

SOFIA LUZ ANDRADE BARRETO

**OSTEOLOGIA DE DOIS ANFÍBIOS ENDÊMICOS DA MATA ATLÂNTICA
BRASILEIRA: *Aparasphenodon pomba* E *Thoropa aff. lutzii* (AMPHIBIA: ANURA)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Renato Neves Feio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

B273o
2019 Barreto, Sofia Luz Andrade, 1993-
Osteologia de dois anfíbios endêmicos da Mata Atlântica
brasileira: *Aparasphenodon pomba* e *Thoropa lutzi* (Amphibia:
Anura) / Sofia Luz Andrade Barreto. – Viçosa, MG, 2019.
57 f.: il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Renato Neves Feio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Animal, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Anfíbios. 2. Osteologia. 3. Anfíbios - Classificação.
I. Feio, Renato Neves. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 597.878

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

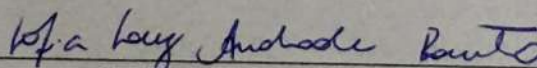
SOFIA LUZ ANDRADE BARRETO

**OSTEOLOGIA DE DOIS ANFÍBIOS ENDÊMICOS DA MATA ATLÂNTICA
BRASILEIRA: *Aparasphenodon pomba* E *Thoropa aff. lutzii* (AMPHIBIA: ANURA)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

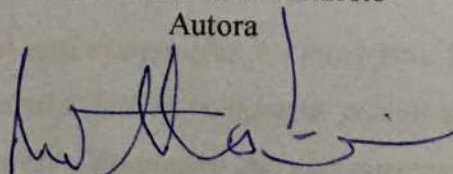
APROVADA: 26 de agosto de 2019.

Assentimento:



Sofia Luz Andrade Barreto

Autora



Renato Neves Feio

Orientador

Dedico essa dissertação aos meus pais, principalmente à minha mãe, Claudemira, Luz do meu nome, pessoa que me incentivou sempre nas minhas escolhas mesmo que elas parecessem absurdas ao restante das pessoas.

AGRADECIMENTOS

A muitos e a todos tenho que agradecer. A tudo e todos que ao meu redor estavam e que de alguma forma possibilitaram que este trabalho fosse concluído.

Primeiramente, queria agradecer à natureza, pois é para ela que nós, biólogos, entregamos a nossa vida, nossa curiosidade, nossa sede por conhecimento e eventualmente tiramos nosso sustento.

Ademais, agradeço à minha mãe, Luz do meu nome, pessoa que me incentivou sempre nas minhas escolhas mesmo que elas parecessem sempre absurdas ao restante das pessoas (e até mesmo para ela). Ao meu pai e meu irmão, que estiveram ao meu lado dando apoio e suporte, à minha avó Yara e tia Deína, pelo amor incondicional.

Ao orientador e amigo Renato Feio – que me abriu as portas do Museu de Zoologia João Moojen mesmo antes da graduação – pelos campos, aulas, ensinamentos, companheirismo, bom humor e por aceitar me orientar!

Agradeço a todos os amigos que fiz pelo caminho em Viçosa, desde a Gangrena dos Coitads no COLUNI, à turma mais divertida da Biologia, a BIO13, passando pelos “meninos do café”, e aos sempre presentes amigos do Museu, que mesmo longe na distância física sempre estão com uma mão espiritual erguida para ajudar no menor dos problemas.

Agradeço a todos os profissionais que possibilitaram a feitura e conclusão deste trabalho, tais como a equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, os pesquisadores José Pombal Jr., Luís Filipe Toledo, Carlos Nunes, Bruno Pimenta, Karina, técnica da coleção do ZUEC.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela acolhida por bons e longos nove anos, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e ao Departamento de Biologia Animal pelo suporte e aprendizado. Agradeço principalmente ao Museu de Zoologia João Moojen, local que considero a minha segunda casa em Viçosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

Enquanto as nações estiverem divididas, haverá guerra, quando se unirem, virá o reino da paz. Enquanto a mulher estiver só, será sempre o ser frágil que flutua à mercê das circunstâncias. Quando se unirem, elas tornar-se-ão uma grande força.

Bertha Lutz

We've all got both light and dark inside us. What matters is the part we choose to act on. That's who we really are.

J.K. Rowling – H. P. and the Order of Phoenix

RESUMO

BARRETO, Sofia Luz Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Osteologia de dois anfíbios endêmicos da mata atlântica brasileira: *Aparasphenodon pomba* e *Thoropa* aff. *lutzi* (Amphibia: Anura)**. Orientador: Renato Neves Feio.

No presente trabalho são apresentados novos dados acerca da osteologia de espécies de anfíbios anuros dos gêneros *Aparasphenodon* e *Thoropa*. O primeiro capítulo aborda a caracterização da osteologia completa – crânio e pós-crânio – de uma nova espécie de *Thoropa*, proveniente da cidade de Cataguases, Minas Gerais, e posterior comparação com caracteres cranianos de espécies congênicas. Esta espécie pode ser caracterizada osteologicamente pelos nasais que sobrepõem extremidade anteromedial do esfenetmoide; esfenetmoide sem pareamento evidente; pré-maxilar com dois processos espinhosos; neopalatinos com extremidades mediais constrictas, processo cultriforme do parasfenoide localizados posteriormente aos neopalatinos e o processo dentígeno do vômer anterior à coana. Esse conjunto de características diferencia o agrupamento das “pequenas” das “grandes” *Thoropa*. Já o segundo capítulo aborda a osteologia craniana da perereca-de-capacete *Aparasphenodon pomba*, uma espécie classificada como criticamente ameaçada por sua ocorrência restrita à localidade tipo Fazenda Sinimbú, município de Cataguases. *Aparasphenodon pomba* exibiu morfologia craniana com aspectos particulares, tais como o padrão de espículas na superfície dorsal dos ossos nasais, maxilares, frontoparietais, esfenetmoide dermal e esquamosal, este último parcialmente sobreposto pelo frontoparietal, *canthus rostralis* levemente elevado, vômeres serapados entre si e com os processos dentígenos angulares, entre outras características. Essas particularidades reafirmam que *A. pomba* é um táxon válido como espécie. Porém, o aprofundamento do estudo da morfologia craniana do gênero *Aparasphenodon* levanta questões: a presença ou ausência do osso pré-nasal é suficiente para definir o gênero *Aparasphenodon*? Para elucidar as relações evolutivas entre as espécies deste gênero, serão necessárias análises filogenéticas consistentes que utilizem caracteres morfológicos e moleculares.

Palavras-chave: Morfologia. Herpetologia. Anura

ABSTRACT

BARRETO, Sofia Luz Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Osteology of two Atlantic Rainforest endemic amphibians: *Aparasphenodon pomba* and *Thoropa* aff. *lutzi* (Amphibia: Anura).** Advisor: Renato Neves Feio.

In this paper we present new data about the osteology of two Anura distinctive genera: *Aparasphenodon* and *Thoropa*. The first chapter deals with the characterization of the complete osteology – *cranium* and *post-cranium* – of a new *Thoropa* species, whose type locality is the municipality of Cataguases, Minas Gerais state. Thus, we compare its cranial features with the other *Thoropa* species. *Thoropa* sp. can be characterized by the nasals that overlap the anteromedial end of sphenetmoid; sphenetmoid without evident pairing; premaxillaries with two spinal processes; neopalatines thin at the medial end and dentigerous process of vomer anterior to the choana. These set of features differentiate the grouping of “small” and “large” *Thoropa*. In the second chapter, we describe the cranial osteology of the casque-headed-frog *Aparasphenodon pomba*, a tree-frog classified as critically endangered species as a result of its habitat restriction to Sinimbú farm at the municipality of Cataguases. *Aparasphenodon pomba* possess a cranial morphology with particular aspects, such as the spicule patterns on the dorsal surface of nasals, maxillaries, frontoparietals, dermal sphenetmoid and squamosal, this last one partially covered by the frontoparietal, *canthus rostralis* slightly elevated, vomer widely separated from each other and the dentigerous process of vomer angled. These particularities reaffirm that *A. pomba* is a valid taxon as species, however, the deepening in the study of the genus osteology rises some questions: is the presence or absence of the prenasal bone is sufficient to define the genus *Aparasphenodon*? To elucidate those questions and the evolutionary relationship among the species of *Aparasphenodon*, it will be necessary consistent phylogenetic analysis using morphological and molecular data.

Keywords: Morphology. Herpetology. Anura

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** A, B e C, vistas dorsal, ventral e lateral, respectivamente, do crânio diafanizado de *Thoropa* sp. aff. *lutzi*. Para melhor visualização e entendimento, D e E representam o desenho esquemático das estruturas ósseas do crânio deste mesmo indivíduo (MZUFV 18650)25
- Figura 2.** Cintura escapular de *Thoropa* aff. *lutzi* 28
- Figura 3.** Esqueleto completo de *Thoropa* aff. *lutzi* diafanizado 30
- Figura 4.** Prancha de diafanização do crânio de *Thoropa miliaris* 31
- Figura 5.** Vista dorsal do crânio, membros anteriores e esqueleto axial do espécime ZUEC17335 *Thoropa taophora* 31
- Figura 6.** (A) Árvore mais parcimoniosa encontrada pelo método *implicit enumeration*, nós marcados por numeração; (B) suporte de Bremer; (C) *Bootstrap (standard;* número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%); (D) *Jackknife* (probabilidade de remoção = 36; número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%) 33
- Figura 7.** Clados encontrados a partir da árvore mais parcimoniosa. A = *Thoropa* “grandes”; B = *Thoropa* “pequenas” + *Cycloramphus* spp. + *Zachaenus parvulus*; B1 = *Thoropas* pequenas; B2 = *Zachaenus parvulus* + *C. eleutherodactylus* e B3 = *Cycloramphus* spp. 34

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Vistas dorsal (A) e ventral (B) do crânio de *Aparasphenodon pomba* (MZUFV 12126), seta vermelha em A mostrando o nasal que se estende anteriormente até cobrir o processo alar do pré-maxilar; (C) espécime adulto 49
- Figura 2.** Raio-X de quatro espécies de *Aparasphenodon*. A: *Aparasphenodon bruno*i (MN RJ 247); B: *Aparasphenodon arapapa* (UFBA 3948); C: *Aparasphenodon bokermanni* (ZUEC 11575); e D: *Aparasphenodon venezolanus* (INPA 22151). Asterisco vermelho: osso pré-nasal; seta vermelha: ausência do osso pré-nasal e nasal que cobre o processo alar do pré-maxilar 51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Comparação de características osteológicas de <i>Thoropa</i> aff. <i>lutzi</i> , <i>Thoropa miliaris</i> e <i>Thoropa taophora</i> | 32 |
|---|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Osteologia craniana comparada das espécies de <i>Aparasphenodon</i> e <i>Corythomantis</i> . or. = ornamentação; max = maxilar. *Sinapomorfia putativa do gênero <i>Corythomantis</i> | 52 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURAS INSTITUCIONAIS

KU: Kansas University;

MNRJ: Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro;

MZUFV: Museu de Zoologia João Moojen;

ABREVIATURAS CARACTERES MORFOLÓGICOS

CC: comprimento do crânio;

C OCC: côndilo occipital;

ESF: esfenetomoide;

ESQ: esquamosal;

FPAR: Frontoparietal;

LC: Largura do crânio;

MAX: maxilar;

NAS: nasal;

NP: neopalatino;

P ALAR MAX: processo alar do pré-maxilar;

PR: proótico;

PRSF: parasfenoide;

PTER: pterigoide;

QJ: quadratojugal;

VOM: vômer.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 13 |
| 3. RESULTADOS | |
| 3.1 CAPÍTULO 1: Osteologia completa de <i>Thoropa</i> aff. <i>lutzi</i> e sua posição filogenética dentro do gênero (Anura, Cycloramphidae) | 17 |
| 3.2 CAPÍTULO 2: Osteologia craniana da perereca-de-capacete <i>Aparasphenodon pomba</i> Assis, Santana, Silva, Quintela & Feio, 2013 (Anura: Hylidae: Lophyohylinae), com comentários sobre a composição dos gêneros <i>Aparasphenodon</i> Miranda-Ribeiro, 1920 e <i>Corythomantis</i> Boulenger, 1896 | 43 |
| 4. CONCLUSÕES GERAIS | 57 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, os primeiros estudos referentes aos anfíbios dizem respeito às descrições morfológicas da macro e microestrutura de órgãos ou sistemas de órgãos (Linnaeus 1746, 1761, 1788; Batavorum 1781; Ecker 1889; Britten 1910; Ramaswami 1939). A observação e descrição de características morfológicas são bases para a interpretação de características que podem acrescentar informações à história filogenética da forma, significado funcional, desenvolvimento ontogenético ou mesmo variações individuais (Brattstrom, 1957; Martin, 1972; Duellman & Trueb, 1994; Trueb et al. 2000; Fratani et al. 2017).

Dentre vários aspectos estudados na morfologia interna dos anfíbios está a estrutura básica, constituída pelo sistema musculoesquelético. Este sistema pode ser dividido em três unidades constituintes: crânio (incluindo o aparato hiobranquial dos girinos), componentes axiais (coluna vertebral) e sistema esquelético apendicular (membros locomotivos e constituintes que ligam os membros aos componentes axiais) (Duellman & Trueb, 1994). Estes mesmos autores apontaram em seu trabalho a existência de variações entre caracteres cranianos que, quando observados e analisados, produzem informações de grande importância taxonômica.

Grande quantidade de artigos que abordam a caracterização osteológica detalhada de várias espécies de anuros simultaneamente datam da década de 1970 (Trueb, 1970a,b, 1973, 1974, 1977; Lynch, 1971; Martin, 1972; Bolt, 1974, 1977; Seibert et al. 1974; Duellman & Trueb, 1976; Chibon, 1977; Branham & List, 1979; Emerson, 1979), podendo estar agregados a estudos de filogenia, biogeografia e evolução de níveis taxonômicos mais elevados – tribos e famílias. Com o decorrer dos anos, foram aprimoradas ferramentas que possibilitaram a melhoria na visualização e, conseqüentemente, estudo do esqueleto dos vertebrados, tais como diversas metodologias de diafanização (Taylor & Van Dyke, 1985; Aurichio & Salomão, 2002; Maisano, 2008; Rueda-Esteban et al., 2017) descarte, microtomógrafos e radiografias. Contudo, apesar do aprimoramento dessas tecnologias e criação de novas metodologias, grande quantidade das espécies de anuros são descritas sem qualquer menção da morfologia osteológica dos indivíduos (Ex. Carvalho et al., 2019; Kaefer et al., 2019; Lyu et al., 2019; Poyarkov et al., 2019; Guayasamin et al., 2018; Mahony et al., 2018).

O gênero *Thoropa* Cope, 1865, pertencente à família Cycloramphidae, inclui seis espécies subdivididas em dois grupos: *T. lutzi* Cochran, 1938 e *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907) classificadas como as “*Thoropa* pequenas”, enquanto *T. megatympanum* Caramaschi e Sazima, 1984; *T. miliaris* (Spix, 1824); *T. saxatilis* Cocroft e Heyer, 1988 e *T. taophora*

(Miranda-Ribeiro, 1923) fazem parte do grupo das “*Thoropa grandes*”. Este gênero é endêmico do Leste do Brasil, ocorrendo desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Frost, 2019). Dentre as espécies listadas, *Thoropa miliaris* e *T. petropolitana* possuem a osteologia descrita em Wandoleck (1907) e alguns aspectos ósseos de *T. lutzi* mencionados em Lynch (1971) para aplicações na filogenia dos anfíbios na época agrupados na família Leptodactylidae. Tendo em vista a descrição de uma nova espécie deste gênero no Laboratório de Herpetologia do Museu de Zoologia João Moojen, nós reconhecemos a necessidade do estudo da morfologia osteológica desta espécie candidata, tanto para o conhecimento empírico do táxon quanto para o incentivo ao uso dos caracteres osteológicos na taxonomia e sistemática dos anuros deste gênero.

Já o gênero *Aparasphenodon* engloba cinco espécies: *A. venezolanus* (Mertens, 1950), distribuído no bioma amazônico; *A. brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920; *A. arapapa* Pimenta, Napoli & Haddad, 2009; *A. bokermanni* Pombal, 1993 e *A. pomba* Assis, Santana, Silva, Quintela e Feio, 2013, estes distribuídos na Mata Atlântica. Este gênero tem como única possível sinapomorfia morfológica a presença do osso pré-nasal (Faivovich et al., 2005), que se localiza na extremidade anterior do crânio, e foi alocado por Duellman et al. (2016) na subfamília Lophyohylineae Miranda-Ribeiro (1926), cujas espécies são informalmente conhecidas como “pererecas-de-capacete”. Das cinco espécies do gênero, apenas *A. brunoi* possui a osteologia craniana descrita em detalhes (Trueb, 1970b). Já *Aparasphenodon pomba* não possui o crânio descrito e em observação prévia mostrou não possuir o osso pré-nasal. Para discutir a implicação desta espécie não possuir o osso pré-nasal, nós realizamos a descrição da sua osteologia craniana, comparamos com as espécies congênicas e com o gênero *Corythomantis* Boulenger, 1896 por conta da similaridade morfológica entre estes dois gêneros.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AmphibiaWeb. (2019). University of California, Berkeley, CA. Available from: <https://amphibiaweb.org> (accessed 20 July 2019).

Auricchio, P. & Salomão, M. (2002). Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. *Instituto Pau Brasil de História Natural*, São Paulo, 77-123.

Bolt, J. R. (1977). Dissorophoid relationships and ontogeny, and the origin of the Lissamphibia. *Journal of Paleontology*, 235-249.

Bolt, J. R. (1974). Osteology, function, and evolution of the trematopsid (Amphibia: Labyrinthodontia) nasal region. *Field Museum of Natural History*.

Brattstrom, B. H. (1957). The phylogeny of the Salientia based on skeletal morphology. *Systematic Zoology*, 6(2), 70-74.

Britten, M. (1910). Zoologische und Anthropologische Ergebnisse einer Forschungsreise im Westlichen und Zentralen Südafrika ausgeführt in den Jahren 1903–1905. XIV. Echinodermata: A) Holothurioidea. *Denkschriften Medicinisch-Naturwissenschaftlichen Gesellschaft zu Jena*, 4(1), 237-243.

Branham, A. E. & James, C. L. (1979). Development of the urostyle during metamorphosis in five species of anurans. *Journal of Morphology*, 159(3), 311-329.

Carvalho, T. R., Cassini, C. S., Taucce, P. P. G. & Haddad, C. F. B. (2019). A new morphologically cryptic species of *Adenomera* closely related to *Adenomera araucaria* from the Atlantic Forest of southern Brazil (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 53, 131–143.

Chibon, P. (1977). Vitesse de croissance et renouvellement des dents chez les amphibiens. *Development*, 42(1), 43-63.

Duellman, W. E. & Trueb, L. (1976). The systematic status and relationships of the hylid frog *Nyctimantis rugiceps* Boulenger (No. 59).

Emerson, S. B. (1979). The ilio-sacral articulation in frogs: form and function. *Biological Journal of the Linnean Society*, 11(2), 153-168.

Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., Frost, D. R., Campbell, J. A. & Wheeler, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2005(294), 1-240.

Fratani, J., Voitovicz-Cardoso, M. & Lourenço, A. C. (2017). Osteology of *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) with comments on intraspecific variation. *Zootaxa*, 4227(2).

Frost, D. R. (2019). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. *American Museum of Natural History*, New York, USA.

Guayasamin J. M., Arteaga, A., & Hutter, C. R. (2018). A new (singleton) rainfrog of the *Pristimantis myersi* Group (Amphibia: Craugastoridae) from the northern Andes of Ecuador. *Zootaxa*, 4527: 323-334.

Hill, R. L., Martin, K. G., Stanley, E., & Mendelson, J. R. I. (2018). A taxonomic review of the genus *Hemiphractus* (Anura: Hemiphractidae) in Panama: Description of Two New Species, Resurrection of *Hemiphractus panamensis* (Stejneger, 1917), and Discussion of *Hemiphractus fasciatus* Peters, 1862. *Zootaxa*, 4429(3), 495-512.

Jones, E. I. (1933). XXXIX. - Observations on the Pectoral Musculature of Amphibia Salientia. *Annals and Magazine of Natural History*, 12(70), 403-420.

Kaefer, Í. L., R. R. Rojas-Zamora, M, Ferrão, I. P. Farias, & Lima, A. P. (2019). A new species of *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae) with two distinct advertisement calls. *Zootaxa*, 4577: 316–334.

Linnaeus, C. (1746). Fauna Svecica sistens animalia Sueciae regni: quadrupedia, Aves, Amphibia, Pisces, Insecta, Vermes, distributa per classes and ordines, genera and species. *Cum differentiis specierum, synonymis auctorum, nominibus incolarum, locis habitationum, descriptionibus Insectorum*, 411, 2-pls.

Linnaeus, C. V. (1761). Fauna Suecica sistens Animalia Sueciae Regni: Mammalia, Aves, Amphibia, Pisces. Insecta, Vermes, (2), 513-535.

Linnaeus, C. (1788). Systema naturae per regna tria naturae secundum classes, ordines, genera, species.

Luque-Montes, I., Austin, J. D., Weinfurther, K. D., Wilson, L. D., Hofmann, E. P., & Townsend, J. H. (2018). An integrative assessment of the taxonomic status of putative hybrid leopard frogs (Anura: Ranidae) from the Chortís Highlands of Central America, with description of a new species. *Systematics and biodiversity*, 16(4), 340-356.

Lynch, J. D. (1971). Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs. *Univ. Kansas Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.* 53:1-238.

Lyu, Z.-T., Y.-m. Mo, H. Wan, Y.-l. Li, H. Pang, & Y.-y. Wang. (2019). Description of a new species of Music frogs (Anura, Ranidae, Nidirana) from Mt Dayao, southern China. *ZooKeys*, 858: 109–126.

Mahony, S., Kamei, R. G., Teeling, E. C. & Biju, S. D. (2018). Cryptic diversity within the *Megophrys major* species group (Amphibia: Megophryidae) of the Asian Horned Frogs: Phylogenetic perspectives and a taxonomic revision of South Asian taxa, with descriptions of four new species. *Zootaxa*, 4523, 1–96.

Martin, R. F. (1972). Evidence from osteology. *Evolution in the genus Bufo*, 37-70.

Poyarkov, N. A., Jr., Gorin, V. A., Zaw, T., Kretova, V. D., Gogoleva, S. I., Pawangkhanant, P. & Che, J. (2019). Pawangkhanant, Jing Che. On the road to Mandalay: contribution to the *Microhyla* Tschudi, 1838 (Amphibia: Anura: Microhylidae) fauna of Myanmar with description of two new species. *Zoological research*, 40(4), 244-276.

Rueda-Esteban, R. J., Varona, J. P., López-McCormick, J. S., & Restrepo, J. D. H. (2017). Diaphanization: A Standardized Protocol for Non-Fetal Tissue Preservation. *International Journal of Morphology*, 35(2).

Seibert, E. A., Lillywhite, H. B., & Wassersug, R. J. (1974). Cranial coossification in frogs: relationship to rate of evaporative water loss. *Physiological Zoology*, 47(4), 261-265.

Taylor, W. R., & Van Dyke, G. C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9: 107–109.

Trueb, L. (1970a). The generic status of *Hyla siemersi* Mertens. *Herpetologica*, 254-267.

Trueb, L. (1970b). Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with co-ossified skulls (Family Hylidae). Lawrence, *University of Kansas*.

Trueb, L. (1973). Bones, frogs, and evolution. *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems*, 65-132.

Trueb, L. (1977). Osteology and anuran systematics: intrapopulational variation in *Hyla lanciformis*. *Systematic Biology*, 26(2), 165-184.

Trueb, L., Púgener, L. A., & Maglia, A. M. (2000). Ontogeny of the bizarre: an osteological description of *Pipa pipa* (Anura: Pipidae), with an account of skeletal development in the species. *Journal of morphology*, 243(1), 75-104.

3.1 CAPÍTULO 1 – Osteologia completa de *Thoropa* aff. *lutzi* e sua posição filogenética dentro do gênero (Anura, Cycloramphidae).

Osteologia completa de *Thoropa* aff. *lutzi* e sua posição filogenética dentro do gênero e (Anura, Cycloramphidae).

SOFIA LUZ^{1*}, JHONNY J. M. GUEDES¹, CARLOS H. L. NUNES-DE-ALMEIDA², & RENATO N. FEIO³

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Museu de Zoologia João Moojen, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Vila Gianetti, nº 32, 36570-900 Viçosa, MG, Brasil.

²Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil.

³Museu de Zoologia João Moojen, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Vila Gianetti, nº 32, 36570-900 Viçosa, MG, Brasil

*Autor correspondente: sofia.luz.andrade@gmail.com.

Resumo: A osteologia completa de *Thoropa* aff. *lutzi* é aqui descrita baseada em espécimes diafanizados, assim como a sua inclusão na filogenia morfológica mais recente do gênero. Examinamos esqueletos de *Thoropa miliaris* e *Thoropa taophora* para fins comparativos. *Thoropa* aff. *lutzi* possui o crânio levemente mais largo que longo, frontoparietais separados medialmente por larga fontanela; ânulus timpânico de formato elíptico, com gap dorsal; nasais separados medialmente. Osteologicamente, *Thoropa* aff. *lutzi* se distingue de *T. miliaris* e *T. taophora* pelo processo cultriforme do parasenoide que não ultrapassa os neopalatinos, processo dentígeno do vômer proporcionalmente mais anterior; esfenetmoide sem pareamento evidente; neopalatinos com extremidade medial acuminada. O resultado da filogenia expõe que *Thoropa* é um gênero polifilético, com dois grupos distintos: um composto pelas espécies de pequeno porte, no qual *Thoropa* aff. *lutzi* está incluída, e outro com as espécies de médio a grande porte, no qual *Thoropa miliaris* faz parte.

Abstract: The adult osteology, cranium and postcranium of *Thoropa* aff. *lutzi* are here described based on cleared and stained specimens, and we add this species in the most recent morphological phylogeny of *Thoropa* genus. We also examined cleared and stained specimens of *T. miliaris* and *T. taophora* for comparative purposes. *Thoropa* aff. *lutzi* has a skull slightly wider than long, frontoparietals separated medially by wide fontanelle; tympanic annulus elliptic-shaped, not complete on the dorsal region; nasals separated medially. Osteologically, *Thoropa* aff. *lutzi* is distinguished from *T. miliaris* and *T. taophora* by the cultriform process of

parasphenoid that do not reach the neopalatine level; dentigerous process of vomer proportionally at a more anterior position; sphenetmoid without apparent pairing; neopalatine bone with the medial extremity acuminated. The result of phylogeny shows that *Thoropa* is a polyphyletic genus, with two distinctive group of species: one composed by the small-sized species, in which *Thoropa* aff. *lutzi* was included, and other with the large-sized ones.

Palavras-chave: Amphibia, elementos cranianos; osteologia, taxonomia, ossos, morfologia, filogenia.

INTRODUÇÃO

Thoropa Cope, 1865 (Cycloramphidae), um grupo de rãs de pequeno a médio porte com o ciclo de vida associado aos ambientes rochosos (Bokermann 1965; Grant et al. 2006). Atualmente, *Thoropa* é reconhecido por seis espécies (Frost 2019) divididas em dois subgrupos: as “grandes *Thoropa*”, composto por *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), *T. megatympanum* Caramaschi & Sazima, 1984, *T. saxatilis* Cocroft & Heyer, 1988 e *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) e as “pequenas *Thoropa*”, composto por *T. lutzi* Cochran, 1938 e *T. petropolitana* (Wandolleck, 1907).

Este gênero é endêmico do Leste do Brasil, ocorrendo desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Sabbag et al. 2018; Frost 2019). Possuem grande variação quanto a sua distribuição altitudinal, sendo conhecidos de regiões desde o nível do mar até cerca de 1.500m, e sempre ocupando afloramentos rochosos úmidos ao longo dos biomas da Mata Atlântica e Cerrado (sensu IBGE 2004) (Bokermann 1965; Cocroft & Heyer 1988; Feio et al. 2006; Nunes-de-Almeida et al. 2016; Haddad et al. 2013). *Thoropa* é caracterizado por seu comportamento reprodutivo: machos são extremamente territorialistas e exibem cuidado parental para com a desova (Giaretta and Facure 2004; Muralidhar et al. 2014; Consolmagno et al. 2016), que são depositadas em rochas úmidas. Além disso, os girinos são semi-terrestres e exotróficos, e após eclodirem se desenvolvem em lâminas d’água nos afloramentos rochosos (Bokermann 1965; Rocha et al. 2002; Sabbag et al. 2018).

Das espécies conhecidas, há a descrição osteológica publicada para *T. miliaris* e *T. petropolitana*, realizadas por Wandolleck em 1907, que caracterizou o crânio e pós-crânio, exibindo pranchas da falange terminal dos dedos, cintura escapular e parte da cintura pélvica. Lynch (1971) trouxe informações pontuais sobre a osteologia do gênero, naquela época

composto pelas espécies *T. lutzi*, *T. miliaris* e *T. petropolitana*, para o estudo da filogenia das espécies de Leptodactylidae. Feio (2002) em sua tese de doutorado realizou a descrição osteológica de cinco espécies do gênero, enquanto Nunes-de-Almeida (2015) em sua dissertação de mestrado utilizou-se de caracteres osteológicos para a reconstrução filogenética morfológica do gênero.

Thoropa tem sido alocada em diferentes famílias desde a sua descrição (ver Boulenger 1891; Miranda-Ribeiro 1926; Lutz 1954; Cochran 1955; Bokermann 1965; Lynch 1971; Frost et al. 2006; Grant et al. 2006), e mesmo no presente momento as suas relações filogenéticas ainda se mantêm incertas (Sabbag et al. 2018). Muito dessa incerteza é atribuído à raridade de algumas espécies, assim como a falta de tecidos de *T. lutzi* e *T. petropolitana*, que conseqüentemente nunca foram incluídas em análises moleculares (Frost et al. 2006; Grant et al. 2006; Sabbag et al. 2018). Isso dificulta a investigação de se há ou não congruência entre as análises morfológicas e moleculares quanto às relações evolutivas a nível específico e genérico desses táxons. Finalmente, a inclusão de caracteres novos e consistentes, tais como os dados osteológicos em uma filogenia morfológica, podem ajudar a estabilizar a posição filogenética do gênero e das espécies que ele contém.

No presente momento, uma nova espécie de “pequena *Thoropa*” previamente identificada como *Thoropa lutzi*, proveniente do município de Cataguases, região norte da Serra da Mantiqueira, bioma Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, está sendo descrita no Museu de Zoologia João Moojen. Para aumentar a informação acerca deste novo táxon, nós descrevemos sua osteologia completa e a osteologia de *Thoropa miliaris* para fins comparativos. Para elucidar o posicionamento filogenético desta espécie, nós a adicionamos na mais recente filogenia morfológica do gênero, utilizando como grupo externo o gênero *Hylodes* Fitzinger, 1826.

MATERIAIS E MÉTODOS

Osteologia

Para a descrição osteológica foram analisados uma fêmea, dois machos e um espécime não sexado de *Thoropa* aff. *lutzi* provenientes da localidade tipo. Para fins comparativos, foram analisados três espécimes de *Thoropa miliaris* e três espécimes de *T. taophora*, todos provenientes de diferentes localidades e não sexados (Apêndice I). O sexo, quando identificado, foi determinado através da examinação dos tratos sexuais primários (presença de testículos e

ovários). Todos os indivíduos estão depositados no Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os espécimes de *Thoropa* aff. *lutzi* foram diafanizados seguindo a metodologia modificada de Taylor & Van Dyke (1985), utilizando-se hidróxido de potássio em vez de tripsina, analisados sob microscópio estereoscópico Olympus SZ51, com câmera Canon EOS Rebel T6. As medidas lineares e angulações das estruturas foram feitas no programa ImageJ. As pranchas foram confeccionadas manualmente utilizando-se Mesa de Luz A4 Slim, posteriormente editadas no programa Adobe Photoshop com utilização de mesa digitalizadora One by Wacon.

A terminologia osteológica geral seguiu Trueb (1970, 1973) e Lynch (1971); osteologia tarsal, carpal e falangeal seguiu Fabrezzi (1992) e os termos “ossificação” e “mineralização” – a ossificação definida como a formação de osso endocondral e intramembranoso, enquanto que calcificação se refere como a deposição secundária de minerais em uma estrutura cartilaginosa – usada aqui segue o estudo de Trueb (1973).

Filogenia

No presente trabalho, utilizamos uma matriz previamente elaborada por Nunes-de-Almeida (2015) com 15 táxons e 86 caracteres (Anexo I), sendo estes 25 osteológicos, 40 de morfologia externa, sete ecológicos e bioacústicos, e 14 de morfologia larval.

Adicionamos a esta matriz quatro táxons, sendo um deles espécie *Thoropa* aff. *lutzi*. As demais adicionadas pertencem ao gênero *Cycloramphus*, cujos dados foram coletados em seus respectivos artigos de descrição e história natural (Heyer & Crombie 1979; Heyer 1983a, 1983b; Heyer et al. 1990; Lima et al. 2010; Maia-Carneiro et al. 2012).

As análises foram realizadas no programa TNT (Tree Analysis using New Technology), e devido ao número limitado de táxons terminais (n=15), realizamos uma busca por *implicit enumeration*. Portanto, nossas análises foram realizadas da seguinte forma: 1) definimos a memória para 10.000 árvores; 2) realizamos um *implicit enumeration*; e 3) colapsamos a árvore após a busca. Também fizemos um Traditional Search usando random seed = 0, réplicas = 100, árvores salvas por réplica = 100 e TBR (tree bisection reconnection) como algoritmo de troca.

Para analisar a confiança da árvore mais parcimoniosa (MPT), calculamos o suporte de ramos através dos métodos de Bootstrap (número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%) e Jackknife (probabilidade de remoção = 36; número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%), assim

como pelo índice de decaimento ou Suporte de Bremer (retendo árvores subótimas = 10). Por fim, calculamos os índices de consistência e retenção da árvore usando a função STATS.RUN.

RESULTADOS

Descrição osteológica de *Thoropa aff. lutzii*

Osteologia. A descrição osteológica que se segue foi feita a partir dos indivíduos MZUFV 18650.

Crânio. Crânio moderadamente ossificado (Fig. 1); levemente mais largo que longo (Largura do crânio/Comprimento do crânio = 1.089), com a largura da caixa craniana aumentando gradualmente na região posterior. A septomaxila dermal está presente, alocada dentro da capsula nasal. Esse osso pode ser visualizado na região lateral da capsula nasal e ventral à cartilagem alar. Dorsalmente, a septomaxila possui formato de “V”, e não alcança o osso nasal. Ventralmente, está alocada entre o processo alar do pré-maxilar e vômer, enquanto dorsalmente está localizada na mediana entre o processo alar e os nasais.

Caixa craniana. O esfenetmoide em vista dorsal está localizado entre os nasais e os frontoparietais e ventralmente se encontra entre o vômer e o processo cultriforme do parasfenoide. O esfenetmoide se estende anteriormente e faz contato com a extremidade medial posterior dos nasais, onde apresenta uma extensão cartilaginosa. Posteriormente, a extremidade lateral do esfenetmoide é sobreposta pelos frontoparietais. Ventralmente, o esfenetmoide faz contato com a extremidade posterior do vômer e com os neopalatinos.

Os proóticos e exocipitais são fundidos na região posterior da caixa craniana. O proótico possui formato triangular em vista dorsal, formando a cápsula ótica; medial e posteriormente, é sobreposto pelas extremidades posteriores dos frontoparietais. A crista ótica está presente e bem desenvolvida e lateralmente é visível a crista proótica, ossificada e com uma extensão globular que faz contato com o ânulus timpânico.

Os exocipitais estão localizados posteriormente a todos os outros ossos cranianos, e se articulam com a coluna vertebral através dos côndilos occipitais, uma estrutura pareada com formato de feijão que se localiza nas bordas inferiores e laterais do *foramen magnum*. A região articular dos côndilos occipitais é completamente ossificada, recoberta por uma fina camada de tecido cartilaginoso.

Dermatocranium. Os nasais são bem desenvolvidos, separados medialmente e com as extremidades mediais posteriores sobrepostas ao esfenetmoide. Lateralmente, os nasais são alongados e possuem extremidade afilada e que não alcançam o nível do osso maxilar. Os nasais

alcançam o nível dos neopalatinos e não fazem contato com o pré-maxilar, maxilar ou pterigoide.

Os frontoparietais são pareados, separados medialmente por uma fontanela larga, e não fazem contato ao longo da sua extensão. Anteriormente, os frontoparietais sobrepõem a extremidade laterodorsal do esfenoide, posteriormente sobrepõem o proótico e são mais largos na região medial e caudal, enquanto afilados na extremidade cranial.

O parasfenoide pode ser visualizado na vista ventral do crânio. Possui o formato de “T” invertido, o ramo anterior robusto, com uma constrição no processo cultriforme. Se estende anteriormente até a altura do forame orbital e não ultrapassa o espaço entre os neopalatinos. Os processos laterais – processos alares do parasfenoide – não possuem inclinação cranial ou caudal, e a projeção posterior se aproxima do espaço intercondilar.

Os neopalatinos são bem desenvolvidos, separados entre si medialmente e direcionados posteriormente. As extremidades laterais, que se articulam com os maxilares, são mais largas e se tornam mais afiladas nas extremidades mediais, que por sua vez se apoiam no esfenoide em aproximadamente $\frac{1}{4}$ da sua extensão.

Os vômeres, pareados, são separados entre si medialmente e possuem processo dentígeno bem desenvolvido. O processo dentígeno se encontra na região medial entre o processo anterior, lateral e posterior. Este último processo é longo, e se estende posteriormente até fazer contato com o esfenoide.

Mandíbula superior. Premaxilares bem desenvolvidos, dentados, 1.5 mais altos que longos, com o processo alar proeminente e orientado dorsal e levemente anteriormente. O processo alar possui dois processos espinhais em sua extremidade superior. A base dos pré-maxilares possui dois processos localizados na região medial, apontando na direção caudal.

Maxilares longos, dentados na sua metade anterior. Essa estrutura pareada, junto com os pré-maxilares e quadratojugais, formam um arco maxilar completo. O maxilar possui uma *pars fascialis* bem desenvolvida, localizada em seu terço anterior, mesma região de ocorrência dos dentes. À medida que se caminha para a extremidade posterior, os maxilares se tornam mais constrictos. A *pars palatina*, visível na vista ventral do arco maxilar, também é bem desenvolvida. Posteriormente, os maxilares se articulam com os quadratojugais.

O quadratojugal é fino anteriormente e vai aumentando em espessura gradativamente no sentido cranial-caudal até a extremidade posterior, que se articula com os ossos esquamosal e pterigoide.

Aparato suspensório. O sistema suspensório é composto pelos ossos pterigoide e esquamosal. O pterigoide possui três ramos bem desenvolvidos. O ramo anterior é longo, e se estende anteriormente até quase alcançar o neopalatino, onde se articula à cartilagem associada à pars palatina dos maxilares. O ramo medial é fino, curto e não se articula com os proóticos, ao passo que o ramo lateral se articula com o quadratojugal e o esquamosal.

O esquamosal é bem desenvolvido e, assim como o pterigoide, este osso possui três ramos. O ramo zigomático (anterior), é levemente elevado dorsalmente, com um alongamento ósseo fino em sua extremidade, não se articula ao maxilar; o ramo ótico (posterior) é mais curto que o zigomático e constricto na extremidade posterior. O ramo ventral, por sua vez, é longo e fino, dilatado na extremidade inferior, no qual se articula com o quadratojugal e pterigoide.

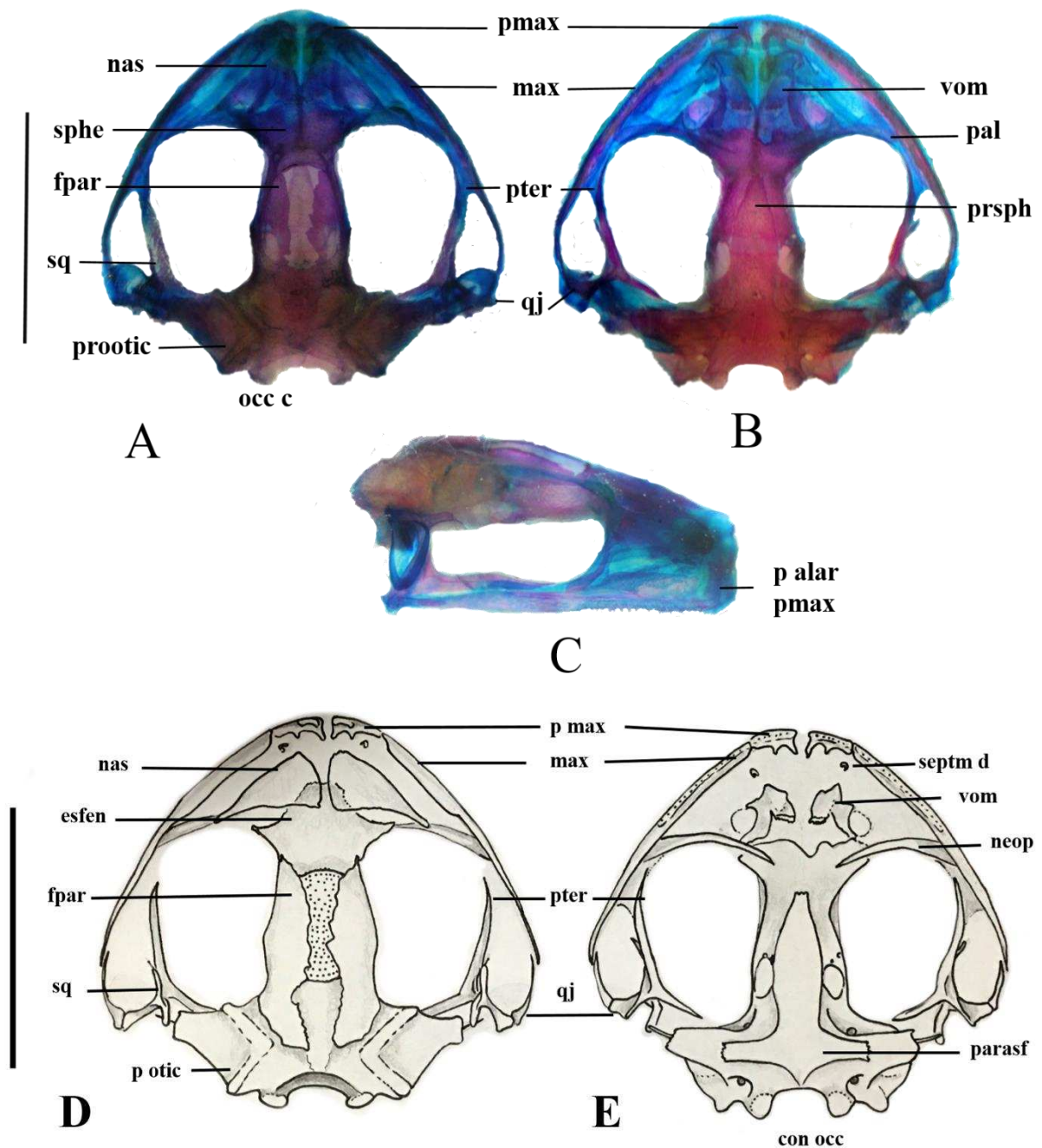


Figura 1. A, B e C, vistas dorsal, ventral e lateral, respectivamente, do crânio diafanizado de *Thoropa* aff. *lutzi*. Para melhor visualização e entendimento, D e E representam o desenho esquemático das estruturas ósseas do crânio deste mesmo indivíduo (MZUFV 18650). Abreviaturas: Esfen, esfenetmoide; Fpar, frontoparietal; max, maxilar; nas, nasal; occ c, côndilo occipital; neop, neopalatino; p max, pré-maxilar; p otic, prootic; parasf, parasenoide; pter, pterigoide; qj, quadratojugal; septm d, septomaxilar dermal; sq, esquamosal; vom, vômer. Escala: 5mm.

Aparato auditório. O aparato auditório é composto pelo tímpano, ânulus timpânico e columella. O ânulus timpânico, cuja funcionalidade é dar suporte ao tímpano externo, é

incompleto dorsalmente, com a abertura no level do braço posterior do squamosal, tendo o formato de uma elipse incompleta no dorso. O ânulus se apoia no ramo ventral do squamosal e se expande até o ramo posterior deste mesmo osso. O ânulus posteriormente também faz contato com o proótico. A *pars externa plectri* se posiciona no centro do ânulus timpânico, e se estende anteriormente até se encontrar com a columella. Esta é ossificada e faz contato com a fenestra ovalis, que por sua vez faz contato com o opérculo anterodorsalmente. O opérculo é uma estrutura oval, cartilaginosa, que cobre quase completamente a janela oval.

Esqueleto axial

A coluna vertebral é composta de 8 (oito) vértebras pré-sacrais, sacro e uróstilo. O atlas não é fundido à vértebra adjacente. Os cótilos cervicais são ovais e oblíquos, tais como os arranjos cotilares descritos por Lynch (1971). As superfícies das terminações articulares dos centros vertebrais são côncavos anteriormente e convexo posteriormente (procélicas).

As maiores vértebras, em ordem decrescente de tamanho – tamanho relativo medido pelo eixo dos processos transversos – são: (*sacro* > III > IV > V = VI = VII = VIII > II > *atlas*). Sobre o direcionamento dos processos transversos, o atlas não apresenta processo transversos; são orientados anterolateralmente em II, VII & VIII e perpendicular ao eixo central em III, V & VI.

A diapófise sacral tem aproximadamente o mesmo tamanho que a vértebra pré-sacral III, porém voltada posterolateralmente, sendo que a sua largura aumenta à medida que se afasta para a extremidade lateral, onde se articula com sesamoide e ílio, estruturas da cintura pélvica.

O uróstilo é longo, fino e com o comprimento um pouco menor que o de todas as pré-sacrais somadas. É completamente ossificado, apenas com a extremidade posterior que se mantém cartilaginosa. O uróstilo apresenta uma crista dorsal e longitudinal que se estende na maior parte da sua extensão, sendo mais alta anteriormente e diminui no sentido caudal. A articulação com o sacro se configura como bicondilar.

Esqueleto apendicular

Cintura escapular. A cintura escapular é composta pelo episterno, procoracoide, epicoracoide, coracoide, clavículas, mesosterno, escápula e cleitrum.

O episterno é em sua maioria ossificado, porém com a porção anterior cartilaginosa. Posteriormente, na ligação com o epicoracoide, o episterno diminui de largura gradativamente

na direção da extremidade anterior, marcada por um disco cartilaginoso, o omosterno, de formato discoide.

O procoracóide é pareado, e em sua região medial é totalmente ossificado, porém, à medida que se desloca para as laterais, há uma crescente desmineralização, com o tecido cartilaginoso dominante. Os procoracóides são adjacentes às clavículas, e formam a borda anterior da fenestra peitoral. Medialmente, o procoracóide é bem mineralizado e se funde com o epicoracóide, tendo como comprimento aproximadamente 2/3 da clavícula.

O epicoracóide é uma cartilagem pareada que tem formato de “C”, um sobreposto ao outro, que tem como localização a região central e ventral da cintura peitoral, conectando os coracóides às clavículas. Neste exemplar, o epicoracóide da esquerda se sobrepõe ao da direita, sendo também as regiões laterais levemente mineralizadas.

O mesosterno é quase completamente cartilaginoso, com alguns pontos de mineralização. O mesosterno se alonga posteriormente e, nessa extremidade, possui uma constrição antes de onde se encontra uma bifurcação. Não há presença de xifisterno.

As clavículas são ossos pareados cujo formato, na região medial, é reto, ao passo que, ao caminhar para as porções laterais, a clavícula é arqueada (Fig. 2). As extremidades medias das clavículas são separadas entre si, e se configuram como a região mais fina em vista ventral. A extremidade glenoidal da clavícula é longa e projetada anteriormente, onde faz contato com a *pars acromialis* da escápula, onde não é possível estabelecer uma separação entre um osso e outro, configurando assim uma fusão.

O coracóide é um osso pareado e com o tamanho aproximado da clavícula, sendo que as duas extremidades são dilatadas: medialmente onde se articula com o epicoracóide e lateralmente com a clavícula, onde também delimita medialmente a fossa glenoidal. A extensão anterior do coracóide delimita a fenestra peitoral. A fossa glenoide é delimitada pelos ossos coracóide posteromedialmente, clavícula anteriormente e escápula lateralmente.

A escápula possui um processo anterior na altura onde se encontra com a clavícula. Nesta espécie esses dois ossos são fundidos, pois não há nenhuma articulação visível entre eles. A escápula é um osso curto, aproximadamente metade do comprimento do coracóide, tem formato que lembra um retângulo com uma pequena constrição no meio, e volta a se expandir na extremidade lateral onde se articula à supraescápula. É completamente ossificado, possuindo uma fina camada de tecido cartilaginoso na face articular glenoidal, onde a escápula assume um formato côncavo, também chamado de *pars glenoidalis*, que forma a fossa glenoide.

O cleitrum é um osso pareado que faz contato com a escápula. É ossificado em sua maioria e é contíguo à supraescápula, que é quase que inteiramente cartilaginosa, apenas mineralizada em alguns pontos. O cleithrum é totalmente ossificado e bifurcado lateralmente, sendo o ramo anterior do mesmo tamanho e 1.5x mais largo que o posterior, que possui também um processo longitudinal.

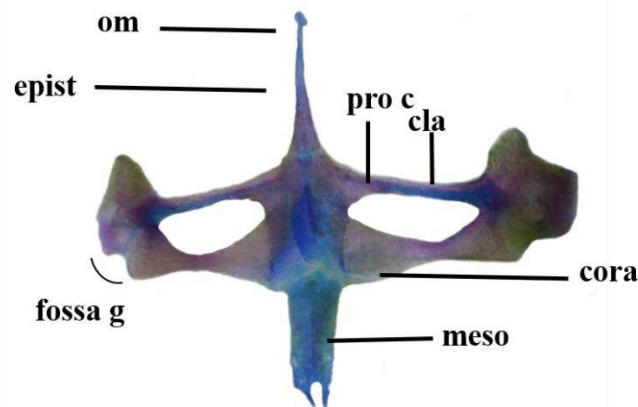


Figura 2. Cintura escapular de *Thoropa* aff. *lutzi*. Abreviatura: Om, omosterno; epis, episterno; fossa g, fossa glenoidal; meso, mesosterno; cora, coracoide; pro c, procoracoide; cla clavícula. Escala: 5mm.

Cintura pélvica. A cintura pélvica é composta pelos ossos pareados ílio e ísquio, além do púbis, completamente ossificados. Nesta espécie se fez presente um sesamoide sacral de formato elíptico irregular, localizado nas margens laterais posteriores da diapófise sacral. As margens internas dos ílios pareados e unidos entre si pelas articulações com os ísquios e pubis apresentam um formato de “V”.

Cada ílio possui uma crista dorsal que ocupa $\frac{3}{4}$ do seu comprimento posterior. Esta crista tem altura uniforme ao longo do seu comprimento, e se expande lateralmente formando uma proeminência dorsal acima da região anterior do acetábulo. Ventralmente, o ílio não possui expansões preacetabulares. Os ílios se fundem um ao outro medialmente e, junto com os ísquios e púbis, formam uma estrutura elíptica na vista lateral. O acetábulo, encaixe para a cabeça do fêmur, em sua região posterodorsal é formado pelo ísquio, que possui um cume dorsal. O púbis é ossificado e forma a porção ventral posterior do acetábulo, entre o ílio e ísquio.

Esqueleto apendicular

Membros anteriores. O úmero possui uma crista anterior, *crista ventralis*, bem desenvolvida, que se estende desde a cabeça glenóide até aproximadamente a metade do comprimento do

osso. A crista lateral do úmero é pouco desenvolvida, porém presente, partindo da cabeça distal. Ambas as cabeças são ossificadas.

A radio-ulna é completamente ossificada, achatada dorso ventralmente e o *sulcus intermedius*, sulco longitudinal, é bem marcado onde ocorre a fusão desses ossos, na região medial, e se estende da região anterior, mais profundo, até aproximadamente $\frac{2}{3}$ do comprimento. A radio-ulna tem aproximadamente $\frac{3}{4}$ do tamanho do úmero. Possui também um ólecrano ulnar bem desenvolvido, que se articula com a cabeça do úmero.

Manus. As mãos possuem sete elementos carpais ossificados: radial, ulnar, central, carpal I, carpal II - IV (fundidos), prepollex e elemento Y. O tamanho relativo dos elementos carpais são: carpais II - IV > central > radial > ulnar > prepollex > elemento Y > carpal I. A fórmula falangeal é 2 - 2 - 3 - 3, e o tamanho relativo dos dedos é IV > V > III > II. Na vista ventral das mãos, nesta espécie, existe um sesamoide palmar. As terminações das falanges são simples e de formato de martelo. O prepollex é bem desenvolvido, totalmente ossificado e composto por três segmentos, sendo o elemento proximal mais espesso e retangular, com a região distal mais fina, o segmento medial é ossificado, de formato irregular e, por fim, o segmento final é cartilaginoso e com formato de cone, porém com a ponta arredondada.

Membros posteriores. O fêmur é bem ossificado. Apresenta uma crista femoral pouco desenvolvida no centro do osso, que parte da região proximal e que tem aproximadamente $\frac{1}{5}$ da extensão do osso. Proximalmente, o fêmur é um pouco curvo. Se faz presente um sesamoide pouco desenvolvido na região ventral da articulação entre o fêmur e a tíbia-fíbula.

A tíbia-fíbula possui aproximadamente o mesmo comprimento do fêmur, porém um pouco mais estreita na região mediana, sendo que as cabeças proximais e distais possuem aproximadamente o mesmo tamanho.

O tibial-fibular apresenta aproximadamente $\frac{1}{2}$ do comprimento do fêmur e tíbia-fíbula. Esses ossos são fundidos nas extremidades proximais e distais pela região medial e separados entre si em seu comprimento.

Estão presentes três elementos tarsais: elemento Y, tarsal 1 e tarsal 2 - 3. O elemento Y é responsável por conectar o elemento proximal do prehallux. O prehallux possui dois segmentos, sendo o proximal completamente ossificado e o distal um cilindro cartilaginoso associado a uma cartilagem perpendicular a si de formato irregular. O metatarsal 1 se articula com o elemento Y, o tarsal 1 se articula com o metatarsal 1 e 2, enquanto os tarsais 2 - 3 se articulam com os metatarsais 2 e 3. Os metatarsais 4 e 5 se articulam diretamente com o fibular. Se fazem presentes dois sesamoides palmares, associados à região fibular da planta do pé. Não

foi observado nenhum sesamoide nos metatarsais. O tamanho relativo dos metatarsos, do maior para o menor é: IV > III > V > II > I, sendo a fórmula falangeal 2 - 2 - 3 - 4 - 3. As falanges terminais possuem ponta em formato de T.

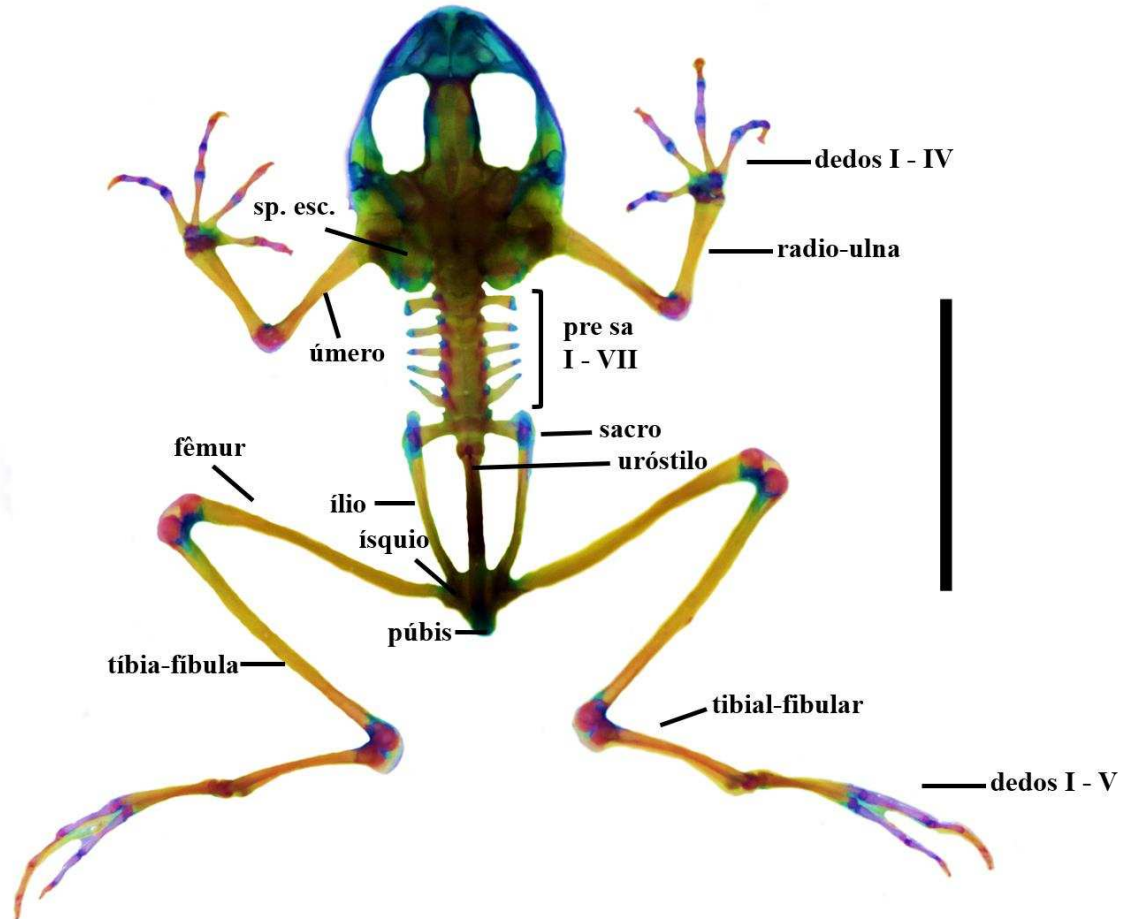


Figura 3. Esqueleto completo de *Thoropa* aff. *lutzi* diafanizado. Dedos posteriores sobrepostos, desta forma impedindo a visualização individual de cada um. Abreviaturas: pre sa, vértebra pré-sacral; sp. esc. supra escápula. Escala: 1 cm.

Breve comparação entre *Thoropa* aff. *lutzi*, *T. miliaris* e *T. taophora*.

As breves comparações entre as espécies (Tabela 1) se realizaram a partir da pontuação de diferenças das estruturas cranianas, resultado da análise dos crânios em lupa e figuras (Figuras 4 e 5).

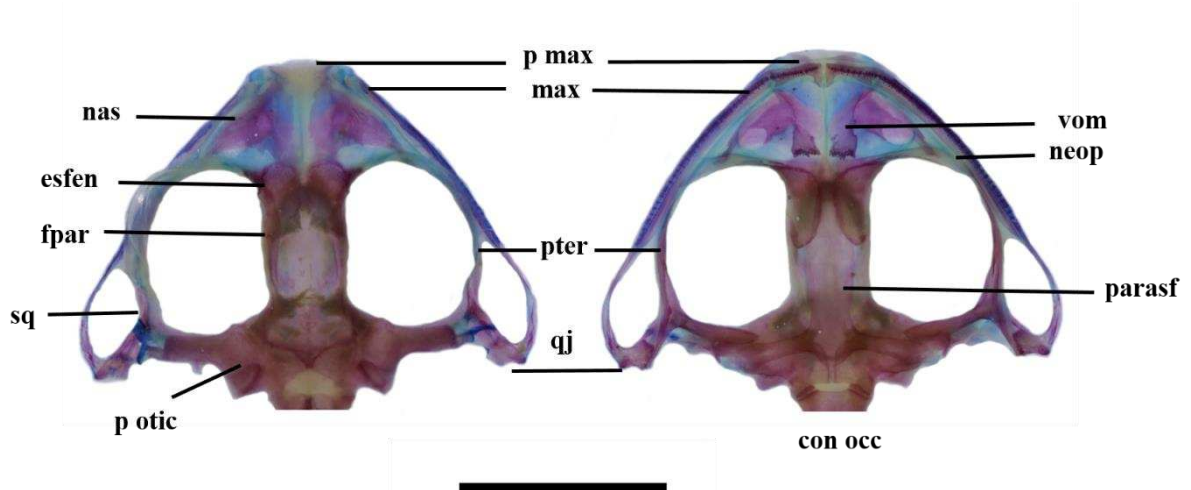


Figura 4. Prancha de diafanização do crânio de *Thoropa miliaris* (MZUFV 4148). Abreviaturas: Esfen, esfenetmoide; Fpar, frontoparietal; max, maxilar; nas, nasal; occ c, côndilo occipital; neop, neopalatino; p amax, pré-maxilar; p otic, prootic; parasf, parasfenoide; pter, pterigoide; qj, quadratojugal; septm d, septomaxilar dermal; sq, esquamosal; vom, vômer. Escala: 1cm.

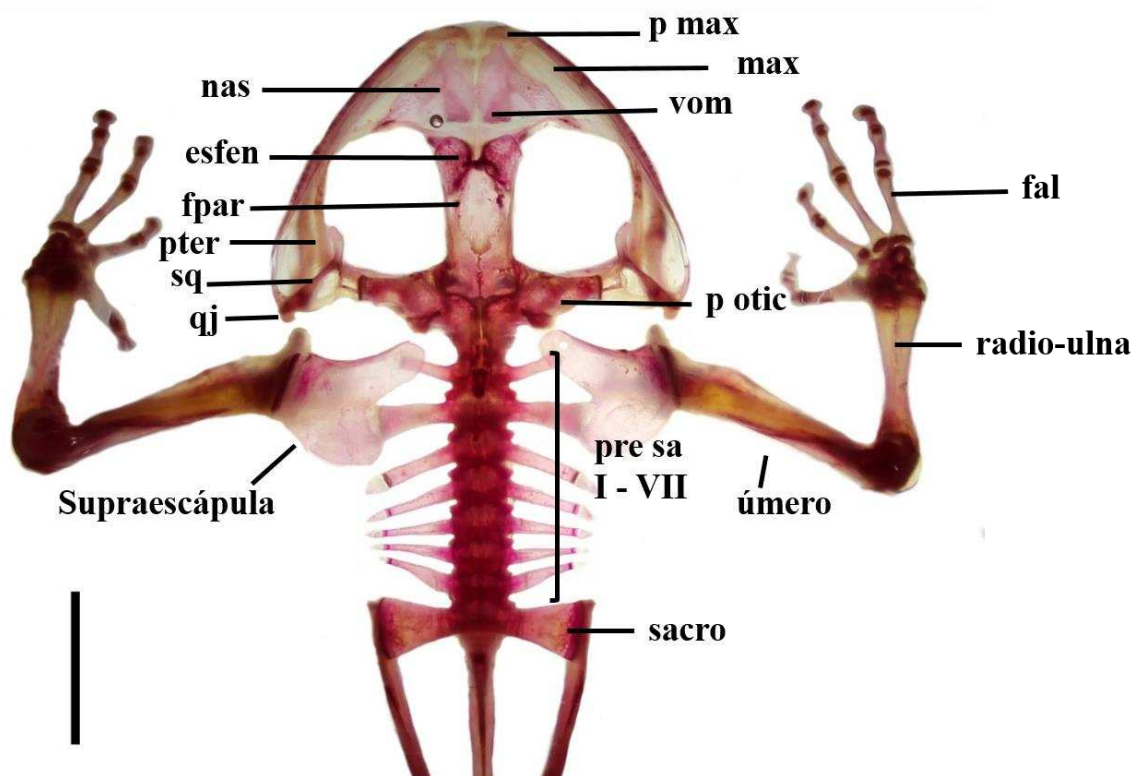


Figura 5. Vista dorsal do crânio, membros anteriores e esqueleto axial do espécime ZUEC 17335 *Thoropa taophora*. Abreviaturas: Esfen, esfenetmoide; Fpar, frontoparietal; max, maxilar; nas, nasal; occ c, côndilo occipital; neop, neopalatino; p amax, pré-maxilar; p otic, prootic; pre sa, pré-sacral; pter, pterigoide; qj, quadratojugal; septm d, septomaxilar dermal; sq, esquamosal; vom, vômer. Diafanização evidenciando tecidos mineralizados. Escala: 1cm.

Tabela 1. Comparação de características osteológicas de *Thoropa aff. lutzi*, *Thoropa miliaris* e *Thoropa taophora*.

| Característica | <i>Thoropa aff. lutzi</i> | <i>Thoropa miliaris</i> | <i>Thoropa taophora</i> |
|---|---|---|---|
| Proporção entre o comprimento e largura do crânio | Mais largo que longo | Mais largo que longo | Mais largo que longo |
| Contato entre a borda posterior dos nasais e esfenetmoide | Parte do nasal anexada ao esfenetmoide posteromedialmente | Parte do nasal anexada ao esfenetmoide posteromedialmente | Não faz contato com o esfenetmoide |
| Fontanela frontoparietal | Exposta | Exposta | Exposta |
| Neopalatinos | Possui porções cartilaginosas, não totalmente calcificado, constricto nas extremidades mediais. | Completamente ossificados, extremidades mediais largas. | Completamente ossificados, extremidades mediais largas. |
| Dentes Maxilares | Presentes (1/2 da extensão do maxilar) | Presentes (2/3 da extensão do maxilar) | Presentes (2/3 da extensão do maxilar) |
| Processo dentígeno do vômer | Presente, dentado e anterior à coana | Presente, dentado e posterior à coana | Presente, dentado, ornamentado e posterior à coana |
| Processo posterior do vômer | Posterior ao processo dentígeno do vômer | Anterior ao processo dentígeno do vômer | Anterior ao processo dentígeno do vômer |
| Processo cultriforme do parasfenoide | Não alcança os neopalatinos | Ultrapassa o level dos neopalatinos anteriormente | Ultrapassa o level dos neopalatinos anteriormente |
| Sutura medial do exoccipital | Pouco desenvolvida | Bem desenvolvida | Bem desenvolvida |
| Esfenetmoide | Presente, não ornamentado e pareamento não evidente | Presente, ornamentado dorsalmente e não fundido medialmente | Presente, ornamentado dorsalmente e não fundido medialmente |
| Quadratojugal | Simples | Bifurcado | Bifurcado |
| Posição da articulação entre a mandíbula e crânio | Anterior ao nível do processo alar do pré-maxilar do parasfenoide | Posterior ao nível do processo alar do parasfenoide | Posterior ao nível do processo alar do parasfenoide |
| Ângulo entre o ramo ventral do esquamosal e maxilar | 61° | 47° | * |

*Não foi possível realizar a medição do ângulo entre o ramo ventral do esquamosal e maxilar no espécime.

Filogenia

A matriz de Nunes-de-Almeida (2015) atualizada consistiu de 15 táxons terminais e 86 caracteres.

A partir do método *implicit enumeration* foi encontrada uma única árvore mais parcimoniosa com 215 passos. (Fig. 6A). O suporte dos ramos para a topologia encontrada é apresentado com os valores de Bootstrap e Jackknife, assim como o suporte de Bremer (SB) (Fig. 6B–D). Os índices de consistência e retenção foram 0.530 e 0.633, respectivamente.

Observamos uma dicotomia formando dois grandes clados: um contendo as “*Thoropa* grandes” (aqui chamado de clado A) e outro com as espécies das “*Thoropa* pequenas”, *Cycloramphus* e *Zachaenus* (clado B). Neste segundo clado, as “*Thoropa* pequenas” se agrupam como grupo irmão de *Cycloramphus* spp. + *Zachaenus parvulus* (Fig. 7), o que indica que o gênero *Thoropa* forma um agrupamento polifilético. Além disso, o clado A apresentou maior suporte de Bremer do que o clado B (4 vs. 1; Fig. 6B). No entanto, observamos que o suporte para o subgrupo formado pelas espécies de *Cycloramphus* + *Zachaenus parvulus* (SB=3; Fig. 6B) foi maior que do clado B.

No que diz respeito às relações filogenéticas do clado A, observamos uma divisão entre *Thoropa megatympanum* dos demais táxons, e *T. saxatilis* como linhagem irmã de *T. miliaris* + *T. taophora* (Fig. 7). Já o clado B é formado por duas subdivisões, sendo elas: *Thoropa* aff. *lutzi* como grupo irmão de *T. lutzi* + *T. petropolitana* (clado B1); *Zachaenus parvulus* como grupo irmão de *Cycloramphus eleutherodactylus* (clado B2); e por fim, no clado B3, temos uma divisão entre *C. izecksohni* dos demais táxons, e *C. rhyakonastes* como grupo irmão de *C. lutzorum* + *C. boraceiensis* (Fig. 7).

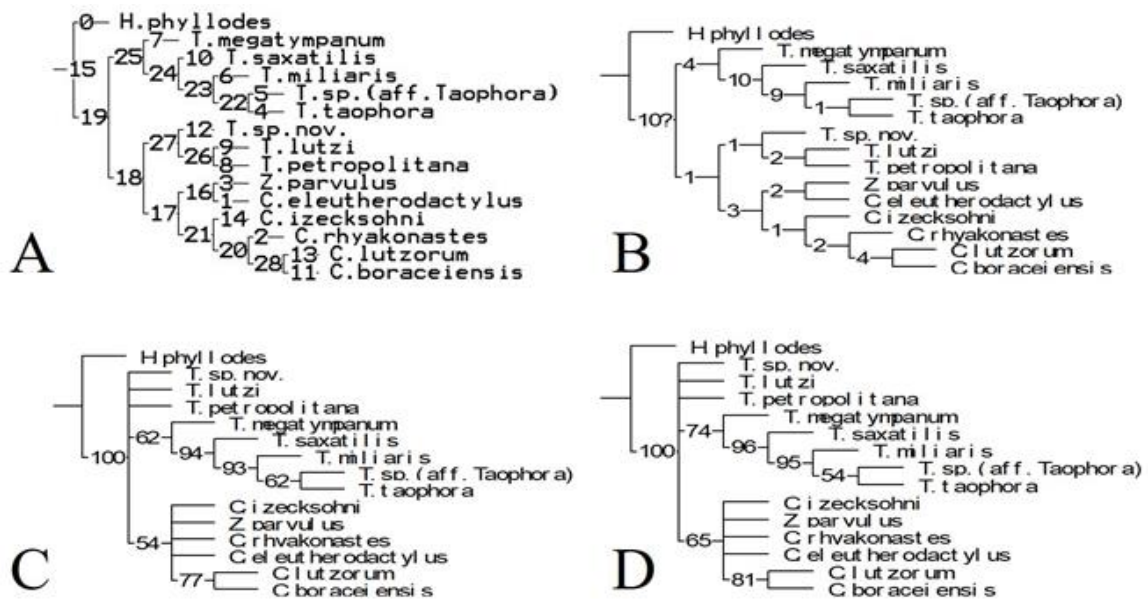


Figura 6. (A) Árvore mais parcimoniosa encontrada pelo método *implicit enumeration*, nós marcados por numeração; (B) suporte de Bremer; (C) *Bootstrap (standard)*; número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%; (D) *Jackknife* (probabilidade de remoção = 36; número de réplicas = 10.000; cutoff = 50%).

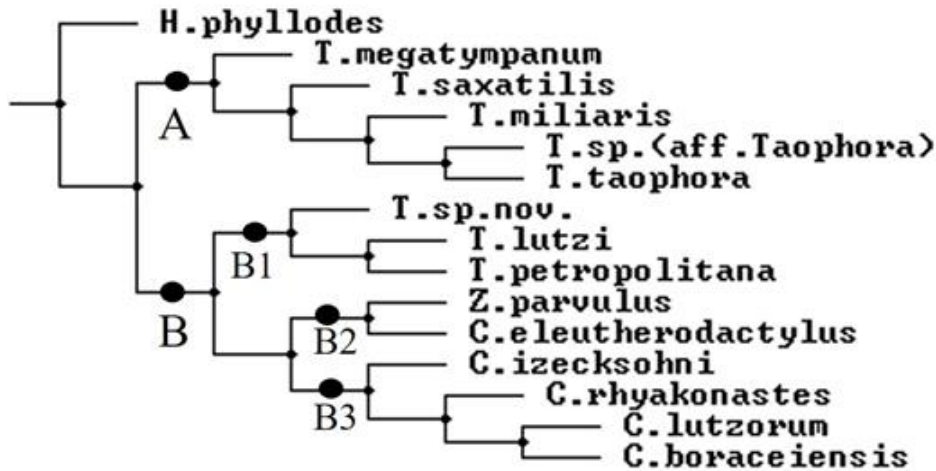


Figura 7. Clados encontrados a partir da árvore mais parcimoniosa. A = *Thoropa* “grandes”; B = *Thoropa* “pequenas” + *Cycloramphus* spp. + *Zachaenus parvulus*; B1 = *Thoropa* pequenas; B2 = *Zachaenus parvulus* + *C. eleutherodactylus* e B3 = *Cycloramphus* spp.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A espécie em descrição, *Thoropa* aff. *lutzi* pode ser caracterizada osteologicamente pelos nasais que sobrepõem extremidade anteromedial do esfenetmoide; esfenetmoide sem pareamento evidente; pré-maxilar com dois processos espinhosos; neopalatinos com extremidades mediais constrictas, processo cultriforme do parasfenoide localizados posteriormente aos neopalatinos e o processo dentígeno do vômer anterior à coana. Esse conjunto de características, principalmente os neopalatinos com as extremidades constrictas e o comprimento do parasfenoide e o processo dentígeno do vômer anterior à coana são diferenças mais conspícuas que podem ser observadas no crânio para diferenciar as “pequenas” das “grandes” *Thoropa*. Lynch (1971) traz a ilustração do crânio de *T. lutzi* revelando essas três características expressivamente diferentes nas espécies de grande porte.

Nas três espécies analisadas – *Thoropa* aff. *lutzi*, *T. miliaris* e *T. taophora* – o processo alar do pré-maxilar é direcionado anterodorsalmente. A inclinação deste processo, que pode ser direcionado anterodorsalmente, dorsalmente e posterodorsalmente, está aparentemente correlacionado com o hábito de escavação: quanto mais posterior a inclinação do processo alar do pré-maxilar, maiores as chances de a espécie ser fossorial ou passar parte da vida enterrada (Lynch 1971). Neste caso, estão de acordo com as observações realizadas em campo (Assis, C.L. comunicação pessoal), onde a inclinação anterodorsal e o crânio não fortificado indicam uma baixa probabilidade dessas espécies serem fossoriais.

Segundo Feio (2002), o grupo das pequenas *Thoropa* apresentam, no crânio, os nasais amplamente afastados entre si, sem contato medial; cêndilos occipitais amplamente separados, extremidade caudal do frontoparietal também amplamente separados; palatinos que fazem pouco contato com o esfenetmoide (menos que $\frac{1}{4}$ da sua extensão), processo cultriforme do parasfenoide que não ultrapassa o esfenetmoide. No pós-crânio das *Thoropa* pequenas, Feio (2002) aponta as apófises laterais da vértebra III um pouco mais longas que as vértebras II; a diapófise sacral pouco alargada nas extremidades laterais. Os dados obtidos através da caracterização osteológica de *T. aff. lutzi* corroboram estes mencionados acima, tanto no crânio quanto no pós-crânio.

Feio (2002) ainda discute que as análises osteológicas não propuseram diagnoses ou diferenças expressivas entre as espécies do gênero. Porém, a partir da observação de determinadas características, tais como a posição dos dentes vomerianos, o formato e comprimento dos neopalatinos e o comprimento do processo cultriforme do parasfenoide segregam as *Thoropa* “pequenas” das “grandes”.

Nesse contexto, os dados providos pela análise filogenética confirmam os de observação osteológica, em que há uma separação evidente das “*Thoropa* grandes” (clado monofilético A), corroborando com outros estudos já realizados (ex.: Fitzpatrick et al. 2009; Nunes-de-Almeida 2015; Sabbag et al. 2018). No entanto, o posicionamento filogenético das “*Thoropa* pequenas” levanta dúvidas sobre o monofileticismo do gênero, uma vez que as espécies menores se posicionaram mais proximamente às espécies de *Cycloramphus* e *Zachaenus* (Fig. 6A). Esse possível parafiletismo também foi observado por Nunes-de-Almeida (2015), que sugeriu, em sua dissertação, a elaboração de novo gênero ao grupo das “*Thoropa* pequenas”, englobando assim as espécies *T. lutzi* e *T. petropolitana*, porém o ato nomenclatural não foi realizado. Os gêneros *Cycloramphus* e *Zachaenus*, por sua vez, apresentam também uma inconsistência: *Zachaenus parvulus* em todas as análises cai no agrupamento de *Cycloramphus*, o que indica que possa fazer parte dele.

Uma das principais diferenças entre os grupos das *Thoropa* “pequenas” e “grandes” é a notável discrepância de tamanho entre elas – máximo comprimento rostro-cloacal de 22 vs. 78 mm, respectivamente (Feio 2002, Nunes-de-Almeida 2015). No entanto, também existem diferenças entre elas em relação a caracteres osteológicos, comportamentais e de morfologia externa de girinos. O crânio das *Thoropa* “grandes” reflete o tamanho corporal, e conseqüentemente apresenta maior comprimento e largura absoluta, bem como outros valores absolutos (ex: largura do frontoparietal, distância entre narinas, largura das pálpebras, diâmetro

do olho). No entanto, no que tange as proporções, as *Thoropa* “pequenas”, assim como as espécies do gênero *Cycloramphus*, apresentam o crânio proporcionalmente mais largo em relação ao seu comprimento e do corpo, pelo comportamento de se agregarem em pequenos grupos, além da configuração do espiráculo larval em posição sinistra.

Por conta da atual raridade de algumas espécies do gênero *Thoropa*, a obtenção de tecidos para análises citogenéticas e moleculares se torna mais difícil. Por conta disso, estudos de caracterização morfológica, tais como osteologia, miologia, além do estudo de outros conjuntos de órgãos, se mostram essenciais para a realização de análises filogenéticas que buscam desvendar as relações evolutivas deste grupo.

Agradecimentos. Nós gostaríamos de agradecer aos curadores da Coleção de Herpetologia da ZUEC pela disponibilidade em receber a nossa visita, assim como à Willi Henning Society por disponibilizar gratuitamente o software TNT, que possibilitou a realização deste trabalho. SL é apoiada pela bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CLA, RNF e CHLNda são apoiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por fornecer licença que possibilitou a feitura deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bokermann, W.C.A. (1965) Notas sobre as Espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37 (3/4): 525–537.
- Boulenger, G.A. (1891) Notes on American batrachians. *Annals and Magazine of Natural History*, 6 (8): 453–457. <http://dx.doi.org/10.1080/00222939109459222>
- Cochran, D.M. (1955) Frogs of Southeastern Brazil. *Bulletin of the United States National Museum*, 201, 1–423. <http://dx.doi.org/10.5479/si.03629236.206.1>
- Cocroft, R.B. & Heyer, W.R. (1988) Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia, Leptodactylidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101 (1): 209–220.
- Consolmagno, R.C.; Requena, G.S.; Machado, G. & Brasileiro, C.A. (2016) Costs and benefits of temporary egg desertion in a rocky shore frog with male-only care. *Behavioral ecology and sociobiology*, 70(5):785-795.
- Fabrezi, M. (1992) El carpo de los anuros. *Alytes*, 10, 1–29.

- Feio, R.N. (2002) Revisão taxonômica do gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Tese.
- Feio, R.N.; Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (2006) Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, 64 (1): 41–60.
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. & Wheller, W.C. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370. <http://dx.doi.org/10.5531/sd.sp.13>
- Frost, D.R. (2019) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Giaretta, A.A. & Facure, K.G. (2004) Reproductive ecology and behavior of *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae, Telmatobiinae). *Biota Neotropica*, 4(2): 1-9.
- Goloboff, P. & Catalano, S. (2016) TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. Cladistics DOI 10.1111/cla.12160
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299, 1–262. <http://dx.doi.org/10.5531/sd.sp.14>
- Haddad C.F.B.; Toledo L.F.; Prado C.P.A.; Loebmann D.; Gasparini J.L. & Sazima I. (2013) Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology. 1st ed. São Paulo: Anolisbooks.
- Heyer, W.R. & Crombie, R.I. (1979) Natural History Notes on *Craspedoglossa stenjnegeri* and *Thoropa petropolitana* (Amphibia: Salientia, Leptodactylidae). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 69 (1): 1979.
- Heyer, W.R. (1983a) Notes on the frog genus *Cycloramphus* (Amphibia: Leptodactylidae), with descriptions of two new species. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 96 (3): 548-559.
- Heyer, W.R. (1983b) Variation and systematics of the frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Arquivos de Zoologia Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 30 (4): 235-339.
- Heyer, W.R.; Rand, A.S.; Cruz, C.A.G.; Peixoto, O.L. & Nelson, C.E. (1990) Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia, Arquivos de Zoologia Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 31 (4): 231-410.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2004). Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em <https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>
- Lima, A.M.X.; Garey, M.V.; Noletto, R. & Verdade, V.K. (2010) Natural History of the Lutz's Frog *Cycloramphus lutzorum* Heyer, 1983 (Anura: Cycloramphidae) in the Brazilian

- Atlantic Forest: Description of the Advertisement Call, Tadpole, and Karyotype. *Journal of Herpetology*, 44: (3), 360-371.
- Lutz, B. (1954) Anfíbios anuros do Distrito Federal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 52 (1), 155–197. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761954000100009>
- Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs. *Univ. Kansas Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.* 53: 1-238.
- Maddison, W.P. and D.R. Maddison. (2018) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51. Disponível em <<http://www.mesquiteproject.org>>
- Maia-Carneiro, T.; Dorigo, T.A.; Almeida-Gomes, M.; Sluys, M.V. & Rocha, C.F.D. (2012) Feeding habits, microhabitat use, and daily activity of *Cycloramphus brasiliensis* (Anura: Cycloramphidae) from the Atlantic Rainforest, Brazil. *Zoologia*, 29 (3): 277-279.
- Miranda-Ribeiro, A. (1926) Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 27, 1–227.
- Muralidhar, P.; De Sá, F.P.; Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2014) Kin-bias, breeding site selection and female fitness in a cannibalistic Neotropical frog. *Mol. Ecol.* 23, 453–463.
- Nunes-de-Almeida, C. H. L. (2015) Phylogenetic reconstruction based on internal and external morphology of the genus *Thoropa* Cope, 1865 (Anura, Cycloramphidae). Tese.
- Nunes-de-Almeida, C.H.; Assis, C.L.; Feio, R.N. & Toledo, L.F. (2016) Redescription of the Advertisement Call of Five Species of *Thoropa* (Anura, Cycloramphidae), Including Recordings of Rare and Endangered Species. *PloS one*, 11(9).
- Rebouças, R.; da Silva, H.R.; Sanuy, D. (2018) Froghood: Postmetamorphic development of the rock river frog *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) (Anura, Cycloramphidae). *Acta Zoologica*, 99(2): 151-157.
- Rocha, C.F.D.; Van Sluys, M.; Bergallo, H.G.; Alves, M.A.S. (2002) Microhabitat use and orientation to water flow direction by tadpoles of the leptodactylid frog *Thoropa miliaris* in southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*, 36: 98–100.
- Sabbag, A.F.; Lyra, M.L.; Zamudio, K.R.; Haddad, C.F.B.; Feio, R. N.; Leite, F.S. & Brasileiro, C.A. (2018) Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 122, 142-156.
- Schneider, C.A.; Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671-675.
- Taylor, W.R. & Van Dyke, G.C. (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybio* 9: 107–109.
- Trueb, L. (1970) Evolutionary relationships of casque-headed tree frogs with co-ossified skulls Family Hylidae). *Lawrence, University of Kansas*.
- Trueb, L. (1973) Chapter 2. Bones, Frogs, and Evolution. *University of Missouri Press*.
- Wandolleck, B. (1907) Einige neue und weniger bekannte Batrachier von Brasilien. Teubner in Komm.

APÊNDICE I

Indivíduos examinados para caracterização e comparação osteológica.

Thoropa aff. lutzii: MZUFV 16626, 18650 – Cataguases, Minas Gerais.

Thoropa miliaris: MZUFV 4148 - Almenara, Minas Gerais; MZUFV 4129 – Alto caparaó, Minas Gerais; MZUFV 4123 – Fazenda da Neblina, Araponga, Minas Gerais.

Thoropa taophora: ZUEC 1730, 1738 e 17335.

Tabela 1. Caracteres e estados de caracteres elaborados por Nunes-de-Almeida (2015) e utilizados aqui neste trabalho.

| NBR | CHARACTERS | STATE 0 | STATE 1 | STATE 2 | STATE 3 | STATE 4 |
|------------------|---|------------------------------------|--------------------------|---------|---------------------------|---------|
| OSTEOLOGY | | | | | | |
| 01 | MIL > 38.05 mm | No | Yes | | | |
| 02 | SKL > 11.71 mm | No | Yes | | | |
| 03 | SKW > 12.22 mm | No | Yes | | | |
| 04 | LV2 > 8.40 mm | No | Yes | | | |
| 05 | LSV > 7.77 mm | No | Yes | | | |
| 06 | LPA > 8.48 mm | No | Yes | | | |
| 07 | WFP > 3.07 mm | No | Yes | | | |
| 08 | WFF > 1.19 mm | No | Yes | | | |
| 09 | LSP > 12.19 mm | No | Yes | | | |
| 10 | PBL > 4.84 mm | No | Yes | | | |
| 11 | SKL/MIL > 30.84 | No | Yes | | | |
| 12 | SKW/MIL > 32.42 | No | Yes | | | |
| 13 | SKW/SKL > 105.07 | No | Yes | | | |
| 14 | LV2/MIL > 22.34 | No | Yes | | | |
| 15 | LSV/MIL > 20.43 | No | Yes | | | |
| 16 | LPA/SKL > 72.97 | No | Yes | | | |
| 17 | WFP/SKL > 27.58 | No | Yes | | | |
| 18 | WFF/SKL > 9.18 | No | Yes | | | |
| 19 | LSP/MIL > 32.01 | No | Yes | | | |
| 20 | PBL/SKL > 39.82 | No | Yes | | | |
| 21 | Skull shape | Longer than wide | Wider than long | | Width equal to the length | |
| 22 | Apical anterior process of frontoparietal | Presence of simple process (1 tip) | Presence of dual process | | Multiple process | |
| 23 | Nasal | Longer than wide | Wider than long | | Width equal to the length | |
| 24 | Nasal lateral process | Not present | Present | | Scarcely perceptible | |
| 25 | Terminal phalanx | Normal | "T" shape | | | |

**EXTERNAL
MORPHOLOGY**

| | | | | | |
|----|--|------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 26 | SVL > 41 mm | No | Yes | | |
| 27 | HW > 17.22 mm | No | Yes | | |
| 28 | HL > 13.34 mm | No | Yes | | |
| 29 | THL > 21.50 mm | No | Yes | | |
| 30 | TBL > 22.46 mm | No | Yes | | |
| 31 | FL > 30.85 mm | No | Yes | | |
| 32 | HnL > 11.77 mm | No | Yes | | |
| 33 | IND > 4.45 mm | No | Yes | | |
| 34 | END > 4.18 mm | No | Yes | | |
| 35 | IOD > 4.21 mm | No | Yes | | |
| 36 | ED > 5.84 mm | No | Yes | | |
| 37 | UEW > 3.57 mm | No | Yes | | |
| 38 | TD > 3.08 mm | No | Yes | | |
| 39 | HW/SVL > 41.23 | No | Yes | | |
| 40 | HL/SVL > 31.88 | No | Yes | | |
| 41 | HL/HW > 78.64 | No | Yes | | |
| 42 | THL/SVL > 52.01 | No | Yes | | |
| 43 | TBL/SVL > 54.33 | No | Yes | | |
| 44 | THL/TBL > 96.07 | No | Yes | | |
| 45 | FL/SVL > 75.16 | No | Yes | | |
| 46 | ED/SVL > 14.11 | No | Yes | | |
| 47 | END/SVL > 9.97 | No | Yes | | |
| 48 | TD/SVL > 6.91 | No | Yes | | |
| 49 | TD/HW > 17.45 | No | Yes | | |
| 50 | HnL/SVL > 28.68 | No | Yes | | |
| 51 | ED/HW > 34.93 | No | Yes | | |
| 52 | END/HW > 24.38 | No | Yes | | |
| 53 | Callus in front of the tympanum | Not present | Present | | |
| 54 | Tympanum visibility | Not visible externally | Visible externally | | |
| 55 | Supra-tympanic membrane | Not apparent | Evident | | |
| 56 | Skin on dorsal view | Few glands or nothing | Many apparent glands | | |
| 57 | Skin on lateral view | Few glands or nothing | Many apparent glands | | |
| 58 | Disposition of nuptial spines on thumb | No spines | Spread, small spines | Two groups, small spines | One group, large spines |
| 59 | Iris | Not reticulated | Reticulated | | |
| 60 | Fingers length formula | II<I<IV<III | I<II<IV<III | II<IV<I<III | II<I<III<IV |
| 61 | Toes length formula | I<II<V<III<IV | I<II<III<V<IV | I<II<V<III<IV | |

| | | | | | |
|------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 62 | Toes fimbriae | Not present | Present | | |
| 63 | Toes membrane | Not present | Present | | |
| 64 | Vocal sac | Simple | Bilobate | | |
| 65 | Tympanum diameter relative to the eye | Small, less than 50% of the eye size | Medium, less than 75% of the eye size | Large, more than 75% of the eye size | |
| BEHAVIOR | | | | | |
| 66 | Reproductive mode | In the water | On the soil | | |
| 67 | Aggregation mode | Solitary | Small group | | |
| 68 | Song - Dominant frequency (approximately) | > 400 Hz | > 1000 Hz | > 1500 Hz | > 3000 Hz |
| 69 | Song - Maximum frequency (approximately) | > 5000 Hz | > 6000 Hz | > 10000 Hz | |
| 70 | Song - Minimum frequency (approximately) | > 0.50 Hz | > 0.200 Hz | > 0.300 Hz | |
| 71 | Canto - Duration | > 30 ms | > 150 ms | > 200 ms | > 300 ms |
| 72 | Song - Number of notes | One note | Three notes | Four to seven notes | More than seven notes |
| TADPOLE EXTERNAL MORPHOLOGY | | | | | |
| 73 | Body shape (dorsal view) | Oval | Elliptic | | |
| 74 | Body shape (lateral view) | Not depressed | Depressed | Very depressed | |
| 75 | Jaw sheath lower part | Short and wide | Long and narrow with rounded tip | Short and narrow with rounded tip | "V" shape |
| 76 | Oral disc | Large with lips underdeveloped | Large with lips well developed | | |
| 77 | Eyes position | Dorsal | Dorsolateral | Lateral | |
| 78 | Nares position | Snout eye half distance | Close to the eyes | | |
| 79 | LTRF | 2/3 | 2(1-2)/3(1) | 1(1)/3(1) | |
| 80 | Spiracle position | Indistinct | Anterior median | Sinister | Posterior median |
| 81 | Abdominal disc | No abdominal disc | Slightly evident | Very evident (folds exceed laterals) | |
| 82 | Abdominal flap | No flap | Not bilobed | Shallowly bilobed | Bilobed |

| | | | | | | |
|----|---|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| 83 | Padrão de cor da região dorsal da cauda | Not disruptive | Disruptive | | | |
| 84 | Size of the dorsal fin of the tail | 1/2 of the tail | 1/3 of the tail | 1/4 of the tail | 1/5 of the tail | Full tail |
| 85 | Size of the ventral fin of the tail | 1/2 of the tail | 3/4 of the tail | 4/5 of the tail | Full tail | |
| 86 | Vent tube | Not visible | Short and median | | | |

Tabela 2. Matriz modificada de Nunes-de-Almeida (2015). Originalmente elaborada utilizando o software Mesquite 2.75 e composto por 86 caracteres e 11 táxons terminais. Em negrito se destacam os novos quatro táxons adicionados.

| | |
|---------------------------------------|---|
| <i>Hylodes phylodes</i> | 0000000000000001010001210000000000001100011011110010010012101100????310300002000430 |
| <i>Cycloramphus eleutherodactylus</i> | 00000100001101010001101100000000000001100001100000011100011000?010????0? ???????????? |
| <i>Cycloramphus rhyakonastes</i> | 1111111001011110100022110000000000111-100001011--010-0011013101?000???01111 100211?00? |
| <i>Zachaeus parvulus</i> | 00000000011111000011011000000000000-100001000--000-0000012000?010????2???? ?????????? |
| <i>Thoropa taophora</i> | 1111111110010010111102211111111111111011010110111101110111000001000002202010000121230 |
| <i>T. sp. aff. taophora</i> | 1111111111000011001110221111111111111101111111111011101110111000001000???20??????????? |
| <i>Thoropa miliaris</i> | 11111111110001001011022111111111111111111011111001110111000001002203202010012121311 |
| <i>Thoropa megatypanum</i> | 00000001000000011001001100000000100010110010111101111101110000020?11021120101121?0031 |
| <i>Thoropa petropolitana</i> | 0000000000011111101010011000000000000001110100010110110030110001013200012210010231201 |
| <i>Thoropa lutzii</i> | 0000000000001101101010011000000000000001010110111110111021110001010103012010012231121 |
| <i>Thoropa saxatilis</i> | 000010110110001011011101111111101111110011011111111101110100020?????020111201?0101 |
| <i>Cycloramphus boraceiensis</i> | ????????????????????????????????111110?01???1110010?0???0?011?0?11?10-1????000???1--????00? |
| <i>Thoropa aff.lutzii</i> | 000000000111?1?0?1?1???10000000000000011111001110111111?1?00001113123011?00122??100 |
| <i>Cycloramphus lutzorum</i> | ????????????????????????????111100?01???1110010?0???0?011?????1?1?1?3411?110???10001 |
| <i>Cycloramphus izecksohni</i> | ????????????????????????????000000?00???1110010?0???0?011?0???01?????0?11?1?02?2100? |

3.2 Capítulo 2 – Luz, S.; Assis, C. L.; Nunes, I. & Feio, R. N. Osteologia craniana da perereca-de-capacete *Aparasphenodon pomba* Assis, Santana, Silva, Quintela & Feio, 2013 (Anura: Hylidae: Lophohylineae), com comentários sobre a composição dos gêneros *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 e *Corythomantis* Boulenger, 1896

Osteologia craniana da perereca-de-capacete *Aparasphenodon pomba* Assis, Santana, Silva, Quintela & Feio, 2013 (Anura: Hylidae: Lophyohylinae), com comentários sobre a composição dos gêneros *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 e *Corythomantis* Boulenger, 1896

SOFIA LUZ^{1,4}, CLODOALDO LOPES ASSIS², IVAN NUNES³ & RENATO NEVES FEIO².

¹ Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Museu de Zoologia João Moojen. 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, Museu de Zoologia João Moojen. 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

³ Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Campus do Litoral Paulista, Instituto de Biociências, Laboratório de Herpetologia (LHERP). 11330-900 São Vicente, SP, Brazil.

⁴ Corresponding author: sofia.luz.andrade@gmail.com

Resumo: Baseado em espécimes diafanizados, nós descrevemos com detalhes a osteologia craniana de *Aparasphenodon pomba* e analisamos os elementos cranianos das três outras espécies do gênero. Os resultados complementam a diagnose de *A. pomba*, revelando diferenças em relação às outras espécies do gênero. Entretanto, o resultado deste estudo evidencia também uma inconsistência dentro de *Aparasphenodon*, uma vez que duas espécies apresentam características diagnósticas do gênero *Corythomantis*.

Abstract: Based on diaphanized specimens and x-rays, we described with details the cranial osteology of *Aparasphenodon pomba*, and we analyzed the cranial elements on three other species of the genus. The results complement the *A. pomba* diagnosis, revealing differences in relation to other species of the genus. However, this study also evidenced a taxonomic inconsistency among *Aparasphenodon*, once two species exhibit the diagnostic feature of *Corythomantis*.

Palavras-chave: Amphibia, elementos cranianos, taxonomia, sistemática, ossos.

INTRODUÇÃO

Lophyohylinae Miranda-Ribeiro, 1926 engloba 12 gêneros (Duellman et al. 2016; Frost 2019), e inclui algumas espécies conhecidas popularmente como “pererecas-de-capacete”,

caracterizadas pelos seus crânios hiper-ossificados e comportamento fragmótico, o ato de usar uma parte do corpo (nesse caso a cabeça) para fechar um buraco (Wheeler 1927; Trueb 1970a; Jared et al. 2005). Dentro dessa subfamília, o gênero *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 inclui cinco espécies: *A. venezolanus* (Mertens 1950), distribuída no bioma amazônico, *A. brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920, *A. bokermanni* Pombal, 1993, *A. arapapa* Pimenta, Napoli & Haddad, 2009 e *A. pomba* Assis, Santana, Silva, Quintela, & Feio, 2013, que habitam a Mata Atlântica do leste brasileiro (Mollo Neto & Teixeira Jr. 2012; Assis et al. 2013; Frost 2019).

Aparasphenodon tem sido definido morfológicamente pelo crânio mais longo que largo, focinho estreito e acuminado em vista dorsal, presença de osso pré-nasal e saco vocal único, medial e subgular (Trueb 1970a). Faivovich et al. (2005) estabeleceram que a única sinapomorfia morfológica putativa do gênero é a presença do osso pré-nasal. Entretanto, a presença desse osso é insuficiente para definir *Aparasphenodon* (Pimenta et al. 2009), uma vez que também está presente em pererecas-de-capacete de outras subfamílias de Hylidae, como o gênero de Hylinae *Triprion* Cope, 1866, revelando que essa é uma característica homoplástica dentro da família (Duellman 2001; Smith et al. 2007). Concomitantemente, esse osso está ausente em algumas espécies de *Aparasphenodon* (Assis et al. 2013), fato que levanta a discussão para a possibilidade deste gênero ser um agrupamento parafilético. A falta de dados osteológicos para mais da metade das espécies dificulta uma mais extensiva e conclusiva proposta taxonômica e das relações filogenéticas entre as espécies do gênero.

Aparasphenodon faz parte de um clado com alta diversidade da osteologia craniana com várias novidades anatômicas (Smith et al. 2007), representado como ((*Corythomantis* + *Trachycephalus*) + (*Aparasphenodon*(*Argenteohyla* + *Nyctimantis*))) (Duellman et al. 2016), uma nova proposta de arranjo filogenético em contraste ao anterior (*Corythomantis*(*Argenteohyla*(*Aparasphenodon*+*Nyctimantis*))) proposto por Faivovich et al. (2005). Essas divergências e instabilidade de topologias ressaltam a pequena quantidade de dados que possuímos desses grupos, e também evidenciado pelo caso do gênero *Aparasphenodon*, em que apenas *A. brunoi* é incluída nas filogenias da família Hylidae (Faivovich et al. 2005; Smith et al. 2007; Wiens et al. 2010; Pyron & Wiens 2011; Duellman et al. 2016). Ademais, a condição do osso pré-nasal em *Aparasphenodon* nunca foi testado em um contexto filogenético, apesar dessa estrutura ser considerada a sinapomorfia putativa do gênero.

Aparasphenodon pomba é uma espécie classificada como “criticamente ameaçada” (CR) pela lista vermelha nacional de espécies ameaçadas (MMA 2014) por sua ocorrência restrita à localidade tipo. É endêmica do bioma Mata Atlântica do sudeste do Brasil e, durante

sua descrição, Assis et al. (2013) alocaram essa espécie dentro do gênero *Aparasphenodon* baseando-se na morfologia externa, coloração, distribuição do gênero e análise do crânio para identificar a presença ou ausência do osso pré-nasal. Neste trabalho, nós descrevemos a morfologia craniana desta perereca-de-capacete, bem como trazemos dados inéditos a respeito da osteologia de outras três espécies de *Aparasphenodon*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Três espécimes diafanizados, dois machos (MZUFV 12126 e 12988) e uma fêmea (MZUFV 12987) de *Aparasphenodon pomba* foram examinados. A determinação do sexo foi feita a partir do exame de tratos sexuais secundários (presença de saco e fenda vocal). A metodologia de diafanização utilizada seguiu o protocolo modificado de Taylor & Van Dyke (1985), onde a tripsina foi substituída por hidróxido de potássio 1%.

A descrição da osteologia craniana foi realizada através da visualização das estruturas em microscópio estereoscópico Olympus SZ51, que foram posteriormente fotografadas com câmera digital Canon EOS Rebel T6 e tratadas no programa Adobe Photoshop. As terminologias osteológicas e subdivisão das partes do crânio seguiram Trueb (1970a, 1973, 1993). Medidas de angulação das estruturas foram realizadas através do programa ImageJ. Nós comparamos nossa caracterização com pranchas de raio-X de outras espécies de *Aparasphenodon* e com artigos que contém a descrição osteológica de espécies de *Argenteohyla* Trueb, 1970, *Corythomantis* e *Nyctimantis* Boulenger, 1882 (Boulenger 1896; Carvalho 1941; Trueb 1970; Pombal *et al.* 2012).

As imagens em raio-X para comparação entre as espécies foram obtidas utilizando-se a máquina Faxitron MX-20 (kV 25; 19 sec) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ). As imagens dos raio-X foram capturadas através do software Faxitron SR DCF 3.1.8b. Todos os espécimes analisados estão depositados nas coleções herpetológicas do Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV), Brasil, Natural History Museum, Kansas University (KU), EUA e Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ), Brasil (ver Apêndice I para os espécimes adicionais examinados).

RESULTADOS

Osteologia craniana de *Aparasphenodon pomba* - Descrição baseada nos espécimes mZUFV 12126, 12988 e 12987.

Crânio (Fig. 1A, 1B) um pouco mais longo que largo ($CC/LC = 1.15$), em vista dorsal o focinho é projetado e arredondado, toda a superfície dorsal apresentando espículas ósseas projetadas e visíveis através da pele (Fig. 1C). O osso pré-nasal não se faz presente, e a extremidade anterior do crânio é delimitada pelos nasais longos.

Região Olfatória. Os pré-maxilares, pareados e dentados, possuem a base quase reta e estão posicionados posterior à extremidade anterior dos nasais, que cobrem dorsalmente o processo alar do pré-maxilar. As extremidades laterais da *pars dentalis* são recobertas pelos maxilares; a *pars palatina* é curta, e cada pré-maxilar carrega um curto e conspícuo processo palatino. Os processos alares não possuem contato medial e são direcionados anterodorsalmente.

Os vômers são largamente separados entre si, denteados, com o processo dentígeno angular em relação ao plano transversal em 22.6° . Posteriormente, o vômer se articula com o esfenoide e seus processos posterolateral e anterolateral formam as margens anterior, medial e posterior do *naris* interno (coana).

Os neopalatinos são robustos, carregam em sua extensão uma série de odontoides ao longo de uma crista ventral, formando a margem posterior do *naris* interno. A extremidade medial é acuminada, enquanto a extremidade lateral, que se articula com os maxilar, é mais larga. Os neopalatinos medialmente se apoiam no esfenoide e não há contato entre os neopalatinos.

Os nasais se apresentam como ossos largos, longos, e se estendem anteriormente até cobrir o processo alar dos pré-maxilares. Medialmente, os nasais fazem contato entre si, exceto na extremidade anterior, em que possuem um gap, e posterior, onde são separados pelo esfenoide dermal. Em vista dorsal, os nasais se articulam com a *pars fascialis* do maxilar lateralmente e formam a margem anterior da órbita; posterolateralmente, articula-se com os frontoparietais. Os nasais carregam uma crista cantal bem desenvolvida, e a superfície dorsal do osso é coberta por projeções de espículas ósseas que formam um padrão reticulado. A extremidade orbital do nasal é formada por pequenas projeções ósseas.

O maxilar é moderadamente robusto; em toda sua extensão dorsal, o maxilar carrega várias projeções ósseas de forma de cumes de espículas que estão direcionados quase que transversalmente ao plano do crânio. A extremidade medial das cristas de espículas do maxilar se encontra com a extremidade lateral das cristas de espículas do nasal, formando ângulos de 69.6° a 106.8° . A *pars palatina* é pouco desenvolvida, e dorsalmente a *pars fascialis* do maxilar é bem desenvolvida e se estende posteriormente até a margem anterior da órbita.

Esfenetmoide e região orbital. Esfenetmoide dermal de formato triangular, localizado na região central no nível da extremidade anterior da órbita. O esfenetmoide dermal é delimitado posteromedialmente pelos frontoparietais e anteromedialmente pelos nasais. Toda a superfície dorsal deste osso é marcada por espículas ósseas.

Os frontoparietais convergem medialmente através dos seus comprimentos; anteromedialmente, o frontoparietal se articula com a margem posterior do esfenetmoide dermal; anterolateralmente, este osso se articula com nasal e forma a margem medial e posterior da órbita. A margem posterior do frontoparietal possui, como extremidade, uma crista de espículas ósseas. Ventral à essa crista, o frontoparietal se anexa ao proótico e exoccipital. Toda a margem externa e superfície dorsal do frontoparietal apresentam uma rede de pequenas espículas ósseas que formam projeções nas extremidades posteriores e laterais do crânio (Fig. 1A).

Regiões ótica e occipital. O esquamosal é arqueado em vista dorsal e se estende posteriormente desde a borda posterior da órbita até o nível da crista frontoparietal. As margens dorsolaterais do esquamosal possuem uma série de pequenas espículas ósseas. O ramo zigomático, anterior, é fino e forma parte da margem posterior da órbita. A sua extremidade anterior se aproxima da superfície dorsal do maxilar, porém sem se articular a ele. O ramo ótico, posterior, é menor que o zigomático, e termina na região posterolateral do frontoparietal, que o sobrepõe levemente. O ramo ventral do esquamosal se encontra no ventre do terço posterior entre os outros dois ramos, e se estende posteroventralmente até a articulação com o quadratojugal e maxilar.

O pterigoide é bem desenvolvido e, assim como o esquamosal, possui três ramos. O ramo anterior é inclinado, direcionado anterolateralmente e se articula com o maxilar. O ramo posterior se articula com o quadratojugal e ramo ventral do esquamosal. O ramo ventral é robusto.

O quadratojugal é pequeno. Sua extremidade anterior se encontra na mediana entre o nível do forame proótico. Anteriormente, o quadratojugal é uma haste fina de osso localizada medial ao maxilar, articulando-se a ele. Já sua extremidade posterior é larga e se articula dorsalmente com o ramo ventral do esquamosal e ramo posterior do pterigoide.

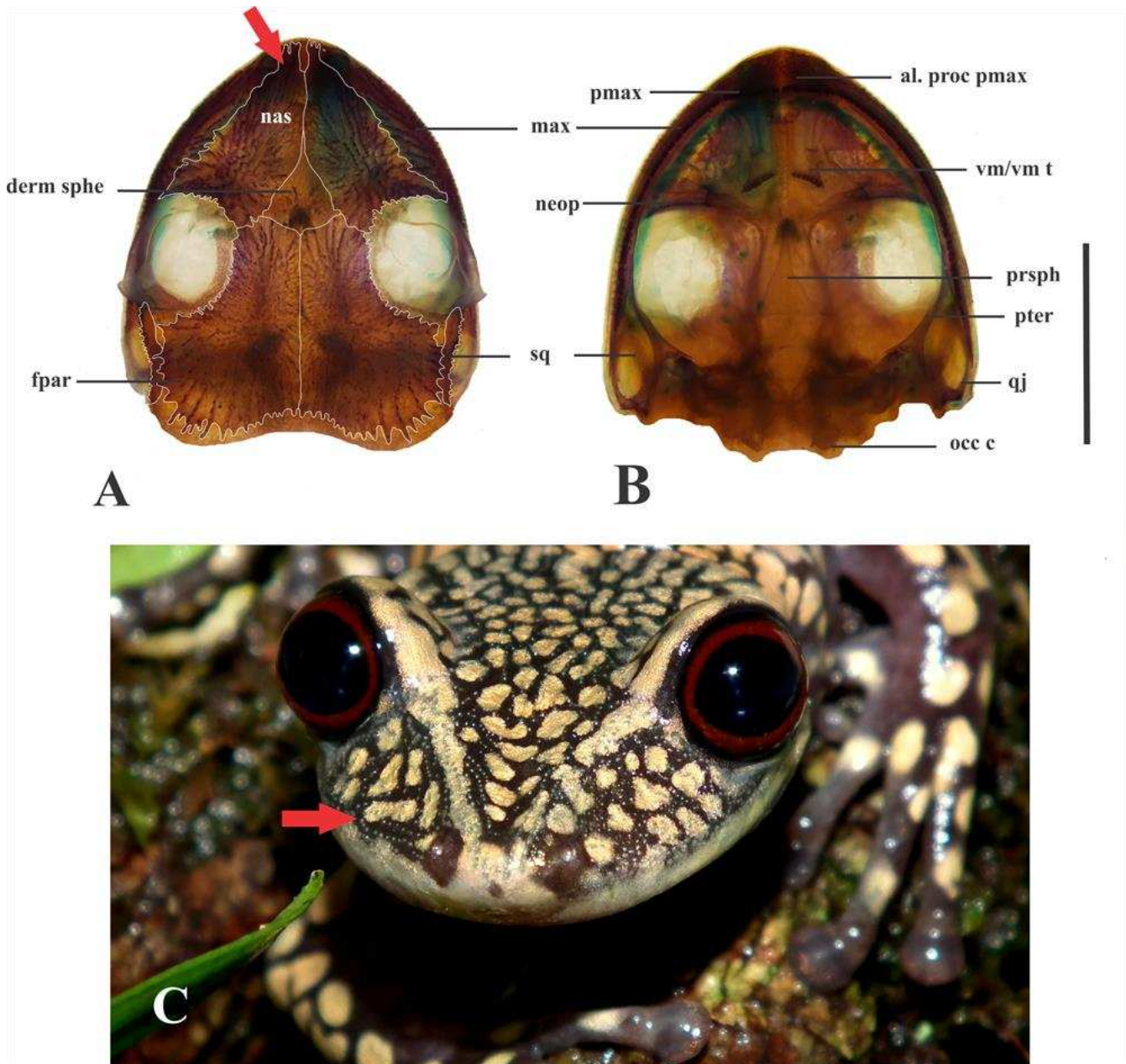


Figura 1. Vistas dorsal (A) e ventral (B) do crânio de *Aparasphenodon pomba* (MZUFV 12126), seta vermelha em A mostrando o nasal que se estende anteriormente até cobrir o processo alar do pré-maxilar; (C) espécime adulto com pequenos pontos brancos (apontados pela seta vermelha) que caracterizam os locais onde as espículas ósseas se anexam à pele. Abreviaturas: al. proc p.max: processo alar do pré-maxilar; der. sphe: esfenetmoide dermal; fpar: frontoparietal; max: maxilar; nas: nasal; neop: neopalatino; sq: esquamosal; occ c: côndilo occipital; pmax: pré-maxilar; prsph: parasenoide; pter: pterigoide; qj: quadratojugal; vm: vômer; vm t: dentes vomerianos. Escala: 1cm.

Comparação com outras espécies.

O crânio de *Aparasphenodon pomba* se distingue das demais espécies de Lophyohylineae (características dentro de parênteses) pelas seguintes especificações: *A. pomba* se distingue do

agrupamento de *Argenteohyla* pelos (nasais reduzidos, pré-maxilar exposto; Trueb 1970b) e *Nyctimantis* (desenvolvimento de uma flange orbital irregular no frontoparietal, e esfenetmoide quase completamente oculto dorsalmente pelos frontoparietais e nasais; Duellman & Trueb 1976). *Aparasphenodon pomba* se distingue de *A. brunoi* (Fig. 2A) pela ausência de pré-nasais (pré-nasal presente), extensão do nasal cobrindo o processo alar do pré-maxilar (a extensão do nasal não cobre o processo alar do pré-maxilar, e sim o osso pré-nasal); difere-se de *A. arapapa* (Fig. 2B) pela ausência de pré-nasal (pré-nasal presente), borda lateral dos frontoparietais cobrem parcialmente o esquamosal (não sobre o esquamosal); vômeres muito separados entre si (não há separação evidente); *canthus rostralis* levemente elevado (muito elevado); difere-se de *A. venezolanus* (Fig. 2D) pela ausência de pré-nasal (pré-nasal presente), frontoparietais largos posteriormente (frontoparietais constrictos posteriormente). *Aparasphenodon pomba* se difere de *Corythomantis greeningi* pelo processo dentígeno do vômer angular (processo dentígeno do vômer reto) e presença de neopalatinos (neopalatinos ausentes); e difere-se de *C. galeata* pelos frontoparietais que cobrem o esquamosal (frontoparietal não cobre o esquamosal), processo dentrígeno do vômer muito separado entre si (pouco separados).

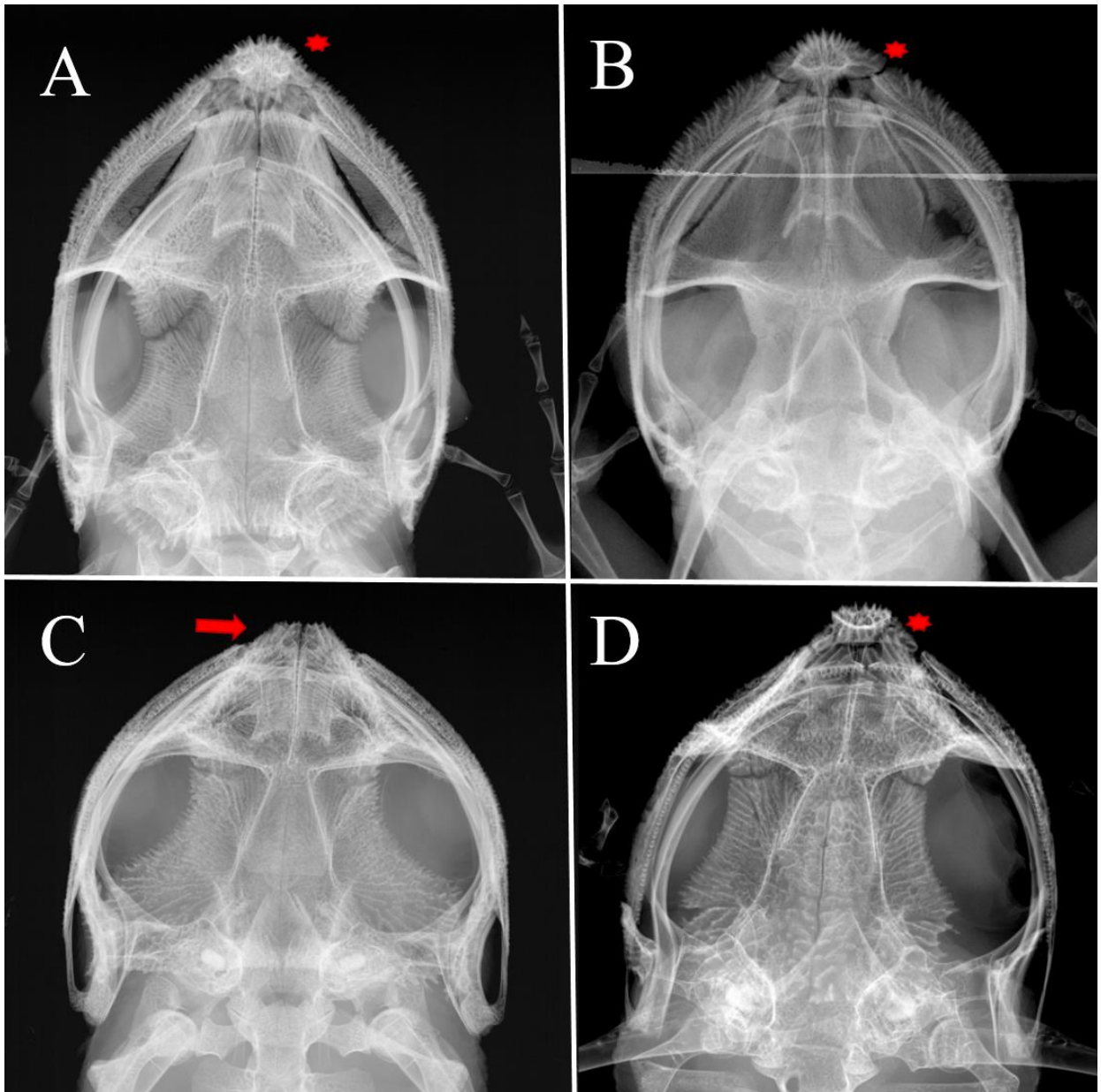


FIGURA 2. Raio-X de quatro espécies de *Aparasphenodon*. A: *Aparasphenodon brunoi* (MNRJ 247); B: *Aparasphenodon arapapa* (UFBA 3948); C: *Aparasphenodon bokermanni* (ZUEC 11575); e D: *Aparasphenodon venezolanus* (INPA 22151). Asterisco vermelho: osso pré-nasal; seta vermelha: ausência do osso pré-nasal e nasal que cobre o processo alar do pré-maxilar.

Tabela 1. Osteologia craniana comparada das espécies de *Aparasphenodon* e *Corythomantis*. or. = ornamentação; max = maxilar. *Sinapomorfia putativa do gênero *Corythomantis*.

| Caracteres osteológicos cranianos | <i>Aparasphenodon pomba</i> | <i>Aparasphenodon arapapa</i> | <i>Aparasphenodon venezolanus</i> | <i>Aparasphenodon bokermanni</i> | <i>Aparasphenodon brunoi</i> | <i>Corythomantis greeningi</i> | <i>Corythomantis galeata</i> |
|---|---------------------------------------|---|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Pré-Nasal</i> | Ausente | Presente | Presente | Ausente | Presente | Ausente | Ausente |
| <i>Extensão do nasal</i> | Cobre o processo alar do pré-maxilar* | Não cobre o processo alar do pré-maxilar | Não cobre o processo alar do pré-maxilar | Cobre o processo alar do pré-maxilar* | Não cobre o processo alar do pré-maxilar | Cobre o processo alar do pré-maxilar* | Cobre o processo alar do pré-maxilar* |
| <i>Contato medial entre os nasais</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Pars facialis do maxilar em contato com nasais</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Frontoparietal cobrindo o esquamosal</i> | Parcialmente | Não cobre | Não cobre | Não cobre | Parcialmente | Parcialmente | Não cobre |
| <i>Esfenotmoide dermal</i> | Triangular | Triangular | Losangular | - | Triangular | Triangular | Triangular |
| <i>Dentes vomerianos</i> | Angular | Angular | Reto | Reto | Angular | Reto | Reto |
| <i>Neopalatino</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Ausente | Presente |
| <i>Or. do maxilar</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Pars facialis do max. or.</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Or. no nasal.</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Or. no pré-nasal.</i> | - | Presente | Presente | - | Presente | - | - |
| <i>Or. no frontoparietal</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Or. no esquamosal</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| Referência | Este trabalho | Pimenta et al. 2009; este trabalho | Este trabalho | Este trabalho | Trueb, 1970 | Trueb, 1970 | Pombal et al. 2012 |

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Aparasphenodon pomba exibiu morfologia craniana caracterizada pelo padrão único de espículas na superfície dorsal dos ossos nasais, maxilares, frontoparietais, esfenetmoide dermal e esquamosal, este último parcialmente sobreposto pelo frontoparietal, *canthus rostralis* levemente elevado, vômeres serapados entre si e com os processos dentígenos angulares, entre outras características. Essas particularidades reafirmam que *A. pomba* é um táxon válido como espécie. Ademais, o estudo anatômico destes elementos cranianos e a comparação com suas espécies congênicas nos permitiu levantar duas questões que envolvem as relações intra e intergenéricas. A primeira questão é a presença do osso pré-nasal. Neste trabalho, observamos que *A. pomba* e *A. bokermanni* não apresentam essa estrutura, que é considerada como a sinapomorfia putativa morfológica para o gênero (Trueb 1970a; Faivovich et al. 2005).

A segunda questão se refere às relações entre as espécies de *Aparasphenodon* e de *Corythomantis*. Faivovich et al. (2005), seguindo Trueb (1970a), considerou que as autapomorfias morfológicas para *C. greeningi*, na época única espécie para o gênero, a ausência dos neopalatinos e nasais que cobrem o processo alar dos pré-maxilares. *Corythomantis galeata* possui o osso neopalatino e, em sua descrição, a sinapomorfia putativa para o gênero *Corythomantis* se restringiu aos nasais que cobrem o processo alar do pré-maxilar (Pombal et al. 2012).

Nós visualizamos que *A. bokermanii* e *A. pomba* compartilham esses os mesmos caracteres cranianos diagnósticos de *Corythomantis*. Baseado nessas similaridades, nós conseguimos organizar as espécies em dois diferentes grupos, um composto por *A. bokermanni*, *A. pomba*, *C. galeata* e *C. greeningi* (nasais que cobrem o processo alar dos pré-maxilares) e outro grupo composto por *A. arapapa*, *A. brunoi* e *A. venezolanus* (presença do osso pré-nasal).

Por fim, as análises adicionais dos elementos cranianos de *A. arapapa*, *A. bokermanni*, *A. brunoi*, e *A. venezolanus* revelam uma inconsistência taxonômica e filogenética dentro do gênero e reforçam a necessidade de testar não apenas o monofileticismo de *Aparasphenodon*, mas também de *Corythomantis*. Nós evitamos aqui dar sugestão de mudança de nomenclatura genérica para *A. pomba* e *A. bokermanni* porque são necessários estudos filogenéticos mais consistentes que analisem a subfamília Lophyohylineae através da comunhão de caracteres morfológicos e moleculares.

Agradecimentos. Nós gostaríamos de agradecer a Victor Dill pelas considerações no manuscrito; ao Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, pela permissão da utilização da máquina de raio-x (curador José P. Pombal Jr.); Bruno Pimenta pelo raio-x de

Aparasphenodon arapapa. SL é apoiada pela bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CLA, RNF e IN são apoiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por fornecer licença que possibilitou a feitura deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Assis, C.L., Santana, D.J., Silva, F.A., Quintela, F.M. & Feio, R.N. (2013) A new and possibly critically endangered species of casque-headed tree frog *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura, Hylidae) from southeastern Brazil. *Zootaxa*, 3716 (4), 583–591. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3716.4.6>
- Boulenger, G.A. (1896) Descriptions of new Batrachians in British Museum. *Annals and Magazine of Natural History*, 17 (6), 401–406. <https://doi.org/10.1080/00222939608680389>
- Carvalho, A.L. (1941) Notas sôbre os gêneros *Corythomantis* Boulenger e *Aparasphenodon* Miranda Ribeiro. *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, 1(14), 101-110.
- DOU - Diário Oficial da União. (2014) *Lista Nacional Oficial das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção*. Seção 1, 121-130.
- Duellman, W. E. (2001). The hylid frogs of middle America. Vol. 1. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. *Natural History Museum of the University of Kansas, Ithaca*.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1976) The systematic status and relationships of the hylid frog *Nyctimantis rugiceps* Boulenger. *Occasional Papers of the Museum of Natural History, The University of Kansas*, 58, 1–14.
- Duellman W.E., Marion A.B. & Hedges S.B. (2016) Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104, 1–109. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>
- Faivovich J., Haddad C.F.B., Garcia P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler W. C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240. [https://doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SROTFF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SROTFF]2.0.CO;2)

- Frost, D.R. (2019) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. New York, American Museum of Natural History. Electronic Database. Available from: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. (Accessed 06 July 2019).
- Jared, C., Antoniazzi, M.M., Navas, C.A., Katchburian, E., Freymüller, E., Tambourgi, D.V. & Rodrigues, M. T. (2005). Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. *Journal of Zoology*, 265 (1), 1–8.
<https://doi.org/10.1017/S0952836904005953>
- Mertens, R. (1950). Ein neuer Laubfrosch aus Venezuela. *Senckenbergiana Biologica*, 31, 1–10.
- Miranda-Ribeiro, A. (1920) *Tripriion*, *Diaglena*, *Corythomantis*, etc. uma subsecção de Hylidae, com duas espécies novas. *Revista do Museu Paulista*, 12, 83–88.
<https://doi.org/10.5962/bhl.part.22254>
- Miranda-Ribeiro, A. (1926) Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional*, 27, 1–227.
- Neto, A.M., & Teixeira Jr, M. (2012) Checklist of the genus *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920 (Anura: Hylidae): distribution map, and new record from São Paulo state, Brazil. *Check List*, 8(6), 1303–1307.
<https://doi.org/10.15560/8.6.1303>
- Pimenta, B.V.S., Napoli, M.F., Haddad C.F B. (2009) A new species of casque-headed tree frog, genus *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro (Amphibia: Anura: Hylidae), from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brazil. *Zootaxa*, 2123: 46–54.
- Pombal, Jr., J.P. (1993) New species of *Aparasphenodon* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. *Copeia*, 4, 1088–1091.
<https://doi.org/10.2307/1447088>
- Pombal Jr., J.P., Menezes, V.A., Fontes, A.F., Nunes, I., Rocha, C.F.D. & Van Sluys, M. (2012) A Second Species of the casque-headed frog genus *Corythomantis* (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil, the distribution of *C. greeningi*, and comments on the genus. *Boletim do Museu Nacional*, 530, 1–14.
- Pyron, R.A. & Wiens, J.J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.012>

- Smith, S.A., Arif, S., Oca, A.R.M. & Wiens, J.J. (2007) A phylogenetic hot spot for evolutionary novelty in middle Americas treefrogs. *Evolution*, 61(9), 2075–2085.
doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00173.x
- Taylor, W.R. & Van Dyke, G.C. (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9 (2), 107–119.
- Trueb, L. (1970a) Evolutionary Relationships of Casque-headed Tree Frogs with co-ossified Skulls (Family Hylidae). *University of Kansas Publication*, 18 (7), 547–716.
<https://doi.org/10.5962/bhl.part.19992>
- Trueb L. (1970b) The generic status of *Hyla siemersi* Mertens. *Herpetologica*, 26 (2), 254–267.
- Trueb, L. (1973) Bones, frogs, and evolution. In: VIAL, J.L. (Ed.) Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems. *University of Missouri Press*, 65–132.
- Trueb, L. (1993). Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. In: HANKEN, J. & HALL, B.K. (Eds.) Patterns of structural and systematic diversity. *University of Chicago Press*, 255–343.
- Wheeler, W.M. (1927) Physiognomy of insects. *Quarterly Review of Biology*, 2, 1–6.
<https://doi.org/10.1086/394264>
- Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X. & Moen, D.S. (2010) An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 871–882.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.013>

APÊNDICE I: Espécimes Adicionais Examinadas.

Aparasphenodon arapapa: UFBA 3948 (raio-x).

Aparasphenodon bokermanni: ZUEC 11575 (raio-x).

Aparasphenodon brunoi: KU 51326, 92216-92218 (esqueleto seco), KU92213 (diafanização), Field number MC 067 (diafanização), MNRJ 274 (x-ray), 15705 (esqueleto seco), MZUFV 1552, 1769, 9134, 11561 (diafanização).

Aparasphenodon venezolanus: INPA 22151 (raio-x).

Corythomantis greeningi: KU 74253, 92223-92224 (esqueleto seco), MNRJ 76754 (esqueleto seco), MNRJ 15867 (diafanização).

Corythomantis galeata: MNRJ 27175 (diafanização).

4. CONCLUSÃO GERAL

A rã-das-pedras em processo de descrição, *Thoropa* aff. *lutzi* pode ser caracterizada osteologicamente pelos nasais que sobrepõem extremidade anteromedial do esfenetmoide; esfenetmoide sem pareamento evidente; pré-maxilar com dois processos espinhosos; neopalatinos com extremidades mediais constrictas, processo cultriforme do parasfenoide localizados posteriormente aos neopalatinos e o processo dentígeno do vômer anterior à coana. Nós encontramos que conjunto de características representado pela largura da extremidade medial dos neopalatinos, o comprimento do processo cultriforme parasfenoide e o posicionamento do processo dentígeno do vômer são suficientes para diferenciar as *Thoropa* “pequenas”, que possuem extremidade medial dos palatinos acuminados; processo cultriforme do parasfenoide curto e dentes vomerianos anteriores à coana, das *Thoropa* grandes. Estas possuem as características opostas às citadas anteriormente: extremidade medial dos neopalatinos larga, processo cultriforme do parasfenoide longo e dentes vomerianos posteriores à abertura da coana.

Já *Aparasphenodon pomba* exibiu morfologia craniana como aspectos particulares o padrão de espículas na superfície dorsal dos ossos nasais, maxilares, frontoparietais, esfenetmoide dermal e esquamosal, este último parcialmente sobreposto pelo frontoparietal, *canthus rostralis* levemente elevado, vômeres serapados entre si e com os processos dentígenos angulares, entre outras características. Essas particularidades reafirmam que *A. pomba* é um táxon válido como espécie, porém o estudo dessas características no gênero como um todo levanta questões: a presença ou ausência do pré-nasal é suficiente para definir o gênero *Aparasphenodon*? *A. bokermanni* e *A. pomba* possuem as sinapomorfias do gênero *Corythomantis* (nasais que se estendem anteriormente até cobrirem o processo alar do pré-maxilar), ao mesmo tempo em que não possuem o osso pré-nasal, que supostamente caracterizaria o gênero *Aparasphenodon*. Concluimos que são necessários estudos filogenéticos que analisem a subfamília Lophyohylineae como um todo através da comunhão de caracteres morfológicos e moleculares para realização de atos nomenclaturais que tornem os clados em questão monofiléticos.

É importante ressaltar que a realização trabalhos de caracterizações morfológicas, tais como osteologia, miologia, além do estudo de outros conjuntos de órgãos, são fundamentais para o entendimento da evolução, adaptação e ecologia das espécies.