se estende continuamente até a região inguinal.

54. Faixa glandular dorsolateral

0 ausente

1 presente (Figura 14)

55. Faixa glandular dorsolateral: grau de desenvolvimento

0 Fracamente desenvolvida e fragmentada

1 Muito desenvolvida, contínua da porção final da pálpebra até a região inguinal

Considerações: Algumas espécies de *Physalaemus* apresentam aglomerados glandulares longitudinais na região dorsolateral do corpo. Esse aglomerado pode ser muito desenvolvido e contínuo da porção final da pálpebra até a região inguinal (Figura 14).

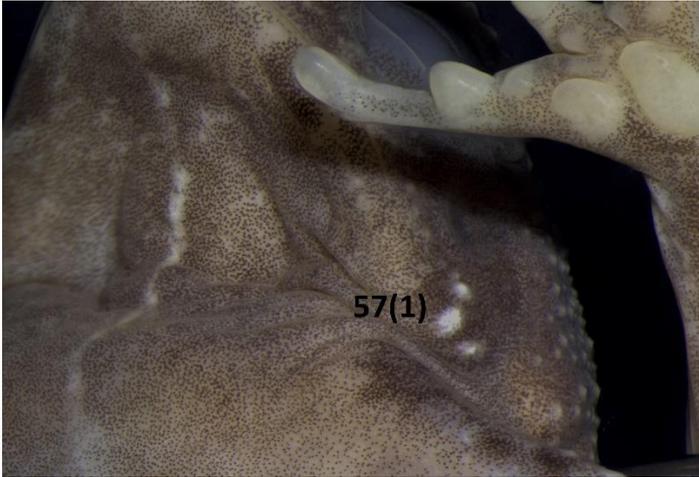


Figura 15. Região gular de *Engystomops petersi* (MZUSP 62051), evidenciando as macroglândulas inframandibulares.

58. Faixa escura dorsolateral

0 ausente

1 presente

59. Faixa escura dorsolateral: extensão

0 atingindo até metade da distância entre o olho e a região inguinal

1 atingindo pelo menos dois terços da distância entre o olho e a região inguinal

Considerações: Não encontrei variação intraespecífica quanto à presença da faixa escura dorsolateral. Em relação à sua extensão, em algumas espécies em que na maior parte dos indivíduos uma faixa escura dorsolateral se estende até a região inguinal, em alguns indivíduos observei que ela se estendia até cerca de dois terços da distância entre o olho e a região inguinal (Figura 16), e por isso considerei ambas as situações no estado 1. Em diversas espécies analisadas, a faixa é pronunciada apenas até a metade da distância entre o olho e a região inguinal.

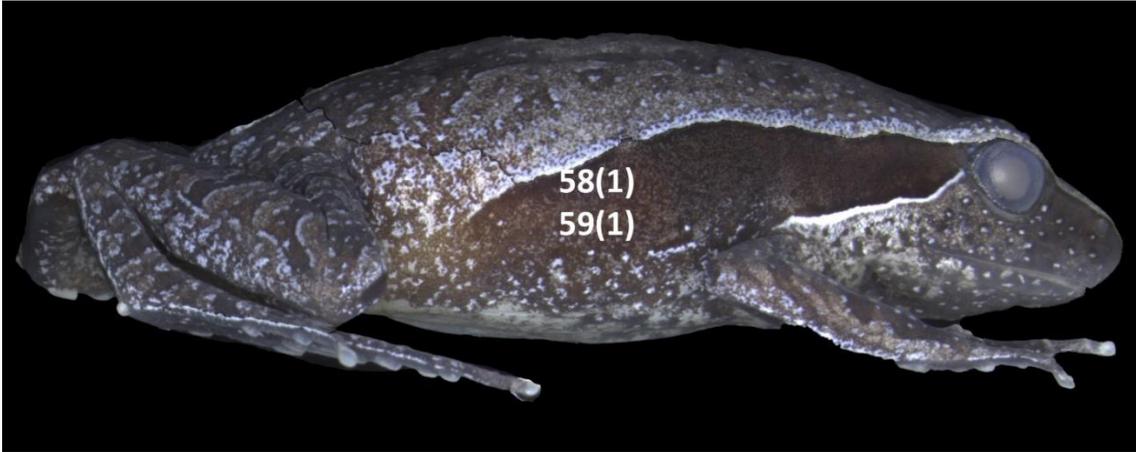


Figura 16. Vista lateral de *Physalaemus feioi* (UFMG 12847), fêmea.

60. Abdômen, pigmentação

0 ausente

1 presente

Considerações: A pigmentação abdominal pode ser muito variável em Leptodactylidae. Em *Physalaemus*, quando presente, a pigmentação consiste em aglomerações de melanóforos escuros dispersas no abdômen (Figura 12). Devido à dificuldade de estabelecer homologias com relação aos padrões de coloração ventral de todos os Leptodactylidae, e por não haver variação significativa em *Physalaemus*, optei por codificar apenas a presença e ausência de pigmentação.

61. Gula, pigmentação em machos

0 ausente

1 presente

62. Linha longitudinal despigmentada na região gular

0 ausente

1 presente

Considerações: A ocorrência de uma linha mediana despigmentada na região gular (Figura 12) é um caráter importante em *Physalaemus*, e foi sugerido por Cardozo & Pereyra (2018) que é uma sinapomorfia putativa dos *Physalaemus* do grupo de *P. gracilis* (sensu Lourenço *et al.* 2015).

63. Linha vertebral urostilar

0 ausente

1 presente

Considerações: Uma marcada linha despigmentada na pele dorsal, na região do uróstilo é facilmente observável em algumas espécies analisadas (Figura 17).



Figura 17. Região posterodorsal de *Physalaemus lateristriga* (UFMG 9836), macho.

64. Colorido inguinal (in vivo)

0 ausente, sem colorido inguinal contrastante

1 presente

Considerações: Este caráter foi codificado utilizando fotografias e dados de literatura. Quando presente, o colorido inguinal em *Physalaemus* é um tom de vermelho vivo.

65-88: Miologia

Caracteres musculares são, comparativamente às demais fontes de caracteres, menos explorados, principalmente em análises filogenéticas. Ainda assim, diversos trabalhos analisam a variação muscular entre os diferentes grupos em Anura (e.g. Burton 1983, 1996a, 1996b, 1998, 2001, 2004; Faivovich 2002; Hoyos *et al.* 2014; Hoyos & Salgar 2016; Blotto *et al.* 2017). Caracteres musculares podem refletir a história evolutiva dos grupos, mostrando as mudanças adaptativas ao estilo de vida (Burton 1998). Contudo, caracteres de miologia tendem a ter pouca variação em nível de gênero, e há grande influência da filogenia na morfologia dos músculos e tendões (Fratani *et al.* 2018, Oliveira-Lagôa *et al.* 2018). Apresento 24 caracteres de musculatura e tendões, provindos da variação dos principais complexos musculares observados nas espécies analisadas.

65-71: Musculatura superficial da gula

A musculatura superficial gular é formada pelos músculos submentalis, intermandibularis e interhyoideus. Esses músculos estão relacionados principalmente à alimentação. O m. interhyoideus ainda apresenta grande diversidade morfológica associada ao desenvolvimento do aparato vocal (Tyler, 1971).

65. M. intermandibularis: encontro das fibras

0 aponeurose (Figura 18, 19)

1 rafe

66. M. intermandibularis: dimensão da aponeurose

0 estreita (Figura 19)

1 ampla (Figura 18)

Considerações: Os músculos intermandibulares podem encontrar-se em uma estreita linha (rafe), ou em uma aponeurose. Em *Physalaemus*, observei que essa aponeurose varia muito em dimensão, podendo ser estreita (Figura 19) ou ampla (Figura 18). Os estados se mostraram conservados em nível de espécie.

67-68: M intermandibularis, elementos suplementares

Os elementos suplementares são pequenos feixes musculares originados do elemento principal do m. intermandibularis que podem variar amplamente de forma (Tyler 1971, Burton 1998, Verdade 2005). Os caracteres a seguir são semelhantes ao caráter 80 de Verdade (2005).

67. M intermandibularis: elementos suplementares

0 ausentes

1 presentes (Figura 18, 19)

68. M intermandibularis, elementos suplementares, direção das fibras musculares

0 anterolateral

1 anteromedial (Figura 18, 19)

69-71: M. interhyoideus

O músculo interhyoideus, na maior parte das espécies de Anura, suporta externamente a mucosa do saco vocal, associado ao m. intermandibularis. Sua forma varia grandemente em *Physalaemus*.

69. M. interhyoideus: fibras

0 contínuas

1 interrompidas medialmente (Figura 18)

70. M. interhyoideus em machos: condição

0 músculo esticado, pouco flácido (Figura 18)

1 músculo flácido, diferenciado em amplo saco (Figura 19)

71. M. interhyoideus em machos, margem posterior: desenvolvimento

0 não ultrapassa ou ultrapassa levemente a maxila (Figura 18)

1 atinge entre $1/3$ e $1/2$ do nível do m. deltodeus

2 atinge a porção posterior do m. deltoideus

3 alcança o m. pectoralis esternalis

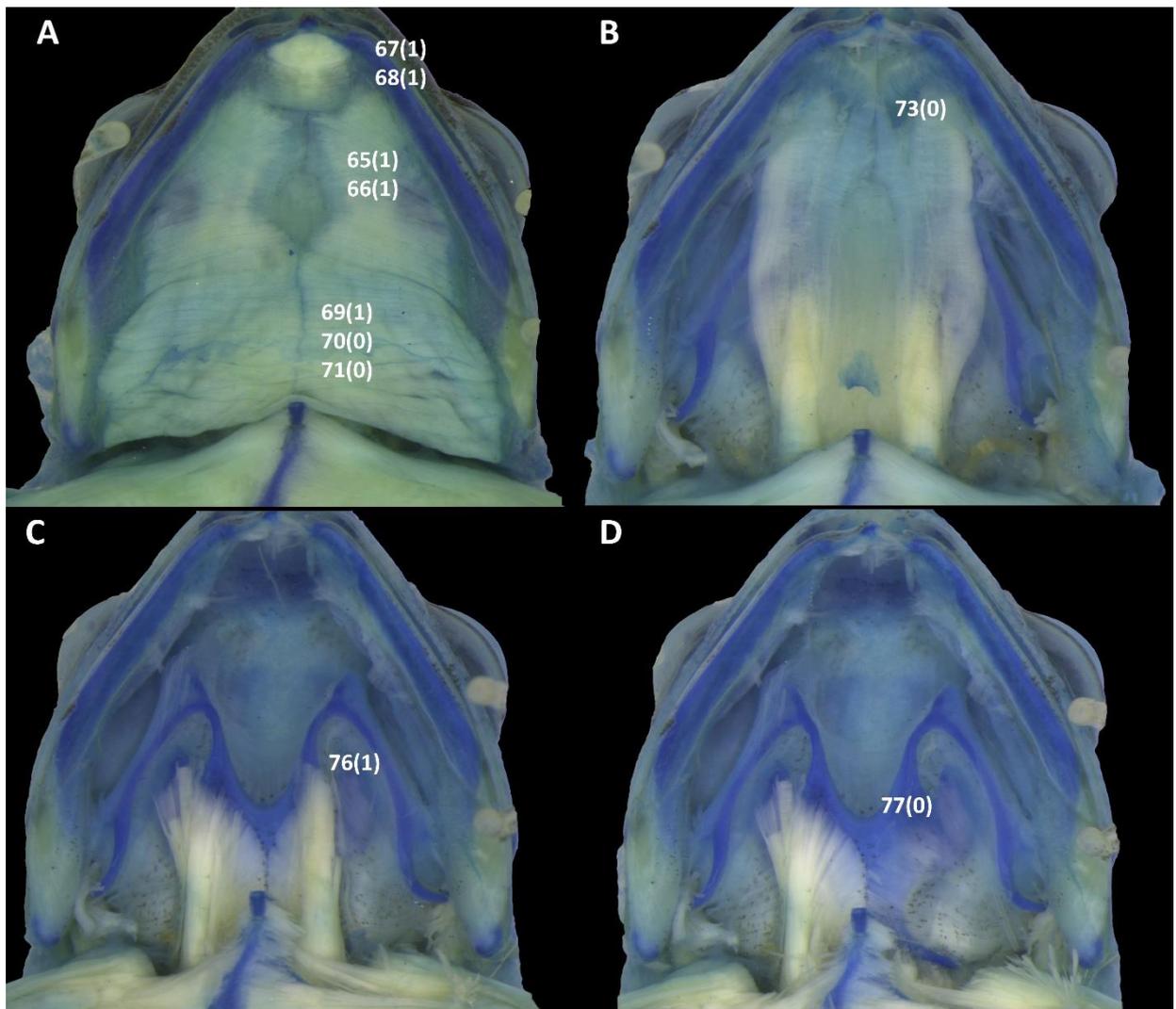


Figura 18. Músculos gulares de *Physalaemus moreirae* (UFMG 9478), macho. A: camada superficial, B: segunda camada (mm. submentalis, intermandibularis e interhyoideus retirados), C: terceira camada (mm. geniohyoideus medialis e lateralis retirados), D: m. sternohyoideus esquerdo retirado.

72-74: Músculos gulares: segunda camada

Os mm. geniohyoideus medialis conectam-se à sínfise mandibular e à placa hioide, e se localizam na segunda camada muscular, adjacentes aos mm. geniohyoideus lateralis. Esse conjunto de músculos separam a camada muscular superficial da

musculatura da língua e são responsáveis pela elevação do assoalho bucal (Regal e Gans. 1976).

72. M. geniohyoideus lateralis: dimensão da base

0 estreita (Figura 19)

1 ampla

Considerações: Este caráter é similar ao caráter 85 de Verdade (2005), e, embora varie amplamente em Anura, não variou nas espécies analisadas.

73. M. geniohyoideus medialis: contato das fibras

0 em contato medial somente próximo a origem

1 contíguos medialmente em toda sua extensão

Considerações: Caráter 83 de Verdade (2005). Figura 19.

74. M. geniohyoideus medialis: origem

0 diretamente na região da sínfise mandibular, adjacente ao m. genioglossus

1 através de um tendão na região da sínfise mandibular, dorsalmente ao m. genioglossus

Considerações: Caráter 84 de Verdade (2005). Figura 19.

75. M. genioglossus: composição

0 um único elemento

1 dois elementos, um dorsal e um ventral

2 três elementos, ventral, medial e superficial

Considerações: O m. genioglossus origina-se na região da sínfise mandibular e penetra na língua, subdividindo-se. Horton (1982) observou a variação na composição do

m. genioglossus, e propôs três estados. O estado 0 deste trabalho corresponde ao estado I de Horton (1982), o estado 1, ao estado II, e o estado 2 ao estado III. Caráter 88 de Verdade (2005).

76. M. sternohyoideus: posição da inserção na superfície ventral da placa do hioide
0 na linha medial
1 próximas à margem lateral (Figura 18, 19)

Considerações: Similar ao caráter 15 de Heyer (1975). Caráter 90 de Verdade (2005).

77. M. petrohyoideus anterior: inserção no hioide
0 todas as fibras no corpo ventral do hioide (Figura 18, 19)
1 parte das fibras na borda, parte no corpo ventral da placa do hioide
2 na borda lateral da placa hioide

Considerações: Similar ao caráter 14 de Heyer (1975) e 91 de Verdade (2005).

Estes autores agruparam os dois primeiros estados propostos aqui em um único estado, e optei por codificar um novo estado intermediário.

78-79: M. omohyoideus

Os mm. omohyoideus, quando presentes, originam-se na margem ventral da escápula e inserem-se no hioide, em pontos variáveis.

78. M. omohyoideus
0 ausente
1 presente

Considerações: Caráter 92 de Verdade (2005).

79. M. omohyoideus: inserção no hioide

0 no processo posterolateral (Figura 19)

1 na extremidade da placa, entre os processos posteromedial e posterolateral (Figura 20)

Considerações: Similar ao caráter 16 de Heyer (1975).

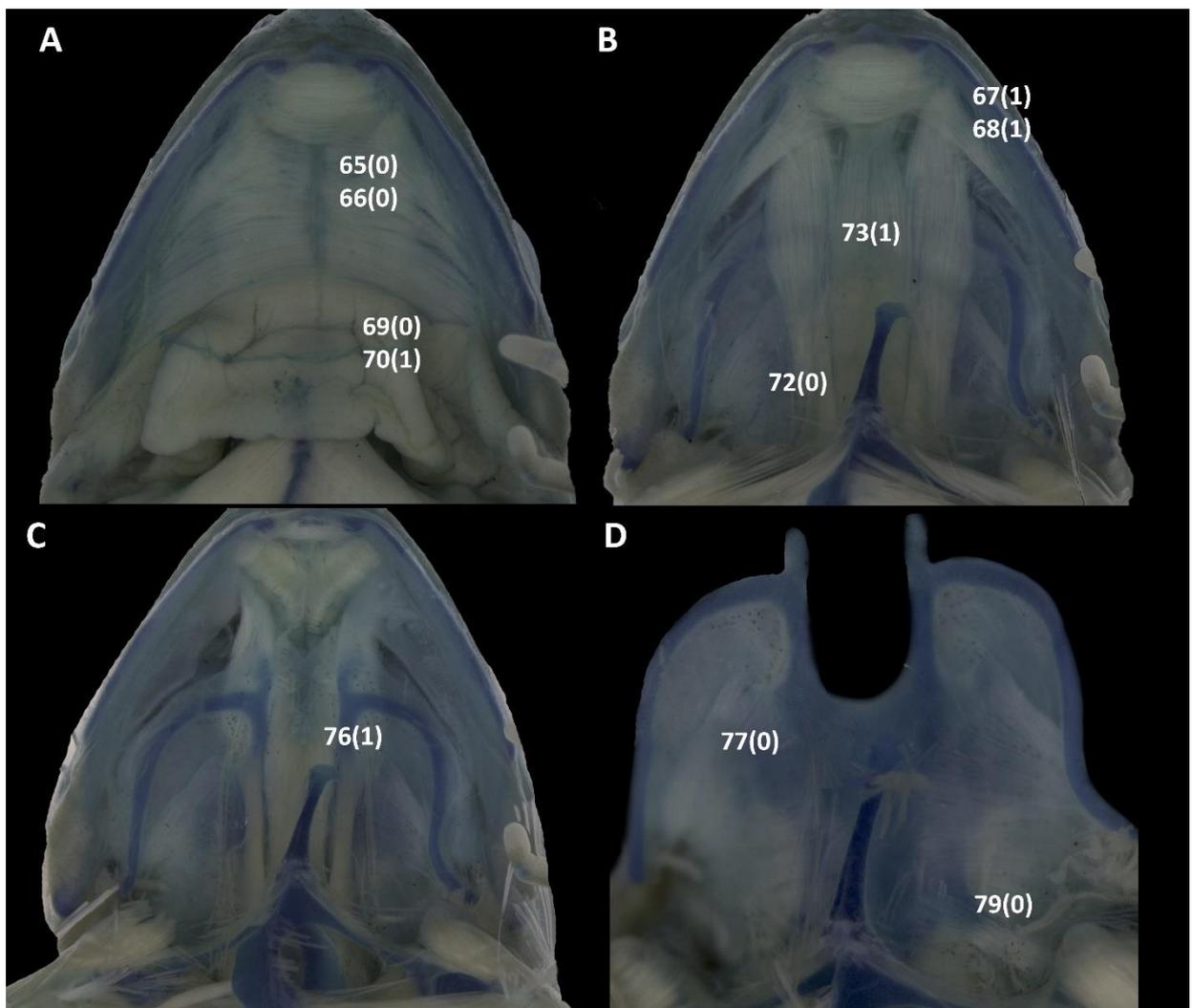


Figura 19. Músculos gulares de *Physalaemus lisei* (UFMG 2679), macho. A: camada superficial B: segunda camada (mm. submentalis, intermandibularis e interhyoideus retirados) C: terceira camada (mm. geniohyoideus medialis e lateralis retirados) D: mm. sternohyoideus retirados.

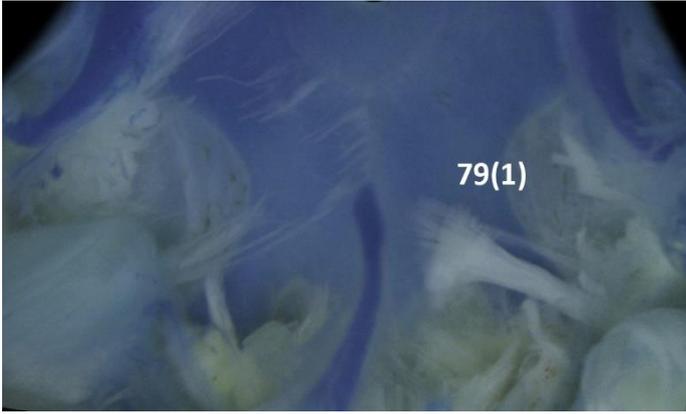


Figura 20. Porção posterior do hoide de *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 20457), macho. Músculos gulares removidos, exceto omohyoideus.

80: Musculatura mandibular

Os músculos mandibulares constituem a maior parte dos músculos da região da cabeça e são responsáveis pela contração da mandíbula para fechamento e abertura. Esse conjunto muscular é muito conservado, e apenas os mm. levator mandibulae pareceram apresentar variações nas espécies analisadas.

80. Mm. levator mandibulae: sobreposição em relação aos frontoparietais

0 ausente (frontoparietais visíveis)

1 presente (frontoparietais não visíveis)

Considerações: Como discutido por Verdade (2005), há uma variação contínua no grau de sobreposição dos mm. levator mandibulae aos frontoparietais. Decidi codificar o estado presente somente quando a sobreposição é completa, e os frontoparietais não são visíveis em vista dorsal.

81. M. ileolumbaris em relação à diapófise sacral

0 não cobre sua extremidade distal (Figura 21)

1 cobre sua extremidade anterodistal

Considerações: O m. ileolumbaris origina-se na extremidade anterior do íleo e estende-se em direção anterior até inserir-se no processo transversal da vértebra pré-sacral IV (Verdade 2005). Em algumas espécies, este músculo recobre a extremidade distal da diapófise sacral. Similar ao caráter 98 de Verdade (2005).

82. M. abductor indicis longus em machos: grau de desenvolvimento

0 pouco desenvolvido

1 hipertrofiado

Considerações: O desenvolvimento do m. abductor indicis longus é o principal responsável pela hipertrofia dos braços de machos em relação a fêmeas da mesma espécie. Machos de algumas espécies de *Physalaemus* possuem este músculo hipertrofiado, e alguns, pouco desenvolvido. Para análise deste caráter, comparei macho e fêmea da mesma espécie, sempre que possível. Quando o músculo tinha largura similar em macho e fêmea, considerei pouco desenvolvido, e quando era consideravelmente mais desenvolvido em machos, considerei hipertrofiado. Verdade (2005) considera que o m. abductor indicis longus é aparentemente formado por três feixes musculares, e observou que a hipertrofia pode ser presente apenas no feixe superior, ou nos feixes transversal e superior. Aqui, considero a hipertrofia do músculo como um único estado, devido à dificuldade na diferenciação precisa destes feixes musculares.

83. M. iliacus externus: extensão em relação ao íleo

0 até metade do seu comprimento (Figura 21)

1 por volta de 3/4 do seu comprimento

Considerações: Relacionado à movimentação do fêmur, o m. iliacus externus recobre o íleo em extensões variadas. Modificado do caráter 17 de Heyer (1975). O estado 2 proposto por Heyer (1975), referente à cobertura total do íleo pelo m. iliacus externus não foi codificado, por não ter sido encontrado em nenhum dos espécimes analisados.

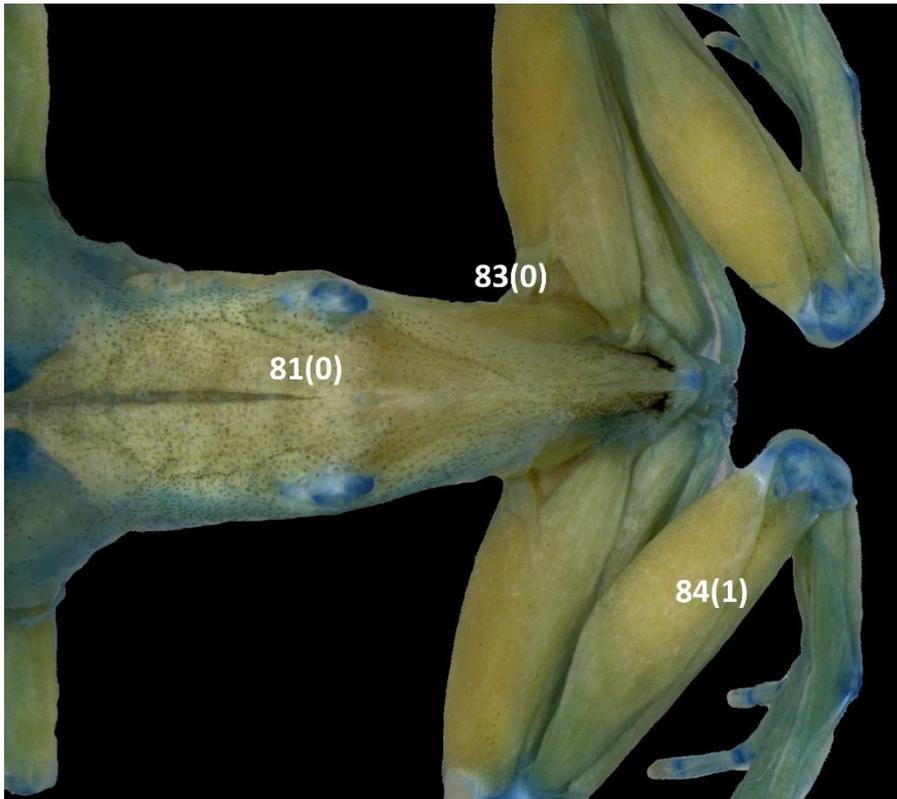


Figura 21. Músculos da região posterodorsal de *Physalaemus kroyeri* (UFMG 4825).

84. M. peroneus: grau de desenvolvimento em relação ao m. plantaris

0 aproximadamente da mesma largura

1 muito mais largo

Considerações: Observei que a largura máxima do m. peroneus varia muito nos Leptodactylidae. Para observação dos músculos, seccionei a base proximal e desloquei a

musculatura, pois pode-se ter uma falta impressão da dimensão do m. peroneus devido à sua posição dorsolateral.



Figura 22. Membros inferiores direitos de *Physalaemus lisei* (UFMG 2679), macho.

85. Mão, dedo II, m. extensor indicis brevis superficialis, tendão

0 ausente

1 presente

Considerações: Burton (1998) já havia observado que o m. extensor brevis superficialis digitii II em Leptodactylidae, e sugeriu que a origem deste músculo, no carpal e radial, era uma condição única compartilhada por *Leptodactylus* e *Hydrolaetere*, corroborando o estreito relacionamento entre essas espécies. Embora não tenha incluído este caráter, percebi que a inserção do músculo no dedo II ocorria por um tendão, em algumas espécies de *Physalaemus*, ou diretamente na falange.

86. Mão, metacarpal III, inserção do m. extensor digitorum communis longus

0 ausente

1 presente

Considerações: O m. extensor digitorum communis longus é o músculo mais superficial do dorso da mão e é responsável pela extensão dos dedos. Ele pode se inserir apenas nos dedos IV e V, ou nos dedos III, IV e V.

87. Mão, dedo III, m. lumbricalis longus

0 1 feixe e 1 tendão

1 2 feixes e 2 tendões

Considerações: A variação encontrada para o m. lumbricalis longus digiti III se refere ao número de feixes e tendões. Caráter 105 de Verdade (2005).

88. Alcance do xifoesterno em relação à musculatura abdominal

0 Até o início do m. rectus abdominis

1 Até fim do primeiro terço m. do rectus abdominis

2 Até o fim do segundo terço do m. rectus abdominis

Considerações: Nas espécies analisadas, o alcance do xifisterno em relação ao abdômen varia amplamente. Propus três estados com relação ao músculo rectus abdominis para abordar essa variação.

89-100: Vísceras

Anfíbios compartilham com outros vertebrados ectotérmicos um sistema de pigmentação extracutânea que consiste em células portadoras de melanina em vários órgãos e tecidos (Franco-Belussi *et al.* 2011). Aspectos morfofuncionais dessa pigmentação visceral ainda são desconhecidos (Corsaro *et al.* 2000, Provete *et al.* 2012).

Para análise e codificação dos caracteres, utilizei a proposta por Franco-Belussi *et al.* (2009), com a variação de despigmentação (categoria 0 de Franco-Belussi *et al.* 2009), pigmentação parcial (combinação das categoria 1 e 2 de Franco-Belussi *et al.* 2009) e pigmentação completa (categoria 3 de Franco-Belussi *et al.* 2009).

Zieri *et al.* (2015) mostraram que os hormônios sexuais alteraram a pigmentação dos melanomacrófagos hepáticos e melanócitos testiculares, e, portanto, as características relacionadas a órgãos sexuais à pigmentação dos órgãos foram analisadas apenas em indivíduos adultos.

Além de caracteres de pigmentação, caracteres de tamanho proporcional de órgãos foram propostos.

89. Peritônio abdominal

0 transparente

1 iridiscente

2 escuro

90. Pulmão: pigmentação

0 despigmentado (Figura 23)

1 parcialmente pigmentado

2 completamente pigmentado

91-94: Fígado

Duellman & Trueb (1986), apesar de não analisarem a fundo a anatomia do fígado de anfíbios, mencionam que anuros possuem fígado bilobado. Franco-Belussi *et al.* (2012) descreveram a anatomia, histoquímica e ultraestrutura do fígado de *Physalaemus*

nattereri durante a estação reprodutiva e observaram três lobos: direito, medial, e esquerdo, sem subdivisões em lóbulos.

Constatei que nas espécies analisadas, a relação de tamanho entre os lóbulos varia grandemente entre as espécies analisadas, e pouco intraespecificamente.

Analisei a pigmentação do fígado apenas dos machos adultos, considerando os resultados de Zieri *et al.* (2015) que mostraram a influência positiva da testosterona no aumento da pigmentação hepática.

91. Fígado: pigmentação

0 não pigmentado

1 parcialmente pigmentado (Figura 23)

2 completamente pigmentado

92. Fígado: número de lobos

0 dois

1 três (Figura 23)

93. Fígado: tamanho do lobo direito em relação ao esquerdo

0 maior

1 menor

2 aproximadamente mesmo tamanho (Figura 23)

94. Fígado: tamanho do lóbulo medial em relação ao lóbulo direito

0 maior

1 menor

2 aproximadamente mesmo tamanho (Figura 23)

95-97: Testículos maduros

95. Testículo maduro: pigmentação

- 0 ausente
- 1 parcial
- 2 completa

Considerações: Franco-Belussi *et al.* (2009) analisaram a pigmentação testicular de 17 espécies de Leptodactylidae, sendo 5 espécies de *Physalaemus*. Eles reportaram pigmentação testicular em todas as espécies de *Physalaemus* analisadas, com variação intraespecífica principalmente entre os estados de pigmentação parcial e completa. Na maioria das espécies analisadas neste trabalho, encontrei uma baixa variação intraespecífica e, por isso, optei por codificar este caráter.

96. Testículo maduro: comprimento em relação do aos rins

- 0 pequeno, aprox. 1/3
- 1 médio, aprox. 1/2 (Figura 23)
- 2 grande, > 2/3

97. Testículo maduro: comprimento em relação ao CRC

- 0 menor ou igual a 10%
- 1 maior que 10% e menor que 15%
- 2 maior que 15%

Considerações: Frequentemente, o tamanho dos testículos é medido em comparação ao tamanho dos rins. Percebi que em alguns indivíduos, o comprimento dos testículos era relativamente pequeno em relação ao comprimento rostricloacal, mas era

semelhante ao comprimento dos rins. Por historicamente a comparação do tamanho dos testículos ser referente ao dos rins, codifiquei as duas formas de comparação.

98. Oócitos maduros: pigmentação

- 0 não pigmentado
- 1 completamente pigmentado
- 2 parcialmente pigmentado

99. Átrio: pigmentação

- 0 ausente
- 1 parcial
- 2 completa

100. Baço: pigmentação

- 0 ausente
- 1 parcial
- 2 completa

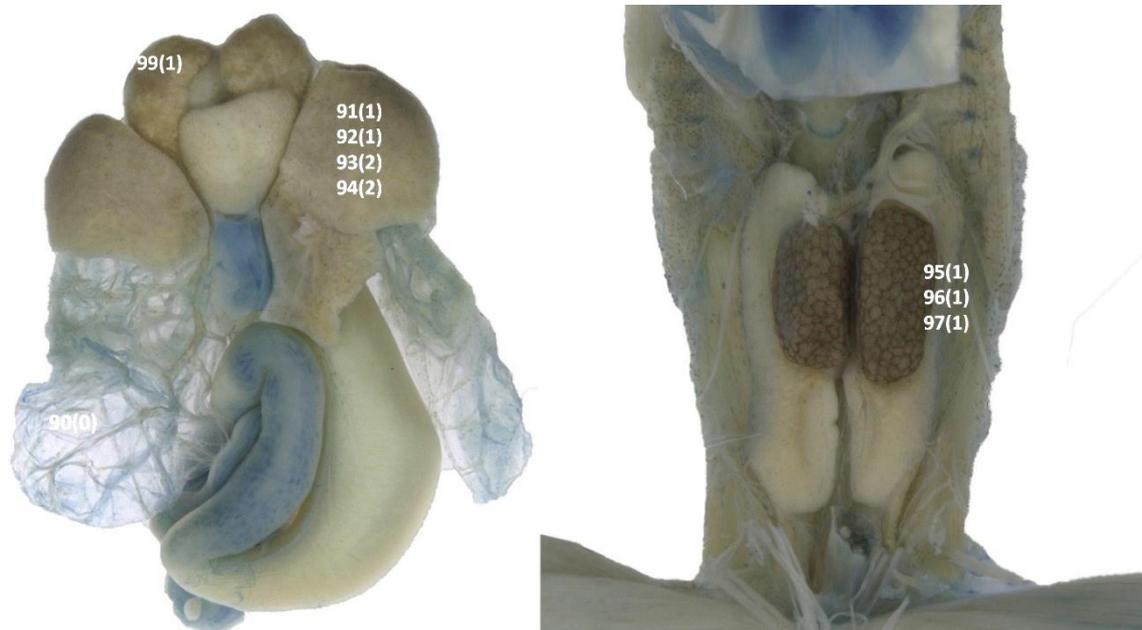


Figura 23. Visceras de *Physalaemus lisei* (UFMG 2679), vista ventral.

101-200: Osteologia

A osteologia dos anuros foi amplamente estudada, e, inicialmente serviu de base para a divisão de dois grandes clados definidos pelo padrão da cintura peitoral arcífera ou firmisterna (Cope 1864). Noble (1922) estabeleceu 5 subordens de anuros baseando-se majoritariamente nas diferenças da estrutura do centro vertebral. Já nas últimas décadas, a morfologia foi estudada de forma mais completa, e caracteres osteológicos de todo o sistema esquelético foram sendo incluídos em trabalhos comparativos em níveis mais específicos (e.g. Lynch 1971, Tihen 1962, Duellman 1970, Trueb 1970), demonstrando a importância dos caracteres osteológicos nos estudos de relacionamento evolutivo em Anura. Lynch (1971) incluiu em sua extensa análise, a família Leptodactylidae (sensu Pyron & Wiens 2011), e foi a principal base para a elaboração dos caracteres a seguir, aliado aos subsequentes trabalhos de Heyer (1975, 1983a).

101-154: Crânio

O crânio constitui a maior fonte de caracteres deste trabalho. Nos anuros, ele é formado por ossos dérmicos, originados de tecido conjuntivo, e ossos endocondrais, originados a partir da substituição de elementos cartilagosos. Os ossos endocondrais formam o neurocrânio e o aparato auditivo, além da articulação da mandíbula e da sínfise mandibular. Os ossos dérmicos formam a camada superficial que protege o neurocrânio dorsal, lateral e ventralmente.

101. Crânio: largura em relação ao comprimento

0 maior

1 menor (Figura 29)

2 aprox. igual (Figura 27)

102-107: Frontoparietais

Os frontoparietais são ossos dérmicos que revestem a maior parte da região dorsal da caixa craniana. Na maioria dos anuros, são pares (Trueb 1973), mas podem ser completamente fusionados, sem indicação de uma linha de sutura medial. Outra variação nos frontoparietais envolve a extensão de ossificação marginal (Trueb 1973). Em parte dos Leptodactylidae, a ossificação é máxima, e a margem anterior dos frontoparietais articula com a margem posterior dos nasais, e as margens mediais se articulam em todo o comprimento dos ossos. Entretanto, a extensão da ossificação é amplamente variável na família.

102. Frontoparietais: separação medial

0 ausente ou estreitamente separados (Figura 27A)

1 amplamente separados

103. Alargamento das juntas inter-frontoparietais

0 ausente

1 presente (Figura 27A)

Considerações: Em algumas espécies, os frontoparietais são mais separados na porção mais anterior (Figura 24) e a dimensão desse afastamento também é variável.

104. Alargamento das juntas inter-frontoparietais: dimensão

0 a partir do terço anterior

1 a partir do quarto anterior

2 a partir do quinto anterior

3 apenas na extremidade anterior (Figura 27A)

105. Frontoparietais: formato da margem posterior

0 côncavo

1 reto (Figura 27A)

2 convexo

106. Frontoparietais, processo posterolateral

0 ausente

1 presente (Figura 27A)

107. Frontoparietais: contato com nasais

0 ausente

1 presente

108-111: Esfenetmoide

O esfenetmoide é um osso invariavelmente presente, que forma a caixa craniana (Trueb 1973). O tamanho de sua porção ossificada é altamente variável em Anura, assim como sua visibilidade dorsal, entre os nasais e os frontoparietais. Nos Leptodactylidae, é um osso inteiramente endocondral. Na maioria dos anuros, as duas metades do esfenetmoide estão fusionadas (Trueb 1993).

108. Esfenetmoide: visibilidade em vista dorsal

0 ausente

1 presente

109. Esfenetmoide: contato com nasais

0 ausente (Figura 24A)

1 presente (Figura 24B, 24C, 27A)

110. Esfenetmoide: extensão do contato com nasais

- 0 apenas ventromedialmente
- 1 medial e posteriormente (Figura 24B)
- 2 apenas posteromedialmente (Figura 24C)

111. Esfenetmoide: contato com fenestra óptica

- 0 ausente (Figura 28A, 28B)
- 1 presente, esfenetmoide margeia anteriormente a fenestra óptica (Figura 27B)

Considerações: Em todas as espécies em que a cartilagem orbital é vestigial, o esfenetmoide margeia anteriormente a fenestra óptica. Na maior parte das espécies analisadas em que a cartilagem orbital é desenvolvida, o contato do esfenetmoide com a fenestra óptica é ausente. Contudo, observei indivíduos que possuem cartilagem orbital desenvolvida, mas interrompida anteriormente, onde o esfenetmoide faz contato com a fenestra óptica. Portanto, optei por codificar, além deste caráter, o grau de desenvolvimento da cartilagem orbital. Similar ao caráter 57 de de Sá *et al* (2014). Figura 36.

112. Nasais: proximidade

- 0 amplamente separados (Figura 24A, 24C)
- 1 em contato ou estreitamente separados (Figura 24B)

Considerações: Lynch (1970) define os *Physalaemus* (incluindo *Engystomops*) com um conjunto de características na qual inclui “ossos nasais grandes, em contato medial”. Apesar de a maioria dos *Physalaemus* possuir contato medial entre os nasais, essa é uma característica que se mostrou variável no grupo.

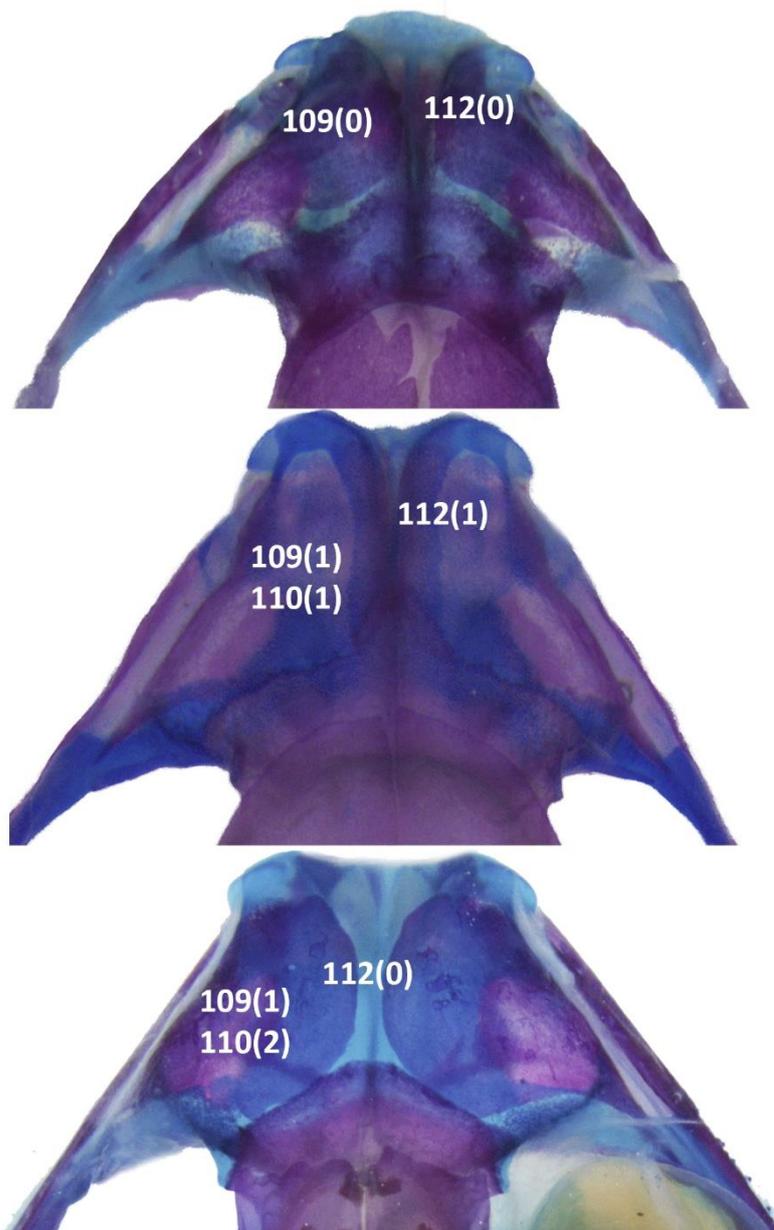


Figura 24. Região anterodorsal do crânio de A: *Physalaemus erythros* (UFMG 14939), B: *Physalaemus maculiventris* (CFBH 26731) e C: *Physalaemus maximus* (UFMG 9623).

113-121: Arco maxilar

O arco maxilar é composto por três ossos dérmicos: quadradojugal, maxila e pré-maxila. O quadradojugal articula o crânio com a maxila e encontra-se ausente em alguns gêneros de Leptodactylidae, como *Pleurodema* e *Pseudopaludicola* (Lynch 1971). A pré-

maxila é um osso par, na margem anterior do crânio (Trueb 1973), cujos processos alares podem variar em orientação nos Leptodactylidae (Lynch 1971). As maxilas são os maiores componentes do arco maxilar (Trueb 1973), e cada componente da maxila consiste em uma pars dentalis, que pode ou não portar dentes, uma pars palatina (Trueb 1973) e uma pars facialis. A pars facialis pode possuir um processo pré-orbital e um processo pós-orbital, este não encontrado em nenhuma das espécies analisadas.

113. Maxila: contato com nasais

0 ausente

1 presente

Considerações: Caráter 134 de Grant *et al.* (2006).

114. Maxila, pars facialis: processo pré-orbital

0 ausente

1 presente

115. Maxila, pars facialis: término da região posterior

0 gradual

1 abrupto

Considerações: Caráter 45 de de Sá *et al.* (2014).

116. Maxila, dentes

0 ausentes (Figura 25)

1 presentes (Figura 27B, 28A, 28B)

117. Maxila, dentes: extensão

0 até a altura do terço anterior das órbitas

1 até metade da altura das órbitas o quadradojugal (Figura 27B)

2 até o ponto de contato com o quadradojugal

118. Maxila e pré-maxilas: relação em vista ventral

0 estreitamente separadas

1 em contato, mas sem sobreposição

2 sobreposição da maxila sobre a pré-maxila (Figura 27B)

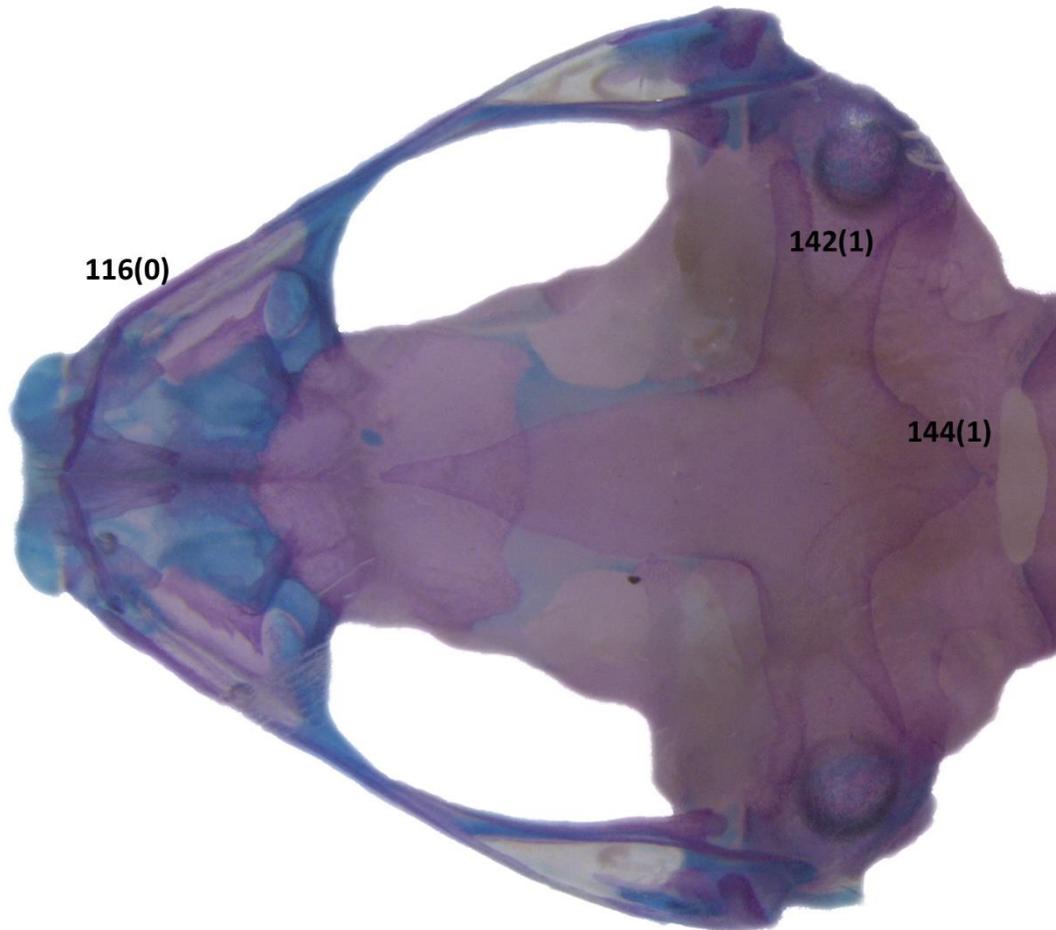


Figura 25. Crânio de *Physalaemus maculiventris* (CFBH 26731), macho, vista ventral. Os formatos circulares vistos lateralmente às asas do parasfenoide na imagem provêm de artefatos de fixação.

119. Pré-maxila, processo alar: orientação longitudinal

0 dorsomedial

1 dorsal

2 dorsolateral

120. Quadradojugal

0 ausente

1 presente

121. Quadradojugal, articulação com maxila: posição

0 no terço anterior da órbita

1 na metade da órbita (Figura 27)

2 no último terço da órbita (Figura 29)

3 no limite posterior da órbita ou posterior à órbita

122-125: Esquamosal

Os esquamosais são ossos dérmicos pares, invariavelmente presentes (Trueb 1973). São compostos por três ramos: zigomático (anterodorsal), ventral e ótico (posterodorsal). As maiores variações do esquamosal consistem na presença e natureza do ramo zigomático e na natureza do ramo ótico (Trueb 1973).

122. Esquamosal, ramo zigomático: comprimento em relação ao ramo ótico

0 de 11 a 40%

1 de 41 a 70% (Figura 26B)

2 de 71 a 100% (Figura 26A)

3 de 101 a 130%

123. Esquamosal, ramo ótico: comprimento em relação ao ramo ventral

0 de 15 a 50%

1 de 51 a 85%

2 de 86 a 100%

3 de 101 a 130%

124. Esquamosal, ramo zigomático: contato com maxila

0 ausente

1 presente

125. Esquamosal, ramo ótico: sobreposição a crista parotica

0 ausente

1 presente

126: Pterigoide

Os pterigoides são ossos dérmicos pares, e trirradiados na maior parte dos anuros (Trueb 1973).

126. Pterigoide, ramo anterior: comprimento em relação ao ramo medial

0 aprox. 2x

1 discretamente maior ou aprox. igual

Considerações: Considerei discretamente maior quando a diferença de comprimento não excedeu 30%. Similar ao caráter 89 de de Sá *et al.* (2014).

127-132: Aparato auditivo

A maioria dos anuros possui um aparato auditivo complexo, caracterizado pela presença de uma janela oval, o opérculo, usualmente separado da columela, e um ânulo timpânico (Trueb 1993). A columela é dividida em três partes: pars externa plectri, pars media plectri e pars interna plectri. Pereyra *et al.* (2016) fizeram uma extensa análise da presença de cada um dos componentes do ouvido médio, e concluíram que a presença do ânulo timpânico implica na presença de columela, mas o contrário não é verdadeiro.

Ainda assim, optei por codificar a presença das duas estruturas. Já a presença de membrana timpânica não foi codificada, pois considerei um caráter de difícil visualização, e parte das minhas observações não concordaram com Pereyra *et al.* (2016). Essa questão será abordada em um estudo posterior mais detalhado.

Para esta análise, adotei o mesmo critério de Pereyra *et al.* (2016), considerando as estruturas vestigiais no estado ausente.

127. Columela

0 ausente

1 presente

128. Ânulo timpânico

0 ausente

1 presente

129. Ânulo timpânico: fusão com crista parótica

0 ausente (Figura 26A)

1 presente (Figura 26B)

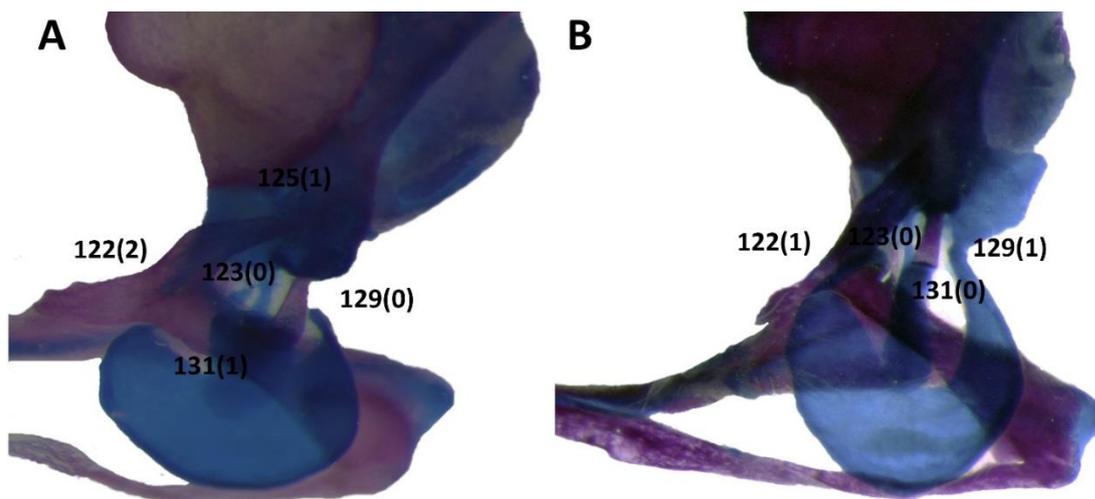


Figura 26. Detalhes do aparato auditivo de A: *Physalaemus obtectus* (MNMA 6060) e B: *Physalaemus atlanticus* (CFBH 4311) em vista dorsolateral.

130. Ânulo timpânico: diâmetro máximo em relação ao comprimento da órbita

0 de 21 a 30%

1 de 31 a 40%

2 de 41 a 50%

3 de 51 a 60%

Considerações: Para análise do diâmetro máximo do ânulo timpânico, escolhi o comprimento máximo da órbita para comparação, já que esse comprimento não se mostrou muito variável nas espécies estudadas. A medição de ambos foi feita em vista dorsolateral.

131. Pars externa plectri: dilatação da extremidade anterior

0 ausente (Figura 26B)

1 presente (Figura 26A)

Considerações: Na maioria dos indivíduos analisados, a pars externa plectri é consideravelmente mais larga no ponto de contato com o ânulo timpânico, em comparação ao ponto de contato com a columela. Em algumas espécies, contudo, a largura da pars externa plectri é aproximadamente constante em todo o seu comprimento. Considerei dilatação quando a diferença de largura foi maior que 40%.

132. Pars externa plectri: dimensão da extremidade anterior em relação ao ânulo timpânico

0 <50%

1 entre 51 e 55%

2 acima de 56%

133. Cartilagem orbital

0 ausente

1 presente

134. Cartilagem orbital: mineralização

0 ausente

1 parcial

2 total

135. Forame oculomotor: constituição

0 encerrado completamente em cartilagem

1 encerrado parcialmente por cartilagem medialmente (Figura 28B, 29)

2 encerrado completamente pelo proótico

136. Forame proótico: constituição

0 encerrado completamente em cartilagem

1 encerrado parcialmente por cartilagem medialmente

2 encerrado completamente pelo proótico (Figura 29)

137. Confluência dos forames proótico e oculomotor

0 ausente

1 presente (Figura 28A)

Considerações: Em alguns indivíduos, apenas um grande forame pôde ser visualizado na posição correspondente aos forames proótico e oculomotor. Observei que, na maioria destes indivíduos, há ainda indícios da divisão dos forames (Figura 27B).

138. Confluência dos forames proótico e oculomotor: grau

0 parcial (Figura 27B)

1 completa (Figura 25, 28A)

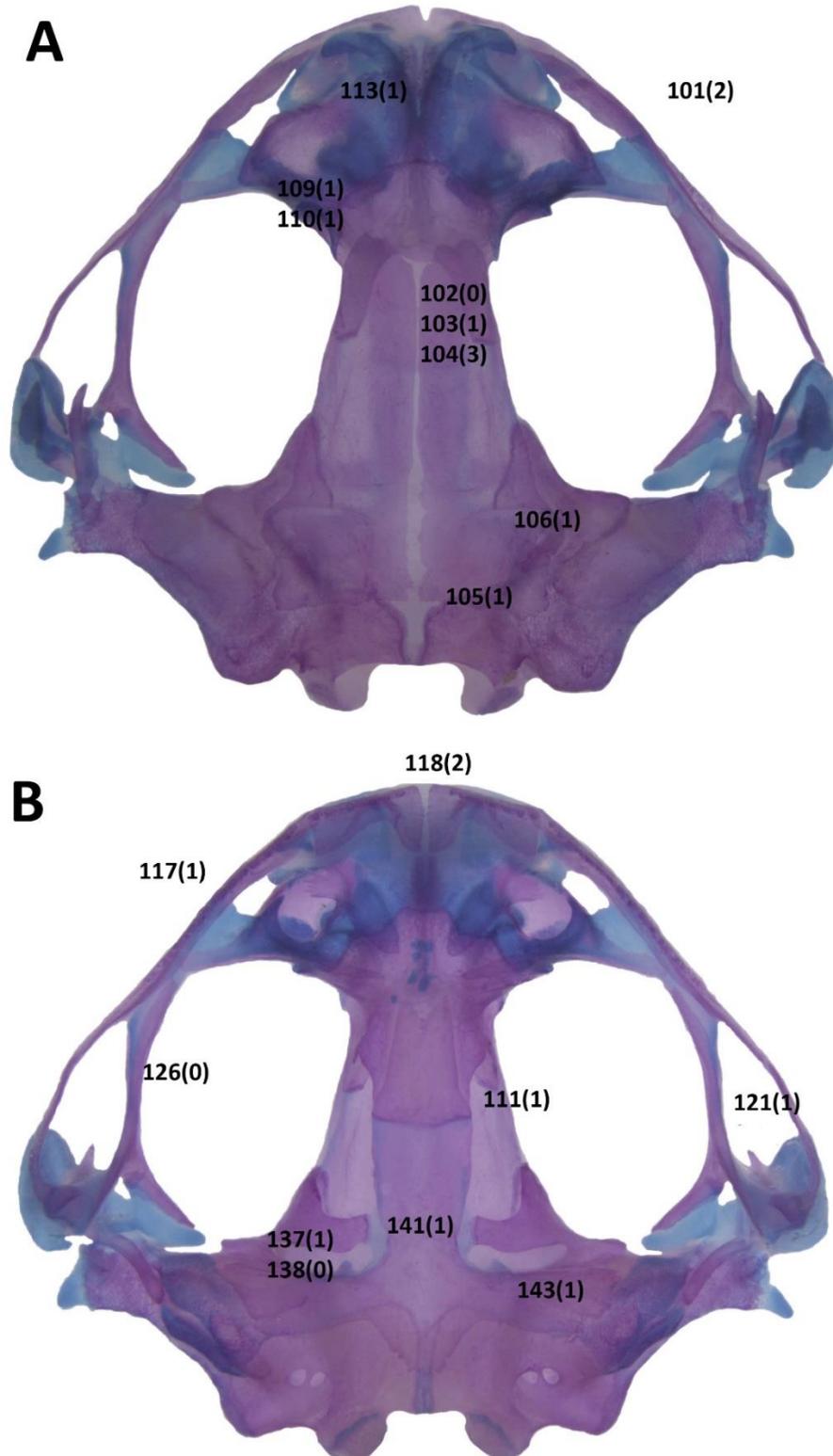


Figura 27. Crânio de *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469) em vistas A: dorsal e B: ventral.

139-144: Parasfenoide

O parasfenoide é um osso dérmico ventral, trirradial, normalmente com formato de T invertido, sendo composto por um processo cultriforme medial e dois processos alares laterais (Trueb 1973). Há, ainda, um processo posteriomedial, que pode ser muito reduzido, ou se estender até o tectum synoticum. Em espécies com alto grau de fusão entre os ossos, o processo cultriforme é indistinto.

139. Paraesfenoide, processo cultriforme: estreitamento anterior

0 ausente

1 presente (Figura 27)

140. Parasfenoide, processo cultriforme: formato da extremidade anterior

0 arredondada

1 triangular (Figura 25, 28A, 28B)

2 reta

141. Paraesfenoide, processo cultriforme: estreitamento posterior

0 ausente (Figura 27B)

1 presente (Figura 27A)

142. Parasfenoide, asa: constrição média, dando aspecto de garra

0 ausente

1 presente (Figura 25)

143. Parasfenoide, asas: orientação

0 posterodorsal (Figura 28B)

1 lateral, perpendicular ao eixo axial do crânio ou levemente inclinadas posterodorsalmente (Figura 27)

144. Parasfenoide, processo posteromedial: extensão em relação tectum synoticum
0 não alcança (Figura 27B)
1 alcança, ou fica muito próximo (Figura 25)

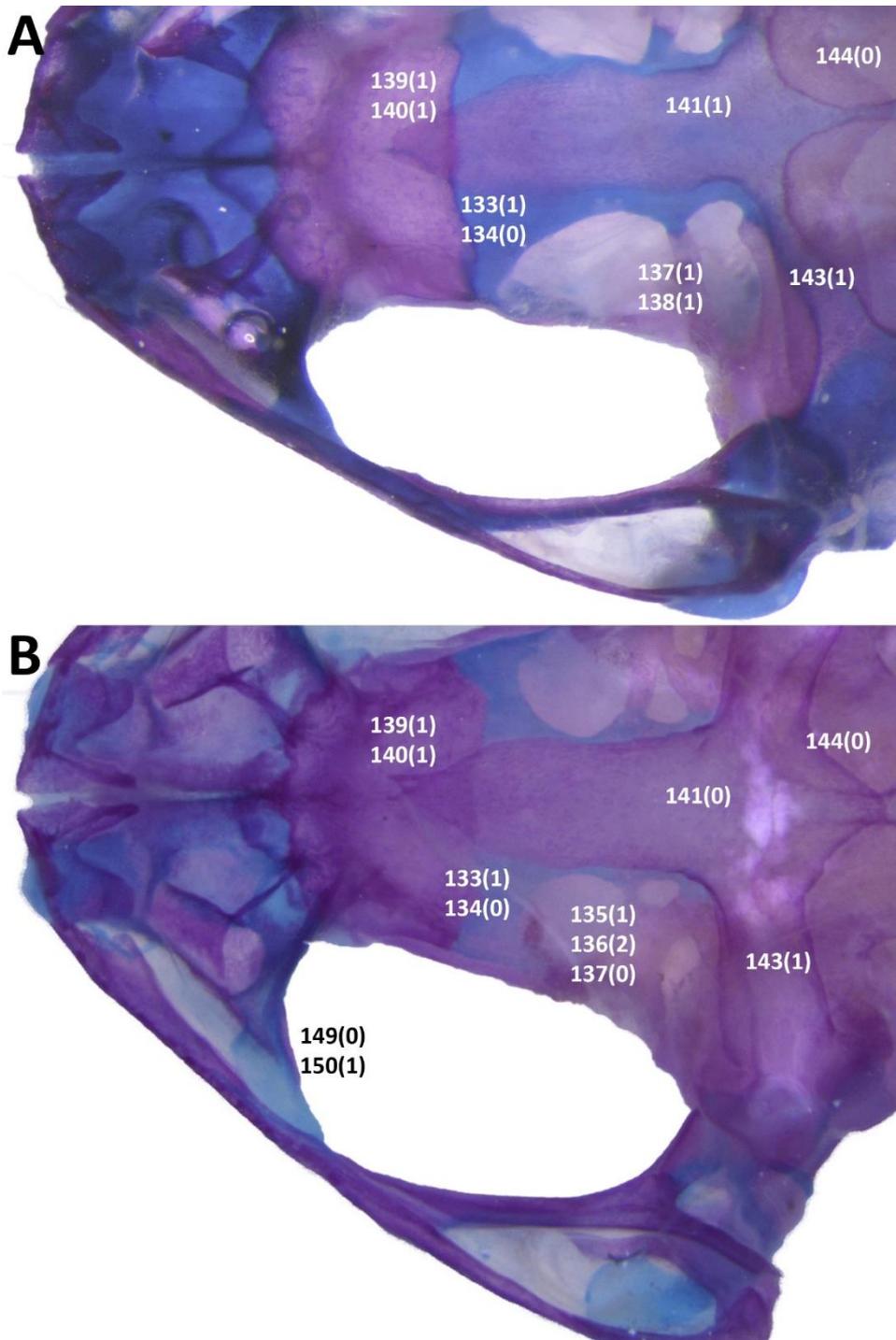


Figura 28. Detalhes do crânio de A: *Physalaemus spiniger* (CFBH 6330) e *Physalaemus moreirae* (UFMG 20314), vista ventral.

145-150: Neopalatinos

Os neopalatinos são ossos dérmicos pares, localizados na superfície ventral do planum antorbitale, na margem anteroventral da órbita (Trueb 1973). Nos anuros, os neopalatinos podem ser reduzidos ou ausentes.

145. Neopalatinos

0 ausentes

1 presentes

146. Neopalatinos: sobreposição ao esfenoetmoide ventralmente

0 ausente

1 presente

147. Neopalatinos: contato com o processo cultriforme do parasfenoide

0 ausente

1 presente

148. Neopalatinos: contato com pterigoides

0 ausente (Figura 28B, 29)

1 presente

Considerações: Considerei que o contato é ausente quando são claramente separados. Similar ao caráter 87 de de Sá *et al.* (2014).

149. Neopalatinos: contato com maxila

0 ausente (Figura 28B, 29)

1 presente (Figura 27A)

150. Neopalatinos: relação de distância com a maxila

0 proximamente relacionados (Figura 28)

1 distantes (Figura 27B)

151-154: Vômeres

Os vômeres são ossos dérmicos pares, e estão entre os mais variáveis do crânio (Trueb 1973). Na maior parte das espécies, os vômeres têm quatro processos: anterior, pré-coanal, pós coanal e posteromedial ou dentífero. O processo dentífero pode ou não portar dentes. Lynch (1971) considera que os vômeres são primitivamente grandes e portam dentes e sua redução ou perda é uma condição derivada. Além disso, pondera que a redução não indica necessariamente perda dos dentes vomerianos.

151. Vômer: contato com neopalatinos

0 ausente

1 presente

152. Vômeres: distância entre extremidades mediais

0 amplamente separados

1 muito próximos ou em contato

153. Vômer, processo anterior: contato com maxila

0 ausente

1 presente

154. Dentes vomerianos

0 ausente

1 presente

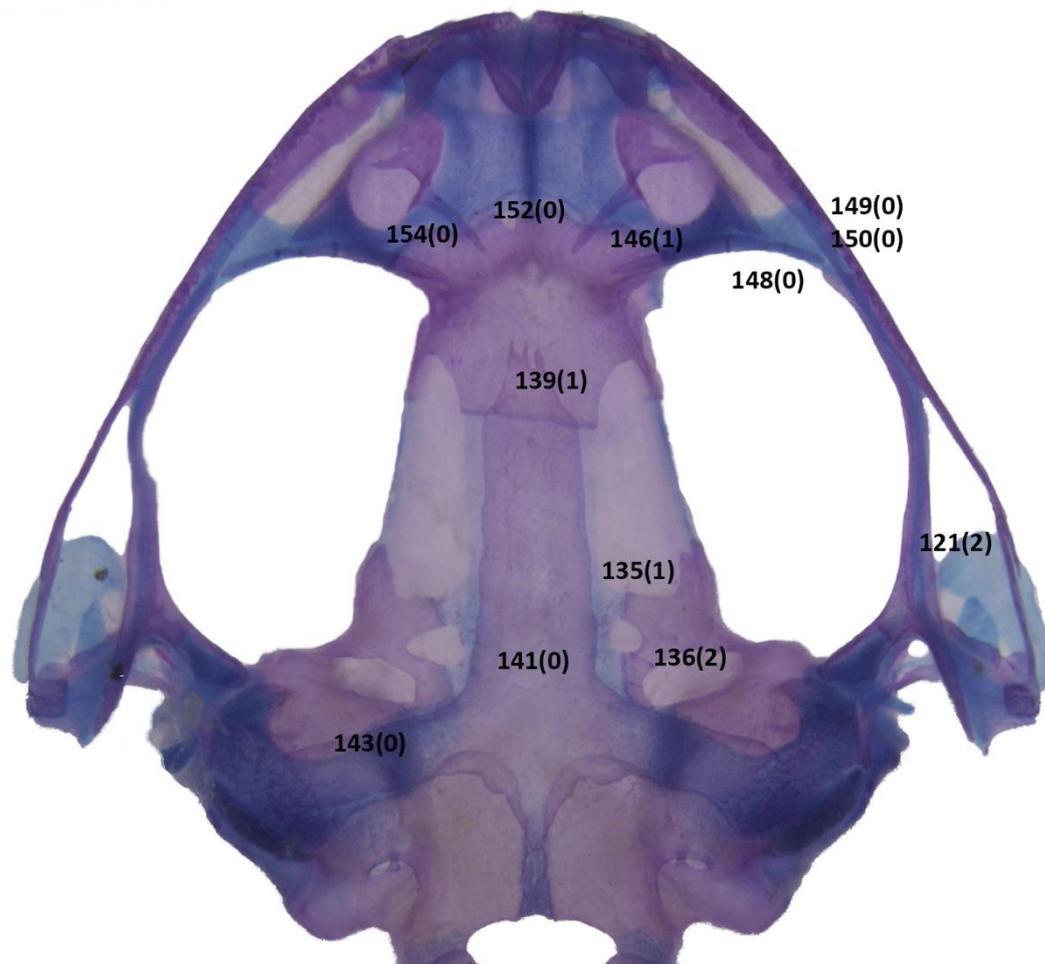


Figura 29. Crânio de *Physalaemus riograndensis* (UFMG 20194) em vista ventral.

155-168: Complexo hiolaringeal

O complexo hiolaringeal é formado por duas unidades: o aparato hiobranquial ou hioide e o aparato laringeal.

155-167: Aparato hiobranquial

No seu design básico, o aparato hiobranquial é formado pela placa do hioide, ligada à superfície ventral da cápsula ótica por um par de processos cartilagosos longos, finos e curvados, os hiais, que se originam da porção anterolateral da placa (Trueb 1993).

A margem anterior da placa do hioide é côncava, formando um sinus hioglossal, que acomoda a passagem do músculo hyoglossus da superfície ventral do hioide para a língua, dorsalmente (Trueb 1993). Os hiais podem possuir processos anteriores de diferentes formas, em seu ponto de curva. Além dos hiais, a placa hioide pode possuir processos anterolaterais, ou alares, processos posterolaterais e processos posteromediais. Todos os processos variam amplamente de forma, e os processos anterolaterais podem estar ausentes.

155. Hial, processo anterior

0 ausente

1 presente

156. Hial, processo anterior: comprimento em relação ao comprimento medial do corpo do hioide

0 curtos, de 16 a 22% (Figura 31)

1 medianos, de 23 a 30%

2 longos, acima de 30%

157. Hial, placa cartilaginosa

0 ausente

1 presente

158. Hial, placa cartilaginosa: início

0 adjacente ao processo anterior do hial (Figura 31)

1 na mesma linha longitudinal do processo anterolateral do hioide

159. Hial, orifício na placa cartilaginosa, lateralmente adjacente ao processo anterior

0 ausente (Figura 31)

1 presente (Figura 30)

160. Hioide, processo anterolateral

0 ausente

1 presente

161. Hioide, processo anterolateral: altura máxima em relação ao comprimento medial do corpo do hioide

0 estreito, de 31 a 50%

1 mediano, de 51 a 69% (Figura 31)

2 largo, de 70% a 89% (Figura 30)

3 muito largo, de 90 a 100%

162. Hioide, processo anterolateral: largura da base em relação à largura máxima

0 <50% (constricção)

1 a partir de 50%

163. Placa do hioide: comprimento medial em relação a largura mínima

0 maior (Figura 31)

1 menor

2 igual (Figura 30)

Considerações: Similar ao caráter 91 de Scott (2005) e ao caráter 95 de de Sá *et al.* (2014).

164. Hioide, processo posterolateral: prolongamento

0 presente

1 ausente

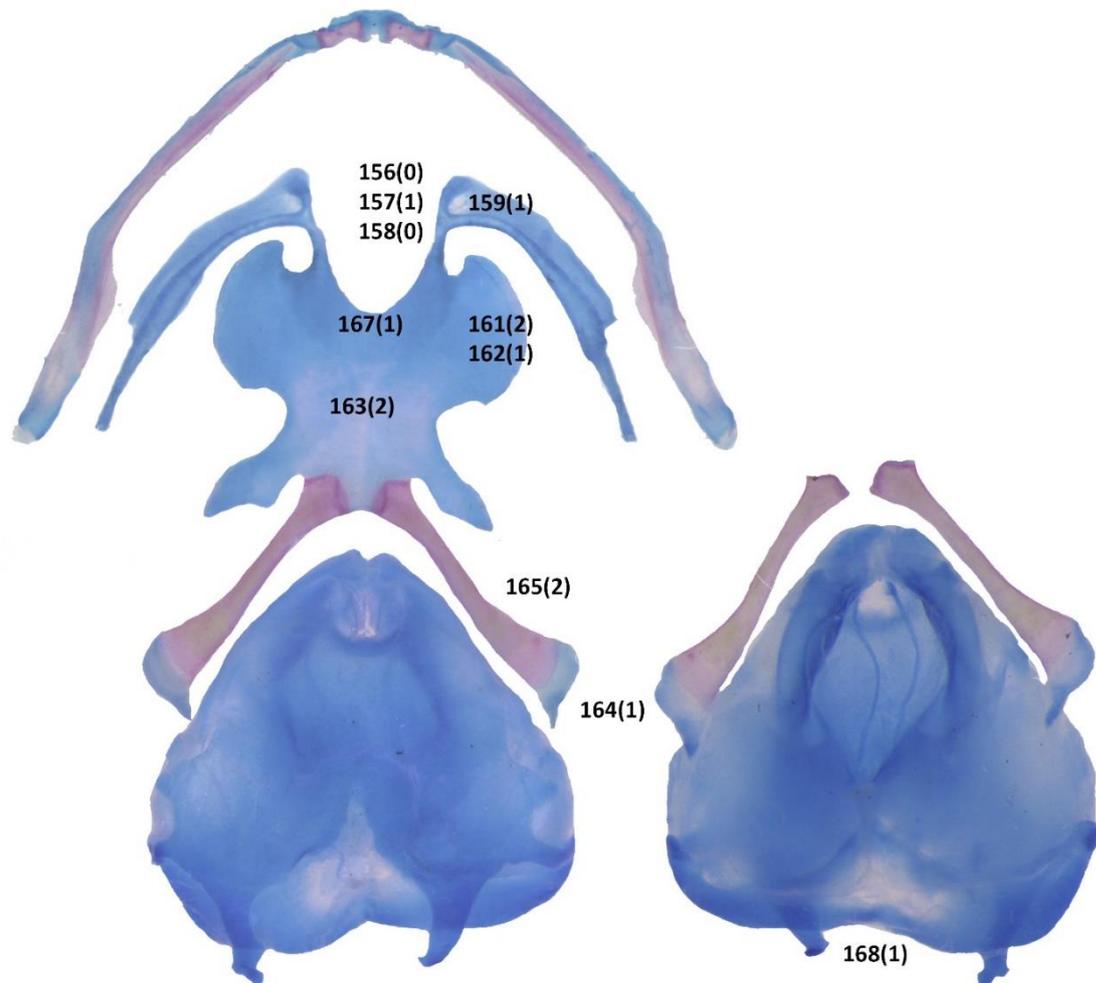


Figura 30. Mandíbula e aparato hiolaringeal de *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469), mostrando a laringe em vista dorsal e ventral, respectivamente.

165. Hioide, processo posteromedial: comprimento em relação ao comprimento medial do corpo do hioide (em machos)

0 curto, até 89% (Figura 31)

1 mediano, de 90% a 120%

2 longo, acima de 121% (Figura 30)

166. Hioide, processo anteromedial, dilatação lateral

0 ausente

1 presente

167. Sinus hioglossal: profundidade

0 raso, alcançando a extremidade do processo alar do hioide

1 medianamente profundo, alcançando aproximadamente o fim do primeiro terço do processo alar do hioide (Figura 30)

2 profundo, atingindo ou ultrapassando a metade do comprimento do processo alar do hioide (Figura 31)

168: Laringe

O aparato laringeal é composto por um par de cartilagens aritenoides, suportadas pela cartilagem cricoide. Associados à cricoide estão os processos branquial, esofágico e cardíaco.

168. Laringe, processo esofágico, região anterior: formato

0 V

1 U (Figura 30)

2 W (Figura 31)

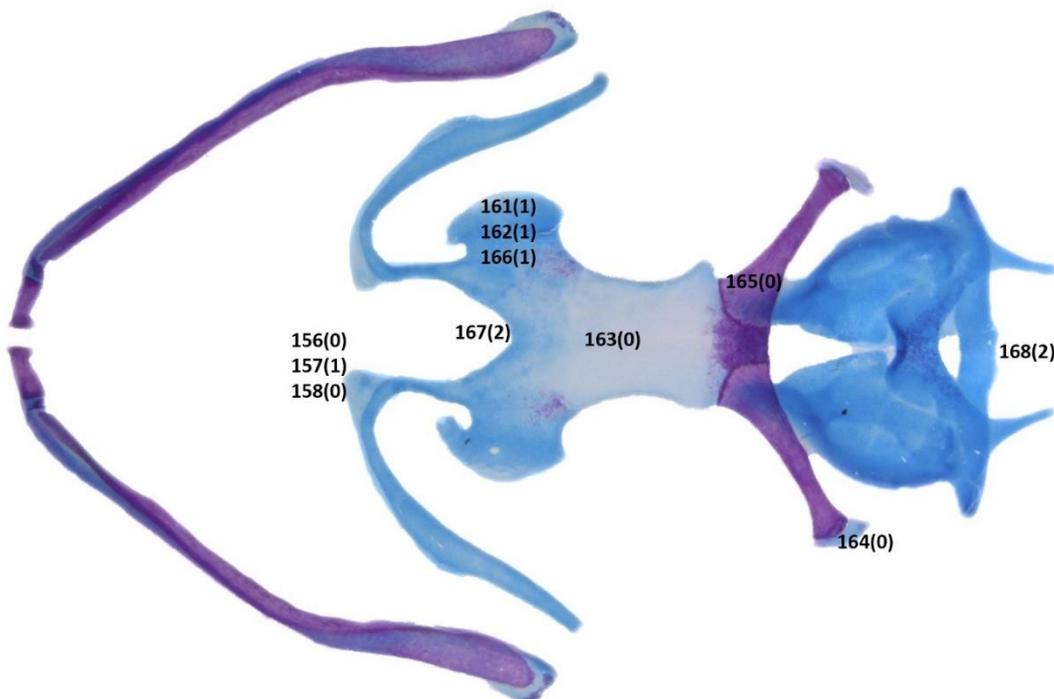


Figura 31. Mandíbula e aparato hiolaringeal de *Physalaemus signifer* (UFMG 4961).

169-176: Cintura peitoral

A cintura peitoral ou escapular reúne os elementos que sustentam a musculatura que movimenta principalmente os membros anteriores. Ela pode ser dividida em três regiões: dorsolateral (supraescápula), lateral (escápula, coracoide e clavícula), e ventral (omosterno, epicoracoide e esterno) (Duellman & Trueb, 1986).

A base primária para a divisão dos Anura por Cope (1865) e Boulenger (1882) foi a variação da arquitetura da cintura peitoral (Lynch 1971). As duas divisões, Arcifera e Firmisterna, se diferem pela forma de posicionamento e fusão dos epicoracoides, e foram amplamente aplicadas em classificações em Anura. Contudo, essa divisão não engloba toda a variação encontrada nas cinturas peitorais, e a tendência é que sejam divididas em um complexo de caracteres (Kaplan, 2004).

169. Epicoracoide: sobreposição (vista ventral)

0 direito sobre o esquerdo

1 esquerdo sobre direito (Figura 32)

170. Epicoracoides: grau de sobreposição

0 levemente sobreposto (até metade da largura do epicoracoide) (Figura 32)

1 sobrepondo-se completamente, ou ultrapassando o limite lateral do epicoracoide adjacente, formando uma grande fenestra peitoral

171. Cleitro

0 não bifurcado

1 bifurcado (Figura 33)

172-176: Esterno

O esterno, ou xifisterno, é um elemento plano, usualmente cartilaginoso, associado à parte posteromedial da cintura peitoral (Trueb 1973). Ocasionalmente, o esterno tem um formato delgado, com uma porção expandida posterior; nesse caso, é referido como mesosterno e a parte posterior como xifisterno (Trueb 1973). Nos Leptodactylidae, a forma do mesosterno e do xifisterno variam amplamente.

172. Mesosterno: divisão na porção anterior

0 ausente (Figura 32)

1 presente (Figura 33)

Considerações: Considerei ausente quando não há indícios de divisão, ou quando há apenas uma linha de sutura medial. Similar ao caráter 110 de de Sá *et al.* (2014).

173. Mesosterno: divisão na porção posterior

0 ausente

1 presente (Figura 33)

174. Mesosterno: estreitamento no comprimento médio

0 ausente (Figura 32)

1 presente (Figura 33)

Considerações: Nas espécies analisadas, o mesosterno pode ter largura constante em todo seu comprimento ou ter um estreitamento no comprimento médio.

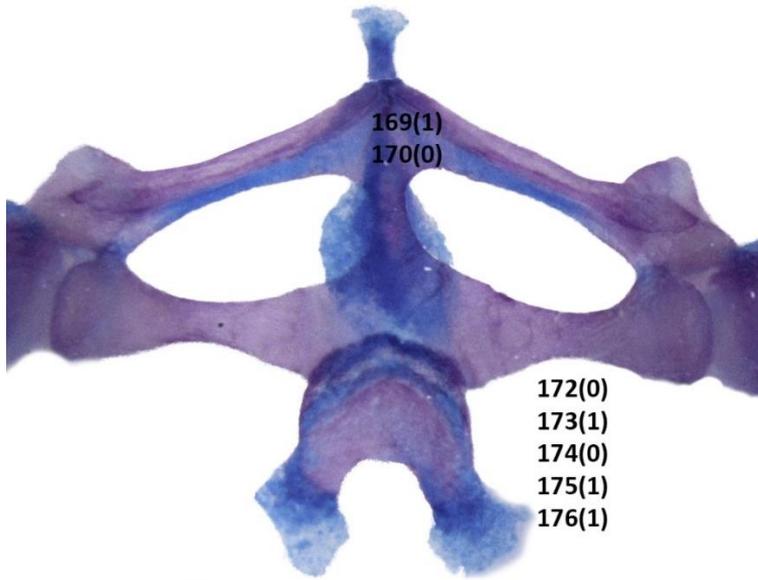


Figura 32. Detalhes dos epicoracoides e esterno de *Physalaemus deimaticus* (UFMG 16771).

175. Xifisterno: divisão medial

0 ausente

1 presente (Figura 33)

176. Xifisterno: extensão da divisão medial

0 incompleta

1 completa (Figura 33)

Considerações: Em alguns indivíduos, o xifisterno é majoritariamente dividido, mas uma conexão na porção anteromedial pode ser observada.

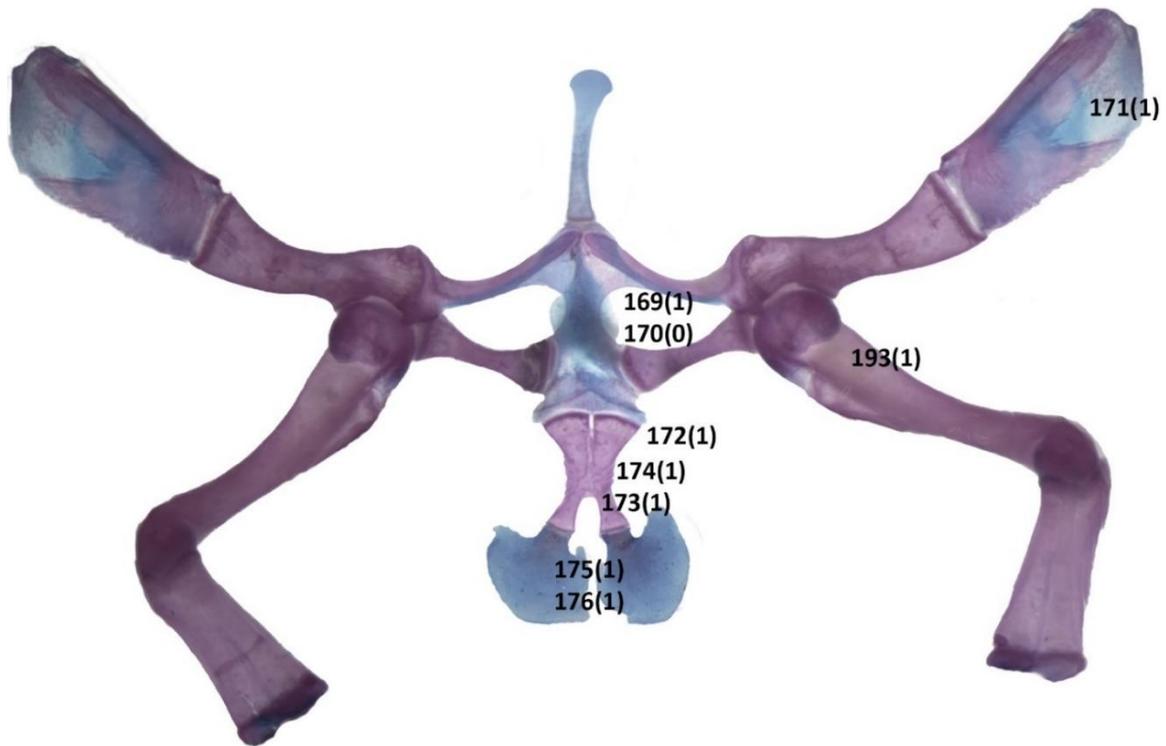


Figura 33. Cintura peitoral de *Physalaemus biligonigerus* (UFMG 18539) em vista ventral, com todas as partes flexionadas para o plano ventral.

177-184: Esqueleto axial

O esqueleto axial fornece um eixo longitudinal de apoio ao crânio, vísceras e esqueleto apendicular, pelo qual passa a medula espinhal. Nos Leptodactylidae, é formado pela coluna vertebral e processos laterais. Todas as oito vértebras, à exceção da primeira, são formadas por um centro vertebral, um arco neural, zigapófises e um par de processos transversos. A orientação dos processos transversos das vértebras varia amplamente nas espécies estudadas.

177. Vértebra pré-sacral II, processo transverso: orientação

0 anterolateral (Figura 34)

1 lateral

2 posterolateral

178. Vértebra pré-sacral III, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral (Figura 34)
 - 1 lateral
 - 2 posterolateral
179. Vértebra pré-sacral IV, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral
 - 1 lateral
 - 2 posterolateral (Figura 34)
180. Vértebra pré-sacral V, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral
 - 1 lateral
 - 2 posterolateral (Figura 34)
181. Vértebra pré-sacral VI, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral
 - 1 lateral (Figura 34)
 - 2 posterolateral
182. Vértebra pré-sacral VII, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral
 - 1 lateral
 - 2 posterolateral (Figura 34)
183. Vértebra pré-sacral VIII, processo transversos: orientação
- 0 anterolateral (Figura 34)
 - 1 lateral
 - 2 posterolateral

184. Vértebra IV, processo transverso: expansão

0 ausente

1 presente (Figura 34)



Figura 34. Coluna axial de *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469) em vista dorsal.

185-200: Apêndices

185-199: Membros anteriores

Os longos ossos dos membros anteriores são constituídos pelo úmero, proximalmente, e pela rádio-ulna distalmente (Trueb 1973). O úmero de machos é frequentemente modificado com adição de grandes cristas em comparação às fêmeas da mesma espécie, por, presumivelmente, permitir uma maior área para fixação de musculatura adicional (Trueb 1973).

185. Pré-pólex: elementos distais: número

0 dois

1 três

2 quatro

3 um

186. Pré-pólex, segundo elemento, segmento lateral adjacente

0 ausente

1 presente

187. Pré-pólex, segmento distal: formato da extremidade

0 arredondado

1 triangular

188. Falange terminal do dedo III: formato

0 em forma de maçaneta (Figura 35C)

1 redondas

2 T (Figura 35B)

189. Falange terminal do dedo III: bifurcação medial

0 ausente

1 presente (Figura 35A)

Considerações: Por considerar a possibilidade de cada falange variar de forma independente, mas não ter encontrado variação entre os dedos, codifiquei o caráter apenas para o dedo III.

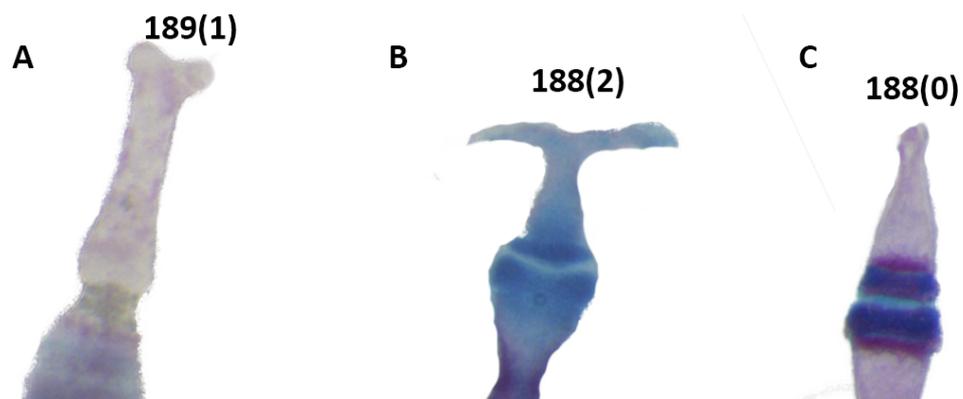


Figura 35. Falanges terminais de A: *Pseudopaludicola falcipes* (UFMG 2781), B: *Crossodactylodes itambe* (UFMG 14036) e C: *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469).

190. Falange distal do dedo II: redução
- 0 ausente
 - 1 presente
191. Úmero, crista ventral (em machos)
- 0 ausente
 - 1 presente
192. Úmero, crista ventral (em fêmeas)
- 0 ausente
 - 1 presente
193. Úmero, crista ventral em machos: extensão
- 0 menos de 1/3 do comprimento do úmero (Figura 36A)
 - 1 entre 1/3 e 2/3 do comprimento do úmero (Figura 33)
 - 2 todo o comprimento do úmero
194. Úmero, crista medial em machos
- 0 ausente
 - 1 presente
195. Úmero, crista medial em machos: grau de desenvolvimento
- 0 rudimentar
 - 1 moderadamente desenvolvida (Figura 36B)
 - 2 muito desenvolvida
196. Úmero, crista medial em machos: extensão
- 0 menos de 1/3 do comprimento do úmero
 - 1 entre 1/3 e 2/3 do comprimento do úmero (Figura 36A)
 - 2 todo o comprimento do úmero

197. Úmero, crista lateral em machos

0 ausente

1 presente

198. Úmero, crista lateral em machos: grau de desenvolvimento

0 rudimentar

1 moderadamente desenvolvida (Figura 36B)

2 muito desenvolvida

199. Úmero, crista lateral em machos: extensão

0 menos de 1/3 do comprimento do úmero

1 entre 1/3 e 2/3 do comprimento do úmero (Figura 36B)

2 todo o comprimento do úmero

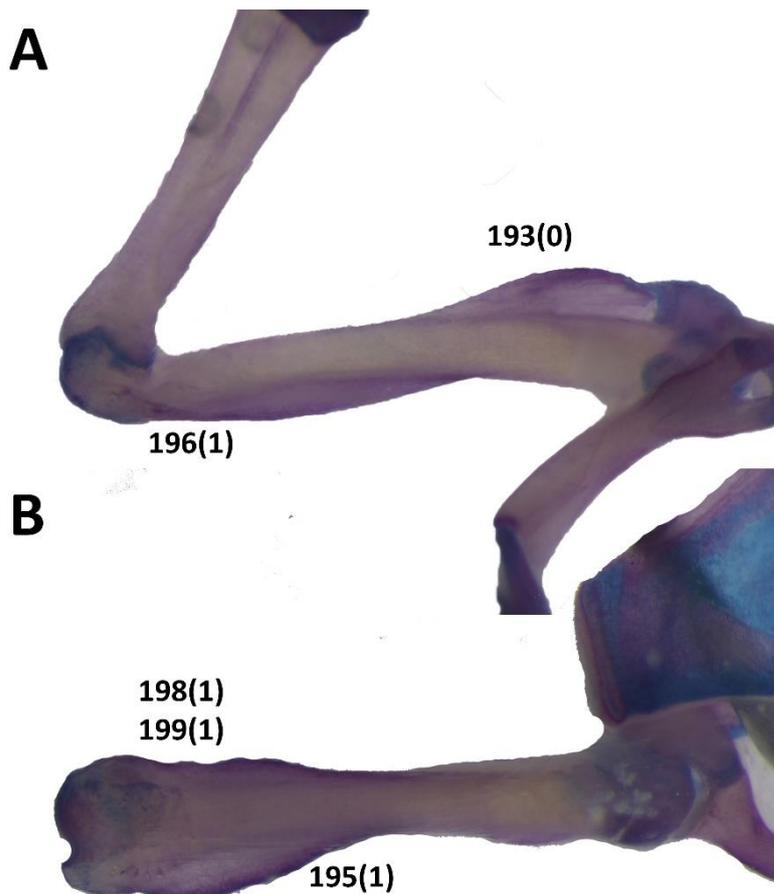


Figura 36. Úmero de *Physalaemus atlanticus* (CFBH 4311) vista A: medial e B: dorsal.

200. Elementos distais do pré-hálux: número

0 um

1 dois

2 três

ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A análise de evidência total (AET) recuperou duas árvores igualmente parcimoniosas, com 10821 passos (Figura 38), enquanto a análise com apenas dados moleculares (ADM) recuperou 39 árvores igualmente parcimoniosas com 9821 passos (Figura 37). Ambas as análises recuperaram a monofiletismo do gênero *Physalaemus*, assim como os demais gêneros amostrados. *Physalaemus* foi recuperado como grupo irmão de (*Engystomops Edalorhina*). O relacionamento próximo de *Pleurodema* com o clado composto por *Physalaemus*, *Engystomops* e *Edalorhina* previamente inferido por Pyron and Wiens (2011), Faivovich *et al.* (2012), Fouquet *et al.* (2013) e Lourenço *et al.* (2015) foi recuperado nestas análises. *Pseudopaludicola* foi recuperado como grupo irmão dos demais Leiuperinae apenas na AET, embora com baixo suporte. Na ADM, o agrupamento do gênero foi ambíguo, resultando em uma politomia na base dos Leptodactylidae na árvore de consenso estrito. A subfamília Paratelmatoibiinae (sensu Fouquet *et al.* 2013), não foi recuperada em nenhuma das análises. Na árvore de consenso estrito da AET, *Rupirana* se encontra em uma politomia na base de Leptodactylidae. Na ADM, *Rupirana* é recuperada como grupo irmão de *Leptodactylus*.

As relações entre as espécies de *Physalaemus* inferidas nas duas análises foram bastante congruentes (Figura 37 e Figura 38). A AET (Figura 38) recuperou, embora com baixo suporte, o grupo de *P. signifer*, como proposto por Nascimento *et al.* (2005), com *P. maculiventris* na base do clado. Já na ADM (Figura 37), seu posicionamento foi

ambíguo na base do grupo de *P. signifer* e na base do grupo de *P. deimaticus*, resultando em uma politomia. *Physalaemus nattereri* ficou na base deste clado composto pelos grupos de *Physalaemus deimaticus* e de *Physalaemus signifer*.

Physalaemus aguirrei ficou posicionado na base de um clado formado pelo grupo de *P. biligonigerus* + grupo de *P. olfersii* + grupo *P. gracilis* (sensu Lourenço *et al.* 2015) nas duas análises. Na AET, o grupo de *P. biligonigerus* foi recuperado como grupo irmão do grupo de *P. gracilis*. Já na ADM, os três grupos aparecem em uma politomia no consenso estrito, devido à ambiguidade no agrupamento de grupo de *P. gracilis* + grupo de *P. olfersii* em algumas das árvores mais parcimoniosas. O grupo de *P. biligonigerus* (sensu Lourenço *et al.* 2015) foi recuperado, embora com baixo suporte, apenas na análise de evidência total, já que *Physalaemus riograndensis* teve o posicionamento ambíguo entre as árvores mais parcimoniosas inferidas na ADM, resultando em uma politomia na base dos cladogramas correspondentes aos grupos de *P. gracilis* + grupo de *P. olfersii* + grupo de *P. biligonigerus*. *P. cicada* foi recuperado em ambas as análises com relativamente alto suporte na base do clado composto por *P. aguirrei* + grupo de *P. biligonigerus* + grupo de *P. olfersii* + grupo de *P. gracilis*. *P. henselii* ficou posicionado na base deste clado na AET, com baixíssimo suporte (Figura 38). Na ADM, foi ambigualmente posicionado também na base do grupo de *P. cuvieri*, resultando em uma politomia no consenso estrito (Figura 37). *Physalaemus cuvieri* foi parafilético com relação a *P. ephippifer* em ambas as análises.

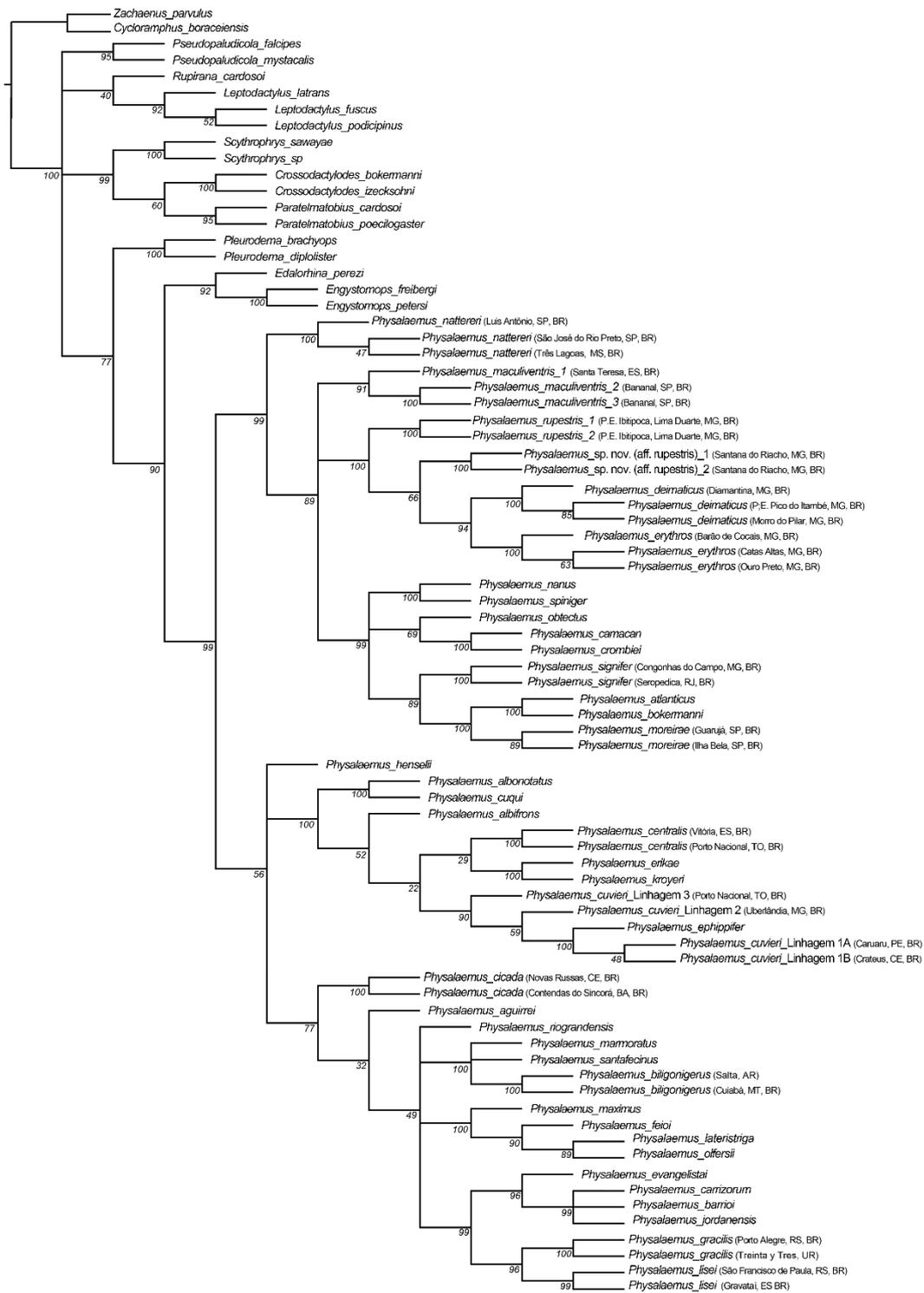


Figura 37: Consenso estrito das 39 árvores mais parcimoniosas (9821 passos), somente com dados moleculares. Os números correspondem valores de suporte de bootstrap. L, linhagem. Os estados brasileiros e países estão representados pelas siglas oficiais. BR Brasil, AR Argentina UR Uruguai.

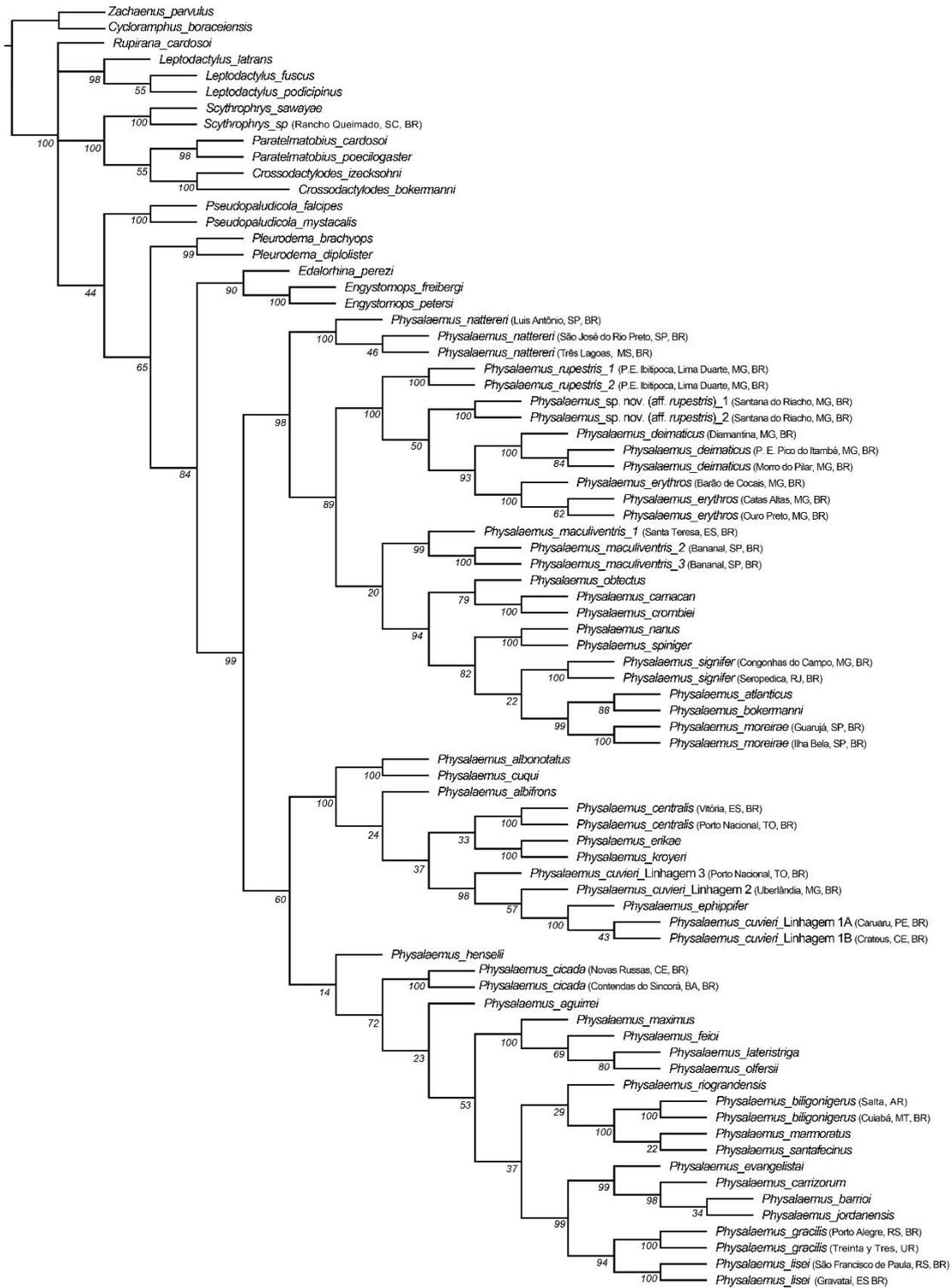


Figura 38: Consenso estrito das 2 árvores mais parcimoniosas (10821 passos) da matriz de evidência total. Os números correspondem valores de suporte de bootstrap. Os estados brasileiros estão representados pelas siglas oficiais. BR Brasil, AR Argentina UR Uruguai.

A composição de clados encontrada na análise de evidência total é apresentada abaixo, com os relacionamentos em notação parentética, seguida das transformações fenotípicas não-ambíguas que suportaram os clados, segundo a topologia do consenso estrito da AET. As transformações fenotípicas estão apresentadas com o número do caráter na matriz, seguido da transformação. As espécies, quando recuperadas monofiléticas, são apresentadas apenas uma vez.

Clado de *P. signifer*

(*P. nattereri* (*P. maculiventris* ((*P. rupestris* (*P. sp. nov. aff. rupestris* (*P. erythros* *P. deimaticus*)))) ((*P. camacan* *P. crombiei*) *P. obtectus*) ((*P. signifer* (*P. moreirae* (*P. atlanticus* *P. bokermanni*))) (*P. nanus* *P. spiniger*))))))

- Fímbria na margem pré-axial do artelho IV moderadamente desenvolvida (12: 0>1)
- Extensão máxima da calosidade nupcial de machos na falange: toda falange proximal (21: 0>1)
- Tubérculo tarsal ausente (36: 1>0)
- Fibras do m. geniohyoideus medialis em contato medial somente próximo à sua origem (73: 1>0)
- Presença de dentes maxilares (116: 1>0)
- Processo anterolateral (alar) do hioide largo (altura máxima de 70% a 89% do comprimento medial do corpo do hioide) (161: 0>2)

Grupo de *P. deimaticus*

(*P. rupestris* (*P. sp. nov. aff. rupestris* (*P. erythros* *P. deimaticus*)))

- Macroglândulas inguinais discoidais e achatadas (52: 0>2)
- M. interhyoideus em machos esticado (70: 1>0)
- Testículo maduro despigmentado (95: 1>0)
- Testículo maduro pequeno em relação aos rins (comprimento aprox. 1/3 do comprimento dos rins (96: 1>0)

Grupo de *P. signifer*

(*P. maculiventris* (((*P. obtectus* (*P. crombiei* *P. camacan*)) ((*P. spiniger* *P. nanus*) (*P. signifer* (*P. moreirae* (*P. bokermanni* *P. atlanticus*))))))

- Confluência dos forames proótico e oculomotor (137: 0>1)
- Altura máxima do processo anterolateral (alar) do hioide de 51 a 69% do comprimento medial do corpo do hioide (processo anterolateral de altura mediana) (161: 2>1)

Clado de *P. cuvieri*

((*P. henselii* (((*P. cuqui* *P. albonotatus*) (((*P. albifrons* (*P. erikae* *P. kroyeri*)) *P. centralis*) (*P. cuvieri* L3 (*P. cuvieri* L2 (*P. ephippifer* *P. cuvieri* L1)))))) (*P. cicada* (*P. aguirrei* (((*P. olfersii* (*P. feioi* *P. lateristriga*)) *P. maximus*) ((*P. riograndensis* (*P. marmoratus* (*P. biligonigerus* *P. santafecinus*))) (((*P. lisei* *P. gracilis*) ((*P. barrioi* *P. jordanensis*) *P. carrizorum*) *P. evangelistai*))))))

- Linha vertebral urostilar presente (63: 0>1)
- Inserção do m. extensor digitorum communis longus no metacarpal III ausente (86: 1>0)

- Segmento lateral adjacente ao segundo elemento do pré-pólex presente 186: 0>1

Grupo de *Physalaemus cuvieri*

((*P. cuqui* *P. albonotatus*) (((*P. albifrons* (*P. erikae* *P. kroyeri*)) *P. centralis*) (*P. cuvieri* L3 (*P. cuvieri* L2 (*P. ephippifer* *P. cuvieri* L1))))

- Margem posterior do m. interhyoideus em machos atingindo a porção posterior do m. deltoideus (71: 0>3)
- Lobo direito do fígado menor que o lobo esquerdo (93: 2>1)
- Hioide: processo anterolateral (alar): altura máxima em relação ao comprimento medial do corpo do hioide (161: 0>1)

Grupo de *Physalaemus gracilis*

(((*P. lisei* *P. gracilis*) ((*P. barrioi* *P. jordanensis*) *P. carrizorum*) *P. evangelistai*))

- Segmento lateral adjacente ao segundo elemento do pré-pólex ausente (186:1>0)

Grupo de *Physalaemus biligonigerus*

(*P. riograndensis* (*P. marmoratus* (*P. biligonigerus* *P. santafecinus*)))

- Faixa escura dorsolateral ausente (58: 1>0)
- Alargamento das juntas inter-frontoparietais apenas na extremidade anterior (104: 2>3)
- Sinus hioglossal medianamente profundo (167: 2>1)
- Processo transversal da vértebra pré-sacral III direcionado anterolateralmente (178: 1>0)

P. biligonigerus + P. marmoratus + P. santafecinus

(P. biligonigerus (P. marmoratus P. santafecinus))

- Artelho III e IV com fímbrias moderadamente desenvolvidas (10: 0>1 e 12: 0>1)
- Prega supratimpânica moderadamente desenvolvida (27: 0>1)
- Tubérculo metatarsal interno queratinizado (30: 0>1) e elíptico (31: 1>0)
- Macrogândulas inguinais globulares e muito destacadas em vista externa (52: 2>1)
- Pigmentação do abdômen ausente (60: 1>0)
- Todas as fibras do m. petrohyoideus anterior inseridas no corpo do hioide (77: 1>0)
- Articulação quadradojugal-maxila na altura do comprimento médio da órbita (121: 1>0)
- Forame proótico encerrado parcialmente por cartilagem e parcialmente pelo proótico, (136: 2>1)
- Extremidade anterior do processo cultriforme do parasfenoide reta (140: 1>2)
- Asas do parasfenoide orientadas latero-lateralmente (143: 0>1)
- Neopalatinos em contato com pterigoides (148: 0>1)
- Processo anterior do hial curto (comprimento entre 16% e 22% do comprimento medial do corpo do hioide) (156:2 >0)
- Placa cartilaginosa do hial presente (157: 0>1)
- Processo anterolateral do hioide largo (altura máxima de 70 a 89% do comprimento medial do corpo do hioide) (161: 0>2)
- Placa do hioide tão longa quanto larga (163: 0>2)
- Prolongamento do processo posterolateral do hioide presente: 164: 0>1)

- Processo posteromedial do hioide longo (acima de 121% do comprimento medial do corpo do hioide) (165: 1>2)
- Crista medial do úmero estendendo-se por 1/3 a 2/3 do comprimento do úmero (196: 0>1)

Grupo de *Physalaemus olfersii*

(*P. maximus* (*P. feioi* (*P. lateristriga* *P. olfersii*)))

- Calosidade nupcial na falange ausente (20:1 >0)
- Prega supratimpânica ausente (26: 1>0)
- Macrogândulas inguinais indistinguíveis (51: 1>0)
- Lobo direito do fígado maior que o esquerdo (93: 2>0)
- Divisão medial do xifisterno incompleta (176: 1>0)
- Processo transversal da vértebra pré-sacral II direcionado anterolateralmente (177: 1>0)
- Processo transversal da vértebra pré-sacral V direcionado lateralmente (180: 2>1)

4. DISCUSSÃO

A configuração dos clados e a evolução dos caracteres fenotípicos mais relevantes é discutida a seguir.

Clado de *Physalaemus signifer*

Um clado contendo as espécies correspondentes ao grupo de *Physalaemus signifer*, e ao grupo de *P. deimaticus*, além de *P. nattereri* foi recuperado com alto suporte

nas análises. Apesar de *Physalaemus nattereri* ter sido historicamente colocado em outro gênero (*Eupemphix*) a partir de análises morfológicas (e.g. Nascimento *et al.* 2005), minhas análises corroboram o agrupamento da espécie no clado de *P. signifer*. Seis sinapomorfias morfológicas foram encontradas suportando este agrupamento, e as mais relevantes são discutidas a seguir:

Dentes maxilares

A presença de dentes maxilares foi historicamente utilizada como característica para separar o gênero *Physalaemus* de *Eupemphix*. Lynch (1970) foi o primeiro a contestar que o particionamento baseado nessa característica estaria genericamente separando espécies proximamente relacionadas, e que a variação desse caráter era discordante dentro dos gêneros. Nascimento *et al.* (2005) notou a ausência de dentes maxilares em todas as espécies que foram associadas em seu trabalho aos grupos de *P. signifer* e *P. deimaticus*. Contudo, diversos autores reportaram a presença de dentes maxilares em espécies do grupo de *P. signifer* (Cardoso & Haddad 1985, Heyer 1985, Heyer & Wolf 1989, Pombal & Madureira 1997, Haddad & Sazima 2004, Pimenta *et al.* 2005, Weber *et al.* 2005, Cruz *et al.* 2007). Em minhas análises, encontrei dentes maxilares em todas as espécies associadas ao grupo de *P. signifer* (sensu Nascimento *et al.* 2005), exceto *P. maculiventris* e *P. nanus*. Os dentes maxilares foram considerados ausentes quando não encontrei qualquer vestígio dessas estruturas, analisando os crânios dos exemplares diafanizados.

Considerando presença de dentes maxilares em *Edalorhina*, *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*, além de algumas espécies de *Engystomops* (Lynch, 1970; Lobo, 1995; Ron *et al.*, 2006), a perda de dentes maxilares é secundária no gênero.

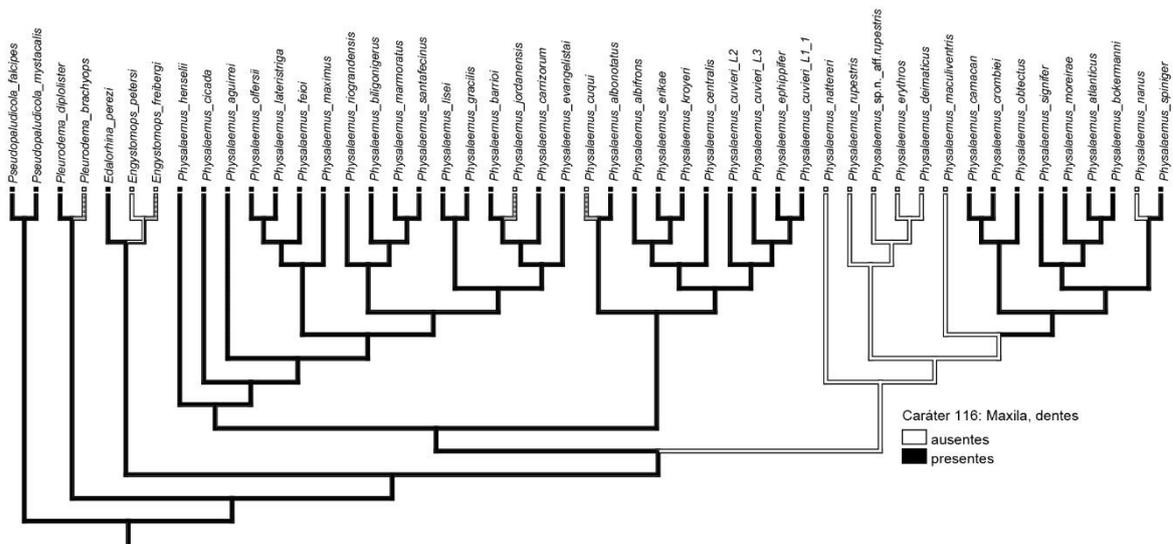


Figura 39. Mapeamento dos estados do caráter 116: dentes maxilares em Leiperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.

Na otimização não-ambígua na árvore de consenso da análise de evidência total, a ausência de dentes maxilares (116: 1>0) aparece como sinapomorfia do clado de *Physalaemus signifer* (Figura 39) e como autapomorfia de *P. nanus*. Contudo, análises de microscopia eletrônica de varredura serão realizadas para verificar se quaisquer vestígios de dentes maxilares estão presentes em exemplares de *P. nattereri*, *P. maculiventris*, *P. nanus* e *Physalaemus* do grupo de *P. deimaticus*, considerando a pequena probabilidade da estrutura ter sido perdida, aparecendo novamente no clado de *P. signifer*.

Tubérculo tarsal

Lourenço *et al.* (2015) considera que o tubérculo tarsal claramente permite separar as espécies de *Physalaemus* em dois grandes clados: clado de *P. signifer* e clado de *P. cuvieri*, sendo ambíguo apenas no grupo de *P. olfersii*. Contudo, os autores ponderam que apesar de ser utilizado para definir grandes grupos em *Physalaemus* e *Engystomops*, a

otimização deste caráter nos Leiuperinae é ambígua. Contudo, a transformação 32: 1>0 (tubérculo tarsal ausente) foi recuperada como uma sinapomorfia do clado de *P. signifer*, e, portanto reforçamos a importância deste caráter para o grupo.

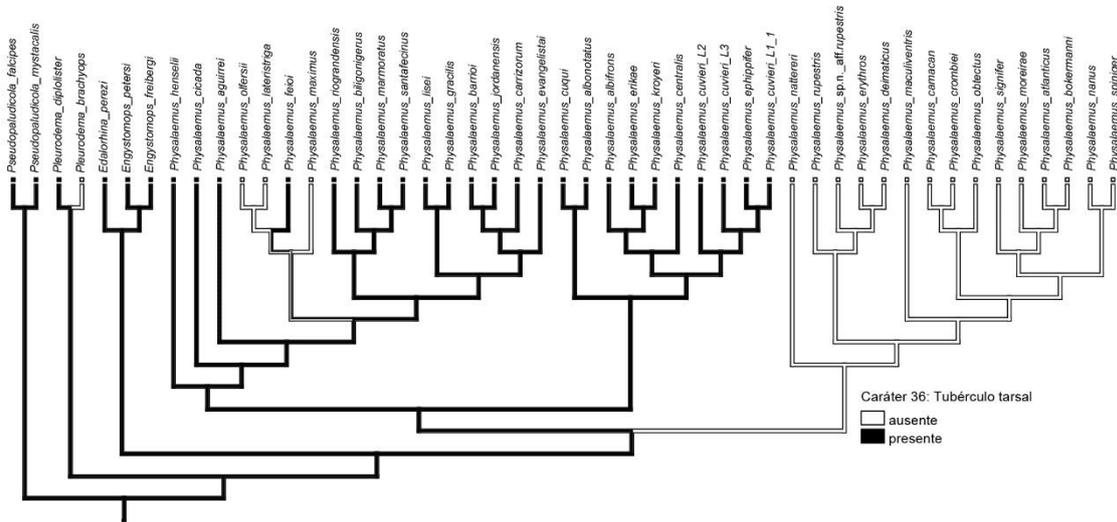


Figura 40. Mapeamento dos estados do caráter 36: tubérculo tarsal, em Leiuperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade.

Calosidade Nupcial

A extensão da calosidade nupcial varia grandemente em *Physalaemus*, mas 3 estados discretos foram codificados e parecem refletir bem a variação dentro do grupo. Nos *Physalaemus* do clado de *P. signifer*, a calosidade nupcial se estende por toda a falange proximal (21: 0>1). Em *P. signifer* e *P. spiniger*, o caráter foi ambíguo, uma vez que em alguns indivíduos das duas espécies, as asperezas podem se estender até a falange distal.

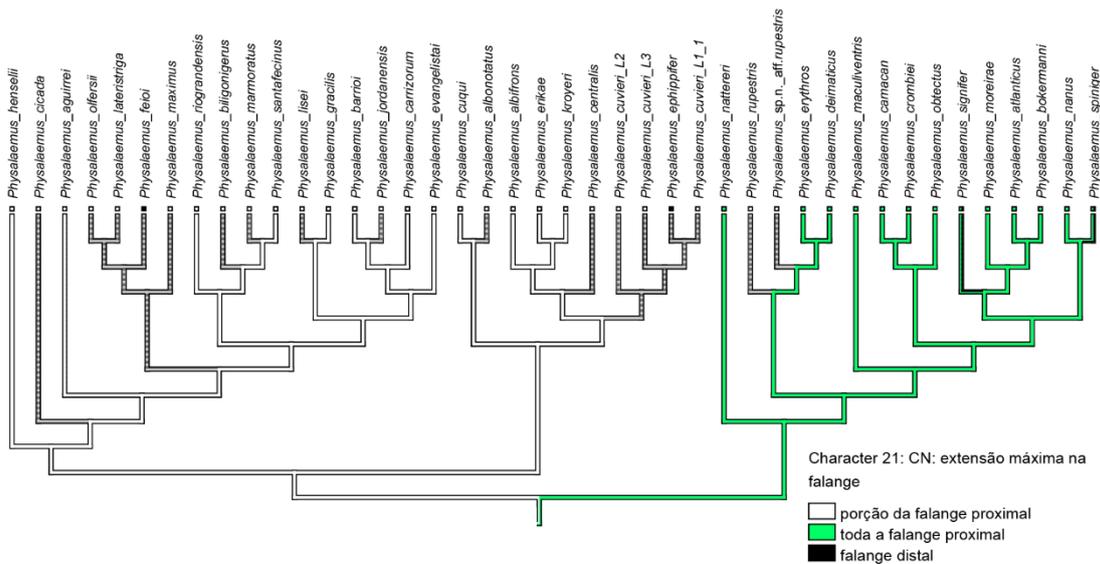


Figura 41. Mapeamento dos estados do caráter 21: extensão máxima da calosidade nupcial de machos na falange em *Physalaemus*. As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica falta de dados para o clado.

Grupo de *Physalaemus signifer*

O grupo de *Physalaemus signifer* como proposto por Nascimento *et al.* (2005) foi recuperado, embora com baixo suporte na análise de evidência total, enquanto não foi recuperado na análise com apenas dados moleculares. *Physalaemus maculiventris* possui algumas características compartilhadas com os *Physalaemus* agrupados no grupo de *P. signifer*, incluindo duas sinapomorfias morfológicas não-ambíguas. A mais relevante é a confluência dos foramens prótico e oculomotor (137: 0>1), encontrado somente em espécies deste clado, além de algumas espécies do grupo de *P. biligonigerus*. Possivelmente, essas sinapomorfias morfológicas contribuíram para o agrupamento da espécie no grupo, ainda que com suporte muito baixo.

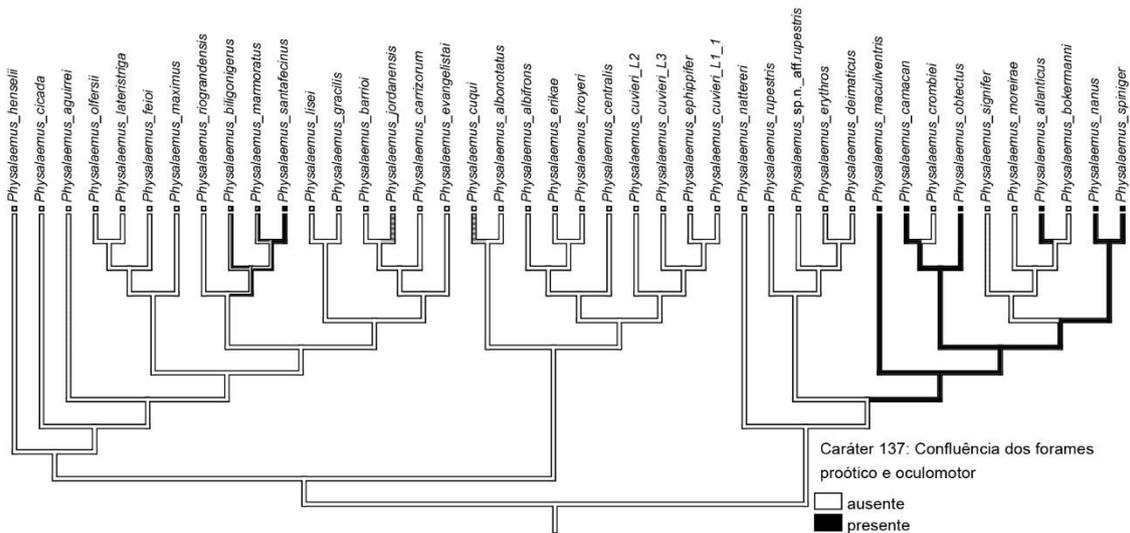


Figura 42. Mapeamento dos estados do caráter 137: confluência dos forâmens proótico e oculomotor em *Physalaemus*. As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica falta de dados para o clado.

Grupo de *Physalaemus deimaticus*

Os *Physalaemus* do grupo de *P. deimaticus* têm distribuição restrita a áreas de altitude da porção mineira do Espinhaço (Lourenço *et al.* 2015, Frost 2019) e possuem diversas características em comum, dentre 4 sinapomorfias morfológicas não-ambíguas, recuperadas para a topologia da árvore de consenso da análise de evidência total.

Esse clado teve alto suporte, e inclui uma nova espécie em descrição (Leal *et al.* 2019, no prelo), muito semelhante a *P. rupestris* por morfologia externa, mas que não foi recuperada como irmã dessa espécie em minhas análises, já que *P. rupestris* foi recuperado como grupo irmão de um clado composto por (*P. sp. nov. aff. rupestris* (*P. erythros* *P. deimaticus*)), embora com baixo suporte.

As características morfológicas mais relevantes para este grupo são discutidas abaixo.

Macroglândulas inguinais

Embora as macroglândulas inguinais em vista externa tenham uma variação contínua, sejam polimórficas para muitas espécies, e sejam de difícil codificação, consistem em importantes caracteres que definem o grupo de *P. deimaticus*, e a transformação 52: 0>2 (macroglândulas inguinais discoidais e achatadas) foi recuperada como sinapomorfia do clado.

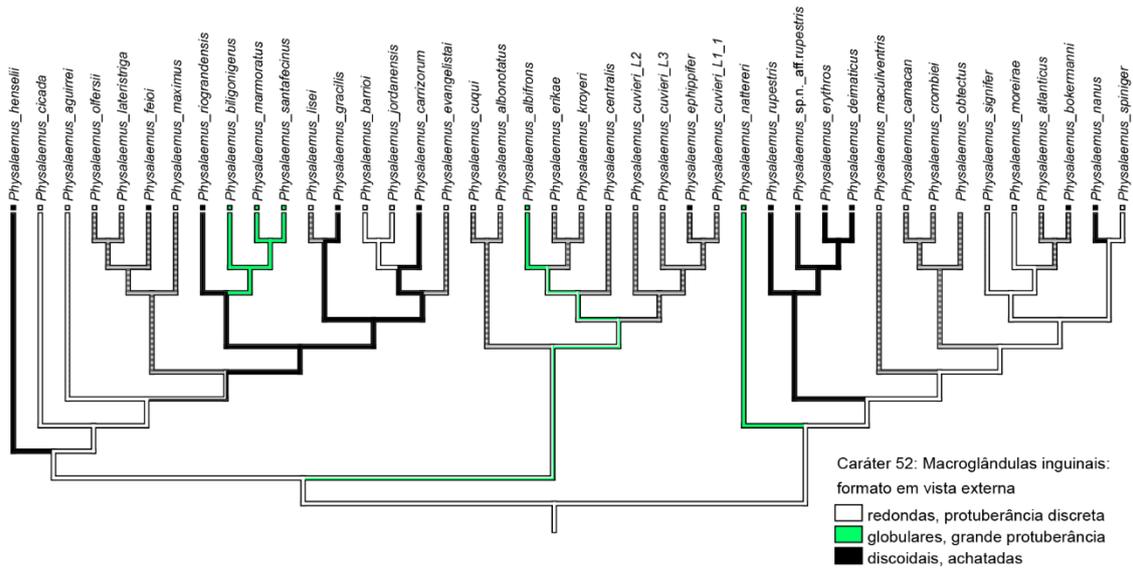


Figura 43. Mapeamento dos estados do caráter 52: formato das macroglândulas inguinais em vista externa em *Physalaemus*. As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados não aplicáveis ou faltantes.

Ânulo timpânico

As espécies analisadas de *Physalaemus rupestris* tem um tímpano muito reduzido, enquanto *P. deimaticus* e *P. erythros* têm o aparato timpânico (membrana timpânica,

ânulo timpânico e columela) ausente, o que poderia indicar uma tendência à perda do aparato timpânico neste clado. Contudo, o espécime de *Physalaemus* sp. nov. (aff. *rupestris*) analisado possui ânulo moderadamente desenvolvido, com diâmetro médio (130: 1), e uma análise mais minuciosa, incluindo mais exemplares é necessária para avaliar essa questão.

A ausência de columela e ânulo timpânico nunca havia sido reportada para o gênero *Physalaemus*.

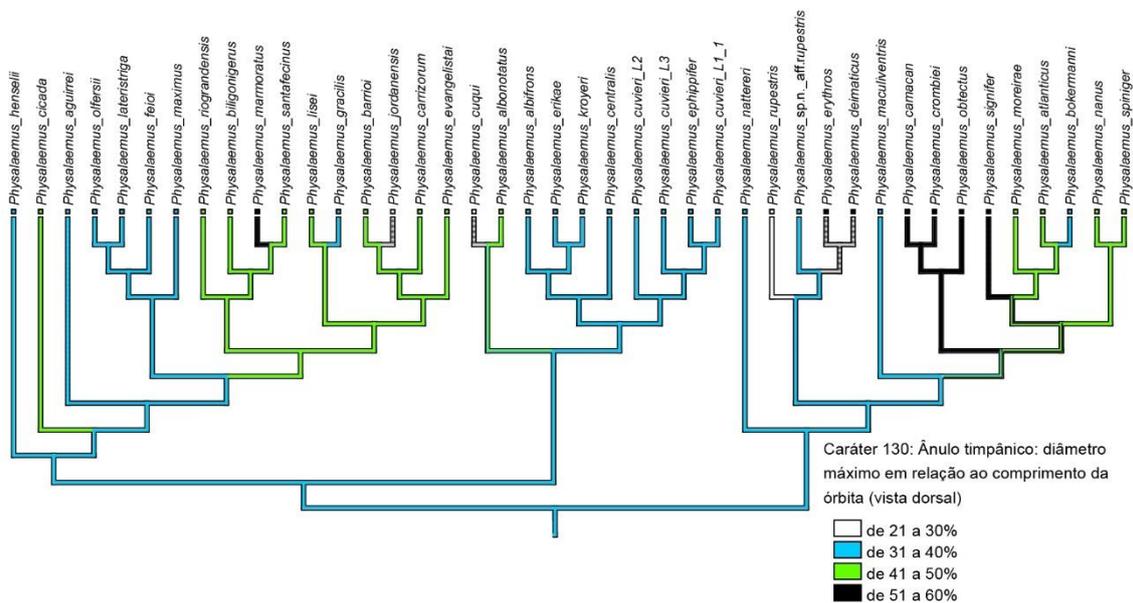


Figura 44. Mapeamento dos estados do caráter 130: diâmetro máximo do ânulo timpânico em relação ao comprimento da órbita em *Physalaemus*. As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados não aplicáveis.

Clado de *Physalaemus cuvieri*

Um clado composto pelas espécies não incluídas do clado de *Physalaemus signifer* foi recuperado com baixo suporte em ambas as análises, com 3 sinapomorfias

morfológicas suportando o clado. Dentre elas, a linha vertebral urostilar foi encontrada em todas as espécies do clado, sendo ausente em todas as espécies do clado de *P. signifer*, constituindo uma característica que claramente permite dividir *Physalaemus* em dois grandes clados.

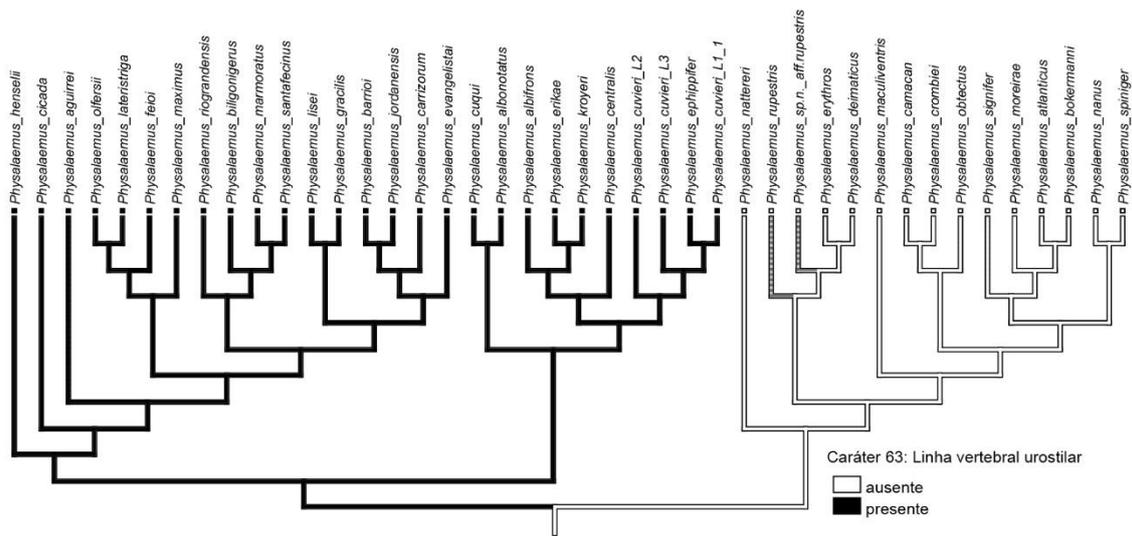


Figura 45. Mapeamento dos estados do caráter 63: linha vertebral urostilar em Leiuperinae. O hachurado indica dados faltantes.

Dentro deste clado, quatro grupos de espécies foram recuperados no trabalho e são discutidos a seguir.

O grupo de *Physalaemus henselii* proposto por Lourenço *et al.* (2015) não foi discutido, pois é composto apenas por mais uma espécie, *P. fenandezae*, a qual não pude analisar a morfologia por falta de material.

Physalaemus henselii, *P. cicada* e *P. aguirrei* foram recuperados na análise de evidência total como taxons irmãos do restante do clado composto por grupo de *P. biligonigerus* + grupo de *P. gracilis* + grupo de *P. ofersii* com suporte muito baixo, na

seguinte configuração (*P. henselii* (*P. cicada* (*P. aguirrei* (grupo de *P. olfersii* (grupo de *P. biligonigerus* grupo de *P. gracilis*))))). Essas três espécies têm diversas características morfológicas que as diferenciam do restante do grupo, sendo 19 transformações recuperadas como autapomorfias não-ambíguas de *P. henselii*, 13 de *P. cicada* e 9 de *P. aguirrei*, e cada ramo suportado é por uma sinapomorfia não-ambígua apenas. É necessária uma análise mais robusta para elucidar a relação destes táxons com o restante das espécies do grupo de *P. cuvieri*.

Grupo de *Physalaemus cuvieri*

O grupo de *Physalaemus cuvieri* (sensu Lourenço *et al.* 2015) foi recuperado com alto suporte, embora as relações internas no clado tenham tido baixo suporte em ambas as análises.

Physalaemus cuvieri

Neste estudo, tentei amostrar diferentes populações de *Physalaemus cuvieri* para análises morfológicas, considerando os resultados de Lourenço *et al.* (2015), que encontraram *P. cuvieri* parafilético com relação a *P. ephippifer* e constituindo um complexo de espécies. Contudo, não encontrei diferenças morfológicas dentre os caracteres levantados para este estudo entre os espécimes das diferentes populações de *P. cuvieri*. Morfologicamente, os espécimes analisados associados a *P. ephippifer* são muito similares aos espécimes analisados associados a *P. cuvieri*, já que a maior parte das diferenças encontradas se refere a caracteres que se mostraram polimórficos para as espécies. Contudo, uma característica encontrada somente em *P. ephippifer* foi a extensão dos dentes maxilares. *P. ephippifer* é a única espécie de *Physalaemus* analisada

com dentes maxilares se estendendo na maxila até seu contato com o quadradojugal (117: 2). Um estudo robusto, com ampla amostragem é necessário para tentar resolver este complexo de espécies.

Physalaemus albifrons

Physalaemus albifrons é uma espécie de difícil posicionamento considerando apenas sua morfologia, tendo sido alocada em diferentes grupos de espécies. Lynch (1970) associa a espécie ao grupo de *P. cuvieri*, mas considera a possibilidade da espécie pertencer ao grupo de *P. biligonigerus*. Nascimento *et al.* (2005) alocaram *Physalaemus albifrons* no grupo de *P. biligonigerus* devido ao compartilhamento de características morfológicas, como: tubérculo metatarsal interno e externo queratinizado, em formato de pá; saco vocal bem desenvolvido; crânio mais largo que longo; articulação crânio-mandibular no mesmo plano que a interseção ente as alae e o processo cultriforme do parasenoide. Contudo, minhas observações não foram inteiramente concordantes com as observações de Nascimento *et al.* (2005). Observei que *P. albifrons* se diferente das espécies que compõe o grupo de *P. biligonigerus* por diversas características morfológicas externas e osteológicas (ver Tabela 1 do Capítulo 2). A posição da articulação crânio-mandibular, foi mais anterior nos indivíduos de *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, comparados aos de *P. albifrons* analisados. Essa característica está relacionada a hábitos alimentares, por determinar a abertura bucal, e, portanto, tem grande potencial de convergência evolutiva. Articulações mais anteriores determinam uma menor abertura bucal, e indicam o consumo de presas menores. Outra característica relacionada na qual que observei variação entre estas espécies, foi no ponto de articulação da maxila com o quadradojugal, que ocorre na altura do comprimento

médio da órbita (121: 0) em *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, e no terço posterior (121: 1) em *P. albifrons*.

Sobre os tubérculos metatarsais, sua forma e queratinização estão relacionadas a hábitos escavadores, ocorrendo convergentemente também em *P. nattereri* e *Pleurodema*.

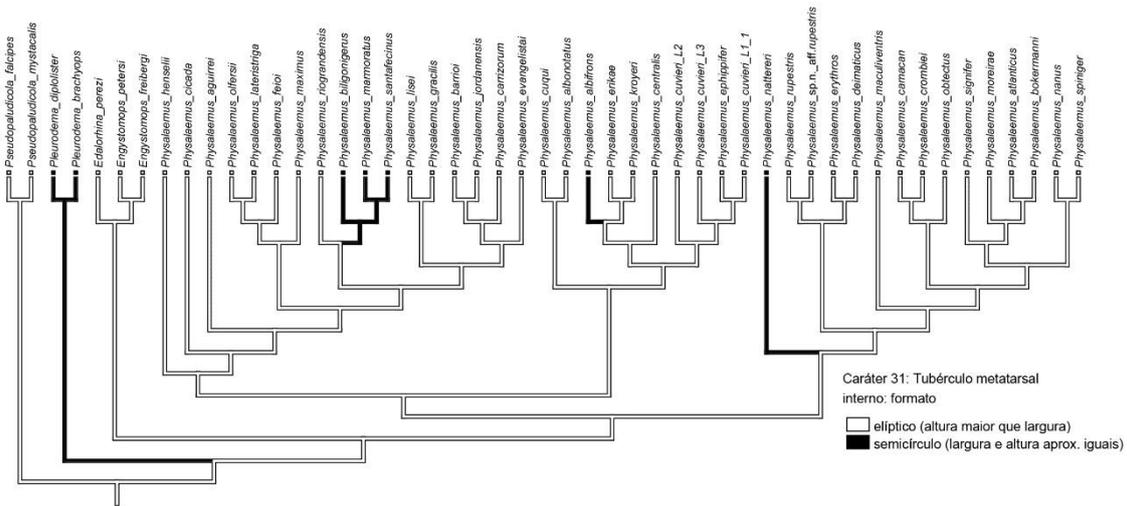


Figura 46. Mapeamento dos estados do caráter 31: formato do tubérculo metatarsal interno em Leiperinae. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambigüidade.

Physalaemus albifrons foi recuperado com alto suporte no grupo de *P. cuvieri*, embora seu relacionamento com as demais espécies do grupo não tenha sido bem suportada em nenhuma das análises.

Grupo de *Physalaemus biligonigerus*

Historicamente, a composição do grupo de *Physalaemus biligonigerus* mudou diversas vezes. Lynch (1970) sugeriu o grupo de *P. biligonigerus* para abrigar as espécies *P. biligonigerus*, *P. santafecinus*, *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus* (considerado sinônimo júnior de *P. marmoratus* por Faivovich *et al.* 2012). Nascimento *et al.* (2005), baseados

em características morfológicas similares às utilizadas por Lynch (1970), sugeriram o grupo de *P. albifrons* pra abrigar *P. albifrons*, e as espécies posicionadas no grupo de *P. biligonigerus* por Lynch (1970), exceto *P. nattereri*. A inclusão de *P. riograndensis* ao grupo de *P. biligonigerus* foi proposta apenas por Lourenço *et al.* (2015) a partir de análises moleculares, já que esta espécie se difere grandemente das demais que compõe o grupo, tendo sido alocada no grupo de *P. cuvieri* por Lynch (1970) e no recém-proposto grupo de *P. henselii* por Nascimento *et al.* (2005). Na análise molecular, *Physalaemus riograndensis* apareceu em uma politomia, com os grupos de *P. gracilis*, de *P. olfersii*, e o restante das espécies do grupo de *P. biligonigerus*. Já na análise de evidência total, a espécie foi recuperada com suporte muito baixo no grupo de *P. biligonigerus*. Apesar das diversas diferenças morfológicas externas, esta espécie compartilha algumas características morfológicas com as demais espécies do grupo, entre 4 sinapomorfias morfológicas não-ambíguas, o que pode justificar seu posicionamento na análise de evidência total. Contudo, uma análise mais robusta é necessária para avaliar o posicionamento de *P. riograndensis*.

Já as demais espécies que compõe o grupo de *Physalaemus biligonigerus* são agrupadas com alto suporte, com vinte sinapomorfias morfológicas suportando o clado, embora as relações internas permaneçam incertas.

Grupo de *Physalaemus gracilis*

O grupo de *Physalaemus gracilis* (sensu Nascimento *et al.* 2005) foi recuperado com alto suporte. No entanto, apenas uma sinapomorfia morfológica não-ambígua foi recuperada na topologia do consenso encontrada na análise de evidência total. Características compartilhadas pelas espécies do grupo de *P. gracilis*, como pele da

superfície dorsal do pé com tubérculos (38:1), linha longitudinal despigmentada na região gular (62:1) não foram recuperadas como sinapomorfias não-ambíguas, aparecendo apenas na otimização DELTRAN, devido a estes caracteres serem compartilhado com *P. riograndensis*. Considerando: (1) o baixo suporte do agrupamento do grupo de *P. gracilis* com o grupo de *P. biligonigerus* na análise de evidência total, (2) as amplas diferenças morfológicas entre as espécies que compõe os dois grupos, e, (3) os resultados das análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança de Lourenço *et al.* (2015), que recuperaram o grupo de *P. gracilis* como grupo irmão do grupo de *P. olfersii*, reforço a importância de análises mais robustas para avaliar os relacionamentos do grupo de *P. gracilis* com os outros grupos do clado de *P. cuvieri*.

Grupo de *Physalaemus olfersii*

Physalaemus olfersii foi colocado por Lynch (1970) no grupo de *P. signifer* baseado poucas características morfológicas que variavam entre as espécies alocadas no grupo. Com a descrição de novas espécies, Nascimento *et al.* (2005) propuseram um novo clado para abrigar espécies que consideraram morfológicamente semelhantes: *P. olfersii*, *P. maximus*, *P. soaresi* e *P. aguirrei*, baseados em características como glândulas inguinais não associadas a ocelos, presença de prega dorsolateral, padrão de coloração dorsolateral, presença de prega tarsal etc..

Em minhas análises, o clado de *Physalaemus olfersii* foi composto por *P. maximus*, *P. feioi*, *P. lateristriga* e *P. olfersii* (considerando que a espécie *P. soaresi* não foi incluída por falta de material), corroborando o agrupamento encontrado por Lourenço *et al.* (2015). A análise não recuperou *P. aguirrei* no grupo de *P. olfersii*, e as características consideradas por Nascimento *et al.* (2005) para definir o grupo se

mostraram plesiomórficas na topologia da árvore de consenso de ambas as análises, como pode ser visto na otimização do caráter 49: ocelos inguinais abaixo.

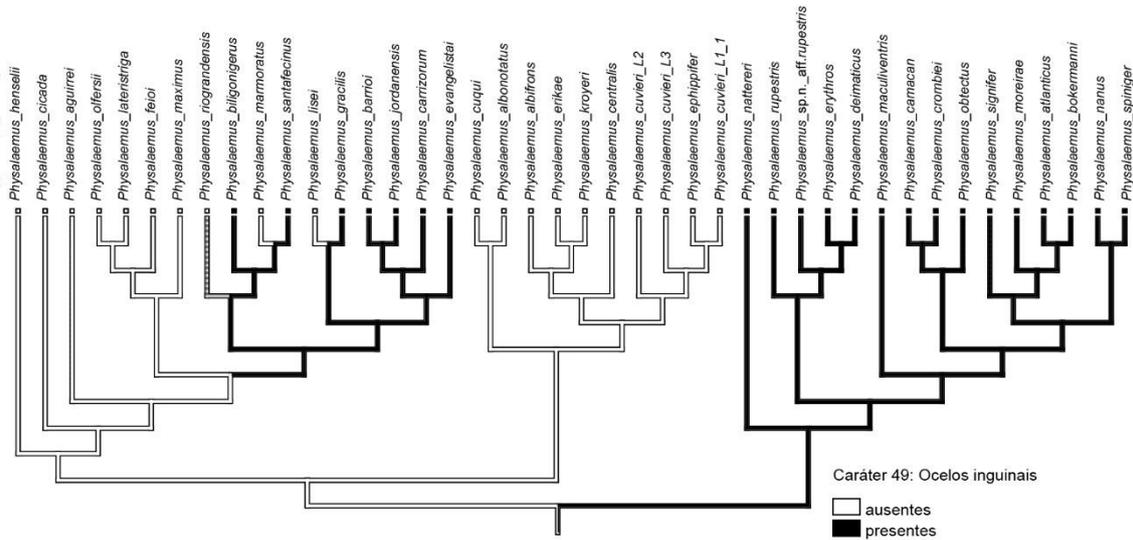


Figura 47. Mapeamento dos estados do caráter 49: ocelos inguinais em *Physalaemus*. As linhas mescladas em cores mescladas indicam ambiguidade. O hachurado indica dados faltantes.

O clado de *P. olfersii* foi recuperado em ambas as análises com alto suporte, e 7 sinapomorfias morfológicas suportam o clado, nenhuma das quais incluídas em diagnoses anteriores do grupo.

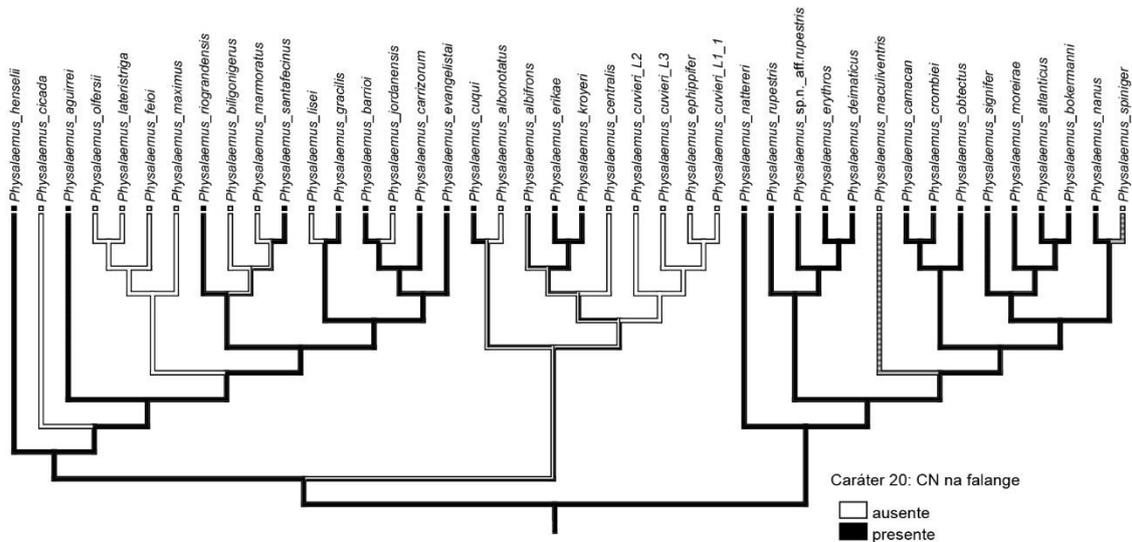


Figura 48. Mapeamento dos estados do caráter 20: calosidade nupcial em machos, uma das sinapomorfias não-ambíguas que suportam o grupo de *Physalaemus offersii* na topologia da árvore de consenso da AET. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade. As linhas hachuradas indicam falta de informação.

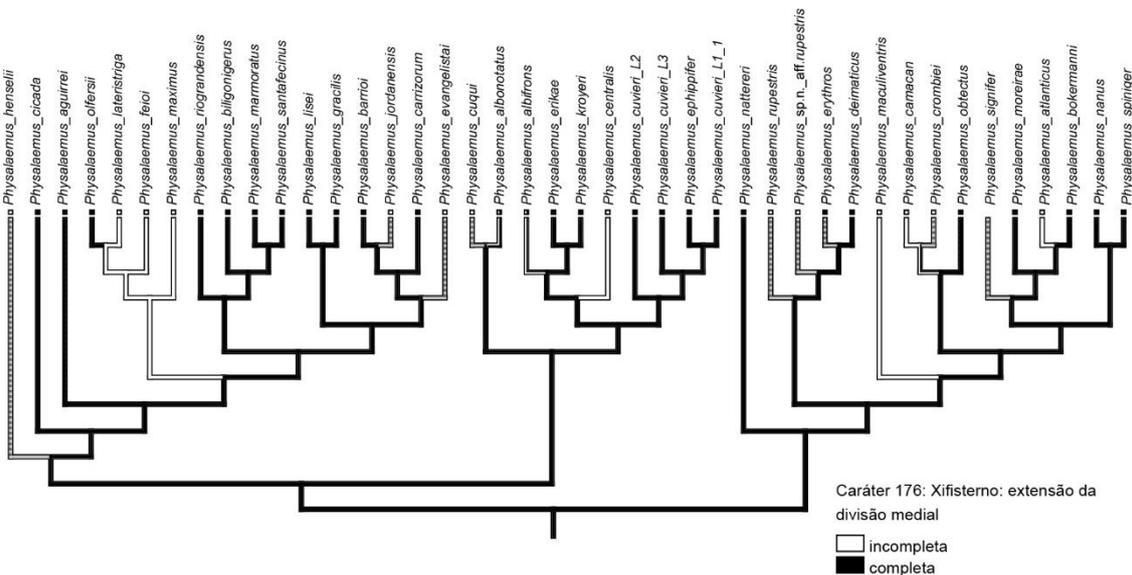


Figura 49. Mapeamento dos estados do caráter 20: divisão medial do xifisterno incompleta, uma das sinapomorfias não-ambíguas que suportam o grupo de *Physalaemus*

olfersii na topologia da árvore de consenso da AET. As linhas mescladas em preto e branco indicam ambiguidade. As linhas hachuradas indicam falta de informação.

Comentários sobre alguns caracteres diagnósticos não codificados

Alguns caracteres classicamente utilizados em descrição de espécies do gênero ou considerados diagnósticos de grupos foram excluídos da análise, abaixo, comento brevemente os principais:

PADRÃO DE COLORAÇÃO DORSAL

O grupo de *Physalaemus signifer* é classicamente caracterizado por uma marca em formato de seta no dorso dos indivíduos adultos (*e.g.*, Bokermann 1966; Cardoso & Haddad, 1985; Pimenta *et al.*, 2005, Nascimento *et al.* 2005). Apesar de ser uma característica diagnóstica importante, é altamente polimórfica para as espécies, além de ser de difícil visualização em indivíduos que não foram cuidadosamente fixados. Por este motivo, escolhi não codificar este caráter.

FORMATO DO FOCINHO

O formato do focinho é um caráter comumente utilizado na descrição e diagnose de espécies do gênero *Physalaemus* (*e. g.* Caramaschi *et al.* 2003, Cassini *et al.* 2010), e na delimitação de grupos (*e. g.* Nascimento *et al.* 2005). Contudo, esse caráter se mostrou polimórfico e dependente da fixação, e por estes motivos, decidi excluí-los da análise.

MEMBRANA TIMPÂNICA

Pereyra *et al.* (2016) fizeram uma extensa análise do aparato timpânico de 556 espécies de Anura, incluindo 7 espécies de *Physalaemus*, de diferentes grupos. Eles concluíram no estudo que a presença das estruturas segue a ordem columela > ânulo timpânico > membrana timpânica, ou seja, a presença de columela implica na presença de ânulo timpânico e membrana timpânica, sem que o contrário seja verdade. Nessa análise, consideraram a membrana timpânica presente em algumas espécies de *Physalaemus* analisadas, como *P. centralis* e ausente em outras, como *P. biligonigerus*. Eu não consegui observar essa variação, e considerei a membrana timpânica (sensu Pereyra *et al.* 2006) um caráter de difícil utilização e decidi não inclui-lo na análise.

GRAU DE MINERALIZAÇÃO

A maioria das estruturas tem seu grau de mineralização dependente da idade do indivíduo. Dessa forma, evitei trabalhar com essa variação, que se mostrou polimórfica para a maioria das espécies analisadas.

BRAÇO HIPERTROFIADO EM MACHOS

A hipertrofia dos braços de machos adultos e sua ausência são citadas em descrições de diversas espécies e na diagnose de grupos (*e. g.* Caramaschi *et al.* 2003, Nascimento *et al.* 2005). Contudo, a visualização da hipertrofia dos braços de anuros em vista externa depende de características como o grau de desenvolvimento do músculo adutor indicis longus e do desenvolvimento das cristas umerais. Exclui da análise, portanto, caracteres externos cuja variação dependia de componentes internos, como músculos e ossos, uma vez que estes caracteres foram analisados separadamente.

PREGA DORSOLATERAL

A prega dorsolateral é uma característica utilizada por Nascimento *et al.* (2005) para diagnose do grupo de *Physalaemus olfersii*. Contudo, eu não observei essa estrutura em nenhum dos indivíduos analisados, e o relevo na região dorsolateral da região supratimpânica até a região inguinal que observei em alguns indivíduos corresponde à faixa glandular dorsolateral desenvolvida. Cassini *et al.* (2010) reporta variação intraespecífica em *P. olfersii* quanto à presença e grau de desenvolvido da prega dorsolateral.

CONCLUSÕES

- Grupos de *Physalaemus* foram recuperados com alto suporte, embora as relações entre vários deles tenha sido recuperada com baixo suporte, necessitando análises mais robustas para elucidação.
- Comparando-se as topologias das árvores de consenso das análises de evidência total e de dados moleculares somente, percebe-se uma discreta mudança na topologia, com alguns clados melhor resolvidos na topologia da árvore de consenso da análise de evidência total. Contudo, o suporte destes clados foi muito baixo, e mais dados são necessários para possibilitar inferências mais precisas.
- Neste trabalho, novas sinapomorfias foram propostas para suportar os clados.
- Uma nova característica morfológica nunca antes reportada para o gênero foi encontrada: a ausência de aparato timpânico, em *Physalaemus deimaticus* e *P. eryhtros*.

- As relações de *Physalaemus cicada*, *Physalaemus aguirrei* e *Physalaemus henselii* ainda precisam ser elucidadas

REFERÊNCIAS

- Antoniazzi M.M., Neves P.R., Mailho-Fontana P.L., Rodrigues M.T., Jared C. (2013) Morphology of the parotoid macroglands in *Phyllomedusa* leaf frogs. *Journal of Zoology* 291, 42–50.
- Bokermann, W.C.A. (1962) Notas sobre três espécies de *Physalaemus* (Amphibia, Salientia, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro 34, 563–568.
- Bokermann, W.C.A. (1966) Dos nuevas espécies de *Physalaemus* de Espírito Santo, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). *Physis*, 26, 193–20.
- Burton, T.C. (1983) The musculature of the Papuan frog *Phrynomantis stictogaster* (Anura, Microhylidae). *Journal of Morphology*, 175, 307–324. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051750308>
- Burton, T.C. (1998a) Variation in the hand and superficial throat musculature of neotropical Leptodactylid frogs. *Herpetologica* 54(1): 53–72.
- Burton T.C. (1998b) Are the distal extensor muscles of the fingers of anurans an adaptation to arboreality. *Journal of Herpetology*, 32, 611–617. <https://doi.org/10.2307/1565224>
- Burton, T.C. (2001) Variation in the foot muscles of frogs of the family Myobatrachidae. *Australian Journal of Zoology*, 49, 539–559. <https://doi.org/10.1071/ZO01045>
- Burton, T.C. (2004) Muscles of the pes of hylid frogs. *Journal of Morphology*, 260, 209–233. <https://doi.org/10.1002/jmor.10204>
- Cannatella, D.C. & Duellman, W. (1984) Leptodactylid frogs of the *Physalaemus pustulosus* group. *Copeia*, 902–921. <https://doi.org/10.2307/1445335>
- Caramaschi, U., Feio, R.N., Guimarães-Neto, A.S., (2003) A new, brightly colored species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Herpetologica*, 59, 521–526. <https://doi.org/10.1655/02-102>
- Cardoso, A.J. & Haddad, C.F.B. (1985) Nova espécie de *Physalaemus* do grupo *signiferus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 45, 33–37.

- Cruz, C.A.G., Nascimento, L.B. & Feio, R.N., (2007) A new species of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura, Leiuperidae) from Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 28, 457–465. <https://doi.org/10.1163/156853807782152444>
- Dingerkus, G. & Uhler, L. (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*, 52, 229–232. <https://doi.org/10.3109/10520297709116780>
- Duellman, W.E. (1970) Hylid frogs of Middle America. Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas 1–2, 1–753.
- Duellman, W.E. (2001) *Hylid frogs of Middle America*. 2^o Edition. Ithaca, New York, U.S.A: Society for the Study of Amphibians and Reptiles/Natural History Museum of the University of Kansas. pp. 1–1158.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York. <https://doi.org/10.2307/1445022>
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fabrezi, M. & Alberch, P. (1996) The carpal elements of anurans. *Herpetologica*, 52, 2, 188–204.
- Fabrezi, M. & Barg, M. (2001) Patterns of carpal development among anuran amphibians. *Journal of Morphology*, 249, 210–220. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050>
- Fabrezi, M. (1992) El carpo de los anuros. *Alytes*, 10,1, 1–29.
- Fabrezi, M. (1993) The anuran tarsus. *Alytes*, 11, 2, 47–63.
- Faivovich, J., Ferraro, D.P., Basso, N.G., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., Wheeler, W.C. & Lavilla, E.O. (2012) A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. *Cladistics*, 28, 460–482. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00406.x>
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special

- reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SR0TFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SR0TFF]2.0.CO;2)
- 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67, 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.02.009>
- Franco-Belussi, L., Santos, L.R. de S., Zieri, R., Vicentini, C.A., Taboga, S.R. & Oliveira, C. (2012) Liver Anatomy, Histochemistry, and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. *Zoological Science*, 29, 12, 844–848. <https://doi.org/10.2108/zsj.29.844>
- Franco-Belussi, L., Santos, L.R.S., Zieri, R., & Oliveira, C. (2011) Visceral pigmentation in for *Dendropsaophus* species (Anura: Hylidae): occurrence and comparison. *Zoologischer Anzeiger*, 250, 102–110.
- Franco-Belussi, L., Zieri, R., Santos, L.R.S., Moresco, R.M., & Oliveira, C. (2009) Pigmentation in anuran testes: anatomical pattern and variation. *The Anatomical Record*, 292, 178–182.
- Fratani J., Ponssa, M.L. & Abdala, V. (2018). Tendinous framework of anurans reveals an all-purpose morphology. *Zoology*, 126, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.08.007>
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Hass, A., Haddad, C.F.B., De Sa, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. & Wheeler, W.C (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)297\[0001:TATOL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)297[0001:TATOL]2.0.CO;2)
- Frost, D. R. (2019) Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. (Data de acesso: 10 de julho de 2019)

- Goloboff, P.A. (1999) Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics*, 15, 415–428. <https://doi.org/10.1006/clad.1999.0122>
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2003) T.N.T.: Tree Analysis using new technology. Program and Documentation. <www.zmuc.dk/public/phylogeny>.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>
- Grant, T. & Kluge, A.G. (2004) Transformation series as an ideographic character concept. *Cladistics*, 20, 23–31. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2004.00003.x>
- Grant, T., Frost D.R., Caldwell J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, B. D., Noonan, B.P., Schargel, W. & Wheeler, W.C. (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299, 1–262. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2006\)299\[1:PSODFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2006)299[1:PSODFA]2.0.CO;2)
- Grant, T., & Kluge, A.G. (2003) Data exploration in phylogenetic inference: Scientific, heuristic, or neither. *Cladistics*, 19, 379–418. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2003.tb00311.x>
- Grant, T., & Kluge, A.G. (2009) Perspective Parsimony, explanatory power, and dynamic homology testing. *Systematic Biodiversity*, 7, 357–363.
- Grosso, J., Baldo, D., Cardozo, D., Kolenc, F., Borteiro, C., de Oliveira, M.I.R., Bonino, M., Barrasso, D. A., Candiotti, F. V. (2019) Early ontogeny and sequence heterochronies in Leiuperinae frogs (Anura: Leptodactylidae). *PLoS ONE*, 14, 6, e0218733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218733>
- Haas, A. (2003) The phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters. *Cladistics*, 19: 23–89. [https://doi.org/10.1016/S0748-3007\(03\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0748-3007(03)00006-9)
- Haddad, C.F.B. & Sazima, I. (2004) A new species of *Physalaemus* (Amphibia: Leptodactylidae) from the Atlantic forest southeastern Brazil. *Zootaxa*, 479, 1–12. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.479.1.1>

- Heyer, W.R. (1975) A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 199, 1–55. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.199>
- Heyer, W.R. (1985) New species of frogs from Boracéia, São Paulo, Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 98, 657–671.
- Heyer, W.R. & Wolf, A.J. (1989) *Physalaemus crombiei* (Amphibia: Leptodactylidae), a new frog species from Espírito Santo, Brazil with comments on the *P. signifer* group. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 102, 500–506.
- Horton, P. (1982) Diversity and systematic significance of anuran tongue musculature. *Copeia*, 3, 595–602. <https://doi.org/10.2307/1444659>
- Hoyos, J.M., Mantilla, C., Galindo, D. & Salgar, L. (2014) Phylogenetic analysis within the *Pristimantis unistrigatus* (Anura, Craugastoridae) group based on morphological characters. *Caldasia* 36, 107–124. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v36n1.43894>
- Hoyos, J.M. & Salgar, L. (2016) New conditions and intraspecific variation of some muscles of hands and feet of *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863) (Anura, Hylidae). *Acta Zoologica*, 97, 143–153. <https://doi.org/10.1111/azo.12151>
- Kaplan, M. (2004) Evaluation and redefinition of the states of anuran pectoral girdle architecture. *Herpetologica*, 60, 1, 84–97. [https://doi.org/10.1655/0018-0831\(2004\)060\[0084:EAROTS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1655/0018-0831(2004)060[0084:EAROTS]2.0.CO;2)
- Kluge, A.G. & Grant, T. (2006) From conviction to anti-superfluity: old and new justifications for parsimony in phylogenetic inference. *Cladistics*, 22, 276–288. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2006.00100.x>
- Larsson, A. (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30, 22, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Leal, F., Leite F. S. F., Costa, W. P., Nascimento, L. B., Lourenço, L. B., Garcia, P. C. A. (2019). Amphibians from Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. VI: A New Species of the *Physalaemus deimaticus* Group (Anura, Leptodactylidae). No prelo.

- Lenzi-Mattos, R., Antoniazzi, M.M., Haddad, C.F.B., Tambourgi, D.V., Rodrigues, M. T. & Jared, C. (2005) The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behavior. *Journal of Zoology*, 266, 285–294. <https://doi.org/10.1017/S095283690500703X>
- Liu, C.C. (1935) Types of vocal sac in the Salientia. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, 19–40.
- Lobo, F. (1992) Descripción osteológica de *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leptodactylidae) y comparación con otras especies del género. *Acta Zoológica Lilloana*, 42, 51–53.
- Lobo, F. (1993) Descripción de una nueva especie del género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) del noroeste argentino. *Revista Española de Herpetología*, 13–20.
- Lobo, F. (1995) Análisis filogenéticos del género *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 9, 21–43.
- Lobo, F. (1996) Nuevas observaciones sobre la osteología del género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica Lilloana*, 43, 317–326.
- Lourenço, L.B., Bacci-Júnior, M., Martins, V.G., Recco-Pimentel, S.M. & Haddad, C.F.B. (2008) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132, 255–266. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9169-y>
- 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.011>
- Lynch, J. (1970) Systematic status of the American Leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix* and *Physalaemus*. *Copeia*, 488–496. <https://doi.org/10.2307/1442276>
- Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactylid frogs. *Miscellaneous Publication Museum of Natural History University of Kansas*, 53, 1–238.

- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2018) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51. <http://www.mesquiteproject.org>
- Miranda-Ribeiro, A.D. (1926) Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) Brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional*, 26, 1–227.
- Nixon, K.C. (1999) The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics*, 15, 407–414. <https://doi.org/10.1006/clad.1999.0121>
- Pauly G.B., Hillis, D.M. & Cannatella, D.C. (2004) The history of a nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the Nearctic toads (*Bufo*). *Evolution*, 58, 2517–2535. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00881.x>
- Pereira, E. B., Collevati, R.G., Kokubum, M.N.C., Miranda, M.E.O. & Maciel, N.M. (2015) Ancestral reconstruction of reproductive traits shows no tendency toward terrestriality in Leptodactylinae frogs. *BMC Evolutionary Biology*, Londres, v. 15, p. 91. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0365-6>
- Pereyra, M.O., Womack, M.C., Barrionuevo, J.S., Blotto, B.L., Baldo, D., Targino, M., Ospina-Sarria, J.J., Guayasamin J.M., Coloma, C.A., Hoke, K.L., Grant, T. & Faivovich, J. (2016) The complex evolutionary history of the tympanic middle ear in frogs and toads (Anura). *Scientific Reports*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep34130>
- Pimenta, B.V.S., Cruz, C.A.G. & Silvano, L.S. (2005) A new species of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic Rain Forest of southern Bahia, Brazil. *Amphibia-Reptilia*, 26, 201–210. <https://doi.org/10.1163/1568538054253483>
- Pombal Jr., J.P., & Madureira, C.A. (1997) A new species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic rain forest of northeastern Brazil. *Alytes*, 15, 105 – 112.
- Provete, D.B., Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L.R., Zieri, R., Moresco, R.M., Martins, I.A., de Almeida, S.C. & de Oliveira, C. (2012) Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. *Zoologica Scripta*.
- Pyron, R.A. & Wiens, J.J. (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and

- caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 2,543–583. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.012>
- Regal, P.J. & Gans, C. (1976) Functional aspects of the evolution of frog tongues. *Evolution*, 30, 718–734. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1976.tb00952.x>
- Rodrigues, I. (2016) Morfologia e histologia de calosidades nupciais em Leiuperinae e Paratelmatobinae (Amphibia: Anura: Leptodactylidae): descrição, busca de caracteres filogenéticos e comentários evolutivos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 209 pp.
- Ron, S.R., Santos, J.C., & Cannatella, D.C. (2006) Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.11.022>
- Sereno, P. (2007) Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics*, 23, 565–587. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2007.00161.x>
- Tárano, Z., & Ryan, M.J. (2002) No pre-existing biases for heterospecific call traits in the frog *Physalaemus enesevae*. *Animal Behaviour*, 64, 599–607. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3080>
- Targino, M., Elias-Costa, A.J., Taboada, C. & Faivovich, J. (2019) Novel morphological structures in frogs: vocal sac diversity and evolution in Microhylidae (Amphibia: Anura). *Zoological Journal of the Linnean Society*. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz042>
- Targueta, C.P., Rivera, M., Souza, M.B., Recco-Pimentel, S.M. & Lourenço, L.B. (2010) Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetics relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 709–725. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.018>
- Tihen, J.A. (1962) Osteological observations on New World *Bufo*. *American Midland Naturalist*, 67, 57–183. <https://doi.org/10.2307/2422826>
- Toledo, R.C. & Jared, C. (1995) Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111, 1–29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)

- Trueb, L. (1970) Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with ossified skulls (family Hylidae). *Occasional papers of the Museum of Natural History the University of Kansas*, 18, 547–716. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.19992>
- Trueb, L. (1973) Bones, frogs, and evolution. In: Vial, J.L. (Ed.) *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. University of Missouri Press, Columbia, MO, pp. 65–132.
- Tyler, M.J. (1971) The phylogenetic significance of vocal sac structure in hylid frogs. *University of Kansas Publications Museum of Natural History*, 19, 4, 319–360. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.15451>
- Vaidya G., Lohman, D.J. & Meier, R. (2011) SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27, 2, 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- Verdade, V.K. (2005) Relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros *Cycloramphus* Tschudi, 1838 e *Zachaenus*, Cope 1866 (Anura: Leptodactylidae). PhD. Thesis. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil.
- Weber, L.N., Gonzaga, L.P., & de Carvalho-e-Silva, S.P. (2005) A new species of *Physalaemus* Fitzinger, 1826 from the lowland Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 63, 677–684.
- Nixon, K.C. (2002) WinClada ver.1.00.08 Published by the author, Ithaca, NY, USA. Winclada.
- Zieri, R., de Souza Santos, L.R., Taboga, S.R., de Oliveira, C. & Franco-Belussi, L. (2015). Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Animal Biology*, 65, 1, 21–32. <https://doi.org/10.1163/15707563-00002457>

APÊNDICE I: Lista de espécimes analisados

Morfologia externa

Physalaemus aguirrei: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Governador Lindemberg (CFBH 26449); Linhares (CFBH 19457, 26259, 26496, 30487, 30673, 38294)

Physalaemus albifrons: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4681); Pindobaçu (UFMG 6150-52); RIO GRANDE DO NORTE: Macaíba (AAGARDA 2472, 2897, 3624, 1077, 1094, 1832, 1834)

Physalaemus albonotatus: BRASIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 3576. 3604-05, 5657-58, 15811)

Physalaemus atlanticus: BRASIL: SÃO PAULO: São Sebastião (CFBH 38802); Ubatuba (CFBH 1503. 4311, 4321, 4566, 7918; ZUEC 2616, 18244, 20423, 20424, 20430, 20635, 21939, 22656)

Physalaemus barrioi: BRASIL: SÃO PAULO: São José do Barreiro (CFBH 28817, 15002, 30815-16, 30819, 30825)

Physalaemus biligonigerus: BRASIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 15839-41); PORTO ALEGRE: Viamão (ZUEC 10393); RIO GRANDE DO SUL: Osório (ZUEC 5322, 10377); Santo Antônio (ZUEC 11469); Torres (ZUEC 20456-57)

Physalaemus bokermanni: BRASIL: SÃO PAULO: Bertioga (UFMG 7169); Cubatão (CFBH 12507); Santo André (CFBH 6011); São Bernardo do Campo (CFBH 38016, 38024); São Sebastião (CFBH 9766, 12897, 38842-43)

Physalaemus camacan: BRASIL: BAHIA: Ilhéus (CFBH 27707, 34075, 35729, 39421); Porto Seguro (CFBH 32104); Una (CFBH 23679-80); Uruçuca (CFBH 32342)

Physalaemus carrizorum: BRASIL: SANTA CATARINA: Garuva (UFMG 19862); Joinville (UFMG 15667, 15680); São Bento do Sul (UFMG 9874-77, 10194, 10204)

Physalaemus centralis: BRASIL: MINAS GERAIS: Buenópolis (UFMG 7311); Brasilândia de Minas (UFMG 13664); Felixlândia (UFMG 13696); Florestal (UFMG

19079; Jaboticatubas (UFMG 5469-70, 5479); Varginha (UFMG 3736-37); Santana do Riacho (UFMG 3545-46, 10120)

Physalaemus cicada: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4685, 4694); Sebastião Laranjeiras (UFMG 4786); MINAS GERAIS: Belo Horizonte (UFMG 7833-34); Buenópolis (UFMG 18545); Itacarambi e Manga (UFMG 8219)

Physalaemus crombiei: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Santa Teresa (UFMG 13715, 13718, 13723); MINAS GERAIS: Caratinga (UFMG 13437); Mariana (UFMG 10437); Santo Antônio do Itambé (UFMG 14750, 14811, 14814); São Gonçalo do Rio Abaixo (UFMG 11849, 11904, 11912)

Physalaemus cuqui: ARGENTINA (MACN 40953-56)

Physalaemus cuvieri: BRASIL: ALAGOAS: Arapiraca (UFMG 7587, 7601); BAHIA: Campo Formoso (UFMG 6219); Jacaraci (UFMG 4751, 4756); Piatã (UFMG 7892); Pindobaçu (UFMG 6095); Riacho Santana (UFMG 4841); Rio de Contas (UFMG 4430); Rio de Contas (UFMG 7852); Sebastião Laranjeiras (UFMG 4796); CEARÁ: Pecém (UFMG 2545-47); ESPÍRITO SANTO: Jardim Anchieta (UFMG 2553); GOIÁS: Colinas do Sul (UFMG 2533); Montes Claros de Goiás (UFMG 3907); MARANHÃO: São Luís (UFMG 2566-67); MATO GROSSO DO SUL: Caarapó (UFMG 8270); MINAS GERAIS: Barão de Cocais (UFMG 6582, 10674); Belo Horizonte (UFMG 2536); Brumadinho (UFMG 8644, 9266, 9361); Catas Altas (UFMG 5170, 7959); Conceição do Mato Dentro (UFMG 11131); Diamantina (UFMG 3964); Dom Joaquim (UFMG 17611); Itambé do Mato Dentro (UFMG 17615); Lassance (UFMG 19167-68); Mariana (UFMG 16202); Morro do Pilar (UFMG 17616); Passa Vinte (UFMG 2659); Rio Acima (UFMG 19277); Santa Bárbara (UFMG 2654); PARÁ: São Geraldo do Araguaia (UFMG 2607); PERNAMBUCO: Igarassu (UFMG 2541-42); RIO GRANDE DO NORTE: Macaíba (AAGARDA 1117, 1151, 1162, 1827, 1829, 1836-37, 1843); SANTA CATARINA: Florianópolis (UFMG 2552, 2554-57); TOCANTINS: Ananás (UFMG 2357)

Physalaemus deimaticus: BRASIL: MINAS GERAIS: Diamantina (UFMG 9609, 9598, 14940, 20128); Jaboticatubas (UFMG 14905); Morro do Pilar (UFMG 16771, 20107-10); Ouro Preto (UFMG 20117)

Physalaemus ephippifer: BRASIL: PARÁ: Alenquer (ZUEC 18152-53); Belém (ZUEC 13712, 13714, 13724); Marabá (UFMG 13211, 13272); Prainha (ZUEC 17594); Santa Isabel (ZUEC 21370); Vitória do Xingu (UFMG 18298-302)

Physalaemus erikae: BRASIL: BAHIA: Brumado (CFBH 33970); Ilhéus (CFBH 36096, ZUEC 17494-98); Itamaraju (CFBH 32121, 32128); Uruçuca (CFBH 28153, 32382, 34052)

Physalaemus erythros: BRASIL: MINAS GERAIS: Barão de Cocais (UFMG 14938-39, 15617), P.E. Pico do Itambé (UFMG 14084, 14259)

Physalaemus evangelistai: BRASIL: MINAS GERAIS: Caeté (UFMG 19658); Conceição do Mato Dentro (UFMG 6440); Ouro Preto (UFMG 4982); Santana do Riacho (UFMG 5586-8 8, 19509, 20196-201)

Physalaemus feioi: BRASIL: MINAS GERAIS: Caratinga (UFMG 13448); (UFMG 18595); Simonésia (UFMG 12847, 12863, 12878, 14529)

Physalaemus gracilis: BRASIL: PARANÁ: Pién (ZUEC 6944); RIO GRANDE DO SUL: Santa Vitória (ZUEC 6254); São Francisco de Paula (ZUEC 4937); São Domingos (UFMG 1661); Siderópolis (CFBH 23732); SANTA CATARINA: Siderópolis (CFBH 23733)

Physalaemus henselii: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Eldorado do Sul (UFMG 20191-92)

Physalaemus jordanensis: BRASIL: MINAS GERAIS: Conceição dos Ouros (CFBH 39917); Poços de Caldas (CFBH 33-4, 4304, 4234, 5366, 6941, 6942); SÃO PAULO: Campos do Jordão (ZUEC 9741)

Physalaemus kroyeri: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4757, 4806-07, 4825, 6162-63); Pindobaçu (UFMG 6161-63)

Physalaemus lateristriga: BRASIL: SANTA CATARINA: São Bento do Sul (UFMG 9836, 10176, 10186-87, 10469, 16666)

Physalaemus lisei: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: (UFMG 2679); Maquiné (CFBH 30389, 3039); São Francisco de Paula (UFMG 2675-78, CFBH 8528, 8535-36, 9409, 9410, 16693-702)

Physalaemus maculiventris: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Santa Teresa (CFBH 10813-14); SÃO PAULO: Apiaí e Iporanga (CFBH 2672932)

Physalaemus marmoratus: BRASIL: MINAS GERAIS: Curvelo (UFMG 2771-74); Grão Mogol (UFMG 15388); Jaboticatubas (UFMG 5428, 5496); Rio Vermelho (UFMG 6514); Ouro Branco (UFMG 9623)

Physalaemus maximus: BRASIL: MINAS GERAIS: Ouro Branco (UFMG 9621-26)

Physalaemus moreirae: BRASIL: SÃO PAULO: Bertioga (UFMG 2713-14, 20314); Ilha Grande (CFBH 9528); Ilhabela (CFBH 15168); Santo André (UFMG 6012, 9475-78, 9505, CFBH 29058, 29280, 37870); Ubatuba (CFBH 4283); PARANÁ: São Mateus do Sul (CFBH 37769)

Physalaemus nanus: BRASIL: SANTA CATARINA: Florianópolis (UFMG 4613); Indaial (UFMG 10105); Rancho Queimado (UFMG 6988)

Physalaemus nattereri: BRASIL: MINAS GERAIS: Ibiá (UFMG 12439); Igaratinga (UFMG 19012); Itacarambi e Manga (UFMG 8197); Goiatuba (UFMG 17970); Lassance (UFMG 19176); Uberlândia (UFMG 2342)

Physalaemus obtectus: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Cariacica (MBML 6056-60); Linhares (MBML 1963, 2027, 2031)

Physalaemus olfersii: BRASIL: MINAS GERAIS: Delfim Moreira (UFMG 18661); SÃO PAULO: Bertioga (UFMG 2741)

Physalaemus orophilus: BRASIL: MINAS GERAIS: Morro do Pilar (UFMG 8850), Mariana (UFMG 10420)

Physalaemus riograndensis: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Cachoeira do Sul (CFBH 35019); Candiota (UFMG 20192-94); São Francisco de Paula (CFBH 79)

Physalaemus rupestris: BRASIL: MINAS GERAIS: Rio Preto (UFMG 13367, 13369, 13371)

Physalaemus santafecinus: ARGENTINA: SANTA FÉ: Santa Fé (MACN 45262-65)

Physalaemus signifer: BRASIL: BAHIA: Prado (UFMG 4961-62, 5559); Prado (UFMG 4962); MINAS GERAIS: Divino (UFMG 18591)

Physalaemus spiniger: BRASIL: SÃO PAULO: Cananéia (CFBH 319, 10693-94); Iguape (CFBH 308, 310); Ilha Comprida (CFBH 17119, 17121); Iporanga (CFBH 6330)

Physalaemus sp. nov. (aff. *rupestris*): BRASIL: MINAS GERAIS: Morro do Pilar (UFMG 10120, 12999-13000, 20187-8)

Physalaemus sp. nov (2): BRASIL: SANTA CATARINA: São Francisco do Sul (UFMG 8379, 8941)

Pleurodema bibroni: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: São Francisco de Paula (UFMG 16715)

Pleurodema diplolister: BRASIL: BAHIA: Pindobaçu (UFMG 6136); Umburanas (UFMG 6237-39); PERNAMBUCO: Buíque (AAGARDA 7803, 7806, 8334, 8424, 8427, 8581, 8621)

Pseudopaludicola falcipes: BRASIL: SANTA CATARINA: Uruguaiana (UFMG 2781)

Pseudopaludicola mineira: BRASIL: MINAS GERAIS: Buenópolis (UFMG 2867, 13933); Morro do Pilar (UFMG 8828); Santana do Pirapama (UFMG 9420); Santana do Riacho (UFMG 3537)

Pseudopaludicola mystacalis: BRASIL: (UFMG 6610, 6719, 6729, 6755)

Pseudopaludicola serrana: BRASIL: MINAS GERAIS: Augusto de Lima (UFMG 13565); Conceição do Mato Dentro (UFMG 11147-51)

Rupirana cardosoi: BRASIL: BAHIA: Mucugê (UFMG 4274)

Scythrophrys sawayae: BRASIL: PARANÁ: Piraquara (UFMG 20658)

Scythrophrys sp. nov.: BRASIL: SANTA CATARINA: Rancho Queimado (UFMG 20656-57)

Crossodactylodes bokermanni: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Castelo (UFMG UFMG 13769)

Crossodactylodes itambe: BRASIL: MINAS GERAIS: Santo Antônio do Itambé (UFMG 14036)

Crossodactylodes izecksohni: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Castelo (UFMG 13771); Santa Teresa (UFMG 14219)

Edalorhina perezii (MZUSP 62051)

Engystomops freibergeri: BRASIL: PARÁ: Vitória do Xingu (UFMG 18176-79)

Engystomops petersi (MZUSP 62051)

Leptodactylus furnarius: BRASIL: MINAS GERAIS: Prados (UFMG 2926)

Leptodactylus fuscus: BRASIL: MINAS GERAIS: Mariana (UFMG 9538)

Leptodactylus labyrinthicus: BRASIL: MINAS GERAIS: Rio Acima (UFMG 19276)

Leptodactylus latrans: BRASIL: BAHIA: Sebastião Laranjeiras (UFMG 4789); MINAS GERAIS: Barão de Cocais (UFMG 10675, 10679); Catas Altas (UFMG 7204); Conceição do Mato Dentro (UFMG 6368)

Leptodactylus mystacinus: BRASIL: MINAS GERAIS: Virginópolis (UFMG 15477); SANTA CATARINA: Caxambu do Sul (UFMG 3275)

Leptodactylus podicipinus: BRASIL: MINAS GERAIS: Januária (UFMG 6711)

Leptodactylus troglodytes: BRASIL: MINAS GERAIS: São João da Ponte (UFMG 20816)

Lithodytes lineatus: BRASIL: PARÁ: Vitória do Xingu (UFMG 18266)

Paratelmatobius lutzii: BRASIL: SÃO PAULO: Itatiaia (MZUSP 94624, 94627)

Paratelmatoobius poecilogaster: BRASIL: SÃO PAULO: Bertiooga (UFMG 3240, 21319)

Musculatura, vísceras e osteologia:

Physalaemus aguirrei: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Linhares (CFBH 26259)

Physalaemus albifrons: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4681); Pindobaçu (UFMG 6150-51)

Physalaemus albonotatus: BRASIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 3604, 3624, 5658)

Physalaemus atlanticus: BRASIL: SÃO PAULO: Ubatuba (CFBH 4311)

Physalaemus barrioi: BRASIL: SÃO PAULO: São José do Barreiro (CFBH 30815)

Physalaemus biligonigerus: BRASIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 15839-41); RIO GRANDE DO SUL: Santo Antônio (ZUEC 11469), Torres (ZUEC 20456-57)

Physalaemus bokermanni: BRASIL: SÃO PAULO: (CFBH 12897)

Physalaemus camacan: BRASIL: BAHIA: Ilhéus (CFBH 35729)

Physalaemus carrizorum: BRASIL: SANTA CATARINA: São Bento do Sul (UFMG 9874-75)

Physalaemus centralis: BRASIL: GOIÁS: Montes Claros de Goiás (UFMG 5276); MINAS GERAIS: Jaboticatubas (UFMG 5469, 5479); Varginha (UFMG 3736)

Physalaemus cicada: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4685, 4694); MINAS GERAIS: Belo Horizonte (UFMG 7834); Itacarambi e Manga (UFMG 8191-92); Sebastião Laranjeiras (UFMG 4786)

Physalaemus crombiei: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Santa Teresa (UFMG 13723); MINAS GERAIS: Mariana (UFMG 10437); Santo Antônio do Itambé (UFMG 14750, 14811, 14814); São Gonçalo do Rio Abaixo (UFMG 11849, 11904, 11912)

Physalaemus cuqui: ARGENTINA (MACN 40953)

Physalaemus cuvieri: BRASIL: MINAS GERAIS: Barão de Cocais (UFMG 6582); Catas Altas (UFMG 5170, 7959); Conceição do Mato Dentro (UFMG 11131); Passa Vinte (UFMG 2659), Santana do Riacho (UFMG 10120)

Physalaemus deimaticus: BRASIL: MINAS GERAIS: Jaboticatubas (UFMG 14905); Morro do Pilar (UFMG 16771)

Physalaemus ephippifer: BRASIL: PARÁ: Vitória do Xingu (UFMG 18299, 18301); BAHIA: Ilhéus (ZUEC 17495)

Physalaemus erikae: BRASIL: BAHIA: Ilhéus (ZUEC 17495)

Physalaemus erythros: BRASIL: MINAS GERAIS: Barão de Cocais (UFMG 14938-39)

Physalaemus evangelistai: BRASIL: MINAS GERAIS: Santana do Riacho (UFMG 5587)

Physalaemus feioi: BRASIL: MINAS GERAIS: Caratinga (UFMG 13448); Divino (UFMG 18595); Simonésia (UFMG 12847, 12863)

Physalaemus henselii: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Eldorado do Sul (UFMG 20192)

Physalaemus jordanensis: BRASIL: SÃO PAULO: Campos do Jordão (ZUEC 9741)

Physalaemus kroyeri: BRASIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4757, 4825, 6161)

Physalaemus lateristriga: BRASIL: SANTA CATARINA: São Bento do Sul (UFMG 9836, 9873, 10176, 10186, 16666)

Physalaemus lisei: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: (UFMG 2679)

Physalaemus maculiventris: BRASIL: SÃO PAULO: Apiaí e Iporanga (CFBH 26731)

Physalaemus marmoratus: BRASIL: MINAS GERAIS: Curvelo (UFMG 2772, 2774); Jaboticatubas (UFMG 5428, 5496); Rio Vermelho (UFMG 6514)

Physalaemus maximus: BRASIL: MINAS GERAIS: Ouro Branco (UFMG 9623, 9626)

Physalaemus moreirae: BRASIL: SÃO PAULO: Bertoga (UFMG 2713, 20314); Santo André (UFMG 9475, 9478)

Physalaemus nanus: BRASIL: SANTA CATARINA: Florianópolis (UFMG 4613); Indaial (UFMG 10105); Rancho Queimado (UFMG 6988)

Physalaemus nattereri: BRASIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 5650); MINAS GERAIS: Ibiá (UFMG 12439); Lassance (UFMG 19176); Uberlândia (UFMG 2342)

Physalaemus obtectus: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Cariacica (MBML 6060)

Physalaemus olfersii: BRASIL: MINAS GERAIS: Delfim Moreira (UFMG 18661); SÃO PAULO: Bertoga (UFMG 2741)

Physalaemus orophilus: BRASIL: MINAS GERAIS: Mariana (UFMG 10420); Morro do Pilar (UFMG 8850)

Physalaemus riograndensis: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Candiota (UFMG 20193-94)

Physalaemus rupestris: BRASIL: MINAS GERAIS: Rio Preto (UFMG 13371)

Physalaemus santafecinus: ARGENTINA: SANTA FÉ: Santa Fé (MACN 45263-64)

Physalaemus signifer: BRASIL: BAHIA: Prado (UFMG 4961, 5559); MINAS GERAIS: Divino (UFMG 18591)

Physalaemus sp. nov. (aff. *rupestris*): BRASIL: MINAS GERAIS: Morro do Pilar (UFMG 10120)

Physalaemus sp. n.(2): BRASIL: SANTA CATARINA: São Francisco do Sul (UFMG 8941)

Physalaemus spiniger: BRASIL: SÃO PAULO: Iporanga (CFBH 6330)

Crossodactylodes bokermanni: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Castelo (UFMG 13769)

Crossodactylodes itambe: BRASIL: MINAS GERAIS: Santo Antônio do Itambé (UFMG 14036)

Crossodactylodes izecksohni: BRASIL: ESPÍRITO SANTO: Castelo (UFMG 13771); Santa Teresa (UFMG 14219)

Edalorhina perezi (MZUSP 62051)

Engystomops petersi (MZUSP 62051)

Leptodactylus fuscus: BRASIL: MINAS GERAIS: Mariana (UFMG 9538)

Leptodactylus labyrinthicus: BRASIL: MINAS GERAIS: Rio Acima (UFMG 19276)

Leptodactylus latrans: BRASIL: BAHIA: Sebastião Laranjeiras (UFMG 5079); Conceição do Mato Dentro (UFMG 6368)

Leptodactylus podicipinus: BRASIL: BAHIA: Januária (UFMG 6711)

Paratelmatoobius lutzi: BRASIL: SÃO PAULO: Itatiaia (MZUSP 94624, 94627)

Paratelmatoobius poecilogaster: BRASIL: SÃO PAULO: Bertoga (UFMG 3240, 21319)

Pleurodema diplolister: BRASIL: BAHIA: Umburanas (UFMG 6239)

Pseudopaludicola falcipes: BRASIL: SANTA CATARINA: Uruguaiana (UFMG 2781)

Pseudopaludicola mystacalis: BRASIL: (UFMG 6755)

Rupirana cardosoi: BRASIL: BAHIA: Mucugê (UFMG 4274)

Scythrophrys sawayae: BRASIL: BAHIA: Piraquara (UFMG 20658)

Scythrophrys sp. nov.: BRASIL: SANTA CATARINA: Rancho Queimado (UFMG 20656)

APÊNDICE II: Números de acesso do GenBank das sequências moleculares utilizadas na análise de evidência total.

Taxon	Voucher	Localidade	Sequências 12S-tRNA^{Val}-16S	RAG-1	Referência
<i>Physalaemus</i>					
<i>Physalaemus aguirrei</i>	CFBH 19457	Linhares, Espírito Santo, Brasil	KP146065	KP145999	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus albifrons</i>	CFBH 16137	Viçosa do Ceará, Ceará, Brasil	KP146010	KP145948	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus albonotatus</i>	ZUEC 16418	Lambari D'Oeste, Mato Grosso, Brasil	KP146051		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus atlanticus</i>	CFBH 7918	Ubatuba, São Paulo, Brasil	KP145927/40		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus barrioi</i>	ZUEC 18146	Serra da Bocaina, São Paulo, Brasil	KP146067		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	DCC-NB 12	Finca San Ramón, Salta, Argentina	DQ337212		Ron <i>et al.</i> (2006)
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	ZUEC 13155	Cuiabá, Mato Grosso, Brasil	KP146108	KP145988	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus bokermanni</i>	ZUEC 17448	Bertioga, São Paulo, Brasil	KP145928/36		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus camacan</i>	ZUEC 17467	Ilhéus, Bahia, Brasil	KP146094	KP145962	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus carrizorum</i>	LGE 8877	Parque P. Moconá, Misiones, Argentina	KP146072	KP145953	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus centralis</i>	ZUEC 13697	Vitória Brasil, São Paulo, Brasil	KP146061	KP145968	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus centralis</i>	ZUEC 13375	Porto Nacional, Tocantins, Brasil	KP146062		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus cicada</i>	CFBH 19395	Novas Russas, Ceará, Brasil	KP146064	KP146000	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus cicada</i>	CFBH 22682	Contendas do Sincorá, Bahia, Brasil	KP146063	KP145996	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus crombiei</i>	CFBH 14910	Sooretama, Espírito Santo, Brasil	KP146095		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus cuqui</i>	LGE 8874	2.5 Km SE de Aguas Blancas, Salta, Argentina	KP146071		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
“ <i>Physalaemus cuvieri</i> ” (Linhagem 1A)	ZUEC 17897	Caruaru, Pernambuco, Brasil	KP146012		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
“ <i>Physalaemus cuvieri</i> ” (Linhagem 1B)	ZUEC 13083	Crateús, Ceará, Brasil	KP146013		Lourenço <i>et al.</i> (2015)

<i>“Physalaemus cuvieri”</i> (Linhagem 2)	ZUEC 13366	Uberlândia, Minas Gerais, Brasil	KP146027	KP145975	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>“Physalaemus cuvieri”</i> (Linhagem 3)	ZUEC 14691	Porto Nacional, Tocantins, Brasil	KP146047	KP145970	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus deimaticus</i>	ZUEC 21193	Diamantina, Minas Gerais, Brasil	KP146100		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus deimaticus</i>	UFMG 14861	P. E. do Pico do Itambé, Minas Gerais, Brasil	MG663309		***
<i>Physalaemus deimaticus</i>	UFMG 20113	Morro do Pilar, Minas Gerais, Brasil	MG651917		***
<i>Physalaemus ephippifer</i>	ZUEC 13737	Belém, Pará, Brasil	KP146004	KP145972	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus erikae</i>	CFBH 32463	Uruçuca, Bahia, Brasil	KP146008		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus erythros</i>	UFMG 15618	Barão de Cocais, Minas Gerais, Brasil	MG663316		***
<i>Physalaemus erythros</i>	UFMG 5563	Catas Altas, Minas Gerais, Brasil	MG663318		***
<i>Physalaemus erythros</i>	UFMG 1415	Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	MG663321		***
<i>Physalaemus evangelistai</i>	MNRJ 55103	Catas Altas, Minas Gerais, Brasil	KP146069		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus feioi</i>	ZUEC 16247	Viçosa, Minas Gerais, Brasil	KP146080		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus fischeri</i>	MR 005	Calabozo, Guárico, Venezuela	DQ337211		Ron <i>et al.</i> (2006)
<i>Physalaemus gracilis</i>	AJC 95-228	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	AY680272		Pauly <i>et al.</i> (2004)
<i>Physalaemus gracilis</i>	MNHN 9511	Bañado de los Oliveras, Treinta y Tres, Uruguay	KP146073	KP145979	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus henselii</i>	MNHN 9512	Ruta 5, km 492, Pueblo Madera, Rivera, Uruguay	KP145924/34		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus jordanensis</i>	CFBH 9903	Campos do Jordão, São Paulo, Brasil	KP146070	KP145997	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus kroyeri</i>	ZUEC 17481	Ilhéus, Bahia, Brasil	KP146006	KP145941	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus lateristriga</i>	ZUEC 18207	Iporanga, São Paulo, Brasil	KP146077	KP145946	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus lisei</i>	CFBH 8527	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	KP146074	KP145961	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus lisei</i>	LGE 8878	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil	KP146075	KP145947	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus maculiventris</i>		Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil	KP146091		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus maculiventris</i>	MZUSP 132062	Bananal, São Paulo, Brasil	KP145929/37	KP145978	Lourenço <i>et al.</i> (2015)

<i>Physalaemus maculiventris</i>	MZUSP 132064	Bananal, São Paulo, Brasil	KP146092		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus marmoratus</i>	ZUEC 13399	São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil	KP146083	KP145957	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus maximus</i>	UFMG 9625	Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil	KP146079		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus moreirae</i>	CFBH 19491	Guarujá, São Paulo, Brasil	KP146089		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus moreirae</i>	CFBH 15162	Ilha Bela, São Paulo, Brasil	KP146087	KP145971	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus nanus</i>	CFBH 9377	Anitápolis, Santa Catarina, Brasil	KP146096		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus nattereri</i>	ACJ 95267	Luis Antônio, São Paulo, Brasil	DQ337208		Ron <i>et al.</i> (2006)
<i>Physalaemus nattereri</i>	ZUEC 11475	São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil	KP146102		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus nattereri</i>	ZUEC 17506	Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil	KP146103		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus obtectus</i>	MNRJ 35018	Linhares, Espírito Santo, Brasil	KP146093		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus olfersii</i>	ZUEC 16250	Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil	KP146078	KP145993	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus riograndensis</i>	LGE 8879	5 Km N from Profundidad, Misiones, Argentina	KP146082		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus rupestris</i>	UFMG 13368	P.E. Ibitipoca, Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil	MG651898		***
<i>Physalaemus rupestris</i>	UFMG 13369	P.E. Ibitipoca, Lima Duarte, Minas Gerais, Brasil	KP 146099		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus</i> sp. n. (aff. <i>rupestris</i>)	UFMG 12999	Santana do Riacho, Minas Gerais, Brasil	MG651900		***
<i>Physalaemus</i> sp. n. (aff. <i>rupestris</i>)	UFMG 16779	Santana do Riacho, Minas Gerais, Brasil	MG651904		***
<i>Physalaemus santafecinus</i>	LGE 8880	Santa Fé, La Capital, Argentina	KP146081	KP145994	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus signifer</i>	CFBH-T 7508	Congonhas do Campo, Minas Gerais	KP146090	KP145944	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Physalaemus signifer</i>	TNHC 60073	Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	DQ337209		Ron <i>et al.</i> (2006)
<i>Physalaemus spiniger</i>	ZUEC 14516	Curitiba, Paraná, Brasil	KP146097		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
Outros Leiuperinae					
<i>Edalohina perezii</i>	ZUEC 9623	Alto Juruá, state of Acre, Brazil	KP146104	KP145992	
<i>Engystomops freibergeri</i>	ZUEC 9641	Foz do Tejo, Acre, Brasil	KP146105	GQ375520	Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Engystomops petersi</i>	QCAZ 34940	Puyo, Pastaza, Ecuador	FJ668193		Targueta <i>et al.</i> (2010)
<i>Pleurodema diplolister</i>	ZUEC 13422	Vassouras, Barreirinhas, Maranhão, Brasil	KP146101		Lourenço <i>et al.</i> (2015)

<i>Pleurodema brachyops</i>	AMNH 139118	Aishalton, Guiana	AY843733	AY844503	Faivovich <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	MACN 38647	Corrientes, Argentina	AY843741		Faivovich <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	ZUEC 14239	Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil	KJ147002		Veiga-Menoncello <i>et al.</i> (2014)
Leptodactylinae					
<i>Leptodactylus latrans</i>	MACN 38648	Loma Verde, Escobar, Buenos Aires, Argentina	AY843688	AY844470	Faivovich <i>et al.</i> (2005)
<i>Leptodactylus fuscus</i>	AMNH 139088	Aishalton, Guiana	DQ283404		Frost <i>et al.</i> (2006)
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	LHUF CG 0244	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	KC477245/0094		Pereira <i>et al.</i> (2015)
Paratelmatobiinae					
<i>Crossodactylodes izecksohni</i>	UFMG 13747	Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil	KP146086		Lourenço <i>et al.</i> (2015)
<i>Crossodactylodes bokermanni</i>	MNRJ 38412	Espírito Santo, Brasil	KC593359		Fouquet <i>et al.</i> (2013)
<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	CFBH 3267	Paranapiacaba, São Paulo, Brasil	EU224404		Lourenço <i>et al.</i> (2008)
<i>Paratelmatobius poecilogaster</i>	CFBH 3253	Paranapiacaba, São Paulo, Brasil	EU224400		Lourenço <i>et al.</i> (2008)
<i>Rupirana cardosoi</i>	FJ 117/JC 1112	Mucuge, Bahia, Brasil	KC593361	KC604034	Fouquet <i>et al.</i> (2013)
<i>Scythrophrys sawayae</i>	CFBH 3185	São Bento do Sul, Santa Catarina, Brasil	EU224417		Lourenço <i>et al.</i> (2008)
<i>Scythrophrys</i> sp.		Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	EU224418/19		Lourenço <i>et al.</i> (2008)
Cycloramphidae					
<i>Cycloramphus boraceiensis</i>	CFBH 5757	Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil	DQ283097		Frost <i>et al.</i> (2006)
<i>Zachaenus parvulus</i>	CFBH 10120	Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil	JQ966107		Lourenço <i>et al.</i> (2008)

^a Topótipo, *** Sequências gentilmente cedidas por L. B. Lourenço

CAPÍTULO 2

Artigo submetido à Zootaxa

Osteology of *Physalaemus biligonigerus* species group (Anura: Leptodactylidae)

BÁRBARA F. ZAIDAN^{1,2}, IGOR FERNANDES RODRIGUES¹ & PAULO C. A. GARCIA¹

¹*Instituto de Ciências Biológicas, UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Zoologia, Laboratório de Herpetologia, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-910, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

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

Abstract

Physalaemus is a Neotropical genus of Leptodactylidae. Recent molecular analysis recovered two major clades: the *Physalaemus signifer* clade and the *Physalaemus cuvieri* clade. Five species groups were recognized in the *P. cuvieri* clade: the *P. biligonigerus* group, the *P. cuvieri* group, the *P. henselii* group, the *P. gracilis* group and the *P. olfersii* group. The *P. biligonigerus* group was composed of *P. biligonigerus*, *P. marmoratus*, *P. riograndensis* and *P. santafecinus*. In the past decades, many taxonomic confusions involving the genus have been addressed, and *P. biligonigerus* group is one of the most addressed. In order to provide morphological information for taxonomic purposes, we analyzed the osteology of *Physalaemus biligonigerus* species group. The morphology of three species traditionally grouped by morphological features, *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, is similar as they share most of the osteological features, including one potential putative synapomorphy. The osteological data points to the reallocation of *P. riograndensis* to

another group of species, and we reinforce the need of a broader analysis to address this question.

Key words: Amphibia, morphology, anatomy, skeleton, cranium

Introduction

The anuran genus *Physalaemus* Fitzinger is composed by 48 species (Frost 2019), distributed in the South America, being one of the largest genera in Leptodactylidae (sensu Lourenço *et al.* 2015). Taxonomic confusions involving *Physalaemus* and the related genera *Engystomops* Jiménez de la Espada and *Eupemphix* Steindachner have been addressed by several authors in the past decades (Lynch 1970, Cei 1990, Nascimento *et al.* 2005, Nascimento *et al.* 2006, Kolenc *et al.* 2011).

Lynch (1970) combined *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus* into a single genus and recognized four species groups, based on morphological characters: *P. biligonigerus* group, *P. pustulosus* group (including species in the genus *Engystomops*), *P. signifer* group and *P. cuvieri* group. *Physalaemus biligonigerus* species group was formed by *P. biligonigerus* (Cope), *P. fuscomaculatus* (Steindachner), *P. nattereri* (Steindachner), and *P. santafecinus* Barrio, based on their greater size; smooth to loosely-pustular skin; first finger not longer than second; a non-elongated inner tarsal tubercle; enlarged, compressed metatarsal tubercles; distinct, disc-like inguinal glands; lack parotoid glands, and presence of premaxillary and maxillary teeth (except in *P. nattereri*).

Nascimento *et al.* (2005), in a phenetic analysis of external morphology, morphometry and osteological characters, rearranged *Physalaemus* into seven groups: *P. albifrons* group, *P. cuvieri* group, *P. deimaticus* group, *P. gracilis* group, *P. henselii* group, *P. olfersii* group and *P. signifer* group, and also revalidated the genus *Eupemphix*

Steindachner to accommodate *P. nattereri*. *P. albifrons* species group consisted of *P. albifrons* (Spix), *P. biligonigerus*, *P. fuscomaculatus* and *P. santafecinus*. In this study, the monophyly of these groups was not tested.

The considerable taxonomic confusion involving *P. fuscomaculatus* was addressed by several authors (Milstead 1963, Barrio 1965, Cei 1990, Nascimento *et al.* 2006, Kolenc *et al.* 2011). Lastly, Kolenc *et al.* 2011 performed a thorough analysis of the holotype from Caiçara, Mato Grosso, Brazil and the seven specimens from Río Apa, Paraguay, the only supposedly known specimens of this species. They considered *P. fuscomaculatus* as junior synonym of *P. biligonigerus* and assigned the seven specimens from Río Apa to *Pleurodema bibroni*. Furthermore, Nascimento *et al.* (2006) demonstrated that specimens previously identified as *P. fuscomaculatus* collected in localities outside the distribution range of Río Apa were actually *P. marmoratus* (Reinhardt and Lutken), considering that those individuals lack vomerine teeth and dark ocellus on lumbar glands, as in types of *G. marmoratus*. On the contrary, the types of *Eupemphix fuscomaculatus* present these structures.

Lourenço *et al.* 2015 performed the first phylogenetic analysis of *Physalaemus*, including species of related genus. Based on molecular data, two major clades were recovered: the *Physalaemus signifer* clade and the *Physalaemus cuvieri* clade. Five species groups were recognized in the *P. cuvieri* clade: the *P. biligonigerus* group, the *P. cuvieri* group, the *P. henselii* group, the *P. gracilis* group and the *P. olfersii* group. The *P. biligonigerus* species group was composed of *P. biligonigerus*, *P. marmoratus*, *P. riograndensis* and *P. santafecinus*, differing from the phenetic proposition of Nascimento *et al.* (2005), by the inclusion of *P. riograndensis* Milstead (previously placed in *P.*

henselii group), despite with low support, and by the exclusion of *P. albifrons* (nested within the *P. cuvieri* group).

Although osteological characters have been included in several studies of the genus (e.g., Lobo 1992, 1995, 1996, Lynch 1970, Lynch 1971, Nascimento *et al.* 2005), few species have been scrutinized and their osteology properly described. As a contribution to knowledge of osteological morphology in *Physalaemus*, we provide a detailed description of the adult osteology of the species within *P. biligonigerus* group (sensu Lourenço *et al.* 2015) and a comparison with *P. albifrons* and *P. nattereri*, who were previously placed within the group.

Material and Methods

This study is based on adult specimens of the four species that comprises *Physalaemus biligonigerus* species group (sensu Lourenço *et al.* 2015). Six males of *P. biligonigerus*, three males and one female of *P. marmoratus*, two males of *P. riograndensis* and two males of *P. santafenicus* (Appendix I). Collection codes are: ZUEC = Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil, UFMG = Coleção Herpetológica da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil, MACN = Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires, Argentina.

Identification of specimens were made using external morphology, aided by diagnostic characters considered by Nascimento *et al.* 2005, Nascimento *et al.* 2006, and Kolenc *et al.* 2011. We did not consider the width of the finger, and development of fringes as diagnostic characters (proposed by Nascimento *et al.* 2006), as we notice that these characters vary intraspecifically, and may be influenced by artefacts of fixation.

Specimens were cleared and stained following the protocol of Dingerkus and Uhler (1972) with minor modifications. Osteological terminology follows Lynch (1971), Trueb (1973, 1993), and Trueb *et al.* (2000); olfactory capsule follow Pugener & Maglia (2007); phalangeal, carpal and tarsal osteology follows Fabrezi (1992, 1993, 1996); laryngeal morphology follows Trewavas (1933), and sesamoids terminology and measurements follows Ponssa *et al.* (2010). Ossification refers to the formation of endochondral and intramembranous bone, whereas calcification (or mineralization) refers to the secondary deposition of minerals in a cartilaginous structure (Trueb 1973). High resolution digital photographs were taken using a Leica M205A stereomicroscope with attached camera. Measurements were taken from those photographs, using the software ImageJ software, and follows Ponssa *et al.* (2010).

Osteological description is based on the skeleton of all adult specimens analyzed.

Results

Cranium: General proportions and shape (Fig 1).— As long as wide, except in *P. riograndensis*, in which is longer than wide. The skull is widest at the level of the jaw articulations with quadratojugals, which are approximately in the midorbital level, except in *P. riograndensis*, in which are approximately in the level of the otic capsules. The rostrum is moderately long, representing approximately one third of the skull's maximum length, except in *P. riograndensis*, in which is shorter, representing approximately one quarter of the skull's maximum length. The braincase is moderately broad, representing approximately one quarter of the greatest width of the skull at the midorbital level (approximately one third in *P. riograndensis*). The midorbital height of the skull is about half of the skull's maximum length.

Neurocranium.— The anterior neurocranium consists of the large olfactory capsules and the anterior wall of the braincase. Olfactory capsules are predominantly cartilaginous (Fig 1A), and the medial walls of the nasal capsules are narrowly separated by the *septum nasi*, which is mineralized in all species, except *P. riograndensis* (in which is predominantly cartilaginous). The tectum and the solum nasi are slightly mineralized. The oblique cartilage is semicircular and borders the posterior edge of the fenestra endonarina (Fig 3D). Ventrally to the oblique cartilage lies the alary cartilage. There is a medial prenasal process between the alary cartilages, more prominent in *P. santafecinus*. The septomaxillae (Fig 3D) are poorly developed, exposed in dorsal and lateral views, ventrolateral to the nasal bones. The posterior wall of the nasal capsule is formed by the cartilage of the planum antorbitale, which forms the anterior margin of the orbit.

The endochondral braincase consists of three pairs of replacement bones — sphenethmoid, prootics, and exoccipitals (Ponssa *et al.* 2010). Ventrally, they are partially overlapped by the cultriform process of the parasphenoid, neopalatines and vomers, and dorsally, by the frontoparietals posteriorly and by the nasals anteriorly (Fig 3B). The bony sphenethmoid extends to the level of the midorbit and encloses the orbitonasal foramen dorsolaterally. The optic fenestra is very broad, bordered by the parasphenoid, sphenethmoid, and prootics.

The oculomotor foramina of *P. marmoratus*, *P. santafecinus* and *P. biligonigerus* are mostly enclosed in cartilage. In some individuals of these species, the division between the oculomotor and prootic foramina is poorly developed, resulting in a partial confluence between the two foramina (Fig. 1B). The prootic foramina are mostly enclosed by the prootics in these species, but their posteromedial walls are cartilaginous. In *P. riograndensis*, the oculomotor foramina are completely delimited, bordered by cartilage

medially and by the prootics laterally, and the prootic foramina are completely enclosed by the prootics.

Dorsally, the prootics are slightly overlapped by the posterior portion of the frontoparietals. They are fused with the exoccipitals, forming the posterior region of the braincase and the otic capsules. The otic capsules are partially mineralized and bear a cartilaginous crista parotica. The epiotic eminence and the otic crest are distinct.

The exoccipitals are partially overlapped by the parasphenoid. They form the margins of the foramen magnum, and the occipital condyles, which articulate with the vertebral column. Occipital condyles are semicircular, with curved articular surfaces medially directed. The articular surfaces are partially cartilaginous.

Pletral Apparatus.— The tympanum is supported by the tympanic annulus, a concave cartilage above the ventral ramus of the squamosal (Fig 1C). The tympanic annulus is incomplete dorsally and does not reach the crista parotica. The pars externa plectri is cartilaginous, oval, positioned centrally within the tympanic annulus. Most times, it has half the diameter of the tympanic annulus, but its size can vary even between both sides of the same individual. The columella is a long, slightly curved bone, formed by the synostotic fusion between the pars media plectri and the pars interna plectri. The pars interna plectri is an expanded footplate of the columella that meets the operculum within the fenestra ovalis. The operculum is ovoid, poorly mineralized and fills most of the fenestra ovalis.

Dorsal Dermal Investing Bones.— The paired trapezoidal nasals roof the nasal capsules. They are in contact or slightly separated medially and have curved borders. The maxillary processes are well developed, extending posterolaterally without reaching the

maxilla. Posteromedially, the nasals overlap the anterior margin of the sphenethmoid and do not contact the frontoparietals.

The frontoparietals are narrowly separated medially, covering almost entirely the frontoparietal fontanelle. Their width is approximately half of their length, which is approximately half of the skull's length. In *P. santafecinus*, the distance between the frontoparietals is greater than in the other species (the distance between frontoparietals is 15% their width at the midlength compared with the maximum 4% in the others), and the frontoparietals are thinner (width 1/3 of their length). The external borders are nearly straight. The posterior portion is expanded and rounded. The frontoparietal overlaps the fused prootics and exoccipitals in the medial region of the epiotic eminence.

Ventral Dermal Investing Bones.— The parasphenoid is slender, unornamented and inverted-T shape. It bears a prominent, posteromedial process that does not extend to the margin of the foramen magnum (Fig 1B). The cultriform process of the parasphenoid overlaps the sphenethmoid anteriorly, extending to the level or slightly surpassing the orbitonasal foramina level. In *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, it is widest at the midlevel of the optic fenestra, and gradually converging anteriorly and posteriorly. In *P. riograndensis*, it is wider at the level of the oculomotor foramina, posteriorly, gradually converging anteriorly. The alae are long, about three quarters the cultriform process length, laterally oriented (markedly posterolaterally oriented in *P. riograndensis*) and underlie the otic capsule. The parasphenoid is not fused with the underlying bones.

The neopalatines are long, slender, curved, with sharp edges and lack odontoids. They are perpendicular to the longitudinal axis of the cranium and overlap the planum antorbitale, the sphenethmoid, the anterior processes of the pterygoid and partes palatinae

of the maxillae (in *P. riograndensis*, they nearly reach the anterior processes of the pterygoid and partes palatinae of the maxillae). Neopalatines tips are broadly separated.

The vomers are paired and overlap solum nasi and sphenethmoid. They are divided in anterior, prechoanal, postchoanal and posterior processes. The anterior processes are broad and do no contact the premaxilla or the maxilla. The prechoanal processes are well-developed and acute. The postchoanal processes are slender and acute. The posterior processes are moderately slender. In *P. riograndensis*, the posterior processes of the vomers are very slender (thinner than the neopalatines). They are transversally oriented and overlap the sphenethmoid, without reaching the neopalatines. The vomers are broadly separated and lack dentigerous elements.

Maxillary arcade.— The upper jaw is complete, composed of premaxillae, maxillae, and quadratojugals. Those components are not fused, and only the latter does not bear teeth. The teeth are conical and have blunt tips. The premaxillae are narrowly separated medially from each other. Each premaxilla overlaps the pars palatina of the adjacent maxilla. The alary processes of premaxillae are slender and parallel to each other. The pars palatina of the premaxilla bears a relatively deep incision (deeper in *P. riograndensis*), producing a well-developed palatine processes medially. This process is semicircular (triangular in *P. riograndensis*). The quadratojugals are well developed, articulating with the maxillae anteriorly, and with the partes articulares of the palatoquadrate and the ventral rami of the squamosal posteriorly.

Mandible (Fig 2A).— The mentomeckelian bones are L-shaped, united medially in continuous cartilage. The dentaries are narrow, covering half of the anterolateral surfaces of Meckel's cartilages. They do not reach the mentomeckelian bones. The

angulosplenic invests nearly the entire medial and ventral surfaces, extending over 90% of the mandible. Posteriorly, the partes articulares remain cartilaginous in all individuals analyzed. The coronoid processes are trapezoidal and moderately developed.

Suspensory apparatus.— The pterygoid has the typical triradiate configuration, with anterior, medial, and posterior rami. All rami are well developed; the medial and posterior processes have approximately the same size; the anterior is twice as long and articulates with the medial surface of the maxilla at its midlength, reaching the neopalatines. The pterygoid is separated from the maxilla by the pterygoid cartilage.

The squamosals are triradiate, T-shaped. The zygomatic processes have about half the length of the otic rami and are subtriangular, except in *P. riograndensis*, in which the zygomatic rami have two thirds of the otic rami length and are acuminate. The otic ramus articulates with the lateral margin of the crista parotica. The ventral ramus articulates with the quadratojugal.

Hyolaryngeal apparatus (Fig 2).— The hyoid is completely cartilaginous. The length of its corpus is equal or slightly greater than its width at narrowest point (except for *P. riograndensis*, in which the corpus is about three times longer than wide at narrowest point). The hyoglossal sinus is U-shaped and it deepens up to half the length of the anterolateral processes (up to a third the length of the anterolateral processes in *P. riograndensis*). The anterolateral processes are broad with a wide connection to the hyoid corpora.

In *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, the hyale bears a short anterior process and an anterolateral cartilaginous expansion, which extends to the level of the midlength of the anterolateral process of the hyoid. The height of this cartilaginous plate is uniform in all its length and corresponds to the height of the anterior process. A

small rounded aperture is present laterally adjacent to the anterior process. In contrast, in *P. riograndensis*, the anterior process is long and free, lacking expansions.

The posterior margins of the posterolateral processes extend over the posterior border of the hyoid, in the level of the second third of the posteromedial process. They are slightly rounded in all species but *P. riograndensis*, in which they are strongly acute.

The posteromedial processes are slender, slightly expanded proximally and distally. They are ossified and bear a well-developed cartilaginous distal epiphysis.

The larynx is a globular structure. The arytenoid cartilages consist of a pair of valve-shaped cartilage. The cricoid cartilage forms a complete ring. The esophageal process is indistinguishable, except in *P. riograndensis*, in which it is differentiated and trapezoidal. The bronchial processes are moderately long and have bi- or multifurcated ends, except in *P. riograndensis*, in which bronchial processes are very long with simple ends.

Postcranial osteology of adults

Axial skeleton.— The vertebral column consists of eight procoelus presacral vertebrae, the sacral vertebra, and the urostyle (Fig 3A). There is no fusion between vertebrae. The cervical cotyles are characteristic of Type-I cotylar arrangement (Lynch, 1971). The neural arches of each vertebrae have moderately developed neural spines, more developed in the second vertebrae, getting progressively smaller towards the posterior vertebrae. The transverse processes of presacral vertebrae II, III, VII and VIII are oriented anterolaterally, of presacral vertebra VI is oriented laterally and of presacral vertebrae IV and V are oriented posterolaterally.

In *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, the vertebrae decrease in size towards the posterior end, and the relative lengths of the transverse processes are: III \approx IV > V \approx VI \approx VII > VIII \approx II. In *P. riograndensis* there is not markedly decrease in size, and the relative lengths of the transverse processes are: III > IV \approx V \approx VI \approx VII \approx VIII > II).

The sacral diapophyses are moderately dilated, and their width increases toward the lateral ends. Elliptic sacral sesamoids lie on the distal margin of the diapophysis. The slender urostyle is not fused to the sacral vertebrae. The sacral-coccygeal articulation is bicondylar. Urostyle is long, slightly shorter than the sacral and presacral length combined, well ossified, except for its posterior end. The urostyle bears a dorsal crest, extending through most of its length.

Appendicular skeleton.

Pectoral girdle.— The pectoral girdle is arciferal (Fig 3B). The omosternum is cartilaginous and has a semicircular expansion anteriorly. Episternum is mainly cartilaginous. In the specimens of *P. biligonigerus* and *P. marmoratus* analyzed, the mineralization of episternum considerably varied, from few mineralized dots in the posterior region to the whole posterior third of episternum.

The epicoracoid cartilage is arcuate and moderately mineralized. In ventral view, the left epicoracoid overlaps the right. The paired clavicles are curved, with concave anterior edges, and do not reach the glenoid fossa.

The mesosternum is mostly ossified in all species, varying in shape interspecifically. In *P. biligonigerus*, *P. marmoratus*, and one individual of *P. santafecinus*, it is bifurcated anteriorly and posteriorly, fusing in the midlength, forming

an X-shape. In the other individual of *P. santafecinus* it is obviously divided in two bony parts, connected medially in all its extension by cartilage, which is progressively wider towards its posterior end. In *P. riograndensis* it is divided only posteriorly, gradually narrowing posteriorly up to half of its total length, where the mesosternum bifurcates.

The xiphisterna consists in two shovel-like cartilages connected in the ends of mesosternum. They are predominantly cartilaginous, with signs of mineralization near the connections with mesosternum.

The scapula has a rectangular form with expanded proximo-distal ends. Its posterior face is sigmoid and borders the glenoid fossa, which is also bordered by coracoids. The scapula is contiguous to the cleithrum, an ossified lamina with bifid distal ends. Its posterior ramus is shorter than anterior ramus. On the anterior ramus there is a longitudinal ridge.

The suprascapula is mainly cartilaginous but greatly mineralized.

Pelvic girdle.— Ilium, ischium, and pubis are articulated together, forming the acetabulum. The medial margins of the ilia form a U-shape in dorsal view (Fig 3C). The distance between the distal tips of the ilial shafts is approximately 40% of the entire length of the element. Each ilium has a dorsal crest on the posterior two thirds of its length. The ilia are not fused medially. The ischia are fused. Preacetabular and supra-acetabular expansions are poorly developed. The pubis is thin, and poorly ossified.

Forelimbs and manus.— The humerus bears a well-developed crista ventralis over the midlength (Fig 3B). Its distal head and the glenoid head are expanded, rounded, and have approximately the same size. The radioulna have a distinct proximo-distal groove between them, corresponding to the sulcus intermedius, that extends over its midlength.

The hand had six individual carpal elements: ulnare, distal carpal 5-4-3, distal carpal 2, radiale, element Y, and elements of prepollex, representing the Type C morphology of Fabrezi (1992). The phalangeal formula is 0-2-2-3-3; the relative lengths of the fingers are $IV > V > III \approx II$ (Figure 4A). A large and predominantly ossified palmar sesamoid is present on the ventral surface of the hand, embedded in the tendons. A couple of small glide sesamoids lie on the ventral face of the distal epiphysis of each metacarpal. Dorsal to the articulation of the radioulna with radiale there is a small sesamoid, the pararadial. The distal ends of the terminal phalanges have a knoblike dilation. The males' inner metacarpal bears an external nuptial spine. The prepollex consists of two segments, in addition to the basal segment. The proximal prepollical element is elongated and, in most individuals, it is completely cartilaginous, but can be completely mineralized. It bears a smaller mineralized segment beside. The distal prepollical element is triangular with a rounded terminus and it is mostly cartilaginous.

Hind limbs and pes.— The femur has the same length as the tibiofibular and about twice the size of tibiale-fibulare.

Four tarsal elements are present: Tibiale-fibulare, Element Y, Distal Tarsal 1, and Distal Tarsal 2-3. The tibiale and fibulare are widely separated at their midlength and fused at their ends. Element Y joins the proximal element of the prehallux, Distal Tarsal 1, Metatarsal I and Tibiale. Distal Tarsal I also articulates with Metatarsals I and II and Tibiale. Distal Tarsal 2-3 articulates with Metatarsals II and III and Fibulare. Metatarsal V and Metatarsal IV articulate directly with the end of the fibulare. A small ossified sesamoid lies on the ventral to the proximal head of the tibiale-fibulare, close to the distal ends of the Metatarsals III and IV.

The digital phalangeal formula is: 2–2–3–4–3. The terminal phalanges are knobbed. The prehallux has two segments extensively mineralized in most individuals; the distal segment is shovel-like and well developed.

Intraspecific variation. The osteological variation among males involves the degree of mineralization and ossification of cartilaginous elements, the size of dermal bones, as frontoparietals and the shape of elements of the pectoral girdle, as omosternum, mesosternum and xiphisternum.

Interspecific variation. Variation observed among studied species is summarized in Table 1.

Discussion

Species within *Physalaemus biligonigerus* species group are similar in osteology, except for *Physalaemus riograndensis*, which have several exclusive characteristics when compared to the other species within the group. Osteological variation between *P. biligonigerus*, *P. santafecinus* and *P. marmoratus* involve mainly the amount of mineralization of cartilaginous structures (e.g. pectoral girdle, nasal capsule, hyoid) and the size of dermal investing bones (e.g., frontoparietals, neopalatines). These features have already been reported to vary intraspecifically, depending on the age of the individual (e.g. Ponssa *et al.* 2007, Ponssa 2008, Fratani *et al.* 2017). We also found intraspecific variation in relation to the degree of mineralization and ossification, although we chose adults with the same body size range of each species. Halliday & Verrell (1988) discussed the weak correlation between body size and age, which is compatible with our observations.

The only morphological difference between *P. biligonigerus* and *P. santafecinus* reported in the original description (Barrio 1965) was in the mesosternum, formed by two symmetrical halves, medially connected by cartilage in *P. santafecinus*, in contrast with the entirely bony element of *P. biligonigerus*, bifurcated anteriorly and posteriorly. Despite one individual of *P. santafecinus* analyzed presented the same type of mesosternum described by Barrio (1965), we found intraspecific variation in this species. Our observations agree with Lobo (1992) finding that there is no difference in the sternum between these two species.

Additionally, the individuals of *P. santafecinus* analyzed presented frontoparietal fenestra exposed. Considering that Lobo (1992) didn't report differences in the frontoparietal between *P. santafecinus* and *P. biligonigerus*, we believe that this difference is due to the age of the individuals.

The small orifice laterally adjacent to the anterior process of the hyale has potential to be a putative synapomorphy to the group that includes *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, as all the specimens of these species presented this structure, and it is absent in related species (sensu Lourenço *et al.* 2015). Despite the expansion of the hyale (which we referred as cartilaginous plate) is present in *P. albifrons* (Table 1), this species lacks the orifice.

P. riograndensis shares with the other species that are nested within *P. biligonigerus* group the absence of orbital cartilage anteriorly, that results in the sphenethmoid bordering the anterior portion of the optic fenestra. Despite that, it differs by several characters of cranium, hyoid and pectoral girdle (Table 1). The osteological information points to the reallocation of *P. riograndensis* to another group of species. A broader analysis is necessary to address this question.

The scarce intraspecific variation agrees with previous observations that osteological characters could be useful for phylogenetics and to diagnose species (e.g., Trueb, 1973, 1977; Ponssa *et al.* 2011), although, the low interspecific variation between *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* and *P. santafecinus*, provides few informative characters for phylogenetic analysis within the group. We expect to use osteological features in part of a suite of characters to address relationships within the other species groups of the genus. This is currently being assembled and evaluated by BFZ.

This overview of the osteology of *Physalaemus biligonigerus* species group, together with data of other studies (e.g. Lynch, 1970, Lobo 1992, 1993, Fratani *et al.* 2017) aids the discussion of morphological transformation series within *Physalaemus* and points to the importance of including morphological data in the analysis of phylogenetic relationships, to elucidate the evolution within the genus.

Acknowledgements

We are grateful to Gláucia M. F. Pontes (Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - MCT-PUCRS), for the *P. riograndensis* specimen granted in exchange. To Julián Faivovich and Santiago Nenda (MNCN), for landing and allowing clearing-and-staining of *P. santafecinus* specimens. To Luís F. Toledo (ZUEC) for landing and allowing clearing-and-staining *P. biligonigerus* specimens.

We thank R. Montesinos for valuable contribution to the analysis.

BFZ and IFR thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) for scholarships.

PCAG thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Literature cited

- Barrio, A. (1965) El género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis* 25, 421–448.
- Bokermann, W.C.A., (1966) Dos nuevas especies de *Physalaemus* de Espírito Santo, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). *Physis* 26, 193–202
- Cei, J. M. (1990) On a Paraguayan sample of a long-time confused species: *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leptodactylidae). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali*, Torino 8:215–231
- Dingerkus, G. & Uhler, L.D (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* 52(4): 229–232
- Fabrezi, M. (1992) El carpo de los anuros. *Alytes*, 10, 1–29.
- Fabrezi, M. (1993) The anuran tarsus. *Alytes*, 11, 47–63.
- Fabrezi, M. (1996) Las falanges terminales en la clasificación de los anuros. Cuadernos de Herpetología, 10, 1–9
- Frost, D.R. (2019) Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (February 4, 2019).
- Fratani, J., Woitovicz-Cardoso, M., Lourenço, A.C. (2017) Osteology of *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) with comments on intraspecific variation. *Zootaxa*, 4227(2), 219–232.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4227.2.4>

Halliday, T.R. & Verrell, P.A. (1988) Body size and age in amphibians and reptiles.

Journal of Herpetology, 33, 253–265.

<https://doi.org/10.2307/1564148>

Kolenc, F., Baldo, D., Borteiro, C., Marangoni, F, Ferraro, D.P., & Faivovich, J. (2011)

The Identity of *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia: Anura). *Copeia*, 4, 513–522.

<https://doi.org/10.2307/41416570>

Lobo, F. (1992) Descripción osteológica de *Physalaemus fernandezae* (Anura:

Leptodactylidae) y comparación con otras especies del género. *Acta Zoológica Lilloana*, 42, 51–53.

Lobo, F. (1995) Análisis filogenético del genero *Pseudopaludicola* (Anura:

Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 9, 21–43.

Lobo, F. (1996) Nuevas observaciones sobre la osteología del género *Physalaemus*

(Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 43, 317–326.

Lourenço, L.B., Targueta, C.P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P.C., Andrade, G.V.

& Recco-Pimentel, S.M. (2015) Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 204–216.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.011>

Lynch, J. (1970) Systematic status of the american Leptodactylid frog genera

Engystomops, Eupemphix and *Physalaemus*. *Copeia*, 488–496.

<https://doi.org/10.2307/1442276>

- Lynch, J. (1971) Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of Leptodactyloid frogs. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History, Miscellaneous Publications*, 53, 1–238.
- Nascimento, L.B., Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (2005) Taxonomic Review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, 63, 297–320.
- Nascimento, L., Pimenta, B.V.S., Gonçalves da Cruz C.A. & Caramaschi, U. (2006) Taxonomic status of *Gomphobates marmoratus* Reinhardt and Lutken, 1862 “1861” and *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology*, 1, 166–174.
[https://doi.org/10.2994/1808-9798\(2006\)1\[166:TSOGMR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2994/1808-9798(2006)1[166:TSOGMR]2.0.CO;2)
- Ponssa, M.L. (2008) Cladistic analysis and osteological descriptions of the frog species in the *Leptodactylus fuscus* species group (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46, 249–266.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00460.x>
- Ponssa, M.L., Jowers, M. & de Sá, R. (2010) Osteology, natural history notes, and phylogenetic relationships of the poorly known Caribbean frog *Leptodactylus nesiotus* (Anura, Leptodactylidae). *Zootaxa*, 2646, 1–25.
<https://doi.org/10.1111/10.11646/zootaxa.2646.1.1>
- Ponssa, M.L., Goldberg, J. & Abdala, V. (2010) Sesamoids in anurans: new data, old issues. *Anatomical Record*, 293, 1646–1668.
<https://doi.org/10.1002/ar.21212>

- Ponssa, M.L., Brusquetti, F. & Souza, F.L. (2011) Osteology and intraspecific variation of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae), with comments on the relationship between osteology and reproductive modes. *Journal of Herpetology*, 45, 79–93.
<https://doi.org/10.1670/09-190.1>
- Pugener, L.A. & Maglia, A.M. (2007) Skeletal morphology and development of the olfactory region of *Spea* (Anura: Scaphiopodidae). *Journal of Anatomy*, 211, 754–768.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00826.x>
- Trewavas, E. (1933) The hyoid and larynx of the Anura. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 222, 401–527.
- Trueb, L. (1973) Bones, frogs and evolution. In: Vial, J. L. (Ed.), *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems*. The University Missouri Press, Columbia, pP. 65–132.
- Trueb, L. (1977) Osteology of anuran sytematics: intrapopulational variation in *Hyla lanciformis*. *Systematic Zoology*, 26, 165–184.
<https://doi.org/10.2307/2412839>
- Trueb, L. (1993) Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: Hanken, J. & B. K. Hall (Eds.), *The Skull 2*. The University of Chicago Press, pP. 255–343.
- Trueb, L., Pugener, L.A. & Maglia, A.M. (2000) Ontogeny of the bizarre: an osteological description of *Pipa pipa* (Anura: Pipidae), with an account of skeletal development in the species. *Journal of Morphology*, 243, 75–104
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(200001\)243:1<75::AID-JMOR4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(200001)243:1<75::AID-JMOR4>3.0.CO;2-L)

APPENDIX 1. Specimens examined

Physalaemus biligonigerus: BRAZIL: MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 15839–41 adult males); RIO GRANDE DO SUL: Santo Antônio (ZUEC 11649, adult male); Torres (ZUEC 20456-57 young males).

Physalaemus santafecinus: (MACN 45263-64 adult male)

Physalaemus marmoratus: BRAZIL: MINAS GERAIS: Curvelo (UFMG 2772, 2774 adult males); Jaboticatubas (UFMG 5496, adult male; UFMG 5428, adult female).

Physalaemus riograndensis: BRAZIL, RIO GRANDE DO SUL, Candiota (UFMG 20193-94, adult males).

Physalaemus albifrons: BRAZIL: BAHIA: Jacaraci (UFMG 4681, adult male); Pindobaçu (UFMG 6150-51, adult males).

Physalaemus nattereri: BRAZIL: GOIÁS: Montes Claros de Goiás (UFMG 3633); MATO GROSSO DO SUL: Corumbá (UFMG 5650); MINAS GERAIS: Ibiá (UFMG 12439); Uberlândia (UFMG 2342).

TABLE 1. Comparison between *Physalaemus* of *P. biligonigerus* group and other two species of *Physalaemus* that were already placed within the group. Plus indicates presence and minus indicates absence. Personal observations. LO= length of the orbit, LT: length of the tympanum, ML= minimum length, MW= minimum width, post.=posterior. Measurements consist in approximate values.

Osteological character	Species					
	<i>P. nattereri</i>	<i>P. albifrons</i>	<i>P. biligonigerus</i>	<i>P. santafecinus</i>	<i>P. marmoratus</i>	<i>P. riograndensis</i>
Maxillary teeth	-	+	+	+	+	+
Position of the skull-mandible articulation in relation to the alae of parasphenoid	above	same level	above	above	above	same level
Sphenethmoid bordering the anterior margin of the optic fenestra	-	-	+	+	+	+
Tympanic annulus (LT/LO)	small (0,25)	small (0,25)	large (0,50)	large (0,50)	large (0,50)	large (0,50)
Prootic foramina bordered entirely by prootics	-	-	-	-	-	+
Cartilaginous plate of the hyale	-	+	+	+	+	-
Small orifice laterally adjacent to anterior process of hyale	-	-	+	+	+	-
Proportions of hyoid plate: MW/ML	≅1	≅1	≅1	≅1	≅1	0.3
Xiphisternum bifurcated posteriorly	+	-	+	+-	+	+
Xiphisternum bifurcated anteriorly	-	-	+	+-	+	-

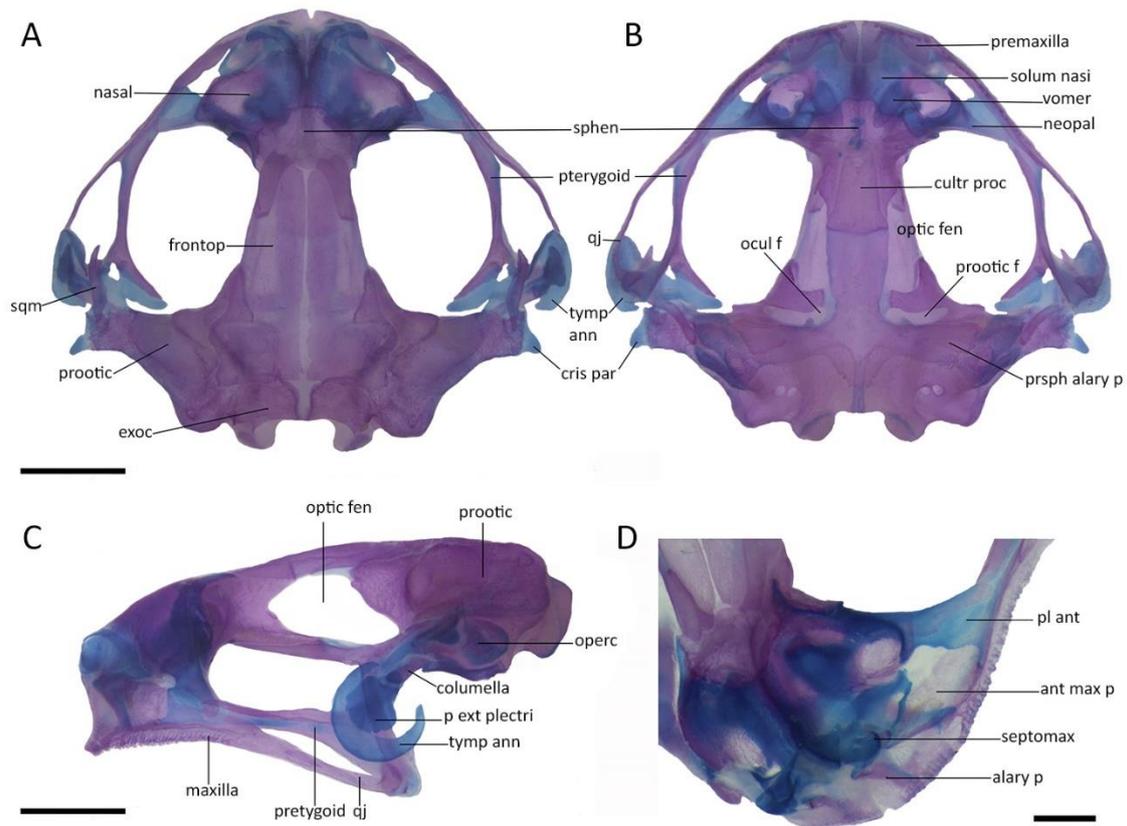


FIGURE 1. Skull of adult male *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469) in (A) dorsal, (B) ventral, and (C) lateral views. Details of the nasal capsule (D). Cartilages are stained blue and mineralized/ossified structures are stained red. Abbreviations: ant max p, anterior maxillary process; cris par, crista parotica; cultr proc, cultriform process of parasphenoid; exoc, exoccipital; frontop, frontoparietal; ocul f, oculomotor foramen; operc, operculum; optic fen, optic fenestra; p ext plectri, pars externa plectri; pl ant, planum antorbitale; pro, prootic; pro for, prootic foramen; prsph ala, ala of parasphenoid; qj, quadratojugal; sphen, sphenethmoid; septomax, septomaxilla; sqm, squamosal; tymp ann, tympanic annulus. Scale line: 2 mm.

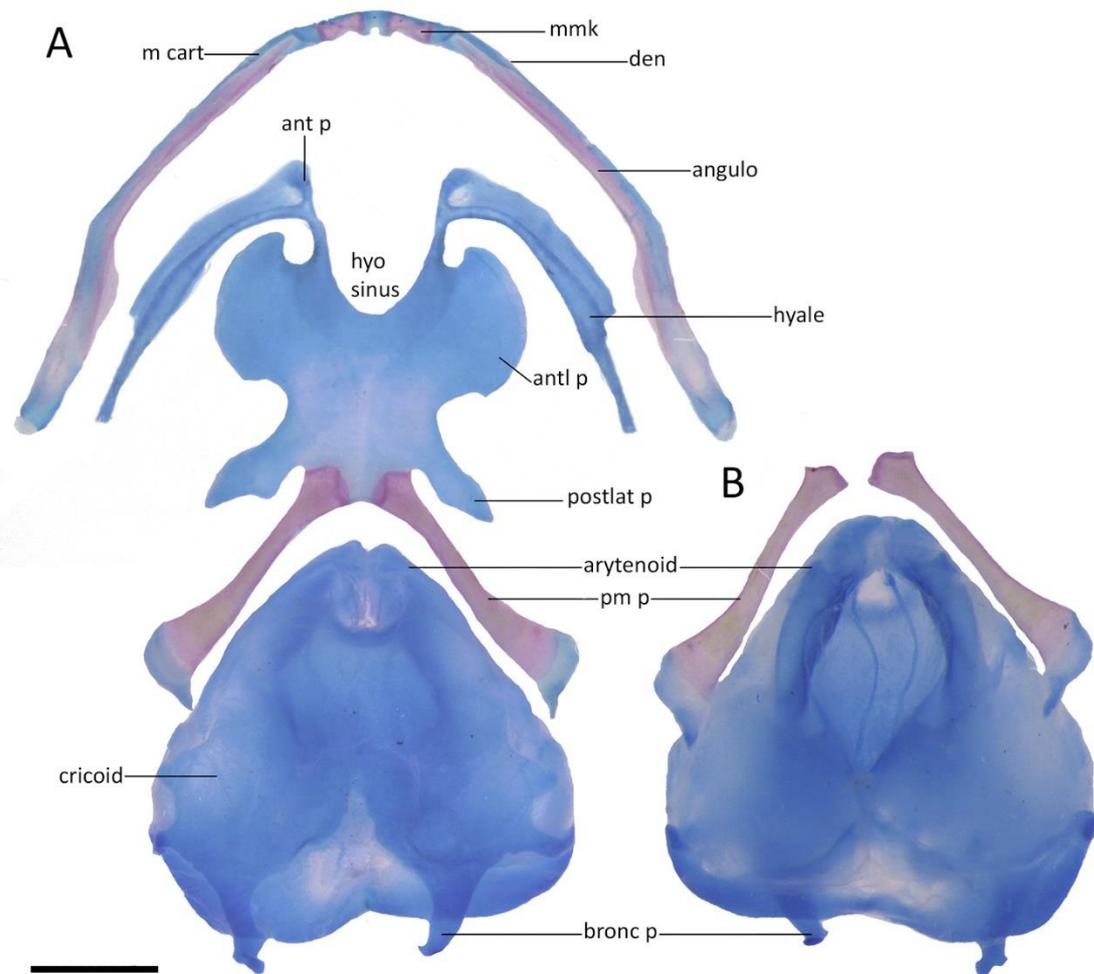


FIGURE 2. Mandible, hyoid, and laryngeal cartilages of adult male *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469). (A) Ventral view. (B) Dorsal view. Cartilages are stained blue and mineralized/ossified structures are stained red. Abbreviations: angulo, angulosplential; ant p, anterior process of the hyale; antl p, anterolateral process of the hyale; br p, bronchial process; den, dentary; hyo sinus, hyoglossal sinus; m cart, Meckel's cartilage; mmk, mentomeckelian; postlat p, posterolateral process; pm p, posteromedial process. Scale line: 2 mm.

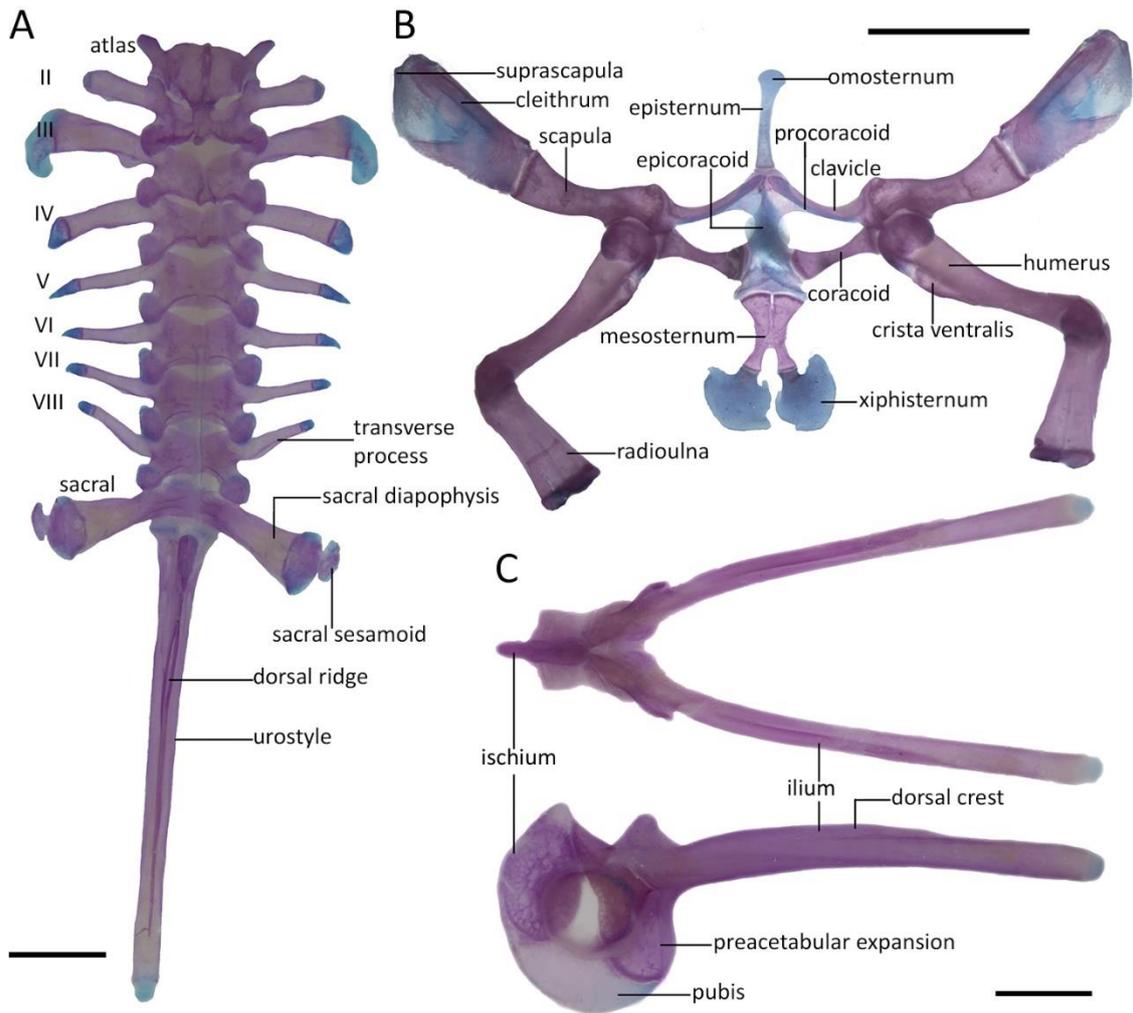


FIGURE 3. Postcranial elements of skeleton of adult male *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469). (A) Axial column in dorsal view. (B) Pectoral girdle in dorsal view with all parts deflected into the ventral plane. (C) Dorsal and (D) lateral views of pelvic girdle. Cartilages are stained blue and mineralized/ossified structures are stained red. Scale line: 2 mm.

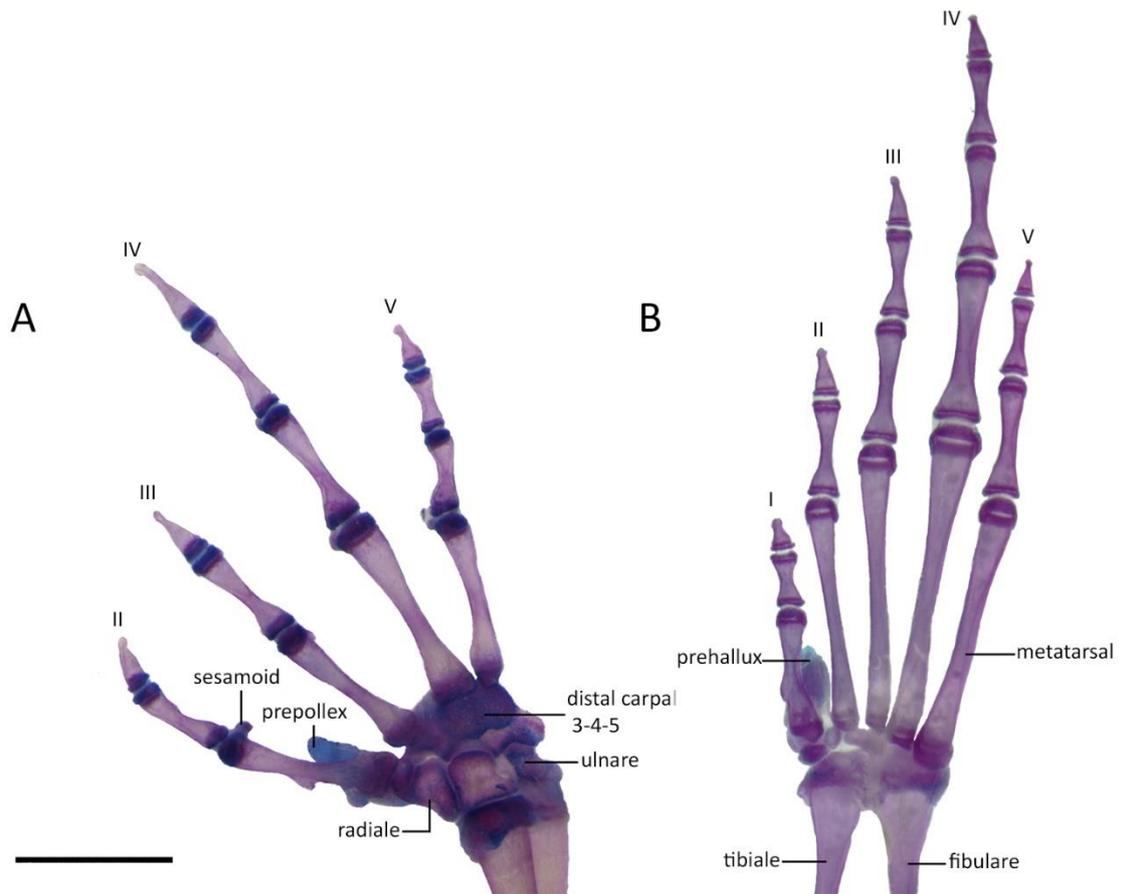


FIGURE 4. Manus (A) and pes (B) in dorsal view of adult male *Physalaemus biligonigerus* (ZUEC 11469 and UFMG 15841, respectively). Cartilages are stained blue and mineralized and ossified structures are stained red. Scale line: 2 mm.