



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

Felipe Paixão de Sena

**REVISÃO TAXONÔMICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Crossodactylus
trachystomus* (Reinhardt & Lütken 1862) NA SERRA DO ESPINHAÇO (Anura:
Hylodidae)**

Belo Horizonte

2023

Felipe Paixão de Sena

REVISÃO TAXONÔMICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt & Lütken 1862) NA SERRA DO ESPINHAÇO (Anura: Hylodidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do título Mestre.

Orientador: Dr. Felipe de Sá Fortes Leite
Coorientadora: Dra. Rachel Montesinos Martins Pereira

Belo Horizonte

2023

043

Sena, Felipe Paixão de.

Revisão taxonômica do complexo de espécies *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt & Lütken 1862) na Serra do Espinhaço (Anura: Hylodidae) [manuscrito] / Felipe Paixão de Sena. – 2023.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Felipe Sá Fortes Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Zoologia. 2. Anuros. 3. Taxonomia. 4. Campo cerrado. I. Leite, Felipe Sá Fortes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

FELIPE PAIXÃO DE SENA

Ao vigésimo sétimo dia do mês de junho do ano de dois mil e vinte e três, às nove horas, ocorreu a defesa de Mestrado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria do Mestrando Felipe Paixão de Sena intitulada: **“Revisão taxonômica do complexo de espécies *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt & Lütken 1862) na Serra do Espinhaço (Anura: Hylodidae)”**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Felipe Sá Fortes Leite, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para o discente para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Clarissa Canedo, Rafael Félix de Magalhães, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do discente.

Após a arguição, apenas os examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: o trabalho foi APROVADO SEM ALTERAÇÕES.

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.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Félix de Magalhães, Usuário Externo**, em 03/07/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clarissa Coimbra Canedo, Usuária Externa**, em 03/07/2023, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Sá Fortes Leite, Usuário Externo**, em 12/07/2023, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2424197** e o código CRC **03EB7CC9**.

Referência: Processo nº 23072.229818/2021-05

SEI nº 2424197

Aos meus pais, Maria do Rosário e Antônio.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão das bolsas de Mestrado pelo País e a FUNARBE (Fundação Arthur Bernardes) pelo amparo a pesquisa científica no País (CNPq/Protax #441802/2020-6).

Aos meus orientadores Felipe e Rachel, por todos os conselhos e puxões de orelha, agradeço a cada ensinamento e pela oportunidade de ter sido orientado por dois grandes pesquisadores a quem me inspiro.

À todas as equipes das coleções visitadas, que me receberam tão bem e me deixaram a vontade para analisar os espécimes. Agradeço ao Dr Clodoaldo de Assis da UFV por ceder tecidos e cantos que foram muito importantes para esse trabalho, agradeço a todos do Museu João Moojen da UFV pela recepção, em especial ao Clodoaldo, Renatão, Duda, Samuli e Leandro, e ao Lucas que me recebeu em sua casa nos dias em que estive em Viçosa; agradeço a equipe do Museu Nacional, ao Dr José Pombal Jr, Manu, Pedro Passos, Pedro Pinna e todos do Laboratório, à todos do laboratório de herpetologia da PUC Minas, Luciana Nascimento, Sophia Virginia, Gabriel, Julia e David; à todos que me receberam no Laboratório da USP em especial ao Taran Grant e a Rachel que me guiaram e a todos do Laboratório da UNICAMP e a Fonoteca Jacques Vielliard; e claro ao Vieira, sua esposa Geyci e seu filho Jonathas que me acolheram durante a estadia em Campinas.

À toda minha família que sempre me apoiou e tanto incentivou que eu seguisse meu caminho e sonhos. Agradeço a minha mãe e meu pai a quem dedico essa dissertação, por toda ajuda financeira, emocional e psicológica, cada palavra de incentivo e conforto para lidar com a distância e com os problemas que surgiram; agradeço a minhas primas Fernanda (Nanda), Jaqueline (Keli) e Silvia que são como irmãs e que me ajudaram financeiramente e durante a estadia em São Paulo pude ficar na casa da Silvia e Keli, matando um pouquinho a saudade, ao meu tio Lourival, meus irmãos Arthur e David, meus segundos pais tia Joana e tio Diassis (pai vovô e mainha), sou muito grato por todos vocês!

A todos os amigos que fiz em BH, todos do Laboratório e a meus anjos da guarda que me acolheram nessa cidade. Agradeço a Gabi, Babi, Brenda, Raíla, Giovanna, Igor e Álvaro do Laboratório; agradeço em especial ao Tiago Pezzuti por ter me apresentado aos meus orientadores e me ajudar a permanecer no PPG; agradeço à Maria Clara Pardini, uma grande amiga, a primeira que fiz em BH e quem me acolheu junto com o James em sua casa; agradeço a Clarissa, Alice, Rafael e Dona Ana por terem me acolhido junto a eles quando saí da casa da Maria Clara, obrigado imensamente a vocês por toda ajuda a suportar a vida longe de casa e me sentir feliz.

A todos do BIOTECPI meu grupo de pesquisa do Piauí. Agradeço ao meu “pai” Dr Etielle Andrade por me apresentar o mundo da herpeto e acreditar que tenho potencial; a meus amigos Lucas e Claylton por terem me incentivado a tentar o mestrado na UFMG; meus amigos de graduação e todos da minha comunidade

Ao Francisco por toda paciência nesses meses fora, por todo apoio e por entender minhas ausências e ansiedade durante esses dois anos, obrigado, ps. Te amo.

RESUMO

A família Hylodidae é composta pelos gêneros *Hylodes*, *Crossodactylus*, *Megaelosia* e *Phatasmarana* que ocorrem predominantemente na Mata Atlântica. *Crossodactylus* é representado por 13 espécies, dentre elas *C. trachystomus* é caracterizada pelo porte pequeno, presença de faixa branca ou creme do focinho ao ombro, presença de faixa lateral oblíqua parcial e barriga reticulada, sendo distribuída pela Serra do Espinhaço, Minas Gerais. Pimenta *et al.* (2015) sinonimizaram *C. trachystomus* e *C. bokermanni* com base em dados morfológicos de adultos. Entretanto, Montesinos (2017) recuperou dois clados irmãos para *C. trachystomus* com uma distância genética de 2% entre eles questionando a sinonímia de Pimenta *et al.* (2015). Além disso, essa autora encontrou um clado representado por espécimes do município de Olhos D'água (MG), que pode se tratar de uma nova espécie. fizemos uma investigação das populações de *C. trachystomus*, com análises de caracterização morfológica de adultos e girinos, vocalização e molecular de populações de *C. trachystomus* ao longo da Serra do Espinhaço. Para análises moleculares foram sequenciados os genes mitocondriais 12s e 16s e fizemos uma filogenia com o critério de otimalidade de Maximo Verossimilhança. Aqui descrevemos três variações morfotípicas com base em adultos de *C. trachystomus*: *C. trachystomus* Quadrilátero; *C. trachystomus* Espinhaço e *C. trachystomus* Olhos D'água. Entretanto, não encontramos nenhuma outra evidência (vocalização, larvas ou filogenia) que justifique separá-las como espécies diferentes. Com base em evidências morfológicas e genéticas, foi possível constatar que a população de Caetité representa uma nova espécie. A nova espécie se distingue de *C. trachystomus* pela ausência da faixa branca do focinho ao ombro, por possuir barriga imaculada e faixa lateral oblíqua parcial reduzida ou ausente. Além disso, *Crossodactylus* sp. nov foi recuperada como linhagem-irmã de *C. trachystomus* e possui uma distância genética que varia de 2 a 5% das demais populações de *C. trachystomus*. Assim, corroboramos a hipótese de Pimenta *et al.* (2015) para *C. trachystomus* e descrevemos uma nova espécie de *Crossodactylus*.

Palavras-chave: Rã de corredeira; Campo rupestre; Taxonomia integrativa

Abstract

Hylodidae is composed by the genera *Hylodes*, *Crossodactylus*, *Megaelosia* and *Phatasmarana* that occur predominantly in the Atlantic Rain Forest. *Crossodactylus* is represented by 13 species, among them *C. trachystomus* is characterized by its small size, presence of a white or cream band from the muzzle to the shoulder, presence of a partial oblique lateral stripe and reticulate belly. The species is distributed throughout the Serra do Espinhaço, Minas Gerais. Pimenta *et al.* (2015) synonymized *C. trachystomus* and *C. bokermanni* based on morphological data from adults. However, Montesinos (2017) recovered two sister clades representing *C. trachystomus* with a genetic distance of 2%, questioning the synonymy of Pimenta *et al.* (2015). In addition, this author found a clade represented by specimens from the municipality of Olhos D'agua (MG), which may be a new species. We carried out an investigation of *C. trachystomus* populations, with morphological characterization analyzes of adults and tadpoles, vocalization, and molecular characterization of *C. trachystomus* populations along Serra do Espinhaço. For molecular analyses, the mitochondrial genes 12s and 16s were sequenced and a phylogeny was performed using the Maxima Likelihood optimality criterion. Here, we describe three morphotypic variations based on *C. trachystomus* adults: *C. trachystomus* Quadrilátero; *C. trachystomus* Espinhaço and *C. trachystomus* Olhos D'água. However, we did not find any other evidence (vocalization, larvae or phylogeny) that justifies separating them as different species. Based on morphological and genetic evidence, it was possible to verify that Caetité population represents a new species. The new species is distinguished from *C. trachystomus* by the absence of white stripe from the snout to the shoulder, by having a white belly and a reduced or absent partial oblique lateral stripe. Furthermore, *Crossodactylus* sp. nov was recovered as a sister lineage of *C. trachystomus* and has a genetic distance that varies from 2 to 4% of the other populations of *C. trachystomus*. Thus, we corroborate the hypothesis of Pimenta *et al.* (2015) for *C. trachystomus* and describe a new species of *Crossodactylus*.

Keywords: torrent frog; Campo Rupestre; integrative taxonomy

Lista de figuras

- Figura 01.** Representação dos quatro morfotipos e suas principais diferenças: a coloração do ventre (primeira coluna): marmoreada em *Crossodactylus trachystomus* SEs e *C. trachystomus* OD, reticulada em *C. trachystomus* QFe e branca em *C. trachystomus* Caetité: formato do focinho e canto rostral (segunda coluna); presença da faixa branca acima do lábio indo do focinho ao ombro (seta azul) e presença da faixa inguinal branca (seta vermelha)..... 20
- Figura 02.** Girinos dos morfotipos: *Crossodactylus trachystomus* SEs em vista lateral (A), dorsal (D), ventral (E) e detalhe do disco oral (J); *C. trachystomus* QFe em vista lateral (B), dorsal (F), ventral (G) e detalhe do disco oral (K); *C. trachystomus* Caetité em vista lateral (C), dorsal (H), ventral (I) e detalhe do disco oral (L). para melhor visualização as papilas do disco oral foram coradas com azul de metileno..... 24
- Figura 03.** Árvore filogenética de Hyloidae representando as relações filogenéticas das populações de *Crossodactylus trachystomus* e o grupo externo formado por representantes dos quatro gêneros da família (*Crossodactylus*, *Hylodes*, *Megaelasia* e *Phantasmarana*) e por *Cycloramphus boraceiensis* (Cycloramphidae)..... 27
- Figura 04.** Detalhamento do clado *Crossodactylus trachystomus*, mostrando as relações entre as diferentes populações amostradas neste estudo..... 28
- Figura 05.** Disposição dos morfotipos recuperados nas análises morfológicas dos adultos na filogenia reconstruída com base em caracteres moleculares: Caetité em amarelo (A), Olhos D'água em verde (B); Serra do Espinhaço em azul (C) e Quadrilátero Ferrífero em lilás (D). 29
- Figura 06.** Holótipo de *Crossodactylus* sp n. (indivíduo UFMG – 2294) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E)..... 32
- Figura 07.** Oscilograma (A), espectrograma (B) e detalhe de uma nota (C) do canto de *Crossodactylus* sp. nova gravado em Caetité, Bahia..... 35
- Figura 08.** Morfotipo de *Crossodactylus trachystomus* Serra do Espinhaço (indivíduo UFMG – 14067) em vista dorsal (A), Ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E)..... 37
- Figura 09.** Morfotipo de *Crossodactylus trachystomus* Quadrilátero Ferrífero (indivíduo UFMG -2306) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E)..... 38

Figura 10. Morfotipo de *Crossodactylus trachystomus* Olhos D'água (indivíduo MZUI 1505) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E). 39

Figura 11. Cantos das populações de *Crossodactylus trachystomus* utilizadas neste estudo: oscilograma (A), detalhe de uma nota do canto (B) e espectrograma (C) de *C. trachystomus* SEs gravado na Serra do Cipó, Minas Gerais; oscilograma (D), detalhe de uma nota do canto (E) e espectrograma (F) de *C. trachystomus* QFe gravado na Serra do Caraça, Minas Gerais e oscilograma (G), detalhe de uma nota do canto (H) e espectrograma (I) de *C. trachystomus* OD gravado na Olhos D'água, Minas Gerais... 40

Figura 12. Mapa de distribuição de *Crossodactylus trachystomus* (círculos azuis) e seus morfotipos: *C. trachystomus* SEs (azul claro), *C. trachystomus* QFe (círculo azul escuro) e *C. trachystomus* OD (círculo azul piscina) e *Crossodactylus* sp. nov. Caetité (losango amarelo) nos estados de Minas Gerais e Bahia. A cruz vermelha indica as localidades que foram utilizadas para análises moleculares. América do Sul representada no canto superior direito, destacado a área de distribuição das espécies. Caatinga em marrom, Cerrado em cinza e Mata Atlântica em verde..... 41

Lista de tabelas

Tabela 01. Lista de primers utilizados para o sequenciamento, direção e a sequência de bases, os primers são dos trabalhos de Palumbi *et al.* (1991); Hedges (1994); Titus & Larson (1996); Graybeal (1997); Feller & Hedges (1998); Goebel *et al.* (1999)..... 57

Tabela 02. Medidas (em milímetros) dos quatro morfotipos de *Crossodactylus trachystomus*, apresentando média, desvio padrão (\pm) e entre parênteses o range dos morfotipos divididos em machos e fêmeas (a população de Olhos D'água possui apenas machos). Medidas: comprimento rostró-cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CC); comprimento da tíbia (CT); comprimento da coxa (CCx); comprimento do tarso (CTr); comprimento do pé (CP); comprimento do braço (CB); comprimento do antebraço (CAB); comprimento da mão (CM); largura da cabeça (LC); largura do focinho (LF); distância interorbital (DIO); distância internasal (DIN); distância olho-narina (DON); distância narina-focinho (DNF); diâmetro ocular (DO) e diâmetro timpânico (DT).... 20

Tabela 03. Medidas (em milímetros) dos girinos das populações de *Crossodactylus trachystomus* analisadas, apresentando média, desvio padrão (\pm) e entre parênteses o range das populações usadas para medição, os girinos foram agrupados de acordo com as localidades dos morfotipos de morfologia externa do adulto. Medidas: comprimento total (CT); comprimento do corpo (CC); comprimento da cauda (CCa); comprimento do espiráculo (CE); largura do máxima do corpo (LMC); largura do corpo em relação aos olhos (LCO); largura do corpo em relação as narinas (LCN); largura do músculo da cauda (LMCa); largura do disco oral (LDO); largura do tubo ventral (LTV); altura máxima da cauda (AMC); altura da nadadeira ventral (ANV); altura da nadadeira dorsal (AND); altura do músculo da cauda (AMuC); altura máxima do corpo (AMCo); altura máxima do tubo ventral (AMTV); altura do espiráculo (AE); distância interocular (DIO); distância internasal (DIN); distância focinho-espiráculo (DFE); distância olho-narina (DON); distância narina-focinho (DNF); diâmetro da narina (DN) e diâmetro ocular (DO)..... 22

Tabela 04. Comparação entre o canto das quatro populações de estudadas *Crossodactylus trachystomus* e a descrição do canto de *Crossodactylus trachystomus* feita por Pimenta *et al.* 2008. Parâmetros utilizados com média \pm desvio padrão. Valores máximo e mínimo apresentados entre parênteses..... 25

Tabela 05. Matriz de distância genética par a par dos grupos formados dentro de *Crossodactylus trachystomus*: *C. trachystomus* Serra do Cipó (SC); *C. trachystomus* Quadrilátero Ferrífero (QFe); *C. trachystomus* Santo Antônio do Itambé (ITA); *C. trachystomus* Olhos D'água (OD); *C. trachystomus* Mariana (MA); *C. trachystomus* Diamantina – Rio Pardo (DM – RP) e *C. trachystomus* Caetité. A distância dentro dos grupos varia de 0,00 a 0,02..... 28

Sumário

Introdução	14
Materiais e Métodos	15
Coleções visitadas	15
Morfologia do adulto	16
Morfologia da larva	16
Análises acústicas.....	17
Análises genéticas	17
Resultados	18
Morfologia externa do adulto	18
Morfologia externa do girino	23
Vocalização.....	27
Análises moleculares.....	30
Conclusões taxonômicas	34
Descrição de uma nova espécie de <i>Crossodactylus</i>	35
Redescrição de <i>Crossodactylus trachystomus</i> (Reinhardt & Lütken, 1862 “1861”)	39
Discussão	46
Referências	50
Anexos	59

Introdução

Hylodidae é uma família de rãs sul-americanas associadas a ambientes encachoeirados, distribuídas desde o estado de Alagoas, no nordeste do Brasil, até o norte da Argentina (FROST, 2023). A família é composta por 48 espécies, divididas em quatro gêneros: *Crossodactylus* Duméril & Bibron 1841, *Hylodes* Fitzinger, 1826, *Phantasmarana* Vittorazzi; Augusto-Alves; Neves-da-Silva, Carvalho-da-Silva; Recco-Pimentel; Toledo; Lourenço & Bruschi, 2021 e *Megaelosia* Miranda-Ribeiro, 1923 (DE SÁ *et al.* 2022; VITTORAZI, *et al.* 2021a). *Crossodactylus* compreende atualmente 13 espécies e possui distribuição geográfica semelhante à da família (FROST, 2022; VITTORAZI, *et al.* 2021b).

Crossodactylus trachystomus é caracterizado por ter um porte pequeno (comprimento rostro-cloacal: 18 – 27 mm), focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral, uma faixa lateral branca ou creme acima do lábio indo do focinho até o ombro e outra na região inguinal (faixa lateral oblíqua parcial) e barriga reticulada (PIMENTA *et al.* 2015); a larva possui corpo globular em vista lateral e arredondado em vista dorsal, disco oral emarginado com um largo gap anterior e duas fileiras de papilas submarginais, com uma fórmula dental 2(2)/3(1), coloração geral amarronzada e cauda marmoreada (CARAMASCHI & KISTEUMACHER, 1998; PEZZUTI *et al.* 2022); o canto é longo (1,4 – 10,2 s), composto por harmônicos, sendo a frequência fundamental encontrada entre o primeiro e o segundo harmônico (PIMENTA *et al.* 2008). A espécie possui distribuição restrita à Serra do Espinhaço (daqui para a frente Espinhaço) (Pimenta *et al.*, 2008), uma das maiores cadeias de montanha do América do Sul, que se estende por cerca de 1.300 km no leste brasileiro (ALMEIDA-ABREU & RENGER 2002). O Espinhaço é dividido em duas grandes seções: o Espinhaço setentrional, na Bahia e o Espinhaço meridional que ocorre em sua maioria em Minas Gerais, sendo o Quadrilátero Ferrífero (daqui para a frente Quadrilátero) a sua formação mais ao sul (ALMEIDA-ABREU & RENGER 2002). *Crossodactylus trachystomus* é uma das espécies endêmicas do Espinhaço com maior distribuição latitudinal, ocorrendo desde o Quadrilátero, até o norte de Minas Gerais próximo à sua divisa com a Bahia (LEITE *et al.*, 2008; PIMENTA *et al.*, 2008).

A crescente disponibilidade de dados moleculares, bem como a aplicação de abordagens analíticas, tem possibilitado identificar e descrever espécies crípticas de anfíbios no mundo (PADIAL & DE LA RIVA, 2009; NUNEZ *et al.* 2012; CHEN *et al.* 2021) e no Brasil (MÂNGIA *et al.* 2020; SILVA *et al.* 2020; PINHEIRO *et al.*, 2021; BRUNES *et al.*, 2023). Baseado em hipóteses filogenéticas é possível investigar se determinadas linhagens

possuem diagnoses morfológicas que outrora podem ter sido consideradas variações bem distribuídas entre as populações de uma espécie. Nos últimos anos, investigações desse tipo realizadas com anfíbios do Espinhaço permitiram que espécies crípticas, que anteriormente eram consideradas uma única espécie, fossem identificadas e descritas. Por exemplo, *Bokermannohyla nanuzae*, espécie que possuía distribuição ampla no Espinhaço meridional, semelhante à de *Crossodactylus trachystomus*, após análises moleculares foi dividida em duas espécies (WALKER *et al.*, 2015). As populações do Quadrilátero e do leste do Espinhaço foram atribuídas à *B. feioi* e as populações situadas na parte central do Espinhaço permaneceram como *B. nanuzae* (BRUNES *et al.*, 2023). Dados moleculares também permitiram a descrição do hilídeo endêmico da encosta leste da Serra do Cipó *Aplastodiscus heterophonicus*, que é morfológicamente indistinguível de *A. cavicola*, que, no Espinhaço, ocorre apenas no Quadrilátero (PINHEIRO *et al.*, 2021). Em ambos os exemplos, os pares de espécies crípticas em questão não foram recuperadas como irmãs.

Pimenta *et al.* (2015) sugeriram, baseados em dados morfológicos, que *Crossodactylus bokermanni* é sinônimo júnior de *C. trachystomus*. Montesinos (2017), em uma análise de evidência total, verificou a presença de dois clados em *C. trachystomus*, um endêmico da região da Serra do Cipó e outro ocorrendo no Quadrilátero (Serra do Caraça) e na Serra do Cipó, questionando a sinonímia feita por Pimenta *et al.* (2015). A autora verificou também no Espinhaço, em Olhos D'água, uma linhagem relacionada (grupo irmão dos clados supracitados) à *C. trachystomus* que foi considerada potencialmente uma espécie nova.

Diante das diferentes evidências que apontam para resultados distintos daqueles observados por Pimenta *et al.* (2015), este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de diferentes fontes de evidências (i.e., dados genéticos, morfológicos de diferentes semaforontes e bioacústicos) se as populações de *Crossodactylus trachystomus* constituem espécies distintas com boas diagnoses morfológicas, se representam espécies crípticas escondidas sob o nome de *C. trachystomus* ou se todas as populações do Espinhaço atribuídas ao complexo *C. trachystomus* pertencem a uma mesma espécie.

Materiais e Métodos

Coleções visitadas

Foram analisados espécimes de *Crossodactylus trachystomus* e *Crossodactylus* sp. aff. *trachystomus* depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Coleção Zoológica do Museu de Ciências e História Natural da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNAM), Coleção de Herpetologia do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ), Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Coleção de Herpetologia do Museu João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV) e Coleção de Herpetologia do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC).

Morfologia do adulto

Foram analisados e medidos 207 espécimes adultos de *Crossodactylus trachystomus* e seis espécimes de *Crossodactylus* aff. *trachystomus* (Anexo I). As medidas foram feitas através de paquímetro digital com precisão de um milímetro e seguiram Kok & Kalamandeen (2008) e Pimenta *et al.* (2014; 2015): comprimento rostro-cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CC); comprimento da tíbia (CT); comprimento da coxa (CCx); comprimento do tarso (CTr); comprimento do pé (CP); comprimento do braço (CB); comprimento do antebraço (CAB); comprimento da mão (CM); largura da cabeça (LC); largura do focinho (LF); distância interorbital (DIO); distância internasal (DIN); distância olho-narina (DON); distância narina-focinho (DNF); diâmetro ocular (DO) e diâmetro timpânico (DT). A terminologia da morfologia externa seguiu Pimenta *et al.* (2014).

Morfologia da larva

Foram analisados e medidos 28 girinos de *Crossodactylus trachystomus* e *Crossodactylus* aff. *trachystomus* de nove lotes entre os estágios 34 – 38, segundo a tabela de Gosner (1960) (Anexo II). A identificação dos girinos foi confirmada por meio de comparação dos caracteres descritos por Caramaschi & Sazima (1985); Caramaschi & Kisteumacher (1989) e Pezzuti *et al.* (2022). Foi utilizado o método de fotografia de alta qualidade utilizando câmera fotográfica para fazer fotos em vista dorsal, lateral e ventral dos girinos sob plataforma ajustável, imersos em água (SCHACHT & MCBRAYER, 2009). Em seguida, as fotos foram utilizadas para medição das larvas através do programa TPS.dig. v.

2.31. As medidas seguiram Altig & McDiarmid (1999) e Pezzuti *et al.* (2022): comprimento total (CT); comprimento do corpo (CC); comprimento da cauda (CCa); comprimento do espiráculo (CE); largura do máxima do corpo (LMC); largura do corpo em relação aos olhos (LCO); largura do corpo em relação as narinas (LCN); largura do músculo da cauda (LMCa); largura do disco oral (LDO); largura do tubo ventral (LTV); altura máxima da cauda (AMC); altura da nadadeira ventral (ANV); altura da nadadeira dorsal (AND); altura do músculo da cauda (AMuC); altura máxima do corpo (AMCo); altura máxima do tubo ventral (AMTV); altura do espiráculo (AE); ângulo de inserção da nadadeira; ângulo de inserção do disco oral; distância interocular (DIO); distância internasal (DIN); distância focinho-espiráculo (DFE); distância olho-narina (DON); distância narina-focinho (DNF); diâmetro da narina (DN) e diâmetro ocular (DO). A terminologia da morfologia externa da larva seguiu Pezzuti *et al.* (2022).

Análises acústicas

Foram analisados 64 cantos obtidos por meio de empréstimos da Coleção Audiovisual do Museu Nacional da UFRJ (MNVOC 16_20; MNVOC 17_01), da Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard (FNJV 31699; FNJV 32033) e dos acervos pessoais do Dr. Clodoaldo Lopes de Assis e Felipe de Sá Fortes Leite (UFV), totalizando dez gravações feitas por meio de gravador Tascam-DR40, Uher 4000 Report UC ou Marantz PMD660, e com microfones unidirecionais Internal ou Sennheiser ME 66 acoplado. Os parâmetros utilizados seguiram Pimenta *et al.* (2008): duração do canto (Δt); duração da nota; máxima frequência à 95%; mínima frequência à 5%; distância entre cantos; distância entre notas; número de cantos; número de notas por canto; pico de frequência e modulação de amplitude. Para remoção dos artefatos e ruídos provocados pela água foi utilizado o programa Audacity v. 3.0.2, com a ferramenta obtenção do perfil do ruído e diminuição de ruído. Em seguida, os sons limpos passaram para análise dos parâmetros pelo programa Raven pro. V. 1.6.4 (YANG, 2019). Os sonogramas foram obtidos usando window size de 512 samples, 75% de overlap, hop size de 128 samples e uma Transformação Discreta de Fourier de 512 samples, com uma janela do tipo Hann. A terminologia seguiu Köhler *et al.* (2017). Os resultados obtidos foram comparados aos de Pimenta *et al.* (2008).

Análises genéticas

As sequências de DNA obtidas foram extraídas de tecido do músculo da coxa ou fígado preservado em álcool absoluto de 23 espécimes (Anexo III), com kit de extração DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). Foram analisadas as sequências parciais dos genes ribossomais 16S e 12S (Anexo IV). O DNA foi amplificado através da reação de PCR (polymerase chain reactions) com volume final de 25 μ L usando os seguintes reagentes: 2,5 μ L de Buffer, 2 μ L de Mg, 1 μ L de DNTP, 0,15 μ L de Taq e 1 μ L de cada primer. Os ciclos de PCR consistiam inicialmente de uma desnaturação de 3 min a 96° C seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação de 30s a 96°C, anelamento de 30s a 45°- 48°C e extensão por 60s a 60° C), com uma etapa final de extensão definida em 60 °C por 7 min. Os produtos do PCR foram limpos usando Agencourt AMPure XP, e depois sequenciado pela Macrogen Inc.; Seul, Coreia. Todas as amostras foram sequenciadas em ambas as direções para verificar possíveis erros de sequenciamento. Os cromatogramas das sequências obtidas foram editados no Geneious (KEARSE *et al.* 2012) e as sequências foram alinhadas usando o MAFFT (KATO & STANDLAIEY, 2013). Adicionalmente, foram utilizadas sequências depositadas no Genbank (Anexo III).

Foram estimadas distâncias *p* intraespecífica e interespecífica usando o MEGA v.6.0. Para isso, foi utilizado o gene 16 S devido a sua maior cobertura amostral e por ser uma região mais comumente utilizada para delimitação de espécies (VIEITES *et al.* 2009). Para a reconstrução da hipótese filogenética foi feita uma árvore sob o critério de Máxima Verossimilhança através no software RAxML v. 8.0 (STAMATAKIS, 2014) combinando os genes 12S e 16S. O suporte dos clados foi calculado por bootstrap com 10000 réplicas. A árvore final foi visualizada utilizando o FigTree v1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2012) e editada no Adobe Illustrator. O grupo externo foi representado por outros representantes dos gêneros da família Hylodidae e de um de Cycloramphidae, utilizado para enraizar a árvore (Anexo III). Para o grupo interno, apenas foram incluídos representantes cuja morfologia externa de adultos pôde ser analisada.

Resultados

Morfologia externa do adulto

Foram verificados 213 espécimes adultos, dos quais 123 eram machos e 90 fêmeas. Após as análises morfológicas, os indivíduos analisados puderam ser distinguidos em quatro morfotipos que foram nomeados conforme sua distribuição geográfica: *Crossodactylus trachystomus* Espinhaço (Es); *C. trachystomus* Quadrilátero (QFe); *C. trachystomus* Olhos D'água (OD) e *C. trachystomus* Caetité.

Crossodactylus trachystomus Es apresenta o focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral (Figura 01), presença de uma faixa branca ou creme acima do lábio (Figura 01, 1), tímpano distinto, cristas dorsolaterais marcadas, ventre marmoreado (Figura 01, A), fimbrias e franja tarsal reduzidas e presença de três espinhos por polegar. *C. trachystomus* QFe possui focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral (Figura 01), presença de uma faixa branca ou creme acima do lábio (Figura 01, 1), tímpano distinto, cristas dorsolaterais marcadas, ventre reticulado (Figura 01, B), fimbrias e franja tarsal largas, presença de mais espinhos no polegar (três espinhos em um polegar e quatro no outro ou quatro em ambos, as demais populações apresentam três em cada polegar) que os demais morfotipos. Já *C. trachystomus* OD apresenta focinho truncado em vista dorsal e acuminado em vista lateral (Figura 01), presença de uma faixa branca ou creme acima do lábio (Figura 01, 1), ventre marmoreado (Figura 01, C), fimbrias e franja tarsal reduzidas, faixa lateral oblíqua parcial chegando até meio do corpo, enquanto a dos demais chega até a escapula (Figura 01, 2) e cristas dorsolaterais bem marcadas, fimbrias e franja tarsal reduzidas e três espinhos por polegar. Por fim, *C. trachystomus* Caetité possui focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral (Figura 01), tímpano pouco distinto, distinto nos demais morfotipos, ventre imaculado (Figura 01, D), fimbrias e franja tarsal reduzidas, cristas dorsolaterais pouco marcadas, coloração do corpo mais escura, faixa branca acima do lábio ausente e faixa lateral oblíqua parcial ausente ou muito reduzida (Figura 01 e Tabela 02).

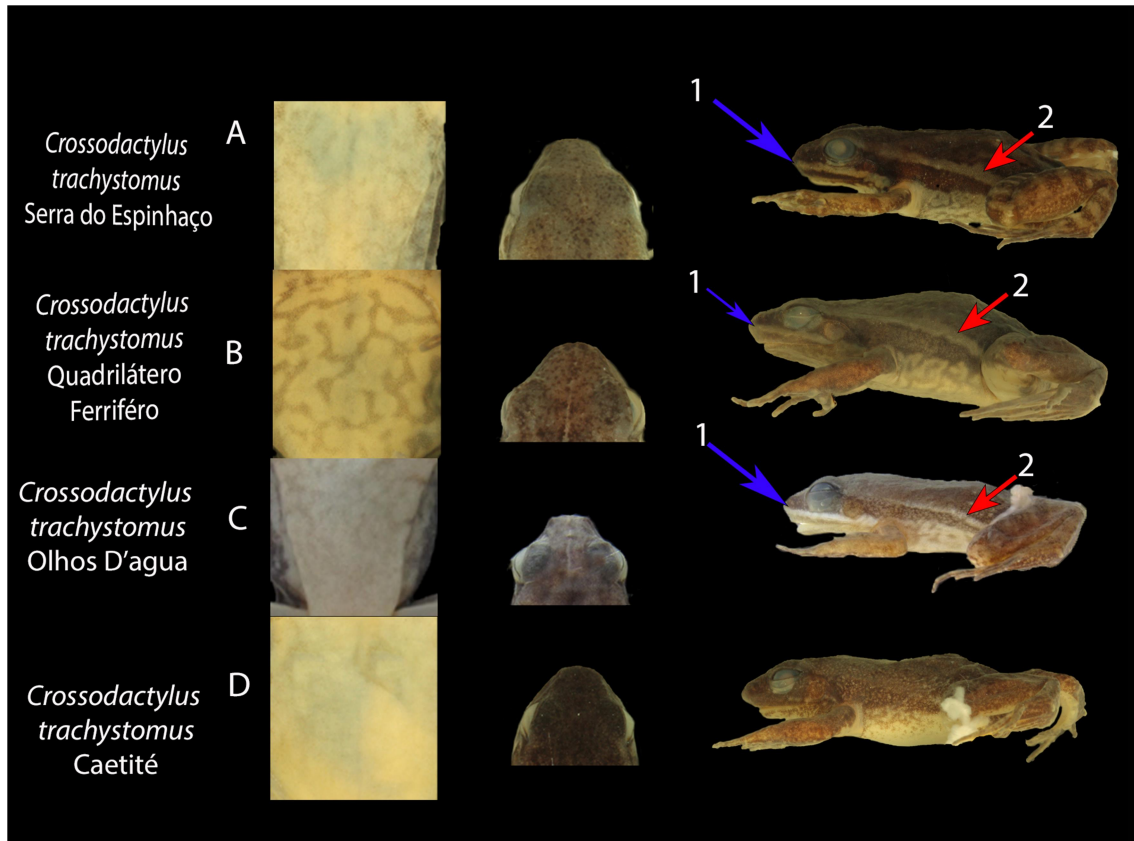


Figura 01: Representação dos quatro morfotipos e suas principais diferenças: a padrão de coloração do ventre (primeira coluna): marmoreado em *Crossodactylus trachystomus* Es (A) e *C. trachystomus* OD (C), reticulado em *C. trachystomus* QFe (B) e immaculado em *C. trachystomus* Caetité (D); formato do focinho (segunda coluna); presença da faixa branca acima do lábio indo do focinho ao ombro (1: seta azul) e presença da faixa inguinal branca (2: seta vermelha).

Tabela 02: Medidas (em milímetros) dos quatro morfotipos de *C. trachystomus*, apresentando média \pm desvio padrão (máximo – mínimo), divididos em machos e fêmeas (a população de Olhos D'água possui apenas machos). Medidas: comprimento rostró-cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CC); largura da cabeça (LC); distância interorbital (DIO); distância olho-narina (DON); distância internasal (DIN); distância narina-focinho (DNF); largura do focinho (LF); diâmetro ocular (DO) e diâmetro timpânico (DT) comprimento da tíbia (CT); comprimento da coxa (CCx); comprimento do tarso (CTr); comprimento do pé (CP); comprimento do antebraço (CAB); comprimento do braço (CB); comprimento da mão (CM).

Medidas (mm)	<i>C. trachystomus</i> Espinhaço		<i>C. trachystomus</i> Quadrilátero		<i>C. trachystomus</i> Caetité		<i>C. trachystomus</i> Olhos D'agua
	Macho (n=25)	Fêmea (n=45)	Macho (n=82)	Fêmea (n=25)	Macho (n=18)	Fêmea (n= 10)	Macho (n=6)
CRC	21,70 \pm 1,84 (17,45 - 25,90)	21,89 \pm 2,11 (16,40 - 25,71)	21,67 \pm 1,75 (16,42 - 26,30)	21,02 \pm 2,95 (16,75 - 27,23)	20,14 \pm 1,93 (17,15 - 24)	21,06 \pm 1,94 (16,40 - 23,10)	19,00 \pm 0,43 (18,45 - 19,55)
CC	8,28 \pm 0,52 (7,17 - 9,05)	8,50 \pm 0,65 (6,76 - 9,90)	8,53 \pm 0,56 (6,25 - 9,94)	8,25 \pm 0,80 (6,67 - 9,93)	7,95 \pm 0,64 (6,90 - 9,24)	7,99 \pm 0,42 (7,06 - 8,63)	7,71 \pm 0,33 (7,38 - 8,43)
LC	6,92 \pm 0,57 (6,04 - 8,13)	6,99 \pm 0,69 (4,85 - 7,92)	7,21 \pm 0,44 (5,88 - 8,42)	6,89 \pm 0,83 (5,47 - 8,70)	6,43 \pm 0,52 (5,81 - 7,53)	6,71 \pm 0,52 (5,27 - 7,24)	6,51 \pm 0,27 (6,18 - 6,98)
DIO	2,22 \pm 0,25 (1,85 - 2,81)	2,17 \pm 0,22 (1,79 - 2,55)	2,26 \pm 0,23 (1,93 - 3,36)	2,15 \pm 0,28 (1,65 - 2,73)	2,28 \pm 0,23 (1,77 - 2,65)	2,26 \pm 0,14 (2,02 - 2,55)	1,86 \pm 0,11 (1,72 - 2,05)
DON	1,53 \pm 0,21 (1,07 - 1,91)	1,61 \pm 0,20 (1,21 - 2,05)	1,50 \pm 0,20 (1,12 - 2,04)	1,46 \pm 0,22 (1,05 - 1,87)	1,58 \pm 0,21 (1,30 - 1,98)	1,54 \pm 0,12 (1,30 - 1,74)	1,41 \pm 0,16 (1,17 - 1,42)
DIN	2,14 \pm 0,31 (1,41 - 2,92)	2,21 \pm 0,26 (1,56 - 3)	2,22 \pm 0,23 (1,61 - 2,73)	2,15 \pm 0,33 (1,51 - 2,7)	2,20 \pm 0,16 (1,99 - 2,45)	2,07 \pm 0,23 (1,62 - 2,50)	1,69 \pm 0,17 (1,33 - 1,86)
DNF	0,77 \pm 0,19 (0,45 - 1,06)	0,81 \pm 0,17 (0,44 - 1,13)	0,84 \pm 0,21 (0,47 - 1,4)	0,77 \pm 0,16 (0,36 - 1,03)	1,02 \pm 0,19 (0,76 - 1,4)	0,94 \pm 0,21 (0,54 - 1,45)	0,64 \pm 0,19 (0,42 - 0,94)
LF	3,28 \pm 0,47 (2,31 - 4,14)	3,36 \pm 0,33 (2,45 - 3,89)	3,45 \pm 0,34 (2,70 - 4,18)	3,35 \pm 0,39 (2,69 - 3,98)	3,46 \pm 0,23 (3,18 - 3,95)	3,25 \pm 0,36 (2,39 - 3,81)	2,93 \pm 0,15 (2,71 - 3,16)

DO	2,67 ± 0,35 (1,58 - 3,12)	2,81 ± 0,32 (2,09 - 3,40)	2,83 ± 0,23 (2,00 - 3,36)	2,81 ± 0,39 (2,10 - 3,50)	2,55 ± 0,25 (2,16 - 3,11)	2,57 ± 0,23 (2,08 - 2,88)	1,59 ± 0,18 (1,27 - 1,8)
DT	1,84 ± 0,23 (1,42 - 2,28)	1,77 ± 0,26 (1,22 - 2,39)	1,92 ± 0,18 (1,11 - 2,34)	1,82 ± 0,25 (1,35 - 2,32)	1,71 ± 0,20 (1,45 - 2,03)	1,7 ± 0,17 (1,26 - 1,90)	1,59 ± 0,18 (1,27 - 1,80)
CT	10,99 ± 0,85 (9,35 - 13,30)	11,39 ± 0,95 (9,32 - 12,40)	10,80 ± 0,74 (8,45 - 13,12)	10,5 ± 1,14 (8,43 - 12)	10,20 ± 0,58 (10,47 - 11,45)	10,52 ± 0,85 (8,50 - 11,59)	9,97 ± 0,14 (9,69 - 10,12)
CCx	10,42 ± 0,78 (8,40 - 11,59)	10,83 ± 1,04 (8,54 - 12,4)	10,36 ± 0,78 (7,60 - 11,92)	10,22 ± 1,07 (8,10 - 11,96)	9,91 ± 0,52 (9,08 - 10,78)	9,87 ± 0,91 (7,68 - 10,96)	9,73 ± 0,41 (8,95 - 10,2)
CTr	5,16 ± 0,61 (4,28 - 6,43)	5,42 ± 0,67 (3,84 - 6,73)	5,13 ± 0,34 (4,11 - 6,51)	5,07 ± 0,67 (3,83 - 6,23)	4,54 ± 0,33 (3,82 - 5)	4,87 ± 0,37 (4,32 - 5,56)	4,33 ± 0,08 (4,23 - 4,47)
CP	12,19 ± 1,65 (10,00 - 18,87)	12,48 ± 1,22 (9,78 - 14,7)	12,01 ± 0,99 (8,92 - 14,99)	11,58 ± 1,31 (8,99 - 13,69)	10,79 ± 0,52 (10,10 - 11,7)	11,32 ± 0,73 (9,32 - 12,36)	10,83 ± 0,20 (10,58 - 11,16)
CAB	4,14 ± 0,49 (3,45 - 5,19)	4,25 ± 0,47 (2,95 - 5,07)	4,17 ± 0,45 (3,12 - 5,41)	4,04 ± 0,49 (3 - 5,01)	3,84 ± 0,32 (3,23 - 4,26)	3,66 ± 0,39 (2,90 - 4,32)	3,8 ± 0,27 (3,45 - 4,23)
CB	5,75 ± 0,58 (4,47 - 7,13)	5,81 ± 0,72 (4,07 - 7,08)	5,83 ± 0,56 (4,33 - 7,25)	5,67 ± 0,83 (4,31 - 6,95)	5,05 ± 0,47 (4,3 - 6,03)	4,96 ± 0,64 (3,71 - 6,60)	5,31 ± 0,41 (4,16 - 5,84)
CM	6,91 ± 0,49 (6,07 - 7,69)	7,05 ± 0,56 (5,93 - 8,00)	7,00 ± 0,47 (5,40 - 7,89)	6,56 ± 0,63 (5,34 - 7,54)	6,24 ± 0,41 (5,5 - 6,84)	6,17 ± 0,44 (5,28 - 7,04)	6,44 ± 0,30 (5,86 - 6,70)

Morfologia externa do girino

Os girinos de *C. trachystomus* não apresentaram diferenças morfológicas e morfométricas dos descritos por Pezzutti *et al.* (2022) e Caramaschi & Kisteumacher (1989). Todas as populações apresentam fórmula oral 2(2)/3(1); corpo deprimido em vista lateral e arredondado em vista dorsal; espiráculo sinistro, curto e largo; disco oral emarginado com um gap anterior; presença de seis a oito papilas submarginais; corpo de coloração marrom escuro uniforme e cauda de cor clara com manchas arredondadas (Figura 02; Tabela 03). Não tivemos acesso às larvas da população de Olhos D'água.

Alguns representantes (11 indivíduos) de Caetité apresentaram variação no formato do corpo, sendo elíptico em vista dorsal do corpo e com nadadeiras curtas. Entretanto, essas variações podem ser artefatos de fixação e/ou representar uma plasticidade fenotípica.

Tabela 03: Medidas (em milímetros) dos girinos das populações de *C. trachystomus* analisadas, apresentando média \pm desvio padrão (máximo – mínimo). Os girinos foram agrupados de acordo com as localidades dos morfotipos de morfologia externa do adulto. A população de Olhos D'água não possui larvas conhecidas. Medidas: comprimento total (CT); comprimento do corpo (CC); comprimento da cauda (CCa); altura máxima da nadadeira (AMN); altura da nadadeira dorsal (AND); altura da nadadeira ventral (ANV); altura do músculo da cauda (AMM); altura máxima do corpo (AC); ; diâmetro da narina (DN); distância narina-focinho (DNF); distância olho-narina (DON); distância olho-focinho (DOF); diâmetro ocular (DO); largura do máxima do corpo (LC); largura do corpo em relação as narinas (LCN); largura do corpo em relação aos olhos (LCO); largura do músculo da cauda (LM); distância internasal (DIN); largura do disco oral (LDO); comprimento do espiráculo (CE); distância espiráculo-focinho (DEF), largura do tubo ventral (LTV) e comprimento do tubo ventral (CTV).

Medidas (mm)	<i>C. trachystomus</i> Espinhaço	<i>C. trachystomus</i> Quadrilátero	<i>C. trachystomus</i> Caetité
CT	42,98 \pm 3,16 (39,00 - 47,90)	40,50 \pm 1,74 (30,50 - 48,1)	22,96 \pm 5,72 (28,06 - 32,64)
CC	14,36 \pm 4,60 (8,71 - 19,75)	10,58 \pm 3,10 (12,50 - 18,12)	8,39 \pm 1,36 (5,00 - 10,38)
CCa	28,62 \pm 4,30 (22,62 - 33,6)	20,19 \pm 6,60 (17,00 - 29,00)	16,00 \pm 4,40 (12,16 - 26,65)
AMN	9,30 \pm 4,20 (3,14 - 4,64)	6,63 \pm 2,00 (7,59 - 11,00)	4,97 \pm 1,40 (2,00 - 7,17)
AND	3,51 \pm 1,15 (2,09 - 4,68)	2,44 - 1,09 (2,71 - 4,8)	1,77 \pm 0,42 (1,35 - 2,47)
ANV	2,73 \pm 0,90 (1,24 - 3,72)	1,97 - 0,38 (2,19 - 2,93)	1,40 \pm 0,86 (1,00 - 2,3)
AMM	4,69 \pm 1,80 (2,33 - 8,21)	3,64 \pm 2,40 (3,53 - 8,00)	2,9 \pm 0,90 (1,70 - 4,94)

AC	8,40 ± 2,30 (6,26 - 12,40)	5,80 ± 2,40 (6,40 - 10,00)	4,49 ± 1,30 (2,22 - 5,76)
DN	0,77 ± 1,10 (0,29 - 1,30)	1,99 ± 0,40 (0,45 - 1,50)	0,53 ± 1,00 (0,20 - 1,10)
DNF	3,98 ± 1,10 (2,30 - 4,32)	7,8 ± 1,00 (4,03 - 7,90)	5,57 ± 3,70 (1,60 - 7,30)
DON	4,17 ± 1,10 (2,45 ± 3,48)	2,90 ± 0,76 (3,74 - 5,22)	2,26 ± 0,53 (1,21 - 3,10)
DOF	1,41 ± 1,19 (0,26 - 2,70)	5,67 ± 2,05 (5,19 - 8,30)	4,93 ± 1,30 (0,76 - 1,50)
DO	3,23 ± 1,00 (1,29 - 3,40)	2,39 ± 0,64 (1,21 - 2,44)	1,46 ± 1,40 (1,77 - 2,40)
LC	10,15 ± 1,15 (4,21 - 10,91)	7,99 ± 1,43 (7,90 - 9,71)	6,22 ± 1,20 (3,07 - 8,20)
LCN	6,20 ± 1,80 (3,00 - 8,00)	4,51 ± 1,60 (4,50 - 5,70)	3,6 ± 0,60 (2,88 - 4,60)
LCO	9,60 ± 3,00 (4,80 - 10,00)	6,84 ± 2,00 (6,56 - 8,00)	5,27 - 1,14 (4,19 - 8,10)
LM	12,72 ± 2,30 (5,40 - 14,05)	2,84 ± 0,99 (3,50 - 5,16)	7,88 ± 1,80 (2,30 - 9,00)

DIN	$3,63 \pm 1,10$ (2,09 - 5,40)	$2,14 \pm 0,77$ (2,60 - 4,14)	$2,3 \pm 0,50$ (1,20 - 3,20)
LDO	$2,9 \pm 1,24$ (1,09 - 3,37)	$3,3 \pm 0,35$ (1,32 - 2,02)	$1,67 \pm 0,40$ (0,60 - 2,10)
CE	$1,92 \pm 1,00$ (0,90 - 2,70)	$1,45 \pm 0,64$ (1,21 - 2,40)	$1,11 \pm 1,00$ (0,60 - 2,10)
DEF	$4,50 \pm 2,00$ (1,28 - 3,80)	$4,50 \pm 0,70$ (3,50 - 4,80)	$4,90 \pm 2,00$ (1,70 - 2,60)
LTV	$2,11 \pm 0,58$ (1,29 - 2,81)	$1,69 \pm 0,57$ (1,74 - 2,77)	$1,20 \pm 0,30$ (1,09 - 1,60)
CTV	$2,56 \pm 0,97$ (1,55 - 3,76)	$2,60 \pm 0,36$ (1,95 - 2,61)	$1,40 \pm 0,40$ (1,20 - 1,60)

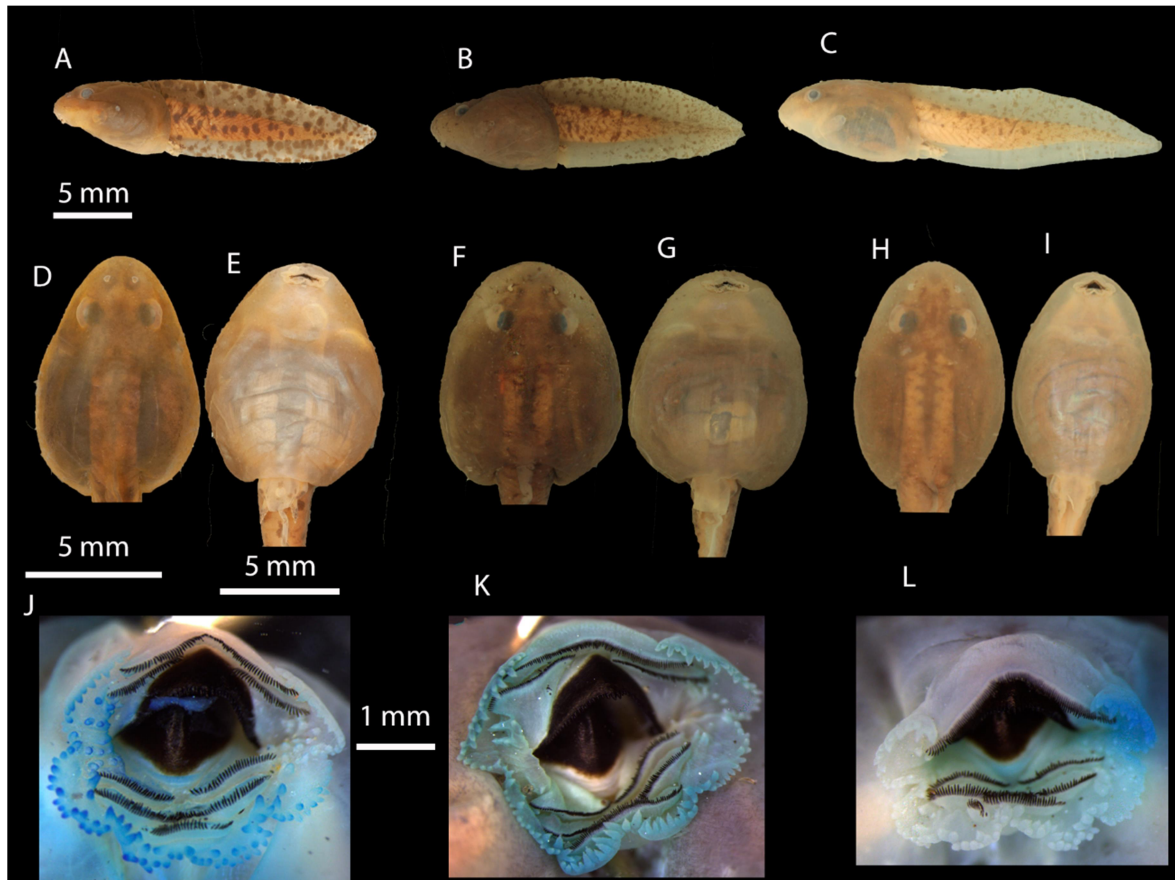


Figura 02: Larvas dos três morfótipos analisados: *Crossodactylus trachystomus* Es em vista lateral (A), dorsal (D), ventral (E) e detalhe do disco oral (J); *C. trachystomus* QFe em vista lateral (B), dorsal (F), ventral (G) e detalhe do disco oral (K); *C. trachystomus* Caetité em vista lateral (C), dorsal (H), ventral (I) e detalhe do disco oral (L). Para melhor visualização as papilas do disco oral foram coradas com azul de metileno.

Vocalização

Foram analisados cantos de quatro localidades, representando os quatro morfótipos recuperados na morfologia do adulto: Caetité, Olhos D'água, RPPN Serra do Caraça (Quadrilátero Ferrífero) e Serra do Cipó (Espinhaço) (Tabela 05).

Houve sobreposição na maioria dos parâmetros acústicos das populações analisadas, com um número de notas por canto que varia entre 13 a 210, canto harmônico com uma frequência dominante entre o primeiro e segundo harmônico que vai de 0,94 a 5,3 KHz (Tabela 04). Entretanto, a população de Olhos D'água apresentou uma modulação de canto mais linear (crescente nas demais populações) (Figura 10 D).

A população do Quadrilátero Ferrífero possui modulação com oscilações ao longo do canto começando crescente e decrescendo em alguns momentos (Figura 10 G). Já a população de Caetité também possui canto harmônico, mas a frequência dominante está presente no primeiro harmônico, assim como a população de Olhos D'água, e diferente das demais populações de *C. trachystomus* as quais possuem a frequência dominante entre o segundo e o primeiro harmônico.

Tabela 04: Comparação entre os parâmetros acústicos das quatro populações de estudadas e a descrição do canto de *C. trachystomus* feita por Pimenta *et al.* 2008. Parâmetros utilizados com média \pm desvio padrão (mínimo e máximo), número amostral.

	<i>C. trachystomus</i> QFe	<i>C. trachystomus</i> OD	<i>C. trachystomus</i> SEs	<i>C. trachystomys</i> Caetité	<i>C. trachystomus</i> (PIMENTA <i>et al.</i> 2008)
Notas/canto	82,53 \pm 38,76 (30 – 210), N= 1238	60 \pm 15 (33 – 90) N=1288	52 \pm 14,34 (33 – 72) N= 287	58 \pm 25 (11 – 114) N= 375	13 – 121
Duração do canto (s)	7,79 \pm 2,04 (2,97 - 17, 43) N= 16	5,96 \pm 1,81 (2,80 - 9,60) N= 26	6,94 \pm 2,04 (4,10 – 9,68) N= 6	5,73 \pm 2,40 (1,10 - 11,20) N= 16	1,4 - 10,1
Duração da nota (s)	0,2 \pm 0,005 (0,01 - 0,03) N= 1238	0,05 \pm 0,01 (0,02 - 0,09) N= 1288	0,04 \pm 0,01 (0,005 – 0,07) N= 287	0,06 \pm 0,01 (0,02 - 0,10) N= 375	0,001 - 0,03
Intervalo entre canto (s)	42,12 \pm 53,02 (1 - 193,02) N= 14	28 \pm 13 (10,73 - 40,78) N= 24	33,72 \pm 15,36 (13,55 – 50,74) N= 4	18,84 \pm 14,18 (6,65 - 53,53) N= 14	4,83 - 117,29
Intervalo internota (s)	0,08 \pm 0,01 (0,03 - 0,21) N= 1235	0,04 \pm 0,001 (0,30 - 0,70) N=1285	0,1 \pm 0,02 (0,09 – 0,21) N= 284	0,03 \pm 0,01 (0,01 - 0,11) N= 373	0,05 - 0,2
Frequência dominante (KHz)	3,70 \pm 0,40 (3,10 - 4,30) N= 16	5,10 \pm 0,40 (3,30 - 5,30) N= 26	1,41 \pm 0,53 (0,94 – 2,25) N= 6	4,20 \pm 1,70 (4,30 - 5,30) N=16	1,8 - 4,8
Harmônico dominante	1° e 2°	1°	1° e 2°	1°	2° e 3°

Análises moleculares

A árvore obtida recuperou o gênero *Crossodactylus* como grupo irmão do clado formado por *Hylodes*, *Phantasmara* e *Megaelosia*, sendo *Hylodes* grupo-irmão de *Phantasmara* e *Megaelosia* (Figura 02). Dentre as espécies de *Crossodactylus*, *C. schimidti* foi recuperada como grupo-irmão de todas as demais espécies, as quais foram recuperadas em dois grandes clados. O primeiro clado é composto por *C. caramaschii*, *C. dantei*, *C. gaudichaudii* e *C. timbuhy*. Já o segundo clado é composto por quatro indivíduos que constituem uma nova espécie de *Crossodactylus* atualmente em fase de descrição por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa, que é o grupo-irmão dos representantes de *C. trachystomus*. Dentro de *C. trachystomus* o indivíduo de Caetité foi recuperado como grupo-irmão de todas as demais populações *C. trachystomus*.

O clado contendo os indivíduos de Rio Pardo de Minas e Diamantina foi recuperado como grupo-irmão das linhagens restantes, que formaram dois clados. O primeiro clado composto pela população de Olhos D'água, recuperada como grupo-irmão da população de Mariana, e ambas formaram o grupo-irmão da população de Santo Antônio do Itambé. Já o segundo clado é composto pelos indivíduos da Serra do Cipó que formaram o grupo-irmão de um clado constituído por indivíduos de Catas Altas e Barão de Cocais.

As distâncias genéticas obtidas entre a população de Caetité e as demais populações de *C. trachystomus* variou de 3 a 5%. Sendo que a distância de Caetité para as populações de Rio Pardo de Minas e Diamantina variou de 2 a 3%, enquanto a distância de Caetité para Olhos D'água foi de 5%. Já o clado composto por Rio Pardo de Minas e Diamantina apresentou distância de 2% a 3% com relação às linhagens que compõe o clado com representantes de Olhos D'água, Mariana e Santo Antônio do Itambé, enquanto diferiu entre 1% e 2% do clado da Serra do Cipó, Barão de Cocais e Catas Altas.

No primeiro clado, a população de Olhos D'água diferiu em 2% da população de Mariana e 3% em relação à linhagem de Santo Antônio do Itambé. Já em relação ao segundo clado, a linhagem da Serra do Cipó diferiu em 2% do clado de Barão dos Cocais e Catas Altas. As distâncias genéticas encontram-se sumarizadas na Tabela 3.

Considerando os quatro morfotipos identificados com base na morfologia, observamos que o morfotipo de Caetité (Figura 4, em amarelo) é recuperado como

grupo-irmão de todos os demais. Entretanto, os morfotipos do Espinhaço (Figura 4, em azul) e do Quadrilátero (Figura 4, em lilás) foram recuperados como polifiléticos. Além disso, o morfotipo de Olhos D'água (Figura 4, em verde) foi recuperado inserido dentro do clado composto por indivíduos com morfotipos do Espinhaço e Quadrilátero.

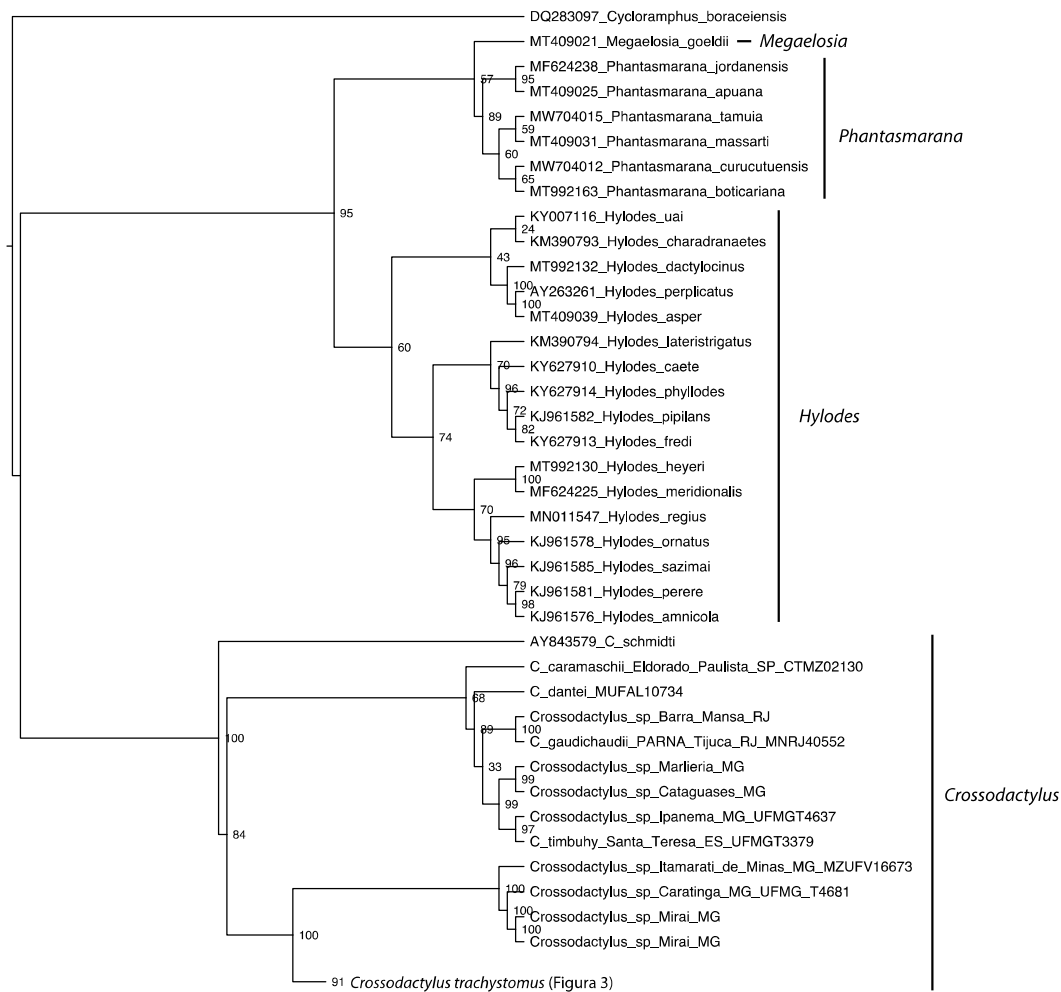


Figura 02: Hipótese filogenética de Máxima Verossimilhança de Hylodidae representando as relações filogenéticas das populações de *Crossodactylus trachystomus* e o grupo externo formado por representantes dos quatro gêneros da família (*Crossodactylus*, *Hylodes*, *Megaelosia* e *Phantasmarana*) e por *Cycloramphus boraceiensis* (Cycloramphidae). Valores de *Bootstrap* estão representados nos nós.

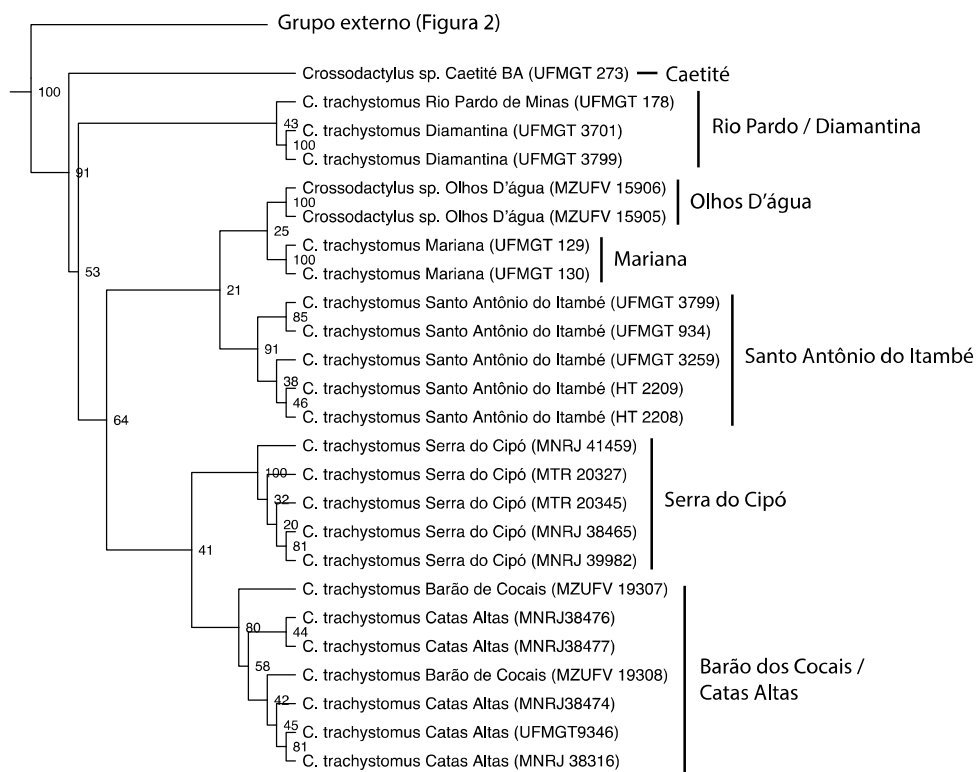


Figura 03: Detalhamento do clado *Crossodactylus trachystomus*, mostrando as relações entre as diferentes populações amostradas neste estudo. Valores de *Bootstrap* estão representados nos nós.

Tabela 03: Matriz de distância *p* interespecífica par a par dos grupos formados dentro de *Crossodactylus trachystomus*: *C. trachystomus* Serra do Cipó (SC); *C. trachystomus* Quadrilátero Ferrífero (QFe); *C. trachystomus* Santo Antônio do Itambé (ITA); *C. trachystomus* Olhos D'água (OD); *C. trachystomus* Mariana (MA); *C. trachystomus* Diamantina – Rio Pardo (DM – RP) e *C. trachystomus* Caetité. A distância dentro dos grupos varia de 0,00 a 0,02.

	1	2	3	4	5	6
1. <i>C. trachystomus</i> SC						
2. <i>C. trachystomus</i> QFe	0,02 ± 0,01 (0,02 - 0,03)					
3. <i>C. trachystomus</i> ITA	0,02 ± 0,01 (0,01 - 0,03)	0,02 ± 0,01 (0,01 - 0,03)				
4. <i>C. trachystomus</i> OD	0,03 ± 0,0 (0,03)	0,02 ± 0,01 (0,02 - 0,03)	0,02 ± 0,02 (0,01 - 0,03)			
5. <i>C. trachystomus</i> MA	0,03 ± 0,02 (0,02 - 0,04)	0,02 ± 0,01 (0,02 - 0,03)	0,02 ± 0,01 (0,02 - 0,03)	0,02 ± 0,01 (0,02 - 0,03)		

6. <i>C. trachystomus</i> DM – RP	0,03 ± 0,0 (0,03)	0,03 ± 0,02 (0,03 – 0,04)	0,02 ± 0,01 (0,02 – 0,03)	0,03 ± 0,0 (0,03)	0,02 ± 0,02 (0,02 – 0,04)	
7. <i>C. trachystomus</i> Caetité	0,03 ± 0,0 (0,03)	0,03 ± 0,02 (0,03 – 0,04)	0,03 ± 0,0 (0,03)	0,03 ± 0,02 (0,03 – 0,05)	0,04 ± 0,0 (0,04)	0,02 ± 0,01 (0,02 – 0,03)

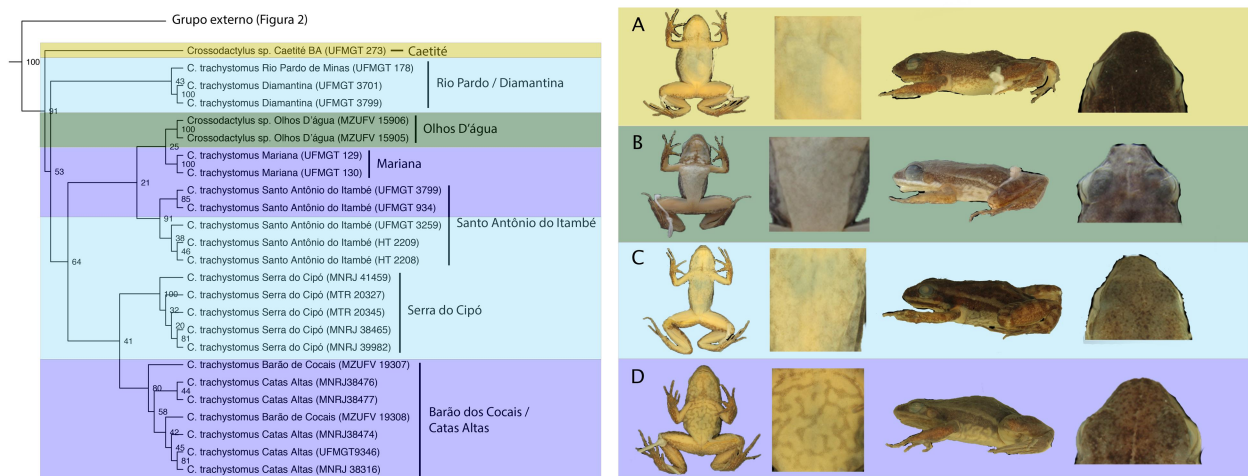


Figura 04. Disposição dos morfotipos recuperados nas análises morfológicas dos adultos na filogenia reconstruída com base em caracteres moleculares: Caetité em amarelo (A), Olhos D'água em verde (B); Espinhaço em azul (C) e Quadrilátero em lilás (D). Ao lado estão representados os principais caracteres que diferem entre as diferentes populações: coloração do ventre; presença ou ausência de faixa branca lateral e formato do focinho.

Conclusões taxonômicas

Para tomar as decisões taxonômicas, analisamos quatro linhas de evidências (i.e., morfologia do adulto, morfologia do girino, bioacústica e genética) separadamente. Com base nos resultados das análises de morfologia de adultos (disposição e presença ou ausência de faixas corporais; formato do focinho; presença de fímbrias nos dedos e largura das fímbrias nos artelhos; coloração ventral e dorsal e cristas dorsolaterais) e larvas (comprimento do corpo, altura das nadadeiras, e formato do corpo e coloração), além de dados moleculares e bioacústicos (frequência dominante) consideramos que a população de Caetité representa uma nova espécie.

Com relação às demais populações de *C. trachystomus*, apesar de termos encontrado três morfotipos diagnosticáveis de adultos, as demais linhas de evidências não apontam para a hipótese de que esses poderiam ser consideradas espécies distintas. Os morfotipos de Olhos D'água, Espinhaço e Quadrilátero apresentaram grande sobreposição com relação à morfologia das larvas e bioacústica. Os girinos apresentaram sobreposição de caracteres com relação ao formato do corpo, fórmula

dental, proporção das medidas morfométricas e coloração; enquanto o canto apresentou sobreposição no número de notas, duração do canto e das notas e a frequência dominante. Além disso, os morfotipos do Espinhaço e do Quadrilátero foram recuperados como polifiléticos nas análises moleculares; enquanto a população de Olhos D'água foi recuperada aninhada dentro do clado contendo representantes do Espinhaço e do Quadrilátero. Sendo assim, consideramos que as populações de *C. trachystomus* tratam-se de uma única espécie com grande variação morfológica. Entretanto, vale ressaltar que os valores de suporte deste clado foram baixos, o que indica que novas evidências, como novos marcadores genéticos, são fundamentais para esclarecer melhor as relações entre essas populações.

Sendo assim, aqui apresenta-se a descrição da nova espécie referente à população de Caetité e a redescritção de *C. trachystomus*, incluindo a variação morfológica observada entre as diferentes populações.

Descrição de uma nova espécie de *Crossodactylus*

Crossodactylus sp. nov.

Holótipo: UFMG 2294; macho adulto coletado no município de Caetité, Bahia (14° 04'35" S 42° 29' 56" W), 18 de outubro de 2007 (Figura 05).

Parátipos: UFMG 2286 fêmea adulta; UFMG 5899 macho adulto; UFMG 2281 fêmea adulta; todos da mesma localidade tipo do holótipo.

Diagnose: (1) corpo delgado; (2) cabeça mais comprida que larga; (3) focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral; (4) canto rostral pouco marcado; (5) tímpano pouco distinto; (6) saco vocal gular; (7) três espinhos do dedo II pequenos e queratinizados; (8) franja tarsal e fimbrias dos artelhos desenvolvidas; (9) ponta dos dedos das mãos arredondado e pouco dilatadas; (10) ponta dos artelhos do pé truncada e dilatadas; (11) tubérculo postrictal contínuo; (12) presença de crista na parte interna do braço; (13) região dorsal granular próxima a cloaca e lisa anteriormente; (14) crista dorsolateral ausente; (15) ausência de faixa branca acima do lábio; (16) ausência de faixa branca lateral parcial nos flancos; (17) barriga imaculada.

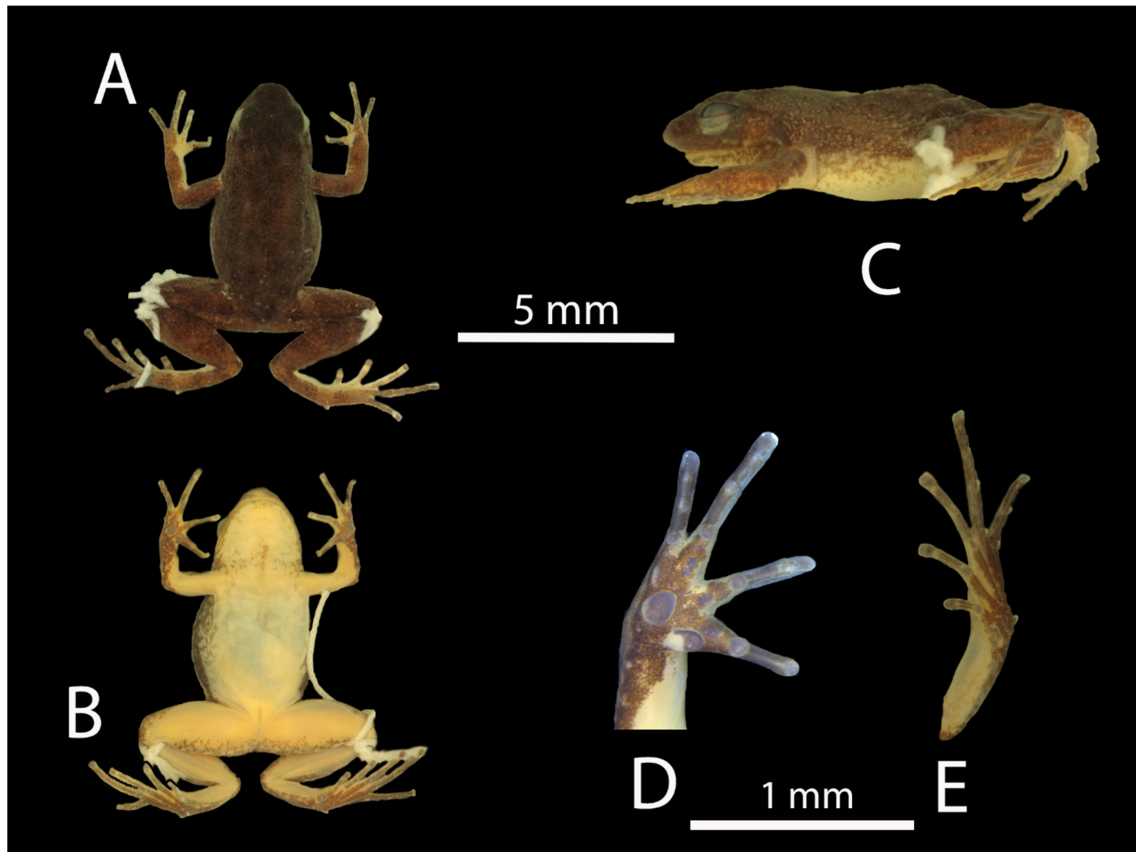


Figura 05: Holótipo de *Crossodactylus* sp. nov. (indivíduo UFMG 2294) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E).

Variação: fêmeas (N = 18) têm um CRC 10% maior que o dos machos (N = 10); machos com a coloração da gula manchada e fêmeas com gula completamente branca; número de espinhos no dedo II variou em número e em arranjo: 2/2, 2/3 e 3/3, sendo ter três espinhos em ambas as mãos uma característica dos machos, o arranjo em fêmeas que possuem apenas dois espinhos é diferente que os que possuem três, os dois são pareados na lateral do dedo, enquanto os três formam um triângulo na superfície do dedo II; todos os machos possuem uma crista granular queratinizada no lábio, enquanto as fêmeas apenas duas possuem tal característica; o desenvolvimento das fimbrias e da franja tarsal também é maior machos, sendo estes menores nas fêmeas.

Comparação com outras espécies: (caracteres das outras espécies em parênteses) *Crossodactylus* Caetitê sp. nov. difere de *C. dantei*, *C. gaudichaudii* e *C. wernerii* pelo corpo esguio (robusto); e difere de *C. boulengeri*, *C. dantei*, *C. timbuhy* e *C. gaudichaudii* por seu focinho arredondado em vista dorsal (pentagonal em *C. boulengeri*, *C. dantei* e *C. timbuhy*, arredondado ou pentagonal em *C. gaudichaudii*);

difere de *C. dispar* e *C. grandis* pela cabeça mais longa que larga (mais larga que longa).

Difere de *Crossodactylus gaudichaudii*, *C. cyclospinus*, *C. caramaschii* e *C. schmidti* por apresentar três espinhos nupciais (dois, seis, cinco e cinco a oito, respectivamente); diferencia de *C. boulegeri*, *C. dantei* e *C. timbuhy* pelo canto rostral pouco marcado (marcado); difere de *C. franciscanus* e *C. grandis* pelo dedos das mãos terem uma leve dilatação (não dilatados); difere de *C. cyclospinus*, *C. dantei*, *C. lutzorum*, e *C. schmidti* pela presença de uma crista de tubérculos no braço (ausente); difere de *C. trachystomus*, *C. cyclospinus* e *C. boulegeri* quanto a ausência de uma mancha branca do focinho ao ombro (presente); difere de *C. trachystomus*, *C. weneri* e *C. timbuhy* por ter um tímpano pouco distinto (distinto).

Descrição do holótipo: macho de pequeno porte (20,63 mm); corpo delgado; cabeça 11% mais comprida que larga, representando 26% do CRC; focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral, narinas protuberantes posicionadas dorsolateralmente e dirigidas para frente, distantes 0,79 mm da ponta do focinho; canto rostral pouco marcado, região loreal levemente curvada; tubérculo postrictal contínuo, pequeno e elíptico logo após a comissura bucal; tímpano aproximadamente circular pouco evidente; olhos com diâmetro cerca de 2,46 mm maiores 1,5x que o diâmetro do tímpano, presença de uma dobra supratimpânica discreta do olho ao ombro; região dorsal de pele lisa anteriormente e granular próxima a cloaca; cristas dorsolaterais ausentes; membros esguios, dedos longos com fimbrias, com ápice arredondado e pouco dilatado, em ordem de tamanho: IV>II>III>V; presença espinhos nupciais queratinizados aculeados com base larga dispostos em três na base do dedo II; presença de calos subarticulares arredondados nos dedos e presença de calos supranumerários na palma da mão, calo metatarsal redondo e calo tenar elíptico; pernas com comprimento total (CT+CCx+CTr+CP) cerca de 17% maior que o CRC; artelhos longos com ápice truncado, dilatado e com a presença de escudos dorsais pareado, em ordem de tamanho: IV>III>V>II>I; presença de fimbrias nos artelhos e de uma franja tarsal desenvolvida ligada a fimbria do artelho I; presença de calos subarticulares arredondados nos artelhos, calos metatarsais elípticos sendo o interno mais desenvolvido, região plantar lisa e sem calos; coloração: coloração em formol: dorso marrom avermelhada escura, ventre branco com a presença de manchas na região gular; membros de coloração semelhante ao corpo marrom avermelhado e com a presença de uma mancha branca na mão nos dedos II e III; presença de uma linha vertebral pouco marcada do focinho a

cloaca, presença de uma curta faixa inguinal branca indo até meio do corpo; presença de uma faixa escura do focinho a coxa delimitada pelo canto rostral dorso e pela faixa branca inguinal superiormente e pela região ventral inferiormente; região superior do lábio marrom com alguns pontilhados ou manchas claras abaixo do olho; Coloração em vida: dorso marrom avermelhado, ventre branco com a presença de manchas na região gular; membros de coloração semelhante ao corpo marrom avermelhado e com a presença de uma mancha branca na mão nos dedos II e III; presença de uma linha vertebral pouco marcada do focinho a cloaca, presença de uma curta faixa inguinal branca indo até meio do corpo; presença de uma faixa escura do focinho a coxa delimitada pelo canto rostral dorso e pela faixa branca inguinal superiormente e pela região ventral inferiormente; região superior do lábio marrom com alguns pontilhados ou manchas branca abaixo do olho.

Medidas do holótipo (mm): CRC: 20,63; CC: 7,66; LC: 6,55; DIO: 2,09; DON: 1,63, DIN: 2,00; DNF: 0,79; LF: 3,33; DO: 2,46; DT: 1,58; CT: 10,42; CCx: 10,36; CTr: 4,67; CP: 11,00; CAB: 3,89; CB: 4,41; CM: 6,46.

Vocalização: Canto harmônico simples de modulação crescente; cantos com duração de 1,09 – 11,18 s ($5,73 \pm 2,40$; N: 16), com intervalos entre cantos de 6,65 – 53,53 s ($18,84 \pm 14,18$); com 11 – 114 (58 ± 25) notas por canto, notas com duração de 0,02 – 0,10 s ($0,06 \pm 0,01$; N: 375) e intervalo entre notas de 0,02 – 0,11 s ($0,03 \pm 0,01$). A frequência 95% de 0,5 – 5,6 KHz ($3,10 \pm 2,30$) e a frequência 5% de 0,08 – 4,8 KHz ($3,50 \pm 16,60$) com um pico de frequência de 0,50 – 5,60 KHz ($4,20 \pm 1,70$), localizado no primeiro harmônico (Figura 12; Tabela 4).

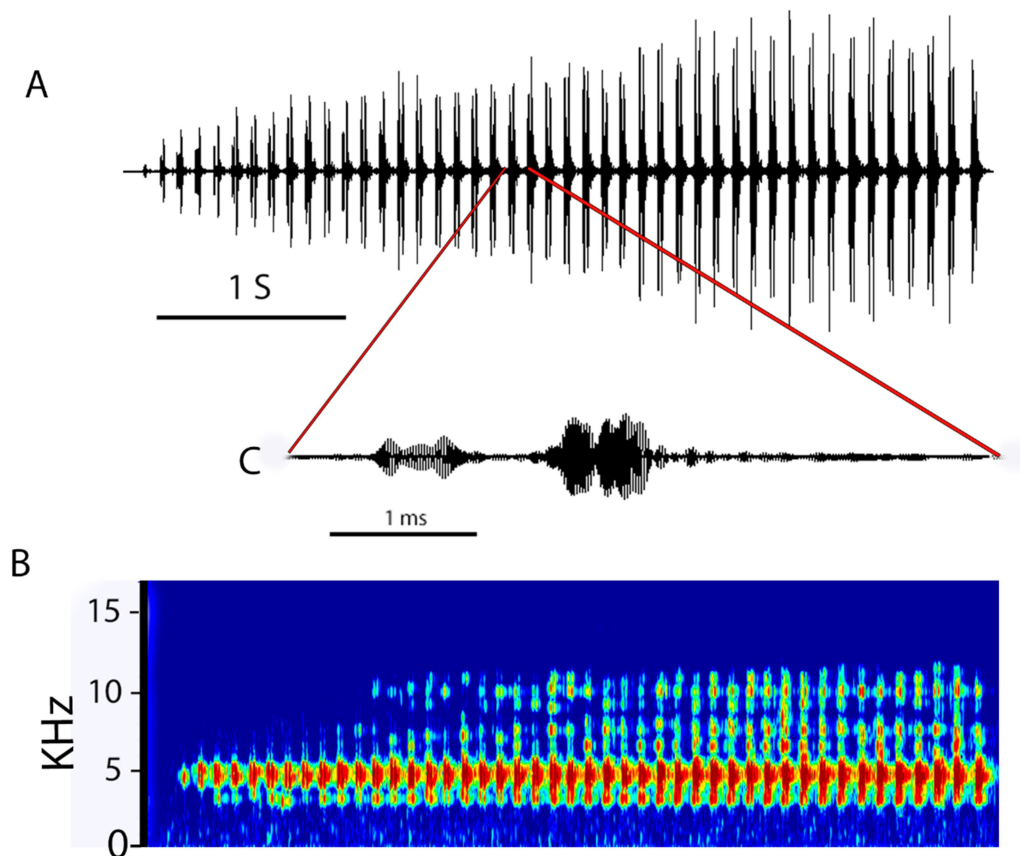


Figura 06: Oscilograma (A), espectrograma (B) e detalhe de uma nota (C) do canto de *Crossodactylus* sp. nov. gravado em Caetité, Bahia.

Distribuição geográfica: A espécie está restrita a localidade tipo no município de Caetité, Serra do Espinhaço, sul da Bahia (Figura 11). A região apresenta mata de galeria com formações de campo rupestre com influência da Caatinga, estando inserida em uma região de ecotono entre Caatinga e Cerrado.

Redescrição de *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt & Lütken, 1862 “1861”)

Tarsopterus trachystomus Reinhardt & Lütken (1862 “1861”)—Hensel (1867).

Leptodactylus gaudichaudii—Boulenger (1882) (part).

Crossodactylus bresslaui Müller (1924)—Müller (1927); B. Lutz (1951; 1952).

Crossodactylus gaudichaudii (non Duméril & Bibron (1841))—Miranda-Ribeiro (1926) (part); A. Lutz (1930) (part).

Phyllobates fuscigula (non Fitzinger (1860))—A. Lutz (1930) (part)

Crossodactylus trachystoma—Cochran (1955); Lynch (1971).

Crossodactylus trachystomus (Reinhardt & Lütken, (1862 “1861”))—Bokermann (1966); Caramaschi & Sazima (1985); Caramaschi & Kisteumacher (1989); Nascimento *et al.* (2005b); Weber & Caramaschi (2006); Canelas & Bertoluci (2007); Leite *et al.* (2008); Pimenta *et al.* (2008); Pimenta *et al.* (2014; 2015); Eterovick *et al.* (2020); Pezzuti *et al.* (2022).

Crossodactylus bokermanni Caramaschi & Sazima (1985)—Caramaschi & Kisteumacher (1989); Bastos & Pombal (1995); Eterovick & Sazima (2004); Eterovick *et al.* (2005); Nascimento *et al.* (2005^a); Nascimento *et al.* (2005b); Afonso & Eterovick (2007); Pimenta *et al.* (2005); Leite *et al.* (2008); Pimenta *et al.* (2008); Caldart *et al.* (2011); Pimenta *et al.* (2014; 2015).

Crossodactylus cf. *bokermanni*—Nascimento *et al.* (2005b).

Crossodactylus gr. *Gaudichaudii*—Nascimento *et al.* (2005b).

Crossodactylus sp.—Nascimento *et al.* (2005b).

***Crossodactylus trachystomus*:** Pequeno porte (CRC: machos: 16,42 – 26,30 mm, n= 25; fêmeas: 16,40 – 27,23 mm, n= 45); corpo delgado; cabeça 11% mais comprida que larga, representando 26% do CRC; focinho arredondado em vista dorsal e acuminado em vista lateral com narinas protuberantes, direcionadas dorsolateralmente dirigidas para frente distantes $1 \pm 0,17$ mm da ponta do focinho; região loreal levemente concava, canto rostral marcado; tubérculo postrictal pequeno, contínuo e elíptico logo após a comissura bucal; tímpano aproximadamente circular, distinto; olhos com $2,7 \pm 0,3$ mm de diâmetro cerca de 1,5x maior que o diâmetro do tímpano; dobra supratimpânica discreta do olho ao ombro; região dorsal de pele lisa anteriormente e granular próxima a cloaca, cristas dorsolaterais pouco marcada indo até próximo a escápula; presença de uma crista glandular na parte interna do braço; dedos finos pouco dilatados com uma prega de pele na lateral dos dedos e ápice pouco dilatado, ordem de tamanho: IV>III>II>V; presença de espinhos queratinizados cônicos desenvolvidos dispostos em três na base do dedo II, sendo o interno sempre menor; presença de calos subarticulares nos dedos e supranumerários na palma da mão, calo metacarpal redondo e calo tenar elíptico; pernas com comprimento total (CT+CCx+CTr+CP) cerca de 12% maior que o CRC; ponta dos artelhos dilatadas com ápice truncado e com a presença de escudos dorsais pareados, em ordem de tamanho dos artelhos: IV>III>V>II>I; presença de fimbrias nos artelhos e uma franja tarsal desenvolvida ligada a fimbria do artelho I; presença de calos subarticulares arredondados e calos metatarsais elípticos sendo o

interno mais protuberante, região plantar lisa e sem calos; coloração: coloração em formol: dorso marrom avermelhado ou marrom acinzentado, presença de manchas escuras pelo dorso, linha vertebral fracamente marcada indo da cloaca ao focinho, coloração dos membros parecida com a do dorso sendo mais clara e nas pernas manchas que tendem a formar barras na coxa e tíbia, coloração ventral esbranquiçada levemente marmoreada principalmente no peito e gula, presença de uma faixa inguinal clara iniciando na coxa e podendo chegar até a região escapular, presença de uma faixa escura na lateral do corpo se iniciando na ponta do focinho e indo até a coxa, sendo delimitada pelo canto rostral e pela faixa inguinal clara superiormente e pela faixa branca e pela região ventral inferiormente, presença de uma faixa branca acima do lábio seguindo do focinho ao ombro abaixo da faixa escura; coloração em vida: dorso marrom oliváceo a marrom avermelhado com manchas escuras, membros com cor semelhante ao dorso com manchas com tendencia a formar barras nas pernas, ventre levemente marmoreado, presença de uma faixa inguinal branca podendo chegar até a escapula, presença de uma faixa escura indo do focinho a coxa, presença de uma faixa branca ou de tom metálico acima do lábio indo do focinho ao ombro (Figura 07).

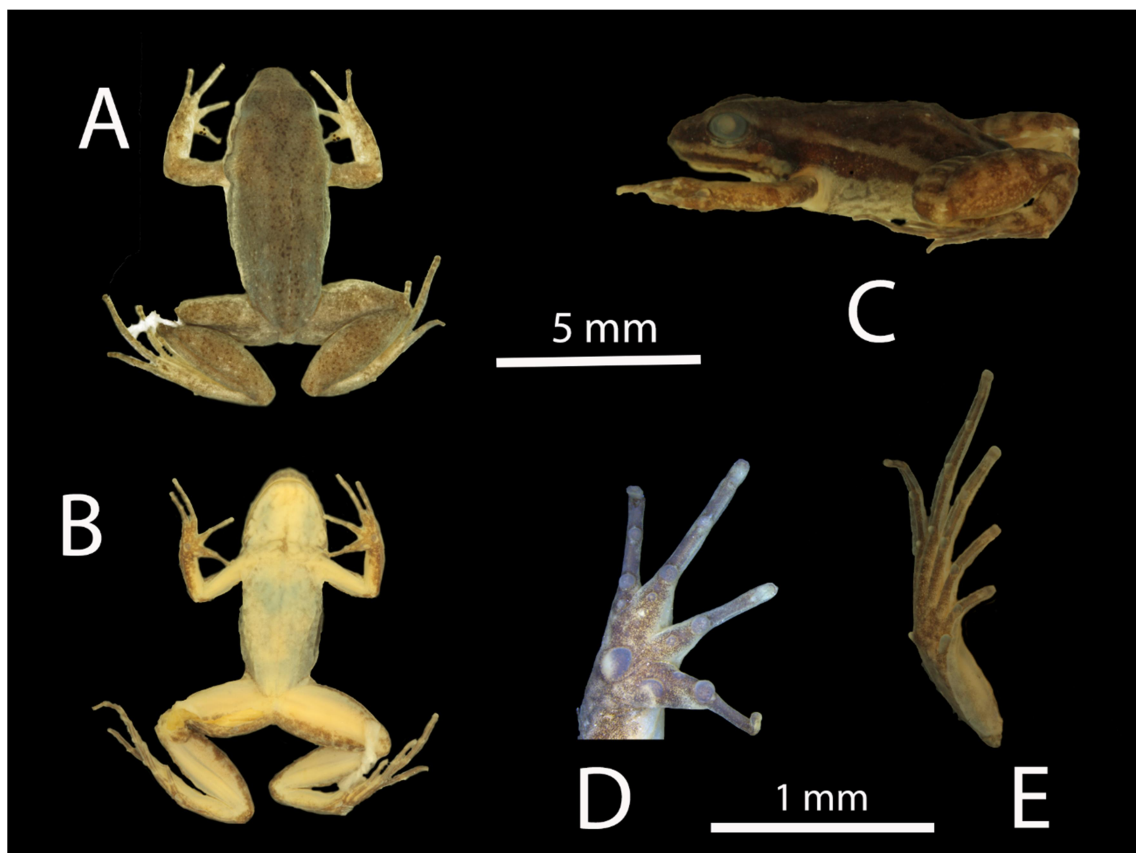


Figura 07: Morfotipo de *C. trachystomus* Espinhaço (indivíduo UFMG – 14067) em vista dorsal (A), Ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E).

Varição: principal variação é em relação ao dimorfismo sexual as fêmeas (N = 70) possuem um tamanho 10% maior em relação aos machos (N = 113) (CRC: $21,53 \pm 1,84$ mm machos; $21,58 \pm 2,50$ mm fêmeas), diâmetro do tímpano em relação ao diâmetro do olho maior em fêmeas; fimbrias e franja tarsal reduzidas em fêmeas; machos possuem grânulos labiais queratinizados enquanto fêmeas possuem mas sem queratinização, antebraço dos machos mais desenvolvido que das fêmeas, o desenvolvimento e presença de espinhos na base do dedo II varia tanto entre os sexos como em indivíduos, as fêmeas possuem espinhos menos queratinizados que os machos que possuem espinhos maiores e mais queratinizados; número de espinhos varia de ausentes a quatro espinhos em ambas as mãos sendo: ausente, 2/2, 2/3, 3/3, 3/4 e 4/4; o arranjo dos espinhos varia nos que possuem 3/3 e 3/4 os espinhos estão em triângulo na base do dedo e nos que possuem 2/2 os espinhos estão pareados na lateral do dedo; a coloração também varia com coloração do ventre de marmoreada a reticulada, a coloração dorsal varia de marrom acinzentado a marrom avermelhado.

A população da região do Quadrilátero possui fimbrias e franja tarsal mais desenvolvidas que as demais, além de ter sido a única população que apresenta quatro espinhos no dedo II, as demais apresentam apenas 2/2, 3/3 ou 2/3 espinhos por polegar (Figura 08).

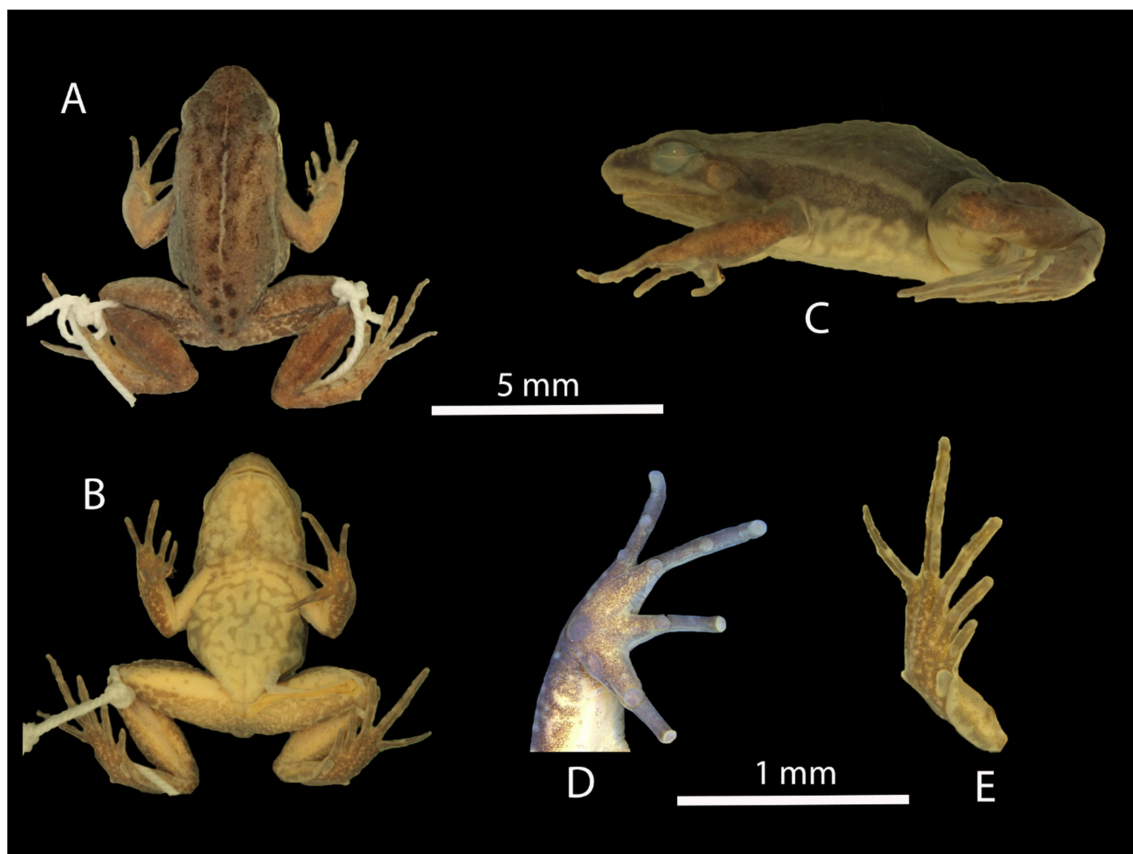


Figura 08: Morfotipo de *C. trachystomus* Quadrilátero (indivíduo UFMG -2306) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E).

A coloração reticulada aparece nas populações mais ao sul e em Santo Antônio do Itambé, do morfotipo do Quadrilátero, as demais apresentam barriga marmoreada. A população de Olhos D'água possui focinho truncado em vista dorsal; barriga marmoreada e cristas dorsolaterais desenvolvidas diferente das demais populações (Figura 09).

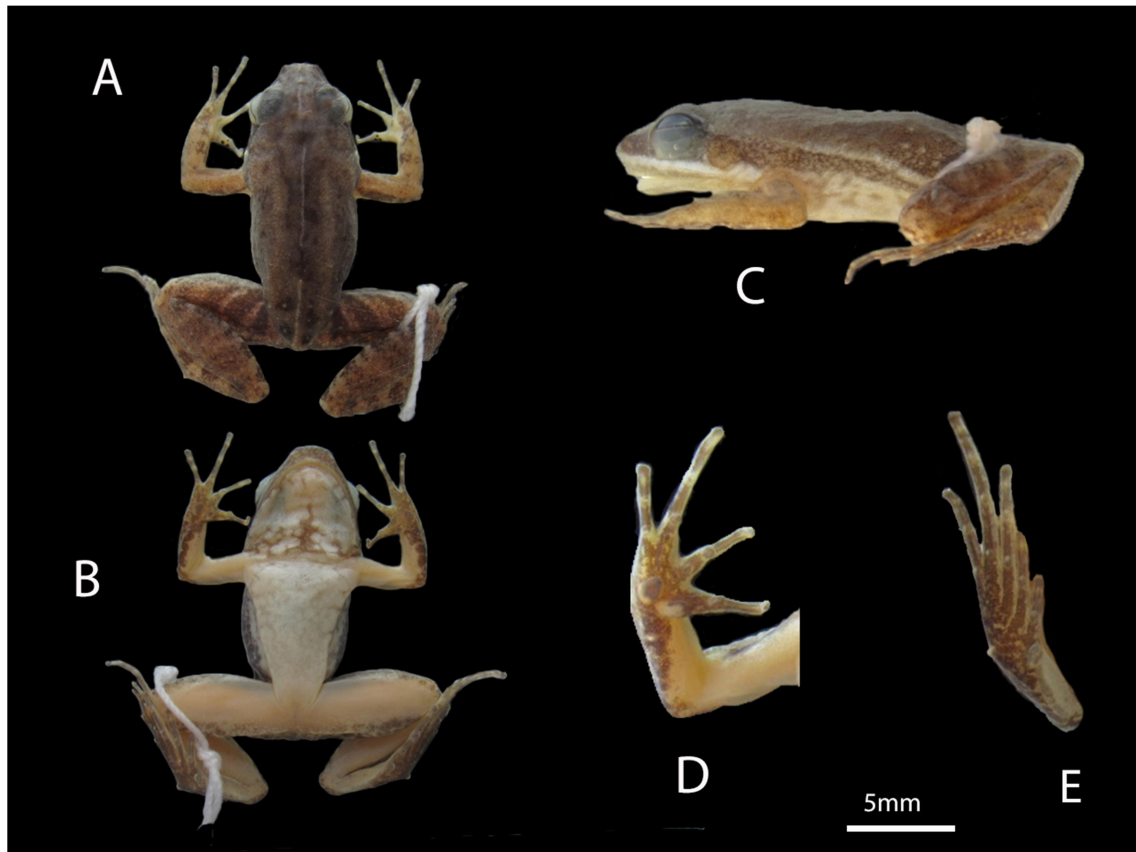


Figura 09: Morfotipo de *C. trachystomus* Olhos D'água (indivíduo MZUFV – 1505) em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) e detalhes da mão (D) e do pé (E).

Vocalização: Canto harmônico simples de modulação crescente; com duração de 2,04 – 17,43 s ($6,61 \pm 2,54$; N: 49) e intervalo entre cantos de 1 – 193,02 s ($32,26 \pm 30,45$); com 30 – 210 ($66,36 \pm 28,11$) notas por canto, com duração de 0,005 – 0,07 s ($0,04 \pm 0,01$; N: 2814) e intervalo entre notas de 0,09 – 0,21 s ($0,10 \pm 0,02$); a frequência a 5% é 0,94 – 4,74 KHz ($3,06 \pm 1,60$) e a frequência a 95% é 3,56 – 6,72 KHz ($4,49 \pm 2,04$) e pico de frequência de 0,94 – 5,34 KHz ($3,94 \pm 1,72$) localizado entre o primeiro e o segundo harmônico (Figura 10).

Variação: O canto possui três variações com base na geografia. O canto da população do Quadrilátero possui frequência dominante no segundo harmônico e modulação que oscila ao longo do canto crescente e decrescente (Figura 10). A população de Olhos D'água tem a frequência dominante localizada predominantemente no primeiro harmônico e uma modulação mais linear e com mais harmônicos (Figura 10). A população do Espinhaço possui um canto de modulação crescente com frequência dominante localizada entre o primeiro e o segundo harmônicos (Figura 10).

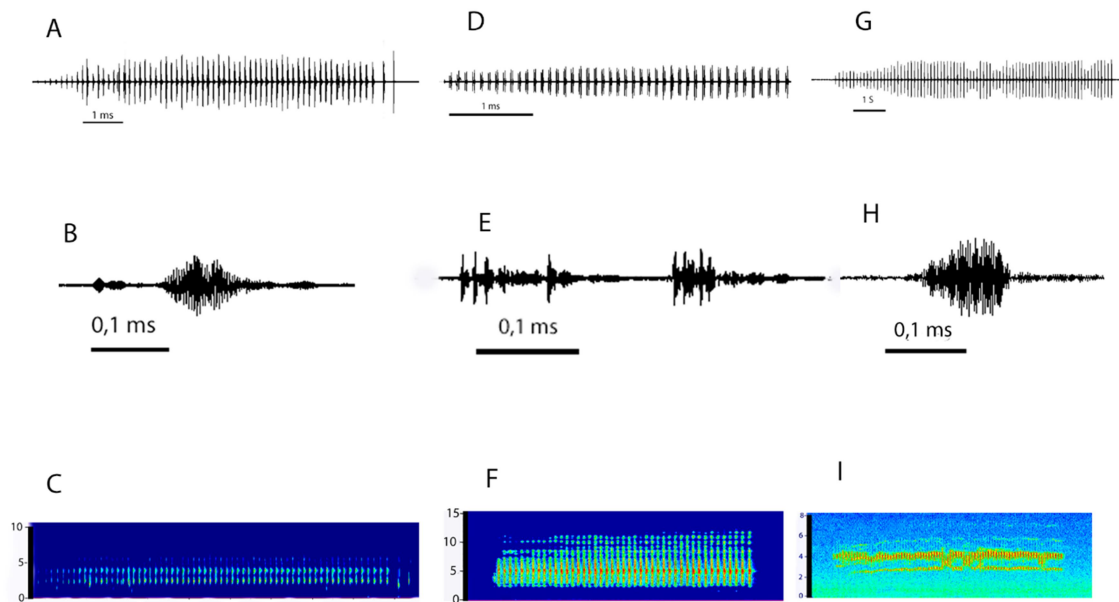


Figura 10: Cantos das populações de *C. trachystomus* analisadas neste estudo: oscilograma (A), detalhe de uma nota do canto (B) e espectrograma (C) de *C. trachystomus* Ses gravado na Serra do Cipó, Minas Gerais; oscilograma (D), detalhe de uma nota do canto (E) e espectrograma (F) de *C. trachystomus* Qfe gravado na Serra do Caraça, Minas Gerais; e oscilograma (G), detalhe de uma nota do canto (H) e espectrograma (I) de *C. trachystomus* OD gravado na Olhos D'água, Minas Gerais.

Distribuição geográfica: *Crossodactylus trachystomus* ocorre ao longo da Serra do Espinhaço, estado de Minas Gerais, em ambientes de riachos em Campo Rupestre e de Mata Atlântica (PIMENTA *et al.* 2015; ETEROVICK *et al.* 2020; FROST, 2022). A distribuição foi estendida cerca de 43 km em linha reta ao norte. Anteriormente, o município mais ao norte era Serranópolis de Minas e, com nossos resultados, passa para Rio Pardo de Minas, ambas no norte de Minas Gerais (Figura 11).

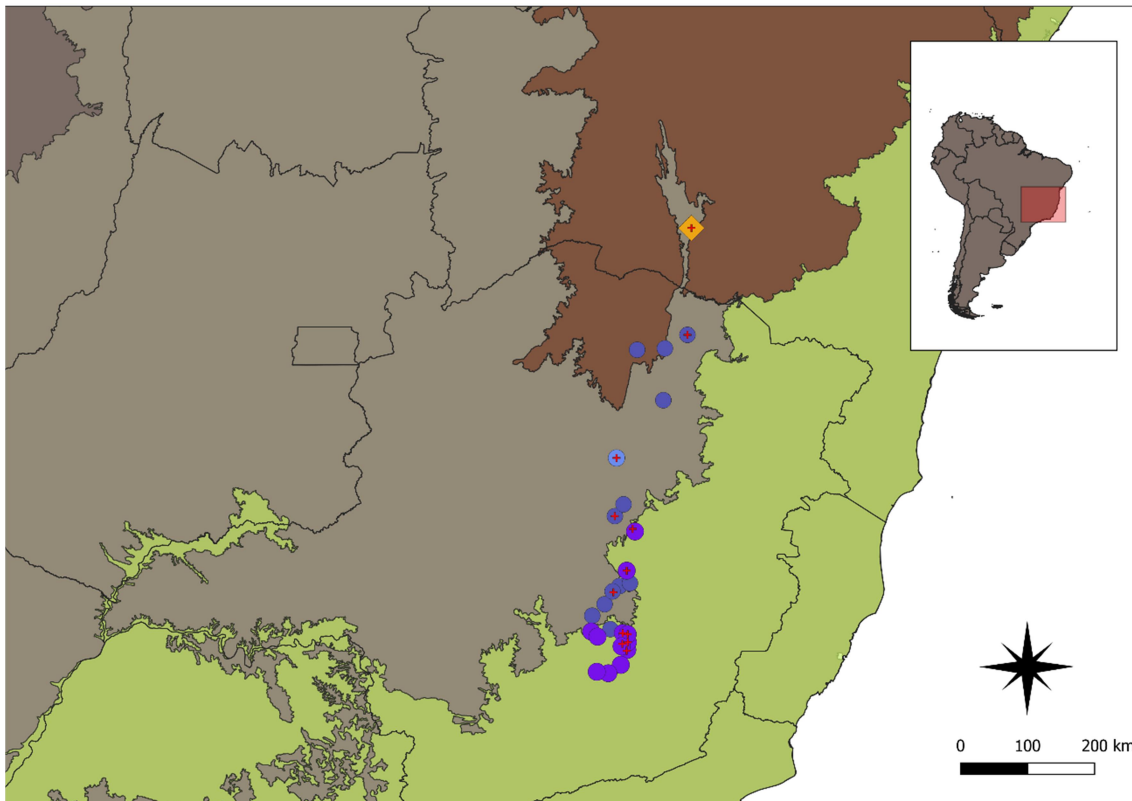


Figura 11: Mapa de distribuição de *Crossodactylus* sp. nov. Caeté (losango amarelo) e *Crossodactylus trachystomus* (círculos azuis) com seus morfotipos: *C. trachystomus* Espinhaço (azul claro), *C. trachystomus* Quadriátero (círculo azul escuro) e *C. trachystomus* Olhos D'água (círculo azul piscina), nos estados de Minas Gerais e Bahia. A cruz vermelha indica os representantes que foram utilizados nas análises moleculares. América do Sul representada no canto superior direito, destacado a área de distribuição das espécies. Caatinga representada em marrom, Cerrado em cinza e Mata Atlântica em verde.

Discussão

Em Hylodidae a formação de complexos de espécies crípticas vem sendo um problema para determinar a real diversidade da família, uma vez que há dificuldade em estabelecer caracteres morfológicos diagnósticos para as espécies (eg. HEYER *et al.* 1990; HADDAD *et al.* 2003; SILVA & BENMAMAN 2008; PIMENTA *et al.* 2014). Isso pode ser explicado pela extrema associação desses organismos ao ambiente em que vivem, resultando em uma restrição na variação de seus aspectos morfológicos (SILVA & BENMAMAN 2008). Com isso, sistemas diagnósticos gerados a partir de outras evidências que complementam a morfologia de adultos é fundamental para contornar o problema (MONTESINOS, 2017).

Essa abordagem integrativa foi fundamental para que pudéssemos reconhecer uma nova espécie de *Crossodactylus*, irmã de *C. trachystomus*, ampliando o número de espécie do gênero de 13 para 14 espécies. O registro de *Crossodactylus* sp. nov., de Caetitê, Bahia, representa a terceira espécie de Hylodidae restrita à região Nordeste, juntamente com *C. dantei* e *C. lutzorum* (CARCERELLI & CARAMASCHI, 1985). Diferente da maioria de seus congêneres (exceção *C. trachystomus*) *Crossodactylus* sp. nov. ocorre em uma mata de galeria em meio a uma área de vegetação campestre enquanto as demais se distribuem em fragmentos de Mata Atlântica (CARAMASCHI & SAZIMA, 1985).

Verificamos que as demais populações analisadas provenientes de outros locais da Serra do Espinhaço correspondem a *C. trachystomus* que apresenta variação fenotípica, especialmente com relação à morfologia externa, havendo quatro morfotipos Espinhaço, Quadrilátero e Olhos D'água diagnosticáveis. A variação da coloração do ventre nas diferentes populações de *C. trachystomus* sugere uma variação clinal, na qual o ventre vai se tornando mais claro, com menos manchas escuras, conforme a distribuição da espécie segue a norte. Resultados semelhante foram observados em *Ololygon machadoi*, onde diferentes morfotipos são observados ao longo do Espinhaço, com indivíduos apresentando ventre mais manchado ao sul e padrões mais claros ao norte (LEAL, 2019). Além da variação no padrão de coloração do ventre, é observada ainda que a extensão das fímbrias e franja tarsal no morfotipo do Quadrilátero são mais desenvolvidas, tanto em machos quanto em fêmeas. Outra variação observada é o focinho truncado em vista dorsal na população de Olhos D'água, sendo mais curto em relação as populações do Espinhaço e Quadrilátero. Pimenta *et al.* (2014) sugere que tais variações sejam artefatos de fixação, entretanto a constância dos diferentes padrões observados nas diferentes populações descarta a hipótese de Pimenta e colaboradores. Sugerimos que fatores ambientais podem influenciar nessa variação já que os espécimes estão sujeitos a pressões ambientais diferente, visto que a distribuição de *C. trachystomus* abrange o Quadrilátero, o qual a parte mais ao sul sofre maior influência da Mata Atlântica e a porção norte apresenta formações abertas com maior influência do Cerrado e Caatinga.

A morfologia externa de girinos em Hylodidae é bastante conservada nas espécies da família, com espécies de corpo robusto, fórmula dental 2(2)/3(1), olhos dorsolaterais, sistema de linha lateral evidente e coloração amarronzada (PEZZUTI *et al.* 2021), embora larvas tenham sido usadas como bons modelos para separar algumas

espécies do gênero *Hylodes* (R. Montesinos, obs. pes.). Porém, nossas análises resultaram em pouca variação das larvas entre as diferentes populações. A baixa variação morfológica pode ser explicada pela associação ao ambiente encachoeirado com pressão seletiva parecida, moldando pouco o corpo das larvas de espécie para espécie, devido as adaptações ao ambiente (ALTIG & JOHNSTON, 1989). Entretanto, uma melhor investigação de novos caracteres larvais, além da morfologia externa, pode ajudar na adição de novos caracteres diagnósticos para as larvas de *Crossodactylus*.

As populações de *C. trachystomus* analisadas apresentaram algumas variações na vocalização, dentre elas a modulação do canto, intervalo entre notas e localização da frequência fundamental. Essas diferenças também são observadas em *Crossodactylus* sp. nov., como a frequência fundamental localizada no primeiro harmônico. A variação dos caracteres acústicos de *C. trachystomus* é abordada em Pimenta *et al.* (2008) apontando três variações: Serra do Caraça, Serra do Cipó e Ouro Preto. Aqui, foi possível analisar duas das três variações propostas por Pimenta *et al.* (2008) (Serra do Caraça e Serra do Cipó) e adicionamos mais uma variação para a população de Olhos D'água. Observamos algumas diferenças em relação aos dados reportados por Pimenta *et al.* (2008). Os autores sugerem que a frequência dominante do canto esteja localizada entre o segundo e o terceiro harmônico. Aqui consideramos que a maioria dos cantos analisados apresenta frequência dominante entre o primeiro e o segundo harmônico. Esse padrão observado nas populações de *C. trachystomus* difere das outras espécies do gênero, as quais apresentam a frequência dominante entre o segundo e o terceiro harmônico, com exceção de *C. franciscanus* e *Crossodactylus* sp nov. que apresentam frequência dominante no segundo (PIMENTA *et al.* 2015) e primeiro harmônico, respectivamente.

Os morfotipos Espinhaço, Quadrilátero e Olhos D'água apresentaram distâncias genéticas significativas para Hylodidae (1 – 3%). Em trabalhos prévios, Hylodidae tem se mostrado ser uma família que evoluiu rapidamente, visto que existem espécies válidas com baixa divergência genética entre elas, como é o caso de *Hylodes amnicola* e *H. perere* com divergência genética de 1,4% (DE SÁ *et al.* 2015). Além disso, *Phantasmarana curucutuensis* e *P. boticariana* e *P. jordanensis* e *P. lutzae* têm 1,2% de divergência genética, enquanto *P. tamuia* e *P. massarti* têm 1,1% e *P. massarti* e *P. boticariana* apresentaram apenas 1% de divergência genética (DE SÁ *et al.* 2022), reforçando que representantes de hylodídeos têm sofrido processos de especiação mesmo com baixas distâncias genéticas. Entretanto, a hipótese filogenética apontou que

não é possível separar as três linhagens de *C. trachystomus* supracitadas pois estas formaram grupos polifiléticos (morfotipos Espinhaço e Quadrilátero) ou aninhada dentro de outro morfotipo (Olhos D'água). Com isso, não foi possível considerá-las linhagens distintas.

Com relação à *Crossodactylus* sp nov., além da distância genética entre ela e as populações de *C. trachystomus* ter sido maior que 3%, ela foi recuperada como uma linhagem irmã das demais populações analisadas, demonstrando que se trata de linhagem independente. Nossa filogenia, recuperou uma topologia diferente daquela apresentada por Montesinos (2017), em que o clado de *Crossodactylus* sp. Olhos D'água foi recuperado como uma linhagem irmã das populações do Espinhaço e Quadrilátero, podendo representar uma potencial nova espécie. Em nossas análises, a população de Olhos D'água foi recuperada como uma linhagem inserida no clado de *C. trachystomus*, acreditamos que isso seja por causa da adição de novas localidades entre os pontos analisados por Montesinos (2017) preenchendo os gaps amostrais. Com isso, apesar da distância genética ter variado de 2 a 3%, a filogenia não nos deu suporte para considerá-la uma linhagem independente.

Outro dado que chama atenção é o agrupamento das populações de Mariana e de Olhos D'água formando um grupo monofilético, já que estas duas localidades estão distantes geograficamente em 318,7 km em linha reta, sendo uma ao sul do Espinhaço, no Quadrilátero, e outra ao norte na porção central do Espinhaço, respectivamente. Diferente dos resultados filogenéticos, os dados de morfologia mostram que as duas populações possuem morfotipos diferentes, sendo que Mariana possui o morfotipo do Quadrilátero (com focinho arredondado em vista dorsal e ventre reticulado) e Olhos D'água possui seu morfotipo próprio (com focinho truncado em vista dorsal e ventre marmoreado). Uma melhor amostragem destas localidades e o preenchimento de novos pontos amostrais entre essas duas localidades poderiam melhor resolver essas inconsistências.

O uso de métodos integrativos de delimitação de espécies que une a morfologia de adultos e girinos, vocalização e dados moleculares vem se mostrando eficaz para validação e descrição de espécies crípticas, o que nos permitiu distinguir a nova espécie de *Crossodactylus* proveniente de Caetité. Outros casos semelhantes são amplamente observados na literatura, como a sinonímia entre *Proceratophrys caramaschii*, *P. aridus* em sinônimos juniors de *P. cristiceps* que apresentam morfotipos dos adultos com algumas diferenças, mas possuem sobreposição em parâmetros acústicos e formam

clados irmãos com grande proximidade genética (MÂNGIA *et al.* 2020). Pelo fato dos representantes de Hylodidae apresentarem morfologia críptica, tais métodos podem ser fundamentais para desvendar a real diversidade de Hylodidae.

A nova espécie de *Crossodactylus* está restrita a uma pequena mata de galeria no centro sul da Bahia e foi coletada em 2008. Em 2017, novas expedições foram realizadas, mas a espécie não foi encontrada (F. Leite, obs. pes.). Além disso, *C. trachystomus* está distribuído em uma região de Minas Gerais que tem sofrido grandes impactos com mineração. Eterovick *et al.* (2020) aponta extinção local para áreas da localidade tipo de *C. trachystomus* e para regiões do Quadrilátero e Serra do Cipó, dificultando o preenchimento de falhas amostrais ao longo de sua distribuição e melhor conhecimento genético e de história natural das espécies. O constante desmatamento de áreas florestais, principalmente pela mineração, é um problema para conservação e conhecimento das espécies, especialmente no estado de Minas Gerais (ETEROVICK *et al.* 2020). Sendo assim, é urgente que se amplie o estudo das populações de anfíbios nessas regiões, visto que muitas dessas populações estão sofrendo drástica diminuição, e até mesmo extinções locais, antes mesmo de serem descritas (TOLEDO *et al.* 2023).

Referências

- AFONSO, L.G. & ETEROVICK, P.C. Microhabitat choice and differential use by anurans in forest streams in southeastern Brazil. **Journal of Natural History**. V. 41, P. 937–948. 2007.
- ALMEIDA-ABREU, P. A. & RENGER, F. E. Serra do Espinhaço Meridional: um orogeno de colisão do Mesoproterozoico. **Revista Brasileira de Geociências**, V. 32, P. 1–14. 2002. <https://doi.org/10.25249/0375-7536.20023210114>
- ALTIG, R. & JOHNSTON, G.F. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. **Herpetological Monographs**. V. 3, P. 81-109. 1989.
- BASTOS, R.P. & POMBAL JR., J.P. New species of *Crossodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Rain Forest of southeastern Brazil. **Copeia**. V. 1995, P. 436–439. 1995. <http://dx.doi.org/10.2307/1446907>
- BOKERMANN, W.C.A. Lista Anotada das Localidades Tipo de Anfíbios Brasileiros. **Serviço de Documentação da Reitoria da Universidade de São Paulo**. São Paulo. 181 pp. 1966.

BOULENGER, G.A. Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the Collection of the British Museum. **2nd Edition. British Museum of Natural History**, London, 503 pp. + 16 pls. 1882.

BRUNES, T. O.; DE S. PINTO, F. C.; TAUCCE, P. P. G.; SANTOS, M. T. T.; NASCIMENTO, L. B.; CARVALHO, D. C.; DE OLIVEIRA, G. C.; VASCONCELOS, S.; LEITE, F. S. F. Traditional taxonomy underestimates the number of species of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae) diverging in the mountains of southeastern Brazil since the Miocene. **Systematics and Biodiversity**. V. 21, P. 1–20. 2023. <https://doi.org/10.1080/14772000.2022.2156001>

CALDART, V.M.; IOP, S. & CECHIN, S.Z. Vocalizations of *Crossodactylus schmidti* Gallardo, 1961 (Anura, Hylodidae): advertisement call and aggressive call. **North-Western Journal of Zoology**. V. 7, P. 118–124. 2011.

CANELAS, M.A.S. & BERTOLUCI, J. Anurans of the Santuário do Caraça, southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. **Iheringia, Série Zoologia**. V. 97, P. 21–26. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212007000100004>

CARAMASCHI, U.; KISTEUMACHER, G. O girino de *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt e Luetken, 1862) (Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**. V. 49, P. 237 – 239. 1989.

CARAMASCHI, U.; SAZIMA, I. Uma nova espécie de *Crossodactylus* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. V. 3, P. 43-49. 1985.

CARCERELLI, L.C; CARAMASCHI, U. Ocorrência do gênero *Crossodactylus* Dumeril & Bibron, 1841 no Nordeste brasileiro, com a descrição de duas novas espécies (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**. V. 52, N. 3, P. 415 – 422. 1992.

CHEN, J.M.; SUWANNAPOOM, C.; WU, Y.H.; POYARKOV, N.A.; XU, K.; PAWANGKHANANT, P.; CHE, J. Integrative taxonomy reveals a new species of *Leptobrachella* (Anura: Megophryidae) from the mountains of northern Thailand. **Zootaxa**. V. 5052, N. 2, P. 41-64. 2021. doi: 10.11646/zootaxa.5052.2.2.

COCHRAN, D.M. Frogs of Southeastern Brasil. **Bulletin of the United States National Museum**. V. 206, P. 1–423 + pls. 1–16. 1955.
<http://dx.doi.org/10.5479/si.03629236.206.1>

DE SÁ, F.; CONDEZ, T.H; LYRA, M.L; HADDAD, C.F.B.; MALAGOLI, L.R. Unveiling the diversity of giant neotropical torrent frogs (Hylodidae): phylogenetic relationships, morphology, and the description of two new species. **Systematics and biodiversity**. V. 20, N. 1, P. 01-31. 2022.

DE SÁ, F. P.; CANEDO, C.; LYRA, M. L.; HADDAD, C. F. B. A new species of *Hylodes* (Anura, Hylodidae) and its secretive underwater breeding behavior. **Herpetologica**. V. 71, P. 58–71. 2015.

DUMÉRIL, A.M. & BIBRON, G. Erpétologie Générale, ou Histoire Naturelle des Reptiles 8. Libr. **Encyclop. Roret**. Paris. 792 pp. 1841.

ETEROVICK, P.C.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; BORGES-NOJOSA, D.M.; SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. & SAZIMA, I. Amphibian declines in Brazil: an overview. **Biotropica**. V. 37, P. 166–179. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00024.x>

ETEROVICK, P.C; SOUZA, A.M; SAZIMA, I. Anuran amphibians from Serra do Cipó. Belo Horizonte – MG, Brazil. Bioreplicas. 1 ed. 292 pp. 2020.

FELLER, A.,E. & HEDGES, S.,B. Molecular evidence for the early history of living amphibians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. V. 9, P. 509-516. 1998.

FROST, D., R. **Amphibian Species of the World**: an Online Reference. Version 6.1 (Date of access). 2021. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001. Acessado em: 20 de outubro de 2022.

GOEBEL, A.,M.; DONNELLY, J.,M. & ATZ, M.E. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have

amplified DNA in amphibians successfully. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. V. 11, P. 163 - 199. 1999.

GOSNER K.L. A simplified table for staging anuran embryo and larvae with notes on identification. **Herpetologica**. V. 16, P. 183–190. 1960.

GRAYBEAL, A. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypothesis characterizing their radiation. **Zoological Journal of the Linnean Society**. V. 119, P. 297-338. 1997.

HADDAD, C.B.F.; SAZIMA, I. GARCIA, P. C. A. E POMBAL JR. J. P. Redescritção de *Hylodes perplicatus* (MirandaRibeiro, 1926) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**. V. 61, P. 245–254. 2003.

HEDGES, S.B. Molecular evidence for the origin of birds. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. V. 91, P. 2621-2624. 1994.

HENSEL, R. Beiträge zur Kenntniss der Wirbelthiere Südbrasilens. **Wiegmanns Archiv für Naturgeschichte**. V. 33, P. 120–162. 1867.

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**. V. 31, P. 231–410. 1990.

KATOH, K; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. V. 30, N. 4, P. 772-80. 2013. doi: 10.1093/molbev/mst010.

KOK, P. J. R. AND M. KALAMANDEEN. Introduction to the taxonomy of the amphibians of Kaieteur National Park, Guyana. **Phyllomedusa Journal of Herpetology**. V. 8. 2008.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.;

THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**. V. 28, N.12, P.1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.

KÖHLER, J., JANSEN, M., RODRÍGUEZ, A., KOK, P. J. R., TOLEDO, L. F., EMMRICH, M., VENCES, M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, V. 4251, P. 1–124. 2017. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>.

LEAL, F.F. Multilocus phylogeny and evolution of a Sky Island species complex reveal Pliocene diversification and unexpected incongruence between morphological and molecular data. **Dissertação: Mestrado**. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 62 pp. 2019.

LEITE, F.S.F.; ETEROVICK, P.C.; JUNCA, F.A. Status do conhecimento, endemismo e conservação de anfíbios anuros da Cadeia do Espinhaço, Brasil. **Megadiversidade**. V. 4, P. 158–176. 2008. <https://doi.org/10.3905/jpm.2003.319889>.

LUTZ, A. Observações sobre batrachios brasileiros. Taxonomia e biologia das Elosiinas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 24, P. 195–222 + 4 pls.1930.

LUTZ, B. Nota prévia sobre alguns anfíbios anuros do Alto Itatiaia. **O Hospital**. V. 39, P. 705–707. 1951.

LUTZ, B. New frogs from Itatiaia Mountain, Brasil. **Copeia**. V. 1952, P. 27–28. 1952. <http://dx.doi.org/10.2307/1437618>

LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Miscellaneous Publications of the University of Kansas Museum of Natural History**. V. 53, P. 1–237. 1971.

MÂNGIA, S.; DE OLIVEIRA, E.F.; SANTANA, D.J.; KOROIVA, R.; PAIVA, F.; GARDA, A. A. Revising the taxonomy of *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Odontophrynidae) from the Brazilian semiarid Caatinga: Morphology, calls and molecules support a single widespread species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. V. 58, P. 1151–1172. 2020. doi: 10.1111/jzs.12365

MCDIARMID, R. W., AND R. I. ALTIG. Tadpoles. **The Biology of Anuran Larvae**. Chicago: University of Chicago Press. 1999.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**. V. 27, P. 1–227 + 22 pls. 1926.

MONTESINOS, R. M. P. Sistemática filogenética de Hylodidae (Amphibia: Anura). **Tese: doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. São Paulo. 297 pp. 2017.

MÜLLER, L. Neue Batrachier aus Ost-Brasilien. **Senckenbergiana**. V. 6, P. 169–177. 1924.

MÜLLER, L. Amphibien und Reptilien der Ausbeute Prof. Bresslau's in Brasilien 1913–14. **Abhandlungen Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft**. V. 40, P. 259–304. 1927.

NASCIMENTO, L.B.; CRUZ, C.A.G. & FEIO, R.N. A new species of diurnal frog in the genus *Crossodactylus* Duméril and Bibron, 1841 (Anura, Leptodactylidae) from Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**. V. 26, P. 497–505. 2005a.

NASCIMENTO, L.B.; WACHLEVSKI, M. & LEITE, F.S.F. 2005b Anuros. In: SILVA, A.C.; PEDREIRA, L.C.V.S.F. & ABREU, P.A.A. (Eds.), **Serra do Espinhaço Meridional: Paisagens e Ambientes, O Lutador**, Belo Horizonte, pp. 209–229. 2005b.

NUNEZ, J.J.; RABANAL, F.E. & FORMAS, J.R. Description of a new species of *Eupsophus* (Amphibia: Neobatrachia) from the Caldivian Coastal range, Southern Chile: an integrative taxonomic approach. **Zootaxa**. V. 3305, P. 53–68. 2012.

PADIAL, J.M.; DE LA RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. V. 155, N. 1, P. 97–122. 2009 <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00424.x>

PALUMBI, S.R.; MARTIN, A. ROMANO, S.; MCMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABAWSKI, G. **The simple fool's guide to PCR**, version 2.0. Privately published, compiled by S. Palumbi, University of Hawaii: Honolulu. 1991.

PEZZUTI, T.L.; LEITE, F.S.F; ROSSA-FERES, D.C.; GARCIA, P.C.A. The tadpoles of the iron quadrangle, southeastern Brazil: a baseline for larval knowledge and anuran

conservation in a diverse and threatened region. **South American Journal of Herpetology**. V. 22, N. 1, P. 01-107. 2021.

PIMENTA, B.V.S.; HADDAD, C.F.B.; NASCIMENTO, L.B.; CRUZ C.A.G. & POMBAL, J.P. JR. Comments on “Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide”. **Science**. V. 309, P. 1999. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1112996>

PIMENTA, B.V.S.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G. Synonymy of *Crossodactylus bokermanni* Caramaschi & Sazima, 1985 with *Crossodactylus trachystomus* (Reinhardt & Lütken, 1862) and description of a new species from Minas Gerais, Brazil (Anura: Hylodidae). **Zootaxa**. V. 3955, N. 1, P. 65-82. 2015.

PIMENTA, B.V.S.; CRUZ, C.A.G.; CARAMASCHI, U. Taxonomic review of the species complex of *Crossodactylus dispar* A. Lutz, 1925 (Anura, Hylodidae). **Aquivos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**. V. 45, N.1, P. 1-33. 2014.

PIMENTA, B.V.S.; WACHLEVSKI, M.; CRUZ, C.A.G. Morphological and Acoustical Variation, Geographic Distribution, and Conservation Status of the Spinythumb Frog *Crossodactylus bokermanni* Caramaschi and Sazima, 1985 (Anura, Hylodidae). **Journal of Herpetology**. V. 42, P. 481–492. 2008.

PINHEIRO, P. D. P., PEZZUTI, T. L., BERNECK, B. V. M., LYRA, M. L., LIMA, R. C. L., & LEITE, F. S. F. A new cryptic species of the *Aplastodiscus albosignatus* group (Anura: Hylidae). **Salamandra**. V. 57, P. 27–43. 2021

RAMBAUT; A. & DRUMMOND, A.J. **FigTree**: tree figure drawing tool, v1.4.2. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

SCHACHT M.C.; MCBRAYER L.D. A method for constructing an adjustable platform to obtain lateral photographs of larval anurans. **Herpetological Review**. V. 40, P. 303 – 304. 2009.

SILVA, H.R. & BENMAMAN, P. Uma nova espécie de *Hylodes* Fitzinger da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil (Anura: Hylodidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. V. 25, N. 1, P. 89 - 99. 2008.

SILVA, L. A. DA; MAGALHÃES, F. DE M.; THOMASSEN, H.; LEITE, F. S. F.; GARDA, A. A.; BRANDÃO, R. A.; HADDAD, C. F. B.; GIARETTA, A.A; DE CARVALHO, T. R. Unraveling the species diversity and relationships in the *Leptodactylus mystaceus* complex (Anura: Leptodactylidae), with the description of three new Brazilian species. **Zootaxa**. V. 4779, P. 151–189. 2020. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4779.2.1>

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**. V. 30, P. 1312 – 1313. 2014.

TITUS, T.A.; LARSON, A. Molecular phylogenetics of Desmognathine Salamanders (Caudata: Plethodontidae): A reevaluation of evolution in ecology, life history, and morphology. **Systematic Biology**. V. 45, P. 451 - 472. 1996.

TOLEDO, L.F.; CARVALHO-E-SILVA, S.P.; CARVALHO-E-SILVA, A.M.P.T.; GASPARINI, J.L.; BAÊTA, D.; REBOUÇAS, R.; HADDAD, C.F.B.; BECKER, C.G.; CARVALHO, T. A retrospective overview of amphibian declines in Brazil's Atlantic Forest. **Biological conservation**. V. 277. 2023.

VIEITES, DR.; WOLLENBERG, K.C.; ANDREONE, F.; KÖHLER, J.; GLAW, F.; VENCES, M. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. **Proc Natl Acad Sci U S A**. V. 106, n. 20, P. 8267 - 8272. 2009. doi: 10.1073/pnas.0810821106.

VITTORAZZI, S. E., G.; AUGUSTO-ALVES, D.; DAS NEVES-DA-SILVA, A., M., P., T.; DE CARVALHO-E-SILVA, S., M.; RECCO-PIMENTEL; TOLEDO, L. F.; LOURENÇO, L. B.; BRUSCHI, D. P. Paraphyly in the giant torrent-frogs (Anura: Hylodidae: *Megaelosia*) and the description of a new genus. **Salamandra**. V. 57, P. 274 – 284. 2021a.

VITTORAZZI, S.; LOURENÇO, L.; ZATTERA, M.; WEBER, L.; RECCO-PIMENTEL, S.; BRUSCHI, D. Cytogenetic and genetic data support *Crossodactylus aeneus* Müller, 1924 as a new junior synonym of *C. gaudichaudii* Duméril and Bibron, 1841 (Amphibia, Anura). **Genetics and Molecular Biology**. V. 44, N. 2, P. 01 – 09. 2021b. 10.1590/1678-4685-gmb-2020-0301.

WALKER, M.; LOURENÇO, A.C.C.; PIMENTA, B.V.S.; NASCIMENTO, L.B. Morphological variation, advertisement call, and tadpoles of *Bokermannohyla nanuzae* (Bokermann, 1973), and taxonomic status of *B. feioi* (Napoli & Caramaschi, 2004) (Anura, Hylidae, Cophomantini). **Zootaxa**. V. 3937, P. 161– 178. 2015. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3937.1.8>.

WEBER, L.N. & CARAMASCHI, U. Descrição da morfologia oral interna de larvas do gênero *Crossodactylus* Duméril e Bibron, 1841 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**. V. 64, P. 141–149. 2006.

YANG, L. K. Center for Conservation Bioacoustics. **Raven Pro**: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.6.1) [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. 2019. Disponível em: <http://ravensoundsoftware.com/> .

Anexo – I
Lista de adultos analisados

Crossodactylus trachystomus: MZUFV 15499 – 06 (Olhos D’agua, MG); ZUEC 10806 – 09; 10811 – 13 (Nova Lima, MG); ZUEC 3438 (Congonhas do Campo, MG); UFMG 2303 – 08 (Catas Altas, MG); MZUFV 7233 – 38 (Ouro Preto, MG); MZUFV 19307, 19308 (Barão de Cocais, MG); MZUFV 6591 – 93, 7104, 7105 (Ouro Branco, MG); MZUFV 7522; UFMG 5356, 19703, 19706, 19707 (Mariana, MG); MNCAM 20744, 20738 (Alto Palácio, MG); UFMG 14067, 14257, 16149 (Santo Antônio do Itambé, MG); UFMG 19579, 19580 (Morro do Pilar, MG); UFMG 17593 (Conceição do Mato Dentro, MG); MNRJ 64593 (Diamantina, MG); MNRJ 48507, 37046 – 48, 41819 – 24; MZUSP 108976 – 78, 110833 (Belo Horizonte, MG); *Crossodactylus trachystomus* (*Crossodactylus bokermanni*): ZUEC 2457, 2458, 2470, 3344, 3349 (Parátipos, Km – 126, Jaboticatubas, MG); ZUEC 1566, 2287, 2531, 2532, 2540, 2541; MZUSP 76891, 76893, 76894 (Serra do Cipó, Km 126, MG, Topotipos); MZUSP 56835 – 38, 314, 126174, 126175 (Serra do Cipó, Km 2, MG); MNCAM 21041 – 43; MNCAM - 20890 (PN Serra do Cipó, MG); MNCAM 5084, 5085, 5087, 17169; UFMG 14257 (Santo Antônio do Itambé, MG); UFMG 6014, 6869 (Rio Pardo, MG); UFMG 11117, 11426, 12115; MNRJ 41038 (Diamantina, MG); UFMG 4377; MNRJ 66023 – 25, 77656, 38473, 60339, 60340, 55008, 55009, 38316, 77564, 38474 – 78, 70368, 70369, 82633, 87305, 89534 (Catas Altas, MG); UFMG 2274; MNRJ 38466, 38467, 38470 (Santana do Riacho, MG); UFMG 15418 (Grão Mongol); UFMG 3999; MZUSP 57281 (Conceição do Mato Dentro, MG); MNRJ 56428 – 38; MZUSP 13520, 13521, 110627, 110628, 110631, 110632, 108792, 108793 (RPPN Serra do Caraça, MG); MNRJ 41459, 41457, 41458, 38465 -69, 39984 – 87 (Alto Palácio, MG); MNRJ 42930 – 35 (Serranópolis, MG) MNRJ 72824 – 26, 53055, 53056 (Santa Bárbara, MG); MNRJ 40637 – 41, 40396 – 99 (Ouro Preto, MG); MNRJ 42926 – 29 (Congonhas do Campo, MG); MZUSP 123865 (Caeté, MG); MZUSP 108948 (Couto de Magalhães, MG); MZUSP 58623 (Serra da Pedra Redonda, MG);

Crossodactylus sp. nov. (*Crossodactylus* aff. *bokermanni*): UFMG 2275 – 300; UFMG 5895 – 900 (Caeté, BA);

C. trachystomus (Hylodes uai): UFMG 20123 – 24 (Diamantina, MG).

Anexo II

Lista das larvas analisadas

Crossodactylus trachystomus: UFMG 1527, 1564 (Santo Antônio do Itambé, MG); UFMG 273 (Cardeal Mota, MG); UFMG 573 (Mariana, MG); UFMG 524 (Rio Pardo, MG); MNCAM 16346, 16367 (São Gonçalo, MG).

Crossodactylus sp nov.: UFMG 503, 611 (Caetité, BA)

Anexo III

Sequências utilizadas para análises moleculares

Sequências depositadas no Genbank:

Crossodactylus aeneus: KM361726; *C. bokermanni*: KY007117; *C. caramaschii*: MT992101; AY143346; AY143358; KJ961569; KU495178; KU495179; KU495180; MN265234; MN382648; *C. aff. caramaschii*: MG019408; MG019409; MG019410; MG019411; MG019412; MG019413; MG019414; *C. schmidt*: HQ290948; AY843579; *Crossodactylus* sp n.: AY143347; *C. weneri*: KU215900; KU215901; KU2115902; *Megaelosia goldieii*: MT409021; *Phantasmarana jordaniensis*: MF624238; *P. apuana*: MT409025; *P. tamuia*: MW704015; *P. massarti*: MT409031; *P. curucutuensis*: MW704012; *P. boticariana*: MT992163; *Hylodes uai*: KY007116; *H. charadranaetes*: KM390763; *H. dactylocinus*: MT992132; *H. perplicatus*: AY263261; *H. asper*: MT409039; *H. lateristrigatus*: KM390794; *H. caete*: KY627910; *H. phyllodes*: KY627914; *H. pipilans*: KJ961582; *H. fredii*: KY627913; *H. heyeri*: MT992130; *H. meridionalis*: MF624225; *H. regius*: MN011547; *H. ornatus*: KJ961578; *H. sazimai*: KJ961585; *H. perere*: KJ961581; *H. amnicola*: KJ961576

Indivíduos sequenciados neste trabalho:

Crossodactylus trachystomus: UFMGT 3799, 3701 (Diamantina); 3259 (Santo Antônio do Itambé); 129, 130 (Mariana); 178 (Rio Pardo de Minas); 934 (Catas Altas); 9346; MZUFV 15905, 15906 (Olhos D'água); 19307, 19308 (Barão dos Cocais); MNRJ 38474, 38476, 38477, 38316 (Catas Altas); 39982, 41459 (Serra do Cipó); MTR 20327, 20345 (Serra do Cipó); HT 2208; 2209 (Santo Antônio do Itambé).

Crossodactylus sp. nov.: 273 (Caetité).

Anexo IV

Tabela 01: Lista de primers utilizados para o sequenciamento, direção e a sequência de bases, os primers são dos trabalhos de Palumbi *et al.* (1991); Hedges (1994); Titus & Larson (1996); Graybeal (1997); Feller & Hedges (1998); Goebel *et al.* (1999).

Primer	Direção (5' 3')	Sequência
12s rDNA		
MVZ59	Forward	ATAGCACTGAAAAYGCTDAGATG
12S-FH	Reverse	CTTGGCTCGTAGTTCCTGGCG
12S-AL	Forward	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT
MVZ50	Reverse	TYTCGGTGTAAGYGARAKGCTT
16S rDNA		
AR	Forward	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
BR	Reverse	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
L13	Forward	TTAGAAGAGGCAAGTCGTAACATGGTA
Titus1	Reverse	GGTGGCTGCTTTTAGGCC
L2A	Forward	CCAAACGAGCCTAGTGATAGCTGGTT
H10	Reverse	TGATTACGCTACCTTTGCACGGT