

ALESSIKA MOURA DE SOUSA

**REVISÃO TAXONÔMICA DE *Ololygon tripui* (LOURENÇO, NASCIMENTO E  
PIRES, 2009) (ANURA, HYLIDAE)**

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S725r  
2019 Sousa, Alessika Moura de, 1992-  
Revisão taxonômica de *Ololygon tripui* (Lourenço,  
Nascimento e Pires, 2009) (Anura, Hylidae) / Alessika Moura de  
Sousa. – Viçosa, MG, 2019.  
xi, 58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Renato Neves Feio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Anura. 2. Anfíbios. 3. Zoologia - Classificação. 4. Mata Atlântica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

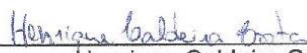
CDD 22. ed. 597.8

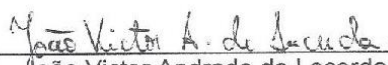
ALESSIKA MOURA DE SOUSA

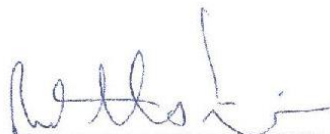
**REVISÃO TAXONÔMICA DE *Ololygon tripui* (LOURENÇO, NASCIMENTO E PIRES, 2009) (ANURA, HYLIDAE)**

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: 29 de março de 2019.

  
Henrique Caldeira Costa

  
João Victor Andrade de Lacerda



Renato Neves Feio  
(Orientador)

“Queriam que ela fosse do lar, mas ela era do ler, com essa liberdade, ela era de onde quisesse ser”.

Allê Barbosa

Dedico este trabalho a minha  
família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram na realização deste trabalho. Minha gratidão será eterna, assim como o carinho por cada um de vocês!

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho e por ter me proporcionado vivenciar experiências inesquecíveis.

Aos meus pais Luzia e Eduardo por estarem sempre do meu lado e por serem referência de honestidade, amor e respeito. Aos meus irmãos Allan e Lourrane, por sempre me apoiarem em todos os aspectos da minha vida. À minha vó Raimunda, por ser exemplo de mulher guerreira, e que me ensinou a nunca desistir. Aos meus tios e primos, por estarem sempre ao meu lado. À minha querida e amada tia Raquel, que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso, mas que era boa demais pra ficar nesse mundão. Te amarei eternamente!!

Ao meu querido orientador e amigo prof. Renato Neves Feio, pela grande oportunidade, parceria e confiança. Por todo seus ensinamentos, simplicidade e apoio em todas as etapas. Foi SHOW ter você como orientador.

À prof. Maria Rita Silvério Pires pela amizade e pelas contribuições para o melhor desenvolvimento do meu trabalho.

À Sarah Mangia, um ser de luz que surgiu em meu caminho, e que me ajudou em todas as etapas deste trabalho, com muita paciência e carinho. Sua alegria e motivação em busca do conhecimento, é inspirador! Gratidão por tudo.

Ao prof. Diego José Santana por abrir as portas do laboratório Mapinguari, por toda ajuda, incentivo e suporte durante as análises moleculares.

Aos amigos do Museu de Zoologia João Moojen e colegas do mestrado em Biologia Animal do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa: Clodoaldo, Déborah, Douglas, Jhonny, Sofia, Henrique, Jonas, Joaquim, Leandro, Késsia, Gabriel, Marcelo, Filipe, Paula, Mauro, Pedro pelos ensinamentos e por todos os momentos compartilhados ao longo destes dois anos.

A todos os amigos do laboratório Mapinguari por me receberem tão bem e compartilhar comigo momentos agradáveis, em especial o Eric Ragalzi por toda sua ajuda e dedicação com as análises moleculares.

Ao Laboratório de Zoologia de Vertebrados da Universidade Federal de Ouro Preto (LZV) por me amparar sempre que necessário. À Paulinha, pela amizade e por ser sempre tão prestativa e gentil, e a Gabi pelos belíssimos desenhos.

Aos meus queridos amigos Carlinha e Pedro, por me acolherem em sua adorável casa durante minhas idas a Campo Grande. Agradeço os momentos divertidos e de ensinamentos, e ao Pedro pelas gravações e grande ajuda com as análises bioacústicas.

Aos amigos Guilherme Ramos da Silva, Maria das Graças de Castro Sedano e Valdeir de Castro Sedano pelo carinho, ajuda e suporte durante os trabalhos de campo no Monumento Natural Serra das Torres, no Espírito Santo.

Ao prof. Jorge Abdala Dergan (Beagle- UFV) pela doação das amostras de tecidos para a realização deste trabalho.

À prof. Luciana Nascimento (PUC-Minas) por ter permitido minha visita a coleção de anfíbios do Museu de Ciências Naturais da PUC, pela doação das amostras de tecidos e por toda atenção e carinho comigo.

Aos amigos, Fifi, Filipe, Ceres, Ana Clara, Rafaela, Thais, Izadora, Izabella, Isabela, Patrícia, Camila, Clarice, Morghana e Bruna, que apesar da distância, a amizade permanece cada vez mais forte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro que ajudou na concretização deste projeto. Ao programa de Pós-Graduação em Biologia animal pela oportunidade, e ao Adnilson por ser sempre tão solícito.

Aos membros da banca avaliadora, Henrique Caldeira Costa e João Victor Andrade de Lacerda, por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho.

Muito Obrigada!

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
ARTIGO I.....	5
ARTIGO II.....	12
APÊNDICE I.....	54
APÊNDICE II.....	55
MATERIAL SUPLEMENTAR .....	57

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I

**Figura 1.** A and B calls of *Ololygon tripui* recorded on 6 July 2017 at type locality: Estação Ecológica do Tripuí, Municipality of Ouro Preto, Minas Gerais State, Brazil (20°23'02.11"S, 43°32'35.26"W, 1184m a.s.l., air temperature 10°C). ..... 9

### ARTIGO II

**Figura 1.** Projeção dos dois primeiros eixos da análise dos componentes principais (PCA) para 18 caracteres morfométricos de machos adultos dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* (pontos vermelhos), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (pontos azuis) e *Ololygon* “Nova Lima” (pontos amarelos).....20

**Figura 2.** Projeção dos dois primeiros eixos da análise dos componentes principais (PCA) para 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* (pontos vermelhos) e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (pontos azuis).....22

**Figura 3.** Árvore de gene obtida a partir de inferência bayesiana para o gene COI e o local de coleta de *Ololygon tripui* (estrela azul), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (ponto vermelho), *Ololygon* “Nova Lima” (ponto verde), *Ololygon* “Mimoso do Sul” (ponto amarelo) e *Ololygon flavoguttata* - grupo externo (ponto preto).....27

**Figura 4.** Rede de haplótipos para o gene COI de *Ololygon tripui* (círculo vermelho), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (círculo verde), *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (círculo roxo), *Ololygon* “Mimoso do Sul” (círculo amarelo) e *Ololygon flavoguttata* (círculo lilás). Os traços representam o número de passos mutacionais em ramos que possuem mais de um passo.....28

**Figura 5.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (holótipo, macho, MZUFV 12401, CRC 26,4mm): (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral.....33

**Figura 6.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (holótipo, macho, MZUFV 12401): (A) Vista lateral da cabeça; (B) Vista ventral da mão direita e (C) Vista ventral do pé direito.....33

**Figura 7.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. em vida, proveniente do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, município de Ervália, Minas Gerais. Foto: Leandro Avelar.....36

**Figura 8.** Girino de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. no estágio 37 de acordo com Gosner (1960). (A) Vista lateral, (B) Vista dorsal e (C) Vista ventral, (D) Disco oral.....39

**Figura 9.** Girino de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. em vida. Lote 303.....40

**Figura 10.** Espectrograma, oscilograma e espectro de potência dos cantos tipo “A” e “B” de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. gravado no dia 13 de novembro de 2017 (MZUFV18773), no Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil.....41

**Figura 11.** *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (holótipo, macho, MCN 020589, CRC 24,78mm): (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral.....42

**Figura 12.** *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (holótipo, macho, MCN 020589): (A) Vista lateral da cabeça; (B) Vista ventral da mão direita e (C) Vista ventral do pé direito.....43

### **Material Suplementar**

**Figura S1.** Árvore de gene obtida a partir de inferência bayesiana para o gene COI de todas as espécies de *Ololygon* disponíveis no Genbank e das sequências obtidas no presente estudo.....57

**Figura S2.** Árvore de gene obtida a partir de Verossimilhança para o gene COI de todas as espécies de *Ololygon* disponíveis no Genbank e das sequências obtidas no presente estudo.....58

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO II

- Tabela 1.** Correlações das variáveis originais com o PC1, PC2 e PC3 para os 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” ..... 19
- Tabela 2.** Correlações das variáveis originais com o PC1, PC2 e PC3 para os 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” ..... 21
- Tabela 3.** Medidas dos espécimes tipo de *Ololygon tripui*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov., *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. e *Ololygon* “Mimoso do Sul” sp. nov. As abreviações estão listadas nos Materiais e Métodos. DP = Desvio Padrão..... 22
- Tabela 4.** Parâmetros acústicos dos cantos de *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”. Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e amplitude. .... 24
- Tabela 5.** Distância-p para o gene COI entre as espécies *Ololygon longilinea*, *Ololygon* “MS”, *O. flavoguttata*, *Ololygon* “NL”, *Ololygon* “Brigadeiro” e *O. tripui*..... 288

### Apêndice II

- Tabela S1.** Espécimes de *Ololygon* utilizados nas análises moleculares.....55

## RESUMO

SOUSA, Alessika Moura de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Revisão taxonômica de *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento e Pires, 2009) (Anura, Hylidae)**. Orientador: Renato Neves Feio. Coorientadoras: Maria Rita Silvério Pires e Sarah Mângia Barros.

*Ololygon* Fitzinger, 1843 é representado por 48 espécies que estão organizadas em dois grupos, *Ololygon catharinae* e *Ololygon perpusilla*, com base em sinapomorfias morfológicas e/ou história natural. O grupo *Ololygon catharinae*, atualmente é composto por 35 espécies, que ocorrem no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. *Ololygon tripui* apresenta distribuição restrita a ambientes serranos no sudeste do Brasil, contudo, devido a ocorrência de outras espécies do gênero ocupando estes ambientes e com morfologia similar, é comum observar espécimes associados à *O. tripui* (e.g. “aff”, “cf.”) depositados em coleções sem uma devida identificação. No presente estudo realizamos uma revisão taxonômica de *O. tripui*, por meio de taxonomia integrativa, utilizando caracteres morfológicos, morfométricos, acústicos e moleculares de populações de diferentes localidades, e descrevemos o canto de anúncio de *O. tripui* em sua localidade tipo. Nós examinamos 87 exemplares que encontram-se depositados em coleções zoológicas, sequenciamos o DNA mitocondrial de 12 indivíduos, e avaliamos 105 cantos provenientes de duas localidades. A partir dos resultados das análises, foi possível o reconhecimento de quatro linhagens distintas, *Ololygon tripui*, e outras três inéditas: *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”, com distribuição ao longo do Parque Estadual Serra do Brigadeiro; *Ololygon* “Nova Lima”, restrita a localidade tipo, município de Nova Lima, Minas Gerais; e *Ololygon* “Mimoso do Sul”, com ocorrência no Monumento Natural, Estadual Serra da Torres, no município de Mimoso do Sul, Espírito Santo. As linhagens apresentam distribuição restrita a ambientes serranos com altitudes acima de 900m, e são encontradas com maior abundância nos meses mais frios.

## ABSTRACT

SOUSA, Alessika Moura de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Taxonomic revision of *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento e Pires, 2009) (Anura, Hylidae)**. Adviser: Renato Neves Feio. Co- advisers: Maria Rita Silvério Pires and Sarah Mângia.

*Ololygon* Fitzinger, 1843 is represented by 48 species that are organized in two groups, *Ololygon catharinae* and *Ololygon perpusilla*, based on morphological synapomorphies and / or natural history. The *Ololygon catharinae* group, currently comprises 35 species, occurring in Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay. *Ololygon tripui* presents a restricted distribution to serranos environments in southeastern Brazil, however, due to the occurrence of other species of the genus occupying these environments and with morphology similar, it is common to observe several specimens associated with *O. tripui* (eg "aff", "Cf.") deposited in collections without proper identification. Here we present a taxonomic review of *Ololygon tripui*, based on integrative taxonomy, using morphological, morphometric, acoustic and molecular characters from populations of different localities, and describe the advertisement call of *O. tripui* from its type locality. We examined 87 specimens that are deposited in zoological collections, we sequenced 12 individuals (mitochondrial DNA), and we analyzed 105 calls from two localities. We recognize four distinct lineages, including *O. tripui*, and three new lineages: *Ololygon* "Serra do Brigadeiro", from the Parque Estadual Serra do Brigadeiro; *Ololygon* "Nova Lima", restricted to the municipality of Nova Lima, Minas Gerais; and *Ololygon* "Mimoso do Sul", occurring at the Monumento Natural Serra das Torres, municipality of Mimoso do Sul, Espírito Santo. These lineages present distribution restricted to mountain environments with altitudes above 900m, and it can be found in greater abundance during colder months

## INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de caracteres morfológicos e morfométricos na taxonomia de anfíbios anuros é o principal método utilizado durante o processo de descrição e caracterização de novas espécies (Duellman, 2001). Um outro fator importante em estudos comparativos para a identificação de anuros é o estudo das características bioacústicas (Martins & Jim, 2003; Köhler et al. 2017). O canto de anúncio em anuros é considerado espécie-específico (Gerhardt & Davis 1988) e, portanto, constitui um importante mecanismo de isolamento reprodutivo. Contudo, muitas espécies de anuros não possuem vocalização descritas, dificultando o reconhecimento preciso, principalmente se tratando de espécies morfológicamente semelhantes (Bang & Giaretta, 2017).

Considerar apenas dados morfológicos, fisiológicos e comportamentais para descrever e comparar espécies podem não ser suficientes, principalmente na identificação de espécies crípticas, visto que a especiação nem sempre é acompanhada por alterações na morfologia, sendo necessário a utilização de novas técnicas (Padial et al. 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos moleculares vem aprimorando os sistemas de identificação taxonômica (Avice, 2004) e o interesse pelo uso de ferramentas moleculares para identificação de espécies aumentou significativamente durante as últimas décadas (e.g. Santana et al. 2015; Nogueira et al. 2016; Forlani et al. 2017, Andrade et al. 2019).

O gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843 é representado por 48 espécies, com ocorrência no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Brusquetti & Lavilla, 2006; Laufer et al. 2009; Pereyra et al. 2012; Frost, 2019). Estas espécies estão organizadas em dois grupos, *Ololygon catharinae* e *Ololygon perpusilla*, com base em sinapomorfias morfológicas e/ou história natural (Duellman et al. 2016). O grupo *Ololygon catharinae*, atualmente é composto por 35 espécies (Frost, 2019), que possuem taxonomia bastante complexa, além da frequente descoberta de novas espécies (e.g. Lourenço et al. 2013, 2014, 2016; Nogueira et al. 2016, Andrade et al. 2018). Contudo, as espécies apresentam estreitas afinidades morfológicas, o que dificulta a identificação de diversas espécies, resultando em um grande número de espécimes depositados em coleções que ainda não foram adequadamente identificados.

*Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento & Pires 2009), pertencente ao grupo *O. catharinae*, foi descrita para a Estação Ecológica do Tripuí, no município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécie apresenta porte médio, e é comumente encontrada em

ambientes lóticos e clima frio (Lourenço et al. 2009). Até o presente estudo, sua vocalização não era descrita, e sua distribuição conhecida restrita a ambientes serranos entre os estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Contudo, é comum encontrar diversos espécimes associados à *O. tripui* depositados em coleções sem uma devida identificação (“aff”, “cf.”), o que impede o conhecimento da distribuição real da espécie. Isso pode ser reflexo da ausência de diagnoses que incluam caracteres morfológicos mais específicos e dados acústicos em descrições de espécies do grupo, o que dificulta a identificação correta de exemplares em campo e de material depositado em coleções.

No presente estudo descrevemos o canto de anúncio de *Ololygon tripui* para a sua localidade tipo, e realizamos uma revisão taxonômica das populações relacionadas à espécie, a partir de uma abordagem integrativa, utilizando dados morfológicos, morfométricos, bioacústicos e moleculares.

## Referências

- Andrade, S. L., Rocha, D.F.; Pombal, J.C.; Vaz-Silva, W. (2018). A new species of the *Ololygon catharinae* species group (Anura: Hylidae) from the Cerrado biome, State of Goiás, Central Brazil. *Zootaxa*. 4425. 10.11646/zootaxa.4425.2.5.
- Andrade, F.S., Silva, L.A., Koroiva, R., Fadel, R.M., Santana, D.J. (2019). A new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) from an Amazonia-Cerrado transitional zone, state of Tocantins, Brazil. *Journal of Herpetology*, 53(1): 68–80.
- Avise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. 2<sup>a</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- Bang, D.L. & Giaretta, A.A. (2017): A reassessment of the vocalizations of three species of *Ololygon* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 16(1): 23-45.
- Brusquetti, F. & Lavilla, E.O. (2006): Lista comentada de los anfibios de Paraguay. *Cuadernos de Herpetologia* 20 (2): 3–79.

- Duellman, W.E. (2001). The Hylid Frogs of Middle America. Society for the Study of *Amphibians and Reptiles*. Ithaca, 2v., xvi, 1158pp, 92 pls.
- Forlani, M.C., Tonini, J.F., Cruz, C.A., Zaher, H., & de Sá, R.O. (2017): Molecular and morphological data reveal three new cryptic species of *Chiasmocleis* (Mehely 1904) (Anura, Microhylidae) endemic to the Atlantic Forest, Brazil. *PeerJ*, 5, e3005.
- Frost, Darrel 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. (Fevereiro, 2019).
- Gerhardt, H.C. & Davis, M.S. (1988). Variation in the coding of species identify in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution*. 42: 556-563.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P.J.R., Toledo, L.F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C.F.B., Rödel, M.-O. & Vences, M. (2017) The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251: 1–124. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>
- Laufer, G., Piñeiro-Guerra, J.M., Pereira-Garbero, R., Barreneche, J.M. & Ferrero, R. (2009): Distribution extension of *Scinax aromothyella* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* (9): 275–278.
- Lourenço, A. C. C., Nascimento, L. B. & Pires, M. R. S. (2009) A new species of *Scinax catharinae* species group (Anura, Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brasil. *Herpetologica*, 65 (4), 468-479.
- Lourenço, A. C. C., Carvalho, A. L. G, Baêta, D., Pezzuti, T. L. & Leite, F. S. F. (2013). A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from Serra da Canastra, southeastern State of Minas Gerais, Brazil. *Zootaxa*, 3613 (6), 573-588. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3613.6.4>
- Lourenço, A.C.C., Luna, M.C. & Pombal Jr., J.P. (2014). A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. *Zootaxa*, 3889 (2), 259–276. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3889.2.5>

- Lourenço, A.C.C., Zina, J., Catroli, G. F., Kasahara, S., Faivovich, J. & Haddad, C.F.B. (2016): A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. *Zootaxa* 4154: 415–435.
- Martins, I. A. & Jim, J. (2003). Bioacoustic analysis of advertisement call in *Hyla nana* and *Hyla sanborni* in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 63(3): 507-516.
- Nogueira, L., Solé, M., Siqueira, S., Affonso, P.R.A.D.M., Strüssmann, C. & Sampaio, I. (2016): Genetic analysis reveals candidate species in the *Scinax catharinae* clade (Amphibia: Anura) from Central Brazil. *Genetics and molecular biology* 39(1): 49-53.
- Padial J., Miralles A., De la Riva I., Vences M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 16-16.
- Pereyra, M.O., Borteiro, C., Baldo, D., Kolenc, F. & Conte, C.E. (2012): Advertisement call of the closely related species *Scinax aromothyella* Faivovich 2005 and *S. berthae* (Barrio 1962), with comments on the complex calls in the *S. catharinae* group. *Herpetological Journal* 22: 133– 137.
- Santana, D.J., Barros, A.B., Pontes, R., & Feio, R.N. (2015): A New Species of Glassfrog Genus *Vitreorana* (Anura, Centrolenidae) from the Cerrado Domain, Southeastern Brazil. *Herpetologica* 71(4): 289-298.

## ARTIGO I

Submetido para publicação no periódico Zootaxa - Qualis B1 CAPES na área de Biodiversidade.

---

### **The calls of *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento & Pires, 2009) (Amphibia: Anura: Hylidae) from its type locality, Southeastern Brazil**

Alessika Moura de Sousa<sup>1\*</sup>, Pedro Carvalho Rocha<sup>1</sup>, Renato Neves Feio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Museu de Zoologia João Moojen, Universidade Federal de Viçosa, Vila Gianetti, casa nº 32, Campus UFV, 36570-900, Viçosa, Brazil.

\*Corresponding author. E-mail: [alessika.moura@gmail.com.br](mailto:alessika.moura@gmail.com.br)

The treefrog genus *Ololygon* Fitzinger, 1843 currently comprise 48 recognized species (Frost, 2018), however only 26 of them had their calls formally described (see from Andrade et al. 2018; Guerra et al. 2018; Bang & Giaretta 2018). The genus was recently revalidated based on molecular data (Duellman et al. 2016), thus encompassing species formerly associated with the *Scinax catharinae* clade (*sensu* Faivovich et al. 2005). *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento & Pires 2009), in turn, was described from Estação Ecológica do Tripuí, Municipality of Ouro Preto, Minas Gerais State, Brazil, and only recently had its calls described (Forti et al. *in press*). However, this description was based on recordings made at Serra do Caparaó, Minas Gerais State, Brazil, which is approximately 175 km away from the species type locality. Therefore, we describe herein the calls of *O. tripui* from its type locality and compare it with the description from Forti et al. (*in press*) and with the remaining data available for the genus.

Description of vocalizations was based on 54 calls from three males recorded on 6 July 2017 and 27 May 2018, at Estação Ecológica do Tripuí, Municipality of Ouro Preto, Minas Gerais State, Brazil (20°23'02.11"S, 43°32'35.26" W, 1184m a.s.l., air temperature 10°C and 9°C, respectively). This locality recordings were made using a Marantz PMD660 digital recorder with sampling rate of 44.1 kHz and 16-bit resolution, coupled to a Sennheiser ME66 / K6 unidirectional microphone. Spectral and temporal parameters were measured using Raven Pro 1.5 software (Bioacoustics Research Program 2014). The spectrogram was generated with window type Hann; window size = 512 samples; overlap = 70%; DFT size = 1024 samples; and mesh spacing = 43.1 Hz. The

sound graphs were obtained with Seewave package (Sueur et al.2008) of R platform (R Core Team 2016), using Hanning window, FFT = 512 and 70% overlap. Call parameters and nomenclature follow Köhler et al. (2017). Comparison with remaining *Ololygon* species was based on data and literature available from Andrade et al. (2018), Bang & Giaretta (2018) and Guerra et al. (2018).

We measured: number of notes per call (NN), call duration (CD), interval between calls (i.e., inter-call interval; CI), note rate (NR; given as notes per second, with time measured from the beginning of the first note until the end of the last note of a sequence), note duration (ND), interval between notes (NI), number of pulses per note (PN), pulse rate (PR; given as pulses per second), number of pulse groups per note (NPG), interval between pulse groups (PGI), pulse group duration (PGD), pulse group rate (PGR; given as pulse groups per second), number of pulses per pulse group (PGP), pulse rate within pulse groups (PGPR), dominant frequency (FD) and 90% frequency bandwidth (FB; given as range from the minimum value of “Frequency 5 %”, to the highest value of “Frequency 95 %”, both parameters acquired by Raven Pro 1.5 (Charif *et al.* 2010). Additionally, we also measured the relative peak of amplitude (PA) in the oscillogram, which is given as percentage of time from the beginning of a note (or pulse group) until the time of amplitude’s peak, thus describing the amplitude envelope of the call. The parameters PA and FD were acquired by the “Peak time” and “Peak frequency”, respectively, from Raven Pro 1.5 (Charif et al. 2010). Whenever a note presented pulsatile structure (*sensu* Köhler et al.2017), we did not measure the PNOV. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation, range. Voucher specimens are deposited at the amphibian collection of the Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Municipality, Brazil (MZUFV 18476, 18477, 18749). Recordings were deposited in the Bioacoustic Fonoteca João Moojenov.

We recorded two distinct vocalizations of *Ololygon tripui* herein referred as “A” and “B” calls according to the acoustic similarity with calls from other *Ololygon* species (e.g. Hepp et al.2017; Bang & Giaretta 2018). Among 54 calls recorded, the A call was less common (20.3 %; n = 11) and always followed by a B call (Fig. 1) (interval between A and B call =  $1.2 \pm 0.45$ , 0.6 – 2.0 s; n = 11 intervals). This call was characterized by a sequence of notes (NN =  $5.5 \pm 0.93$ , 4 – 7 notes; CD =  $0.92 \pm 0.24$ , 0.46 – 1.35 s; n = 11 calls), emitted at irregular rate (CR =  $4.6 \pm 6.2$ , 0.6 – 11.7 calls/min; n = 3 recordings) and variable intervals (CI =  $87.5 \pm 69.2$ , 9.2 – 211.1 s; n = 7 intervals). Notes from the A

call were emitted at regular rate (NR =  $6.2 \pm 1.3$ , 5.2 – 8.6 notes/s; n = 11 calls) and constant intervals (NI =  $0.192 \pm 0.036$ , 0.114 – 0.232 s; n = 49 intervals), with an ascendant amplitude modulation among them. Each note is similar, with short duration (ND =  $11.7 \pm 5.2$ , 3.0 – 26.0, n = 60), peak of amplitude around 30 % of notes duration (PA =  $30.8 \pm 11.8$ , 7.7 – 60 %; n = 59 notes) and pulsed structure (PN =  $2.9 \pm 1.1$ , 1 – 4 pulses; n = 26 pulsed notes). Pulses were emitted at somewhat regular rate (PR =  $392.3 \pm 54.1$ , 333.3 – 500 pulses/s; n = 26 pulsed notes). However some notes (56 %; n = 34) presented pulsatile structure with poorly defined pulses. Dominant frequency was around  $2,754.5 \pm 255.6$  Hz (FD = 2,437.5 – 3,468.8 Hz; n = 59), with 90 % of energy concentrated between 2,109.4 and 2,531.2 Hz.

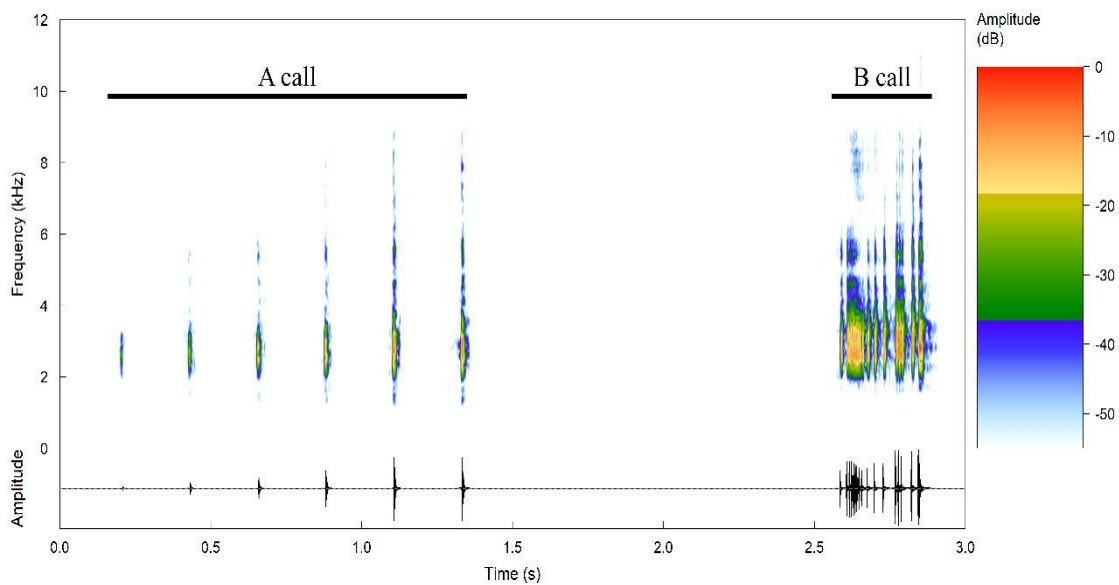
The B call, in turn, was more common (79.6%; n = 43 calls) and frequently emitted alone. This call was characterized by a single pulsed note (Fig. 1), with longer duration (CD = ND =  $388.4 \pm 246.4$ , 95 – 839 ms; n = 43 notes) and a strong tendency to form multiple pulse groups per note, with the last pulse group frequently presenting a pulsatile structure (53.4 %; n = 23 notes). Regardless of the presence of pulse groups, each note (i.e. B call) was composed of about 26 pulses (PN =  $26.7 \pm 9.4$ , 16 – 46 pulses; n = 20 notes) emitted at variable rate (PR =  $85.2 \pm 26.0$ , 51.75 – 130.4 pulses/s; n = 20 notes). The call was emitted at irregular rate (CR = NR =  $27.8 \pm 22.5$ , 0.72 – 61.3 notes/min; n = 9 recordings) and variable intervals (CI = NI =  $21.2 \pm 45.9$ , 0.617 – 212.04 s; n = 34 intervals). Each note can have from one to 17 pulse groups (NPG =  $6.2 \pm 4.2$ , 1 – 17 pulse groups per note; n = 43 notes) emitted irregularly (PGR =  $18.2 \pm 5.9$ , 6.2 – 34.7 pulse groups/s; n = 38 notes with pulse groups) and with variable intervals (PGI =  $30.3 \pm 15.7$ , 8 – 80 ms; n = 224 pulse groups). Pulse groups also have variable duration (PGD =  $33.6 \pm 25.5$ , 5 – 198 ms; n = 262 pulse groups), variable peak of amplitude (PA<sup>PG</sup> =  $41.7 \pm 22.7$ , 2 – 94.7 %; n = 261 pulse groups), irregular number of pulses (PGP =  $3.9 \pm 2.8$ , 1 – 20 pulses; n = 237 pulse groups) and pulse rate (PGPR =  $117.8 \pm 40.6$ , 50 – 297.3; n = 192 pulse groups). Dominant frequency was around  $2,912.2 \pm 289.9$  Hz (FD<sup>PG</sup> = 2,437.5 – 3,515.6 Hz; n = 267 pulse groups), with 90 % of energy concentrated between 2,062.5 and 4,453.1 Hz.

The advertisement call (i.e. call type A) of *Ololygon tripui* is distinguished from those of *O. berthae*, *O. catharinae*, *O. centralis* and *O. skaios* by the shorter call duration (CD = 0.46 – 1.35 s in *O. tripui*; 3.2 – 52.04 s in *O. berthae*; 2 s in *O. catharinae*; 3.90 – 9.09 s in *O. centralis*; 4.42 – 7.9 s in *O. skaios*) and from *O. caissara*, and *O. strigilata*

by the longer call duration (CD = 0.01 – 0.02 s in *O. caissara*; 0.011 – 0.017 s in *O. strigilata*). It is distinguished from *O. agilis*, *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, and *O. berthae* by the lower dominant frequency (FD = 2437, 5 – 3468,8 Hz in *O. tripui*; 7450–7920 Hz in *O. agilis*; 5000–6500 Hz in *O. argyreornata*; 4.769 – 5.414 Hz in *O. aromothyella*; 3600 – 5000 Hz in *O. berthae*), and from *O. skaios* by the higher dominant frequency (FD= 2437, 5 – 3468,8 Hz in *O. tripui*; 2205 – 2243 Hz in *O. skaios*). The longer intervals between notes distinguish *O. tripui* from *O. agreensis*, *O. heyeri*, *O. humilis*, *O. littoralis* and *O. skaios* (NI = 0.617 – 212.04 s in *O. tripui*; 0.023 – 0.076 s in *O. agreensis*; 0.055 – 0.061 s in *O. heyeri*; 0.003 – 0.055 s in *O. humilis*; 0.024 – 0.066 s in *O. littoralis*; 0.036 – 0.168 s in *O. skaios*). *Ololygon tripui* is distinguished from *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. goya*, *O. heyeri*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. ranki*, , *O. strigilata*, *O. skaios* and *O. trapicheiroi* by the longer note duration (ND = 0.117±0.052 s, 0.03 – 0.26 s in *O. tripui*; 0.01 – 0.02 s in *O. caissara*; 0.01 – 0.03 s in *O. canastrensis*; 0.01 – 0.05 s in *O. goya*; 0.002 – 0.01.3s in *O. heyeri*; 0.02 – 0.09s in *O. hiemalis*; 0.002 – 0.006 s in *O. humilis*; 0.016 – 0.067 s in *O. longilinea*; 0.005 – 0.018 s in *O. luizotavioi*; 0.05 s in *O. machadoi*; 0.01 – 0.05 s in *O. ranki*;; 0.011 – 0.017 s in *O. strigilata*; 0.013 – 0.056 s in *O. skaios*; 0.006 – 0.337 s in *O. trapicheiroi*), from *O. centralis* and *O. rizibilis* by the lower note duration (ND = 0.03 – 0.26 s in *O. tripui* ; 20 – 35.5 s in *O. centralis*; 1.0 – 4.7 s in *O. rizibilis*), and from *O. longilinea* and *O. skaios* by the lower number of notes per call (NN = 4 – 7 notes in *O. tripui*; 8 – 19 notes in *O. longilinea*; 42 – 73 notes in *O. skaios*). *Ololygon tripui* is distinguished from *O. agilis*, *O. albicans*, *O. caissara*, *O. strigilata* and *O. trapicheiroi* by the higher number of notes per call (NN = one note in *O. agilis*, *O. albicans*, *O. caissara*, *O. strigilata* and *O. trapicheiroi*).

Overall, the calls of *Ololygon tripui* described by Forti et al. (*in press*) match the ones described herein, thus confirming the taxonomic identity of *O. tripui* from Serra do Caparaó locality. The calls described by Forti et al. (*in press*) are also divided in two types: the so called call type “A”, which was also characterized by short notes emitted in sequences, and the call type "B" (i.e. aggressive call), which is a long non-harmonic note with fused pulses. However, the call type A from Serra do Caparaó has a longer call duration (CD = 0.46 – 1.35 s type locality; 2.2 – 4.1 s Caparaó) and a lower note duration (ND = 0.03 – 0.26 s type locality; 0.017 – 0.029 s Caparaó). Although neither call descriptions account for the intraspecific variation in call parameters (i.e. static and

dynamic characters, *sensu* Gerhardt 1991), temporal parameters such as call and note duration are expected to present great variation (see Köhler et al.2017), especially between populations separated by large geographical distances (e.g. Rocha et al.2017; Magalhães et al.2018). In addition, Forti et al. (*in press*) suggested that call type A was the advertisement call, while the call type B has an aggressive function, thus corroborating the literature records for other species of *Ololygon*. Even though some ethological studies might shed light on the actual social context of each call, we believe this is also the case for *O. tripui*.



**Figura 1.** A and B calls of *Ololygon tripui* recorded on 6 July 2017 at type locality: Estação Ecológica do Tripuí, Municipality of Ouro Preto, Minas Gerais State, Brazil (20°23'02.11"S, 43°32'35.26"W, 1184m a.s.l., air temperature 10°C).

### Acknowledgements

We thank the employees of Estação Ecológica do Tripuí Juarez and Cicero and the friend Leandro de Avelar Oliveira for help during fieldworks. The Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA and Instituto Estadual de florestas – IEF for granting a license for the collection (58946-1; 020/2018), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes for financial support.

## References

- Andrade, S.P., Santos, D.L., Rocha, S.F., Pombal Jr., J. P., Vaz-Silva, W. (2018) A new species of the *Oloolygon catharinae* species group (Anura: Hylidae) from the Cerrado biome, State of Goiás, Central Brazil. *Zootaxa*, 4425 (2), 283–303. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4425.2.5>
- Bastos, R.P., Alcantara, M., Morais, A.R., Lingnau R. & Signorelli, L. (2011) Vocal behaviour and conspecific call response in *Scinax centralis*. *Herpetological Journal*, 21, 43–50.
- Bioacoustics Research Program (2014) Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software. Version 1.5. The Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven> (September 2018)
- Bang, D. & Giaretta, A.A. (2018) Vocal repertoire of *Oloolygon pombali* (Lourenço, Carvalho, Baêta, Pezzuti & Leite, 2013) (Anura: Hylidae) from its type locality, with notes on phenotypic variation. *Zootaxa*, 4413 (2), 392–396. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4413.2.12>
- Charif, R.A., Waack, A.M., Strickman, L.M. (2010) Raven Pro 1.4 User's Manual. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY.
- Duellman, W. E. Marion, A. B. & Blair, H. S. (2016) Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104 (1), 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 Hylinae, phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240. [http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090\(2005\)294\[0001:SROTFF\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SROTFF]2.0.CO;2)
- Frost, D. (2018) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> (accessed 31 August 2018)
- Gerhardt, H.C. (1991) Female mate choice in treefrogs: Static and dynamic properties. *Animal Behaviour* 42, 615–635. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80245-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80245-3)
- Guerra, V., Llusia, D., Gambale, P.G., Morais, A.R. de, Márquez, R. & Bastos, R.P. (2018). The advertisement calls of Brazilian anurans: Historical review, current

- knowledge and future directions. *Plos One* 13, e0191691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191691>
- Hepp, F., A. C. C. Lourenço, and J. P. Pombal Jr. (2017) Bioacoustics of four *Scinax* species and a review of acoustic traits in the *Scinax catharinae* species group (Amphibia: Anura: Hylidae). *Salamandra* 53: 212–230.
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P.J.R., Toledo, L.F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C.F.B., Rödel, M.-O. & Vences, M. (2017) The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251: 1–124. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>
- Lourenço, A. C. C., Nascimento, L. B. & Pires, M. R. S. (2009) A new species of *Scinax catharinae* species group (Anura, Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brasil. *Herpetologica*, 65 (4), 468-479.
- Magalhães, R.F., Rocha, P.C., Santos, F.R., Strüssmann, C. & Giaretta, A.A. (2018) Integrative taxonomy helps to assess the extinction risk of anuran species. *Journal for Nature Conservation*, 45, 1–10.
- Rocha, P.C., Lacerda, J.V.A., Magalhães, R.F. de, Canedo, C., Pimenta, B.V.S., Heitor, R.C. & Garcia, P.C. de A. (2017) Call variation and vocalizations of the stealthy litter frog *Ischnocnema abdita* (Anura: Brachycephalidae). *Acta Herpetologica* 12, 37–48.
- Sueur J., Aubin, T., Simonis, C. (2008) Seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics*, 18, 213-226. <http://dx.doi.org/10.1080/09524622.2008.9753600>

**Revisão taxonômica de *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento e Pires, 2009) (Anura, Hylidae).**

Alessika Moura de Sousa<sup>1\*</sup>, Pedro Carvalho Rocha<sup>1</sup>, Sarah Mângia<sup>2</sup>, Diego José Santana<sup>2</sup>, Maria Rita Silvério Pires<sup>3</sup> & Renato Neves Feio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Zoologia dos Vertebrados, Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil.

\*Autor correspondente: [alessika.moura@gmail.com](mailto:alessika.moura@gmail.com)

**Abstract**

The species group *Ololygon catharinae* currently comprises 35 species, distributed in Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. *Ololygon tripui* belongs to the *O. catharinae* group, it was described for Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto municipality, Minas Gerais state, located in the southern part of the Serra do Espinhaço. There is little information on the *O. tripui* species, with available data restricted to the description paper, distribution notes, and some data about its karyotype, which difficult to correctly identify specimens related to the species, besides distribution. Here we provide a taxonomic review of *Ololygon tripui* with morphological, morphometric, bioacoustic and molecular comparisons of populations from diferente localities. We obtained four distinct lineages, three were previously unknown and were described in this paper. The phylogenetic relationship between the lineages was congruent with the results obtained in the morphological, morphometric and bioacoustic analyzes.

**Key words:** Taxonomy, morphology, bioacoustics, COI.

## Resumo

O grupo *Ololygon catharinae* possui atualmente 35 espécies, distribuídas no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. *Ololygon tripui*, pertencente ao grupo *O. catharinae*, é descrita para a Estação Ecológica do Tripuí, no município de Ouro Preto, Minas Gerais, localizada na parte sul da Serra do Espinhaço. Existem poucas informações sobre a espécie *O. tripui*, as quais se restringem ao artigo de descrição, notas de distribuição, e alguns dados sobre o seu cariótipo, o que dificulta a identificação correta de espécimes relacionados a espécie, além de impossibilitar uma avaliação real de sua distribuição. O presente estudo faz uma revisão taxonômica de *Ololygon tripui*, através de comparações morfológicas, morfométricas, bioacústicas e moleculares de populações de diferentes localidades. Como resultado, obtivemos quatro linhagens distintas, incluindo *O. tripui*, e outras três inéditas. A relação filogenética entre as linhagens foi congruente com os resultados obtidos nas análises morfológicas, morfométricas e bioacústicas.

**Palavras chave:** Taxonomia, morfologia, bioacústica, COI.

## Introdução

O gênero *Ololygon* Fitzinger, 1843 é representado por 48 espécies, com ocorrência no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Brusquetti & Lavilla, 2006; Laufer et al. 2009; Pereyra et al. 2012; Frost, 2019). Estas espécies estão organizadas em dois grupos, *Ololygon catharinae* (35 espécies) e *Ololygon perpusilla* (13 espécies), com base em sinapomorfias morfológicas e/ou história natural (Duellman et al. 2016). O grupo *O. catharinae* foi definido com base em três sinapomorfias morfológicas putativas: porção posterior do anel cricóide extensivamente alongada e curvada; mineralização parcial dos elementos intercalares entre a última e penúltima falange; origem laterodistal do músculo extensor *brevis distalis digiti* III (Faivovich, 2002). Contudo, grande parte das espécies são diagnosticadas por um conjunto pequeno de caracteres, muitos destes observados apenas em espécimes vivos (e.g. Cruz et al. 2011; Lourenço et al. 2014, Andrade et al. 2018).

*Ololygon tripui*, pertencente ao grupo *O. catharinae*, é descrita para a Estação Ecológica do Tripuí, no município de Ouro Preto, Minas Gerais, localizada na parte sul da Serra do Espinhaço (Lourenço et al. 2009). Sua distribuição é restrita a ambientes serranos com altitudes acima de 900m, registrada na parte sul da Serra do Espinhaço e

Serra da Mantiqueira, no Estado de Minas Gerais (Feio et al. 2008; Santana et al. 2010), e na região das encostas do maciço serrano denominado de Serra das Torres, em Mimoso do Sul, Espírito Santo (Silva et al. 2013). Contudo, devido a ocorrência de outras espécies do gênero ocupando estes ambientes serranos (e.g. *O. flavoguttata*, Cruz & Feio 2007; *O. carnevallii*, Folly 2017), com morfologia similar à *O. tripui*, é comum observar diversos espécimes associados à *O. tripui* (e.g. “aff”, “cf.”) depositados em coleções sem uma devida identificação.

Espécies filogeneticamente relacionadas e que ocupam a mesma fisionomia ambiental em diferentes unidades de relevo (e.g. Serra do Espinhaço e Mantiqueira), sugerem homologias biogeográficas e levantam questões sobre a influência da evolução climática e geomorfológica nos padrões de especiação dos anfíbios anuros (Nascimento et al. 2005). Além disso, estudos taxonômicos realizados em regiões serranas tem mostrado que muitas dessas espécies que ocorrem nesses ambientes, representam ou podem representar complexos de espécies e que precisam ser melhor estudadas (Thomé et al. 2010, Mângia et al. 2014, Neves et al. 2018).

Existem poucas informações sobre a espécie *O. tripui*, as quais se restringem ao artigo de descrição (Lourenço et al. 2009), notas de distribuição (Feio et al. 2008; Silva et al. 2013), e alguns dados sobre o seu cariótipo (Peixoto et al. 2016), o que dificulta a identificação correta de espécimes relacionados a espécie, além de impossibilitar uma avaliação real de sua distribuição. A amplitude da distribuição geográfica é um dos critérios utilizados para a alocação de espécies em categorias de ameaça pela IUCN, constituindo informação de extrema importância para planejamentos conservacionistas. Dessa forma, no presente estudo nós realizamos uma revisão taxonômica das populações identificadas como *Ololygon tripui*, incluindo os espécimes “aff” e “cf.” depositados em coleções, com base em caracteres de morfologia externa e larval, morfometria, dados acústicos e moleculares, no intuito de definir a posição taxonômica destas populações.

## **Materiais e Métodos**

### ***Morfologia e Morfometria***

Nós coletamos espécimes de *Ololygon tripui* em visitas esporádicas entre abril e dezembro de 2018, nos municípios de Ouro Preto (20°23'02.11"S, 43°32'35.26" W), e

Ervália (20° 52'40.7" S, 42° 31'14.6" W) no estado de Minas Gerais, e em Mimoso do Sul, Espírito Santo (21°02'60"S, 41°15'0.8"W). Os exemplares coletados (autorização do IBAMA 58946-1) foram eutanasiados com o uso de Xilocaína 5%, como anestésico, posteriormente fixados com o uso de formalina (formol 10% em água destilada) e mantidos em potes com álcool 70%. Todos os espécimes fixados foram depositados na coleção de anfíbios do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV).

Nós examinamos um total de 87 exemplares identificados como *Ololygon tripui* (61 machos e 26 fêmeas), provenientes de oito localidades. Os espécimes encontram-se depositados nas seguintes coleções zoológicas: Coleção Herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen, da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV), Coleção de Anfíbios da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNAM) e Coleção Herpetológica do Laboratório de Zoologia da Universidade Federal de Ouro Preto (LZV) (Apêndice I).

Para a análise morfométrica, seguimos Duellman (1970) e Pugliese (2002). Realizamos 18 medidas morfométricas, com o auxílio de paquímetro digital: comprimento rostro-cloacal (CRC); comprimento da cabeça (CC); largura da cabeça (LC); comprimento do fêmur (CF); comprimento da tíbia (CT); comprimento do tarso (CTA); comprimento do pé (CP); comprimento do úmero (CU); comprimento do antebraço (CA); comprimento da mão (CM); diâmetro do olho (DO); diâmetro da narina (DN); diâmetro do tímpano (DT); distância interocular (DIO); distância do olho ao focinho (DOF); distância do olho à narina (DON); distância internasal (DIN); largura do disco adesivo do terceiro dedo (LD3A); e largura do disco adesivo do quarto artelho (LD4A). Foram realizadas análises de componentes principais (PCA), no intuito de verificar o nível de variação morfométrica entre os grupos morfológicos. A análise foi realizada separadamente para machos e fêmeas. As análises estatísticas foram feitas no programa Rstudio (R Core Team 2016).

Para as características morfológicas, seguimos Heyer et al. (1990) para análise do formato da cabeça em vista dorsal e lateral, e fórmula plantar. Para forma dos calos das mãos e pés, língua e saco vocal, seguimos a terminologia proposta por Duellman (1970). Variáveis no padrão de coloração, manchas, desenhos e calosidades distribuídas ao longo do corpo também foram analisadas, seguindo Lourenço et al. (2009) e outros artigos de descrições de *Ololygon* (e.g. Lourenço et al. 2013, Lourenço et al. 2016, Andrade et al. 2018). Para as características larvais seguimos a terminologia de Gosner (1960).

### ***Bioacústica***

Para comparação acústica, utilizamos gravações correspondentes à descrição do canto de anúncio de *O. tripui* (Sousa et al. manuscrito submetido), baseada em 54 cantos de três machos (MZUFV 18476, 18477, 18749) gravados em 6 de julho de 2017 e 27 de maio de 2018, na Estação Ecológica do Tripuí, município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil (20°23'02.11 "S, 43°32'35.26" W, 1184m de altitude, temperatura do ar 10 ° C e 9 ° C, respectivamente), que corresponde a localidade tipo da espécie. Também utilizamos gravações do canto de 3 espécimes (MZUFV 18773, dois sem voucher) da população da Serra do Brigadeiro, Ervália, Minas Gerais (21°42'39" S, 43°54'41" O, 1227m de altitude, temperatura do ar 16,7 ° C), obtidas no dia 15 de novembro de 2017.

Utilizamos um gravador digital Marantz PMD660 com taxa de amostragem de 44,1 kHz e resolução de 16 bits, acoplado a um microfone unidirecional Sennheiser ME66/K6 para registrar o canto de anúncio dos machos. Os parâmetros espectrais e temporais foram medidos usando o software Raven Pro 1.5 (Bioacoustics Research Program 2014). O espectrograma foi gerado com janela tipo Hann; tamanho da janela = 512 amostras; sobreposição = 70%; Tamanho DFT = 1024 amostras; e espaçamento de malha = 43.1 Hz. Os gráficos de som foram obtidos com o pacote Seewave (Sueur *et al.* 2008) da plataforma R (R Core Team 2016), usando janela de Hanning, FFT = 512 e 70% de sobreposição. Nós analisamos os 19 parâmetros acústicos que são usualmente avaliados em descrições de canto de anuros (Tabela 4), seguindo Köhler et al. (2017).

### ***Análise molecular***

Pequenos fragmentos de tecido foram extraídos após eutanásia dos espécimes de cada população de *O. tripui*, obtidos nas coletas das diferentes localidades amostradas, para extração e análise do DNA mitocondrial. Também foi utilizado tecidos doados pela coleção de anfíbios da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNAM) e Laboratório de Sistemática molecular-Beagle da Universidade Federal de Viçosa. Todas as análises moleculares foram realizadas no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Nós sequenciamos fragmentos do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de 12 exemplares identificados como de *O. tripui*, provenientes de quatro localidades: quatro indivíduos de Ouro Preto (localidade tipo), três indivíduos de Nova Lima, quatro indivíduos de Ervália, situadas no estado de Minas Gerais, e um indivíduo de Mimoso do

Sul, Espírito Santo (Apêndice II). Extraímos o DNA utilizando a técnica de extração com fenol clorofórmio para amplificar uma seção do gene mitocondrial COI. As condições de PCR para a amplificação consistiram em 5 µl de dNTP, 5 µl de cada iniciador, 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq polimerase. O programa de ciclagem por PCR foi utilizado: 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min e concluindo com uma extensão de 5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados por Etanol / Acetato de Amônio e sequenciados na Plataforma de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco. Editamos e alinhamos as sequências no software Geneious 7.1.3 (Biomatters). Utilizamos sequências de todas as espécies de *Ololygon* para o gene COI, disponíveis no GenBank (11 espécies) com o algoritmo Muscle. A espécie *Osteocephalus buckleyi* e *Ololygon flavoguttata* foram utilizadas como grupo externo. O comprimento da sequência final usada para as análises filogenéticas foi de 578 pb.

Para verificar o relacionamento filogenético entre as espécies de *Ololygon*, utilizamos métodos de inferência bayesiana no programa Beast v.8.0 (Drummond et al. 2012), com o modelo de substituição GTR + I + G, estabelecido pelo jModelTest (Darriba et al. 2012), e Verossimilhança no programa MEGA 7 (Kumar et al. 2016). As topologias obtidas para os dois métodos tiveram baixos valores de suporte, porém, ambas apresentaram a formação de um clado composto por *O. flavoguttata* e as doze sequências do presente estudo (Figura S1, Figura S2). A partir dos resultados destas análises, realizamos uma terceira análise apenas para o clado *O. flavoguttata* e as sequências do presente estudo, por meio de inferência bayesiana no programa Beast v.8.0, com 20 milhões de geração, utilizando o modelo de substituição GTR + I + G.

Nós calculamos a distância genética (distância-p) entre as linhagens encontradas na árvore de gene, por meio do programa MEGA 7 (Kumar et al. 2016). Para construir a rede de haplótipos utilizamos o programa PopART (Leigh & Bryant 2015).

## **Resultados**

**Varição morfológica** – Após a análise dos 87 exemplares, provenientes de oito localidades, observamos que no geral os espécimes analisados apresentam grande similaridade nos caracteres morfológicos. Entretanto, algumas variações morfológicas, como formato da cabeça, padrão de manchas dorsais e ventrais, presença de glândula

inguinal, possibilitaram a separação de três grupos: *Ololygon tripui*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” e *Ololygon* “Nova Lima”. Espécimes de outras quatro localidades (Caeté, Congonhas, Ouro Branco e Santa Bárbara) por apresentar uma maior similaridade morfológica com *O. tripui*, tiveram sua identificação mantida. Já a população de Mimoso do Sul, não foi possível formar um grupo devido o número reduzido de exemplares para comparação (n = 2).

Os exemplares relacionados ao grupo de *Ololygon tripui*, possuem focinho subovoide em vista dorsal; canto rostral côncavo e bem marcado, fenda vocal presente nos machos; saco vocal não desenvolvido externamente, língua grande não presa nas bordas laterais e posteriores; antebraço não hipertrofiado, prega peitoral ausente; mancha interocular em formato de “W”, um par de faixas em cada flanco, pele do dorso granulada; ventre marrom com manchas beges; região inguinal e áreas ocultas das coxas com manchas marrom em fundo verde claro; presença de glândula externamente diferenciada na região inguinal. O grupo de *Ololygon tripui*, apresenta distribuição na parte sul da Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais.

A morfologia dos exemplares do grupo *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” assemelha-se à *O. tripui*, diferindo deste, dentre outras características descritas a seguir, principalmente por possuir focinho em formato mucronado em vista dorsal, duas faixas brancas na região lateral da cabeça, uma posicionada entre o tímpano e o olho e a outra posicionada abaixo do olho em direção à margem superior da boca, língua alongada e presa nas bordas anterior e laterais, dorso pouco tuberculado quase liso, e ausência de glândula inguinal externamente desenvolvida. Os indivíduos analisados apresentam focinho mucronado em vista dorsal e protuberante em vista lateral, canto rostral bem marcado e côncavo, mancha interocular em forma de “W”, duas faixas brancas na região lateral da cabeça, uma posicionada entre o tímpano e o olho e a outra posicionada abaixo do olho em direção a margem superior da boca, ventre de coloração marrom claro com diversos pontos e manchas beges espalhados, dois pares de faixas escuras dorsolaterais, um par de cada lado do flanco. Exemplares relacionados ao grupo *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” estão distribuídos ao longo do Parque Estadual Serra do Brigadeiro e no município de Simonésia, Minas Gerais.

O grupo morfológico *Ololygon* “Nova Lima” distingue-se dos grupos morfológicos definidos anteriormente principalmente por possuir, focinho arredondado em vista dorsal e protuberante em vista lateral, mancha interocular de cor escura de

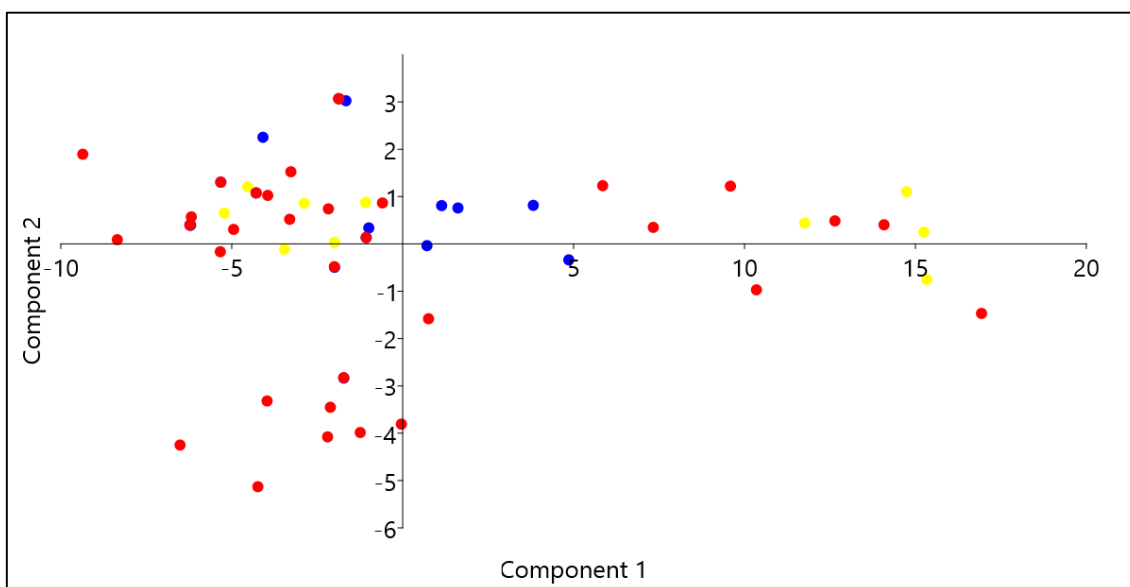
formato trapezoidal e canto rostral levemente marcado. Os exemplares examinados apresentam, focinho arredondado em vista dorsal e protuberante em vista lateral, mancha interocular de cor escura de formato trapezoidal, canto rostral levemente marcado e côncavo, região loreal côncava e oblíqua, ventre de cor creme com diversos pontos e manchas beges espalhados, superfícies dorsais anteriores e posteriores dos braços e pernas apresentam faixas transversais escuras. O grupo morfológico *Ololygon* “Nova Lima” é restrito ao município de Nova Lima, Minas Gerais.

**Varição morfométrica** – Machos – Na Análise de Componentes Principais (PCA) para machos dos grupos morfológicos *Ololygon tripui*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” e *Ololygon* “Nova Lima” os três primeiros componentes principais acumularam 90,48% da variação encontrada (PC1 79,84%; PC2 6,53%; PC3 4,11%). A análise de PCA mostrou que há grande sobreposição entre os espécimes amostrados, não sendo possível a formação de grupos. Os caracteres morfométricos que mais contribuíram para a discriminação obtida estão apresentados na Tabela 1. Os escores individuais dos exemplares analisados foram projetados no espaço reduzido dos dois componentes principais de maiores contribuições (Figura 1).

**Tabela 1.** Correlações das variáveis originais com o PC1, PC2 e PC3 para os 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”.

Variáveis	PC 1	PC 2	PC 3
CRC	0.6743	-0.082898	-0.53146
CC	0.19168	-0.83155	0.43712
LC	0.20948	-0.036381	0.011174
CF	0.28274	0.219	0.55569
CT	0.35038	0.2215	0.16703
CTA	0.17201	0.32642	0.38233
CP	0.2878	-0.073504	-0.11344
CU	0.2231	0.082538	0.052015
CA	0.13983	0.15672	0.06517
CM	0.21636	-0.08299	-0.034386
DO	0.063764	0.0074025	0.12929
DN	0.0018171	0.0238	0.022071
DT	0.023868	0.011151	-0.01166
DIO	0.10572	0.20505	0.039956
DOF	0.10168	0.049275	0.010792
DON	0.072898	0.00046629	-0.0090007
DIN	0.027028	0.044697	-0.046375
LD3A	0.028164	-0.062582	-0.029014

LD4A	0.021048	-0.044358	-0.018687
Autovalor	432.012	353.714	222.848
Proporção da variação (%)	79,84	6,53	4,11
Variação cumulativa (%)	—	—	90,48

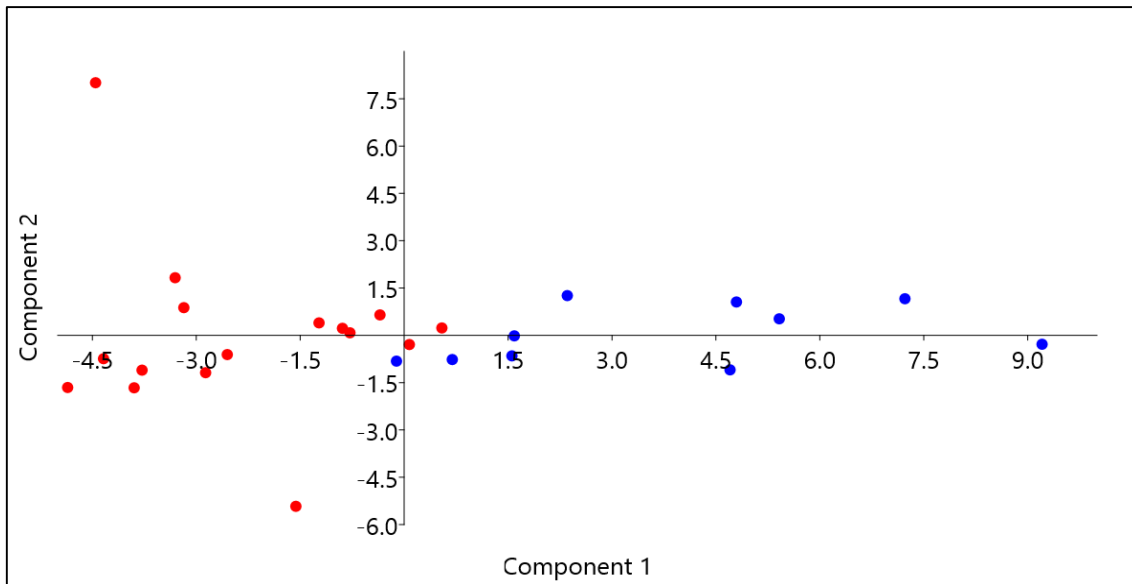


**Figura 1.** Projeção dos dois primeiros eixos da análise dos componentes principais (PCA) para 18 caracteres morfométricos de machos adultos dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* (pontos vermelhos), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (pontos azuis) e *Ololygon* “Nova Lima” (pontos amarelos).

Fêmeas – Na Análise de Componentes Principais para fêmeas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”, os três primeiros componentes foram responsáveis por 81,12% da variância encontrada (Tabela 2). O primeiro componente (PC1) representou 50,41% da variação dos dados e foi influenciado principalmente, pelo comprimento rostro cloacal, comprimento do tarso, comprimento da tíbia e comprimento fêmur. O segundo componente (PC2), responsável por 16,12% da variância encontrada, teve maior contribuição positiva das variáveis comprimento do tarso, comprimento do fêmur e comprimento da cabeça. Já o terceiro componente (PC3) que representou 14,59% da variância encontrada, teve maior contribuição positiva das variáveis comprimento rostro cloacal, comprimento do úmero e comprimento da cabeça. Os escores individuais dos exemplares analisados foram projetados no espaço reduzido dos dois componentes principais de maiores contribuições (Figura 2).

**Tabela 2.** Correlações das variáveis originais com o PC1, PC2 e PC3 para os 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”.

<b>Variáveis</b>	<b>PC 1</b>	<b>PC 2</b>	<b>PC 3</b>
CRC	0.52686	0.11852	0.33712
CC	0.11174	0.15491	0.23062
LC	0.20127	0.14139	0.15432
CF	0.27062	0.26499	0.14566
CT	0.43167	-0.83233	-0.03172
CTA	0.43821	0.29335	-0.80099
CP	0.24519	0.035075	0.0013753
CU	0.059388	0.13741	0.31346
CA	0.17209	0.10212	0.14546
CM	0.2255	0.15436	0.092655
DO	0.092246	0.060338	0.031506
DN	0.048217	0.031629	0.015447
DT	0.067785	0.035981	0.032892
DIO	0.17506	-0.16376	0.017629
DOF	0.11881	0.033173	0.068028
DON	0.091628	-0.0174	0.098975
DIN	0.055929	-0.055736	0.0083504
LD3A	0.011044	0.0047089	0.010802
LD4A	0.04342	0.035561	-0.017239
Autovalor	14,38	4,59	4,16
Proporção da Variação (%)	50,41	16,12	14,59
Variação cumulativa (%)	–	–	81,22



**Figura 2.** Projeção dos dois primeiros eixos da análise dos componentes principais (PCA) para 18 caracteres morfométricos de fêmeas adultas dos grupos morfológicos *Oloolygon tripui* (pontos vermelhos) e *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro” (pontos azuis).

As médias e os desvios padrões das medidas dos espécimes considerada na análise dos componentes principais são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Medidas dos espécimes tipo de *Oloolygon tripui*, *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro”, *Oloolygon* “Nova Lima” e *Oloolygon* “Mimoso do Sul”. Os valores estão apresentados em média, desvio padrão e amplitude. As abreviações estão listadas nos Materiais e Métodos.

	<i>O. tripui</i>		<i>O. "Serra do Brigadeiro" sp. nov.</i>		<i>O. "Nova Lima" sp. nov.</i>	<i>O. "Mimoso do Sul" sp. nov.</i>
	♂ (n= 33)	♀ (n= 16)	♂ (n=16)	♀ (n=10)	♂(n=10)	♂ (n=2)
<b>CRC</b>	25,23 ±4,70 19,18 – 34,3	38,66 ± 1,56 36,3 – 39,97	24,39 ± 2,47 20,85 – 28,63	42,29 ± 1,88 40,50 – 45,23	28,15 ± 5,86 21,97– 35,76	28,82 ± 0,12 28,77 – 28,95
<b>CC</b>	10,81 ± 2,36 8,81 – 14,39	14,79 ± 1,22 13,41 –18,12	9,97 ± 1,26 7,48 – 12,34	14,70 ± 1,30 12,87 –15,82	10,47 ± 2,21 7,91 – 14,15	10,45 ± 0,49 9,98 –14,05
<b>LC</b>	8,52 ± 1,25 6,24 – 11,05	13,44 ± 0,77 12,15 –14,98	8,43 ± 0,91 6,50 – 10,32	14,5 ± 0,98 13,55 –15,61	9,59 ± 2,31 7,65 –13,22	12,01 ± 2,87 9,98 –14,05
<b>CF</b>	11,60 ± 2,30 8,05 – 15,83	17,51 ± 1,36 15,46 – 20,27	11,59 ± 1,50 10,12 – 15,83	19,05 ± 1,08 17,80 – 21,12	12,5 ± 3,07 9,95 –16,94	16,21 ± 1,46 15,18 –17,25
<b>CT</b>	13,47 ± 2,60 10,38 –18,84	19,77 ± 2,53 12,17 – 25,08	12,97 ± 1,45 10,81– 5,15	22,20 ± 1,35 11,75 –15,28	15,16 ± 3,05 12,18– 18,85	17,50 ± 0,02 17,48 –17,53
<b>CTA</b>	7,25 ± 1,56 5,38 –9,98	10,55 ± 0,83 9,28 – 12,11	7,48 ± 1,16 6,23 – 9,52	13,65 ± 1,10 11,75 –15,28	7,9 ± 1,83 5,66 – 10,57	9,11 ± 0,26 8,93 – 9,30

<b>CP</b>	10,60 ± 2,01 7,44 – 14,94	16,41 ± 0,85 14,89 – 17,85	10,26 ± 1,14 9,80 – 11,91	17,93 ± 0,99 16,90 – 20,18	12,47 ± 2,69 9,35 – 16,45	12,49 ± 0,05 12,45 – 12,53
<b>CU</b>	7,46 ± 1,80 3,24 – 10,17	12,07 ± 1,06 10,09 – 13,67	7,35 ± 0,79 6,12 – 8,99	11,92 ± 1,16 0,69 – 14,2	8,41 ± 1,85 6,43 – 10,32	8,67 ± 0,51 8,31 – 9,04
<b>CA</b>	4,45 ± 1,09 2,94 – 6,32	7,25 ± 0,56 6,43 – 8,31	4,66 ± 0,79 3,64 – 6,28	8,22 ± 0,98 6,50 – 9,27	5,33 ± 1,24 4,04 – 6,77	6,42 ± 0,18 6,29 – 6,55
<b>CM</b>	7,95 ± 1,80 5,15 – 11,09	11,83 ± 0,82 10,64 – 13,52	7,74 ± 0,91 6,08 – 8,92	13,12 ± 0,90 11,57 – 14,73	8,6 ± 1,88 6,65 – 11,27	8,86 ± 0,30 8,65 – 9,08
<b>DO</b>	2,93 ± 0,54 1,25 – 3,57	4,04 ± 0,41 3,43 – 5,03	3,18 ± 0,47 2,25 – 3,91	4,62 ± 0,55 4,20 – 5,62	3,23 ± 0,89 2,21 – 5,25	2,59 ± 0,09 2,53 – 2,66
<b>DN</b>	0,28 ± 0,11 0,12 – 0,46	0,43 ± 0,19 0,12 – 0,78	0,41 ± 0,18 0,10 – 0,75	0,79 ± 0,16 0,57 – 1,05	0,17 ± 0,05 0,09 – 0,31	0,37 ± 0,01 0,35 – 0,37
<b>DT</b>	1,02 ± 0,28 0,53 – 1,49	1,53 ± 0,25 0,95 – 1,95	1,13 ± 0,26 0,76 – 1,65	1,83 ± 0,40 1,35 – 2,47	0,98 ± 0,28 0,48 – 1,46	1,07 ± 0,07 1,02 – 1,12
<b>DIO</b>	4,52 ± 0,94 1,87 – 5,94	6,23 ± 0,98 4,52 – 7,62	4,78 ± 0,52 3,97 – 5,63	7,21 ± 0,73 6,35 – 8,84	4,93 ± 1,23 3,62 – 7,29	5,23 ± 0,09 5,17 – 5,30
<b>DOF</b>	4,24 ± 0,71 3,4 – 5,88	6,27 ± 0,41 5,51 – 6,91	4,36 ± 0,47 3,71 – 5,22	6,73 ± 0,73 3,35 – 5,61	4,66 ± 1,14 3,23 – 6,32	4,81 ± 0,10 4,74 – 4,89
<b>DON</b>	2,77 ± 0,53 2,08 – 3,67	4,27 ± 0,48 3,34 – 5,12	2,87 ± 0,54 2,12 – 3,64	4,49 ± 0,73 3,35 – 5,61	3,12 ± 0,85 1,94 – 4,20	3,48 ± 0,46 3,81 – 3,15
<b>DIN</b>	1,27 ± 0,37 0,67 – 1,86	1,84 ± 0,54 1,15 – 3,15	1,28 ± 0,3 0,95 – 1,86	2,03 ± 0,30 1,40 – 2,47	1,35 ± 0,28 0,89 – 1,87	1,38 ± 0,27 1,32 – 1,45
<b>LD3A</b>	1,04 ± 0,26 0,46 – 1,32	1,78 ± 0,19 1,52 – 2,07	0,94 ± 0,26 0,46 – 1,36	1,79 ± 0,26 1,50 – 2,25	1,26 ± 0,38 0,76 – 1,73	1,08 ± 0,07 1,13 – 1,03
<b>LD4A</b>	0,95 ± 0,24 0,39 – 1,26	1,66 ± 0,27 1,18 – 2,31	1,03 ± 0,30 0,39 – 1,44	1,95 ± 0,26 1,30 – 2,23	1,1 ± 0,33 0,74 – 1,55	1,35 ± 0,03 1,33 – 1,38

**Bioacústica** – Foram analisadas gravações de populações das seguintes localidades: Estação Ecológica do Tripui, município de Ouro Preto, (localidade tipo de *O. tripui*) e Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Ervália, estado de Minas Gerais (grupo *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro”). Não foram obtidas gravações de cantos de populações associadas ao grupo morfológico de Nova Lima e Mimoso do Sul.

As gravações referentes ao grupo de *Oloolygon tripui* apresentaram duas vocalizações distintas, que aqui chamamos de canto “A” (canto de anúncio) e canto “B” (canto territorial) de acordo com a similaridade acústica com o canto de outras espécies de *Oloolygon* (e.g. Hepp et al. 2017, Bang & Giaretta 2018). O canto de anúncio (canto tipo “A”) é composto de quatro a sete notas multipulssionadas (n=11 cantos, 3 indivíduos), com duração de 0,46 a 1,35s ( $\bar{X}$  = 0,92s ± 0.24). Cada nota consiste de 1 a 4 pulsos ( $\bar{X}$  = 2.9 pulsos por nota ± 1.1) e taxa de emissão de notas por segundo de 5.2 a 8.6

( $\bar{X}$  = 6.2 notas/s  $\pm$  1.3). A frequência dominante do canto varia de 2, 437.5 a 3, 468.8 Hz ( $\bar{X}$  = 2, 754.5 Hz  $\pm$  255.6). O canto territorial (canto tipo “B”), foi mais frequente (79,6%; n = 43 cantos) e frequentemente emitido isoladamente. Essa chamada foi caracterizada por uma única nota pulsada, contendo de 16 a 46 pulsos por nota ( $\bar{X}$  = 26.7 pulsos/nota  $\pm$  9.4), com duração de 0,095 a 0,83s ( $\bar{X}$  = 0,38s  $\pm$  0,24), com forte tendência a formar múltiplos grupos de pulsos. Cada nota pode ter de 3 a 12 grupos de pulsos ( $\bar{X}$  = 6,71 grupos de pulsos  $\pm$  2,33) emitidos irregularmente, podendo variar de 6,2 a 34,7 grupos de pulsos /s ( $\bar{X}$  = 18,2 grupos de pulsos/s  $\pm$  5,9). A frequência dominante foi em torno de 2, 437,5 a 3, 515,6 Hz ( $\bar{X}$  = 2,912,2 Hz  $\pm$  289,9).

O grupo morfológico *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” também apresentou dois tipos de canto, os quais definimos anteriormente como canto “A” e canto “B”. O canto “A” é composto por 5 a 37 notas multipulsionadas (n = 30 cantos, 3 indivíduos), diferindo de *Ololygon tripui* principalmente pela maior amplitude na duração do canto que varia de 0,064 a 5,32s ( $\bar{X}$  = 2.22s  $\pm$  1.16); número de notas por canto de 5 a 37 ( $\bar{X}$  = 15.6 notas por canto  $\pm$  7.4); número de pulsos por nota variando de 1 a 8 pulsos ( $\bar{X}$  = 4.7 pulsos por nota  $\pm$  1.6) e frequência dominante que varia de 2, 296.9 a 4, 312.5Hz ( $\bar{X}$  = 3, 030.5 Hz  $\pm$  394.1). O canto “B” é composto por uma única nota formada por 16 a 63 pulsos por nota ( $\bar{X}$  = 34,86 pulsos por nota  $\pm$  14,15), com duração de 0,18 a 0,78s ( $\bar{X}$  = 0,40s  $\pm$  0,14), podendo formar grupos de pulsos. Cada nota pode apresentar de 3 a 12 grupos de pulsos ( $\bar{X}$  = 34,86 grupos de pulso por nota  $\pm$  14,15), e frequência Dominante podendo variar de 2343,80 a 3750,00Hz ( $\bar{X}$  = 3012Hz  $\pm$  325,76) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros acústicos dos cantos de *Ololygon tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro”. Os valores apresentados representam a média, desvio padrão e amplitude.

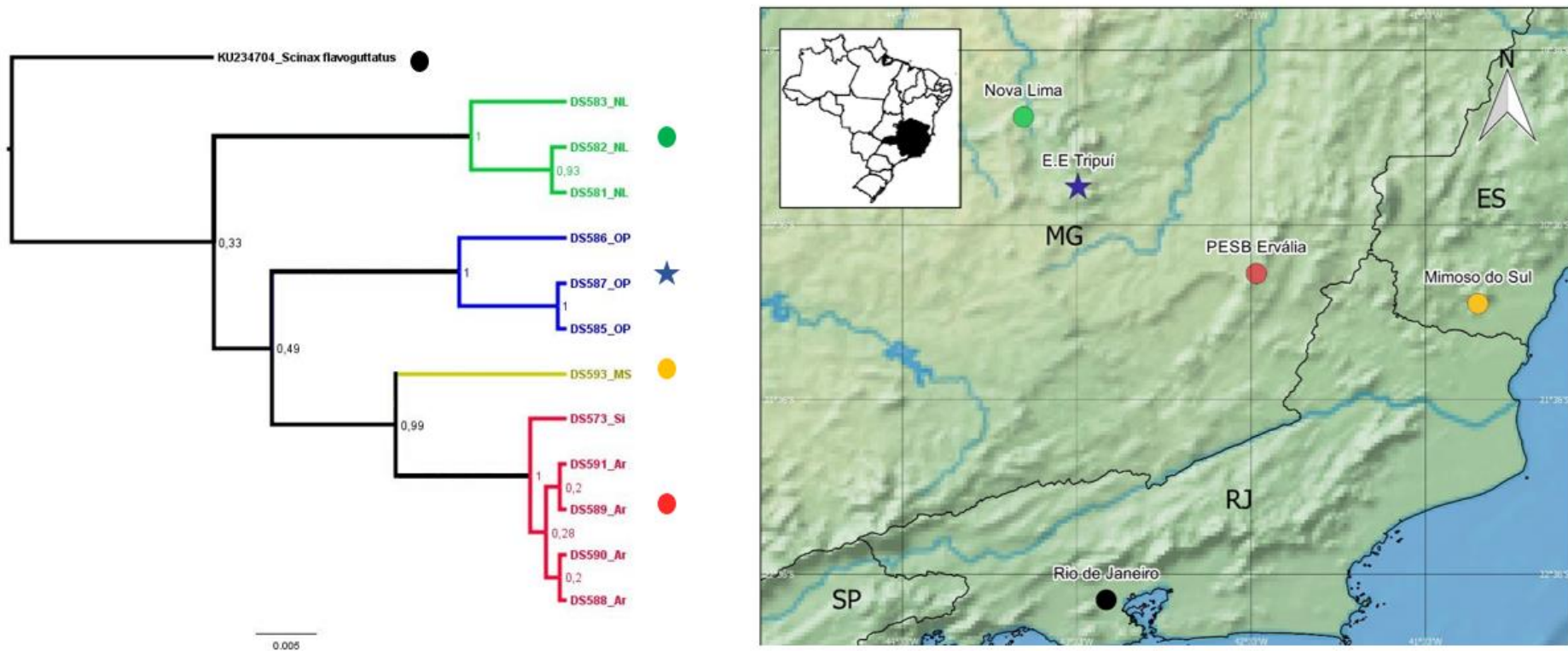
	Estação Ecológica Tripui		Serra do Brigadeiro	
	Canto “A”	Canto “B”	Canto “A”	Canto “B”
<b>Taxa de canto (cantos/min)</b>	4.6 $\pm$ 6.2 (0.6 – 11.7) n = 3	–	3.1 $\pm$ 0.9 (2.4 – 3.7) n = 2	–
<b>Duração do canto (s)</b>	0.92 $\pm$ 0.24 (0.46 – 1.35) n = 11	–	2.22 $\pm$ 1.16 (0.64 – 5.32) n = 30	–
<b>Intervalo entre os cantos(s)</b>	87.5 $\pm$ 69.2 (9.2 – 211.1) n = 7	–	18.3 $\pm$ 39.9 (0.2 – 173.9) n = 28	–

<b>Nº de notas por canto</b>	5.5 ± 0.93 (4 – 7) n = 11	1	15.6 ± 7.4 (5 – 37) n = 30	1
<b>Taxa de notas (notas/s)</b>	6.2 ± 1.3 (5.2 – 8.6) n = 11	27.8 ± 22.5 (0.72 – 61.3) n = 9	7.2 ± 0.5 (5.9 – 8.0) n = 30	2.5 ± 0.4 (2.2 – 2.8) n = 2
<b>Duração da nota (ms)</b>	11.7 ± 5.2 (3.0 – 26.0) n = 60	388.4 ± 246.4 (95 – 839) n = 43	15.1 ± 4.8 (3 – 41) n = 468	459.3 ± 280.2 (293 – 1,527) n = 21
<b>Pico de amplitude (%)</b>	30.8 ± 11.8 (7.7 – 60) n = 59	–	34.1 ± 12.7 (5.5 – 87.5) n = 466	–
<b>Intervalo entre as notas (s)</b>	0.192 ± 0.036 (0.114 – 0.232) n = 49	21.2 ± 45.9 (0.617 – 212.04) n = 34	0.136 ± 0.017 (0.068 – 0.312) n = 438	27.4 ± 50.9 (1,217 – 174.9) n = 18
<b>Pulsos por nota</b>	2.9 ± 1.1 (1 – 4) n = 26	26.7 ± 9.4 (16 – 46) n = 20	4.7 ± 1.6 (1 – 8) n = 466	34.8 ± 14.1 (16 – 63) n = 22
<b>Taxa de pulsos(pulsos/s)</b>	392.3 ± 54.1 (333.3 – 500) n = 26	85.2 ± 26.0 (51.75 – 130.4) n = 20	348.1 ± 108.0 (73.2 – 714.3) n = 442	92.4 ± 37.1 (43.1 – 174.5) n = 22
<b>Nº de grupos de pulsos por nota</b>	–	6.2 ± 4.2 (1 – 17) n = 43	–	6.7 ± 2.3 (3 – 12) n = 21
<b>Taxa de grupo de pulsos (G.P./s)</b>	–	18.2 ± 5.9 (6.2 – 34.7) n = 38	–	15.9 ± 3.5 (7.8 – 20.5) n = 21
<b>Duração do grupo de pulsos (ms)</b>	–	33.6 ± 25.5 (5 – 198) n = 262	–	48.5 ± 48.4 (11 – 451) n = 141
<b>Pico de amplitude (% entre G.P.)</b>	–	41.7 ± 22.7 (2 – 94.7) n = 261	–	36.5 ± 17.6 (6.9 – 89.1) n = 141
<b>Intervalo entre os grupos de pulsos (ms)</b>	–	30.3 ± 15.7 (8 – 80) n = 224	–	23.4 ± 82.2 (2 – 900) n = 120
<b>Pulsos por grupo de pulsos</b>	–	3.9 ± 2.8 (1 – 20) n = 237	–	5.1 ± 4.8 (1 – 23) n = 141
<b>Taxa de pulsos (pulsos/s entre G.P.)</b>	–	117.8 ± 40.6 (50 – 297.3) n = 192	–	104.4 ± 48.9 (33.3 – 277.8) n = 141
<b>Frequência Dominante (Hz)</b>	2,754.5 ± 255.6 (2,437.5 – 3,468.8) n = 59	2,912.2 ± 289.9 (2,437.5 – 3,515.6) n = 267	3,030.5 ± 394.1 (2,296.9 – 4,312.5) n = 468	3,012.3 ± 325.7 (2,343.8 – 3,750.0) n = 141
<b>90% frequency bandwidth</b>	2,109.4 – 2,531.2	2,062.5 – 4,453.1	1,546.9 – 5,109.4	2,203.1 – 4,828.1

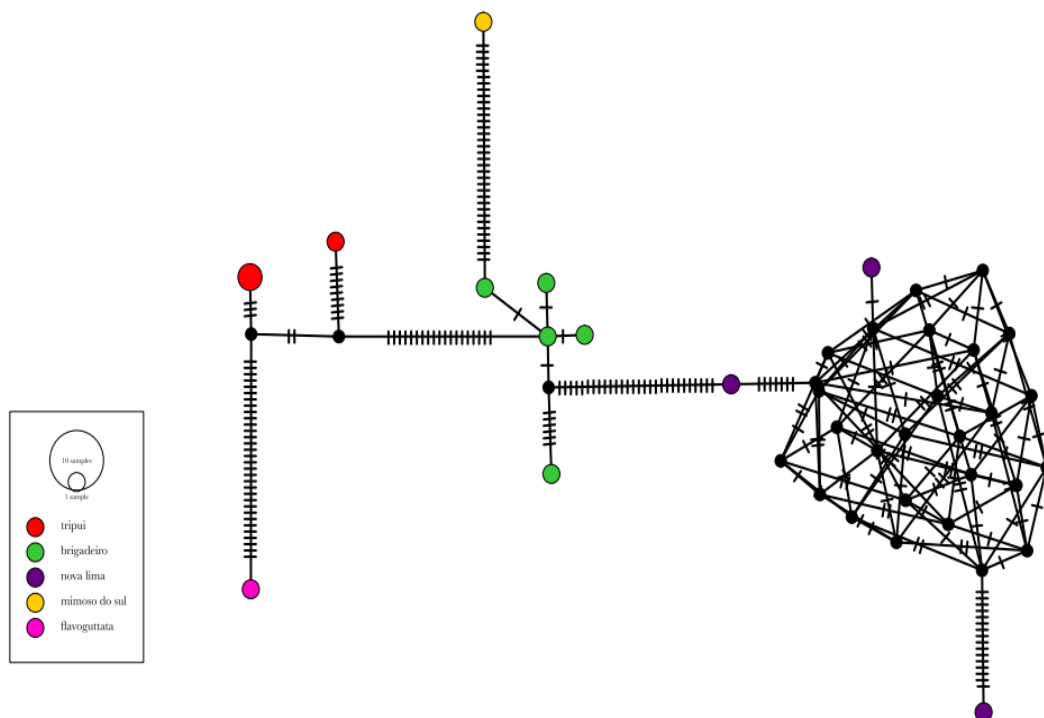
**Molecular** – A árvore de gene recuperou quatro linhagens, *Oloolygon tripui*, e outras três novas linhagens: *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro”, *Oloolygon* “Mimoso do Sul” e *Oloolygon* “Nova Lima”. A linhagem *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro” formou um clado irmão com *Oloolygon* “Mimoso do Sul”, que por sua vez formaram um clado irmão de *Oloolygon tripui*. Estas três linhagens foram recuperadas como um clado irmão de *Oloolygon* “Nova Lima” (Figura 3).

Por meio da rede de haplótipos é possível observar que não existe compartilhamento de haplótipos entre as linhagens encontradas na árvore de gene. Além disso, o número de passos mutacionais entre as linhagens é superior ao observado entre haplótipos de ma mesma linhagem (Figura 4).

A distância genética (distância-p) entre as linhagens encontradas na árvore de gene, para o gene mitocondrial COI variou de 3,5% a 19% (Tabela 5). *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro” e *O. tripui* apresentaram a menor distância genética (3,5%) entre as linhagens avaliadas. *Oloolygon* “Mimoso do Sul” apresenta os maiores valores de distância genética entre as linhagens avaliadas (5 a 19%).



**Figura 3.** Árvore de gene obtida a partir de inferência bayesiana para o gene COI e o local de coleta de *Ololygon tripui* (estrela azul), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (ponto vermelho), *Ololygon* “Nova Lima” (ponto verde), *Ololygon* “Mimoso do Sul” (ponto amarelo) e *Ololygon flavoguttata* - grupo externo (ponto preto).



**Figura 4.** Rede de haplótipos para o gene COI de *Ololygon tripui* (círculo vermelho), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (círculo verde), *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (círculo roxo), *Ololygon* “Mimoso do Sul” (círculo amarelo) e *Ololygon flavoguttata* (círculo lilás). Os traços representam o número de passos mutacionais em ramos que possuem mais de um passo.

**Tabela 5.** Distância-p para o gene COI entre as espécies *Ololygon longilinea*, *Ololygon* “Mimosos do Sul” (MS), *O. flavoguttata*, *Ololygon* “Nova Lima” (NL), *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” (Brigadeiro) e *O. tripui*.

Espécies	1	2	3	4	5
1 <i>O. longilinea</i>	-				
2 <i>Ololygon</i> "MS"	0,190	-			
3 <i>O. flavoguttata</i>	0,143	0,081	-		
4 <i>Ololygon</i> "NL"	0,177	0,060	0,069	-	
5 <i>Ololygon</i> "Brigadeiro"	0,150	0,053	0,053	0,056	-
6 <i>Ololygon tripui</i>	0,139	0,071	0,050	0,061	0,035

**Considerações taxonômicas** – Os resultados obtidos no presente estudo permitiram o reconhecimento de quatro linhagens distintas sob o táxon *O. tripui*, com base em caracteres morfológicos, morfométricos, bioacústicos e moleculares. Três linhagens são inéditas, chamadas aqui de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” com distribuição conhecida apenas para a localidade tipo Parque Estadual Serra do Brigadeiro e Simonésia; *Ololygon* “Nova Lima”, também conhecida apenas para a localidade tipo (município de Nova Lima, Minas Gerais) e *Ololygon* “Mimoso do Sul” registrado no Monumento Natural Estadual Serra das Torres, no município de Mimoso do Sul, no estado do Espírito Santo. Dessa forma, realizamos abaixo a descrição de “Serra do Brigadeiro” e “Nova Lima”. Embora a distância-p para o gene COI tenha sido de 7,1% entre *Ololygon* “Mimoso do Sul” de *O. tripui*, até o momento não podemos distinguir estas duas linhagens pois não temos material suficiente para comparar os caracteres diagnósticos. Assim, decidimos não descrever a população de Mimoso do Sul no presente estudo, apesar de representar uma nova espécie.

***Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento & Pires, 2009)**

**Material tipo** – Parátipos: Machos: MCNAM 7741, coletado em 23 de abril de 2004; MCNAM 7742– 7744, coletados em 8 de agosto de 2004; MCNAM 7745–7746, coletados em 15 de abril de 2005; MCNAM 7747-7749, coletados em maio de 2005; MCNAM 7751-7754, coletados em 18 de maio de 2005; MCNAM 7759-7761, coletados em 14 de outubro de 2006. Fêmeas: MCNAM 7750, coletada em 17 de junho de 2005; MCNAM 7756, coletada em 24 de julho de 2005; MCNAM 7755, coletada em 19 de agosto de 2005; MCNAM 7758, coletada em 3 de setembro de 2005. Todos estes espécimes foram coletados por A.C.C. Lourenço, D. Baetat, L. O. Drummond, M. D. Cid Brum, V. L. Guedes e V. S. Monteiro. A lista completa de espécimes analisados encontra-se no apêndice I.

**Localidade tipo** – Estação Ecológica do Tripuí, Município de Ouro Preto, Estado de Minas Gerais, Brasil (20°23'22''S 43°02'32''O).

**Etimologia** – O nome da espécie é derivado do termo Tupi-Guarani Ityrapoi que significa “colina delgada”, e também corresponde ao nome da localidade tipo da espécie, Estação Ecológica do Tripui.

**Diagnose** – Espécie caracterizada por: (1) CRC dos machos 21,3-26,2 mm e das fêmeas 37,0-39,2 mm; (2) focinho subovoide em vista dorsal; (3) canto rostral côncavo e marcado; (4) região loreal côncava e oblíqua; (5) fenda vocal presente; (6) saco vocal não desenvolvido externamente; (7) antebraço não hipertrofiado nos machos; (8) ausência de ácinos glandulares macroscópicos na região peitoral; (9) prega peitoral ausente; (10) presença de ácinos glandulares macroscópicos na região medial do braço; (11) presença de ácinos glandulares macroscópicos na região dorsal dos dedos II e III; (12) machos apresentam almofada nupcial na região medial do dedo II, mas não hipertrofiada; (13) região dorsomedial do dedo II não pigmentada de preto nos machos; (14) mancha interocular em formato de “W” que ultrapassa levemente o espaço interocular; (15) um par de faixas dorsolaterais, uma faixa em cada flanco, origina-se na região posterior dos olhos e estende-se até a metade do comprimento do corpo; (16) pele do dorso granulada; (17) ventre marrom com grande densidade de manchas irregulares bege igualmente distribuídas; (18) em vida, região inguinal e áreas ocultas das coxas apresentam manchas aureoladas marrons em fundo verde-claro; (19) presença de glândulas externamente diferenciadas na região inguinal dos machos; (20) membrana interdigital desenvolvida entre os artelhos IV e V, atingindo a base do disco adesivo na margem medial do artelho V; (21) Canto de anúncio composto de 4–7 notas multipulssionadas, com duração de 0,46 a 1,35s ( $\bar{X}$  = 0,92s  $\pm$  0.24); cada nota consiste de 1–4 pulsos ( $\bar{X}$  = 2.9 pulsos por nota  $\pm$  1.1); taxa de emissão de notas por segundo de 5.2 a 8.6 ( $\bar{X}$  = 6.2 notas/s  $\pm$  1.3); frequência dominante do canto varia de 2, 437.5 a 3, 468.8 Hz ( $\bar{X}$  = 2, 754.5 Hz  $\pm$  255.6).

**Comparação com outras espécies** – *Ololygon tripui* difere de *O. agilis*, *O. argyreornata*, *O. melanodactyla* e *O. skuki* por apresentar machos maiores (CRC 19,2 – 34,3 mm; 12.0 – 18.4 mm de CRC de machos combinados para estas espécies), e por apresentar fêmeas maiores (CRC 36,3 – 39,9 mm) que *O. agilis*, *O. albicans*, *O. angrensis*, *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. carnevallii*, *O. centralis*, *O. goya*, *O. heyeri*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. jureia*, *O. kautskyi*, *O. littoralis*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. melanodactyla*, *O. obtriangulata*, *O. pombali*, *O. ranki*, *O. rizibilis*, *O. skaios* e *O. skuki* (14,7–38,8 mm combinados para estas espécies). O canto

rostral marcado, difere *O. tripui* de *O. agilis*, *O. albicans*, *O. argyreornatus*, *O. aromothyella*, *O. Berthae*, *O. machadoi*, *O. melanodactylus*, *O. ranki* e *O. rizibilis* (não está bem marcado nessas espécies). A mancha interocular em forma de “W” diferencia *O. tripui* de *O. agilis*, *O. albicans*, *O. argyreornata*, *O. ariadne*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. brieni*, *O. canastrensis*, *O. catharinae*, *O. centralis*, *O. goya*, *O. hiemalis*, *O. jureia*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. rizibilis* e *O. skaios*, que possuem um triângulo invertido e, às vezes, em forma de “T”, e de *O. trapicheiroi* que a mancha em forma de “W” ultrapassa a região interocular e chega próximo ao meio do corpo. Em vida, a coloração verde claro na região inguinal e nas superfícies ocultas da coxa, distinguem *O. tripui* de *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. canastrensis*, *O. centralis*, *O. flavoguttata*, *O. heyeri*, *O. longilinea*, e *O. machadoi* (amarelo ou laranja nestas espécies), *O. luizotavioi* (marrom marmorado), *O. brieni* e *O. trapicheiroi* (azulado), *O. humilis* (azul turquesa pálido), *O. obtriangulata* (violeta acinzentado), *S. skaios* (manchas vermiculadas marrom-escuras em fundo verde-claro). O focinho subovoide em vista dorsal diferencia *O. tripui* de *O. ariadne*, *O. aromothyella*, *O. brieni*, *O. catharinae*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. jureia*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. strigilata* e *O. trapicheiroi* (focinho sub-elíptico nestas espécies) de *O. angrensis*, *O. argyreornata*, *O. canastrensis*, *O. centralis*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi* e *O. rizibilis* (espécies com focinho arredondado); de *O. machadoi* (focinho truncado) e de *O. muriciensis* e *O. skuki* (focinho mucronado). A presença de fenda vocal diferencia *O. tripui* de *O. ariadne* e *O. skaios*, que não possuem. O antebraço não hipertrofiado diferencia *O. tripui* de *O. aromothyella*, *O. goya*, *O. jureia* e *O. skaios* (machos com antebraço hipertrofiado). Por apresentar almofada nupcial modificando a largura do dedo II, mas não hipertrofiada, *O. tripui* difere de *O. centralis*, *O. jureia*, *O. kautskyi* e *O. skaios* (almofada nupcial não distinta para estas espécies). Por apresentar glândula inguinal externamente diferenciada, difere de *O. aromothyella*, *O. carnevallii*, *O. centralis* e *O. kautskyi* (espécies que não apresentam glândulas externamente visíveis nesta região; hipertrofiada em *O. centralis*).

**Redescrição** – A descrição do holótipo é apropriada (Lourenço et al. 2009).

**Girino** – A descrição do girino é apropriada (Lourenço et al. 2009).

**Vocalização** – Descrição apropriada (Sousa et al. artigo I).

***Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov.**

Figuras 5-6.

***Holótipo*** – MZUFV 12401, macho adulto, coletado em lagoa das bromélias no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, município de Ervália, estado de Minas Gerais, Brasil (21°42'39" S, 43°54'41" O, 1227m a.s.l.), em 05 de julho de 2012, por Guimarães, C.S.; Feio, R. N.; Santos, P.S.

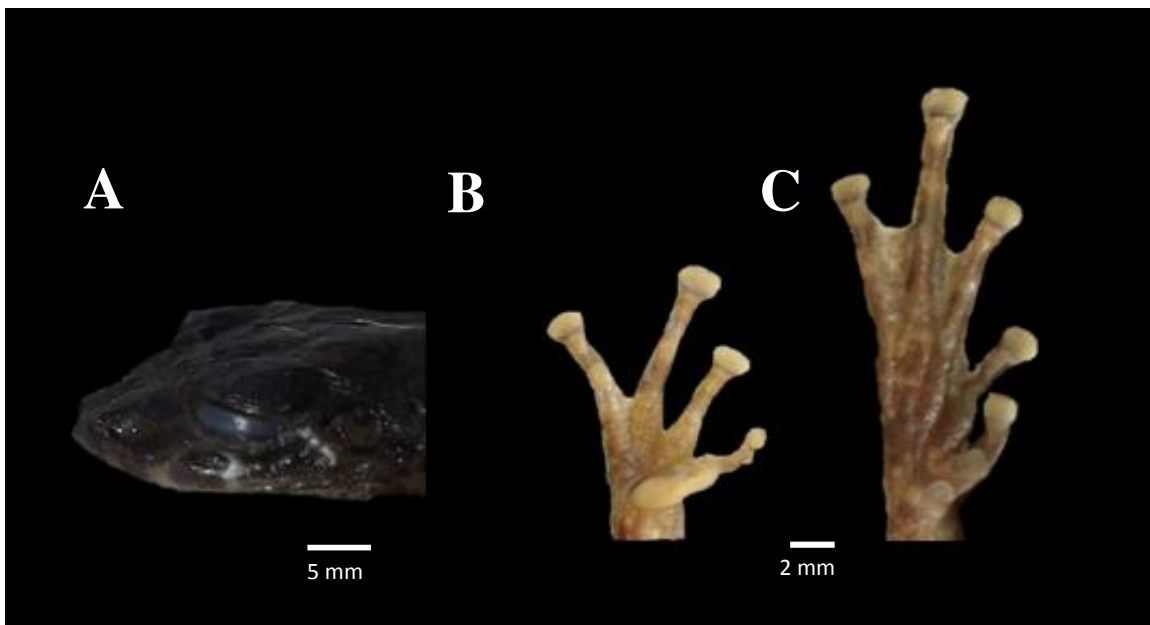
***Paratopótipo*** – MZUFV 18562, macho adulto, coletado em 24 de novembro de 2016 no Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Ervália, Minas Gerais por Rocha, P.C.; Avelar, L., MZUFV 18745- 47, coletados em 05 de maio de 2017 no Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Ervália, Minas Gerais por Feio, R. N.

***Parátipo*** – MZUFV 18773, macho coletado em 13 de novembro de 2017, no Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Ervália, Minas Gerais por Rocha, P.C.; MZUFV 192664, em 25 de outubro de 2017 por Guimarães, C.S.; Rocha, P.C.; Santana, D.J.

***Diagnose*** – A nova espécie é diagnosticada pela seguinte combinação de caracteres: (1) porte médio (machos 20,8-28,6 mm, fêmeas 39,5- 45,2 mm), (2) mancha interocular em forma de “W” e manchas de formas ameboides de coloração verde claro na região inguinal e áreas ocultas das coxas, (3) focinho mucronado em vista dorsal e protuberante em vista lateral, (4) canto rostral bem marcado e côncavo, (5) duas faixas brancas na região lateral da cabeça, uma posicionada entre o tímpano e o olho e a outra posicionada abaixo do olho em direção a margem superior da boca, (6) prega peitoral ausente, (7) ventre de coloração marrom claro com diversos pontos e manchas beges espalhados, (8) dois pares de faixas escuras dorsolaterais, um par de cada lado do flanco, (9) canto de anúncio possui de 5 a 37 notas multipulsionadas, com duração de 0,003 à 0,041s ( $\bar{X}$ = 0,015s  $\pm$  0,005, n=30), cada nota apresenta de um a oito pulsos ( $\bar{X}$ = 4,75 pulsos/nota  $\pm$ 1,63, n= 466), taxa de emissão de pulsos por segundo varia de 73,17 a 714,29 ( $\bar{X}$ = 348,17 pulsos/s  $\pm$  108,03, n=466) e frequência dominante atingindo de 2296,9 a 4312,5Hz ( $\bar{X}$ = 3030,5 Hz  $\pm$  394,1, n=468).



**Figura 5.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (holótipo, macho, MZUFV 12401, CRC 26,4mm): (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral.



**Figura 6.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (holótipo, macho, MZUFV 12401): (A) Vista lateral da cabeça; (B) Vista ventral da mão direita e (C) Vista ventral do pé direito.

*Comparações com outras espécies* – *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. diferencia das espécies do grupo *O. perpusilla* por reproduzir em riachos (espécies do grupo *O. perpusilla* se reproduzem exclusivamente em bromélias).

sp. nov. difere de *O. agilis*, *O. argyreornata*, *O. melanodactyla* e *O. skuki* por apresentar machos maiores (CRC 20,8 – 28,6mm; 12.0 – 18.4 mm de CRC de machos combinados para estas espécies), e por apresentar fêmeas maiores (CRC 40,5 – 45,1 mm) que *O. agilis*, *O. albicans*, *O. angrensis*, *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. carnevallii*, *O. centralis*, *O. goya*, *O. heyeri*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. jureia*, *O. kautskyi*, *O. littoralis*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. melanodactyla*, *O. obtriangulata*, *O. pombali*, *O. ranki*, *O. rizibilis*, *O. skaios*, *O. skuki*, e *O. tripui* (14,7–39,2 mm combinados para estas espécies). O canto rostral marcado, difere *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. agilis*, *O. albicans*, *O. argyreornatus*, *O. aromothyella*, *O. Berthae*, *O. machadoi*, *O. melanodactylus*, *O. ranki* e *O. rizibilis* (não está bem marcado nessas espécies). A mancha interocular em forma de “W” diferencia *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. agilis*, *O. albicans*, *O. argyreornata*, *O. ariadne*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. brieni*, *O. canastrensis*, *O. catharinae*, *O. centralis*, *O. goya*, *O. hiemalis*, *O. jureia*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. rizibilis* e *O. skaios*, que possuem um triângulo invertido e, às vezes, em forma de “T”, e de *O. trapicheiroi* que a mancha em forma de “W” ultrapassa a região interocular e chega próximo ao meio do corpo. Em vida, a coloração verde claro na região inguinal e nas superfícies ocultas da coxa, distinguem *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. canastrensis*, *O. centralis*, *O. flavoguttata*, *O. heyeri*, *O. longilinea*, e *O. machadoi* (amarelo ou laranja nestas espécies), *O. luizotavioi* (marrom marmoreado), *O. brieni* e *O. trapicheiroi* (azulado), *O. humilis* (azul turquesa pálido), *O. obtriangulata* (violeta acinzentado), *S. skaios* (manchas vermiculadas marrom-escuras em fundo verde-claro). O focinho mucronado em vista dorsal diferencia *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. ariadne*, *O. aromothyella*, *O. brieni*, *O. catharinae*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. jureia*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. strigilata* e *O. trapicheiroi*; o focinho sub-elíptico de *O. angrensis*, *O. argyreornata*, *O. canastrensis*, *O. centralis*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi* e *O. rizibilis* (espécies com focinho arredondado); difere de *O. flavoguttata*, *O. goya*, *O. heyeri*, *O. skaios* e *O. tripui* (possuem focinho subovoide); e de *O. machadoi* (focinho truncado). A presença de fenda vocal diferencia *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. ariadne* e *O. skaios*, que não possuem. Por não apresentar saco vocal notavelmente expandido externamente, *O. “Serra do Brigadeiro”* sp. nov. difere de *O. aromothyella*, *O. berthae* e *O. rizibilis* (espécies com saco vocal expandido externamente). Por apresentar alguns tubérculos na região dorsal, difere de *O. aromothyella* (dorso liso) e *S. skaios*

(rugoso) e de *O. carnevallii* e *O. tripui* (dorso com muitos tubérculos). O antebraço não hipertrofiado diferencia *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. aromothyella*, *O. goya*, *O. jureia* e *O. skaios* (machos com antebraço hipertrofiado). Por apresentar almofada nupcial modificando a largura do dedo II, mas não hipertrofiada, difere de *O. centralis*, *O. jureia*, *O. kautskyi* e *O. skaios* (almofada nupcial não distinta para estas espécies). A ausência de uma glândula inguinal diferenciada externamente distingue *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. ariadne*, *O. brieni*, *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. catharinae*, *O. centralis*, *O. flavoguttata*, *O. jureia*, *O. hiemalis*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi*, *O. obtriangulata*, *O. rizibilis*, e *O. tripui* (hipertrofiada em *O. centralis* e externamente diferenciada nas outras espécies).

**Descrição do holótipo** – CRC 26,4 mm. Corpo delgado de tamanho médio, cabeça ligeiramente mais larga que longa (largura da cabeça representa 37,5% do CRC, comprimento da cabeça representa 36% do CRC); focinho mucronado em vista dorsal e protuberante em vista lateral; narina protuberante imediatamente antes da ponta do focinho, localizadas lateralmente, separadas entre si por distância equivalente a 41,3% do diâmetro do olho. Olhos grandes posicionados lateralmente, diâmetro do olho 30% do comprimento da cabeça e 11% do comprimento rostro-cloacal (CRC); distância olho-narina aproximadamente 33% do comprimento da cabeça; mancha interocular em forma de “W”; canto rostral bem marcado e côncavo, região loreal côncava; tímpano de formato arredondado, com diâmetro de 44% do DO; prega supratimpânica bem marcada, estendendo-se do canto posterior do olho até a região anterior do ombro; língua alongada, e não presa nas bordas posterior; fenda vocal presente; duas séries transversais de cinco dentes vomerianos posicionados entre as coanas, saco vocal não expandido externamente. Antebraços mais curtos e largos que os braços; margens externas dos antebraços lisa; tubérculo metacarpal interno único e elíptico; metacarpo externo grande e bilobado; tubérculos subarticulares arredondados, poucos tubérculos supranumerários pequenos e arredondados; membrana intergital ausente entre os dedos II e III, e vestigial entre os outros dedos; discos adesivos dos dedos elípticos, comprimento relativo dos dedos II < III = V < IV; A área glandular na margem medial do dedo II desenvolveu-se formando uma almofada nupcial não pigmentada. Tubérculo metatarsal interno único, arredondado; tubérculo metatarsal externo único, pequeno e oval; tubérculos subarticulares simples, arredondados, poucos tubérculos supranumerários simples, arredondados. Comprimento

relativo dos artelhos I <II <V ≤ III <IV dedos com fórmula das membranas interdigitais dos pés I — III<sup>+</sup> — 1<sup>1/2</sup>III2<sup>+</sup> — 3-IV3<sup>-</sup> — 1<sup>+</sup>V. Discos adesivos pequenos, mais largos que longos. Superfície dorsal pouco granulada, com maior disposição de grânulos nas regiões dos flancos e do ventre.

**Medidas do holótipo (mm)** – CRC 26,4; CC 9,9; LC 9,5; CF 12,3; CT14,6; CTA7,4; CP 11,3; CU 7,9; CA 5,1; CM 8,1; DO 2,9; DN 0,4; DT 1,3; DIO 4,6; DOF 4,8; DON 3,2; DIN 1,2; LD3A 0,97; LD4A 1,1.

**Coloração em vida** – Região dorsal marrom, com manchas irregulares de coloração marrom claro (Figura 7). Dois pares de faixas escuras dorsolaterais, um par em cada flanco. Apresenta uma mancha interocular escura em forma de “W”. Olho de coloração castanho. Duas faixas brancas posicionadas próximas ao olho e tímpano. Região ventral de coloração marrom claro com diversos pontos e manchas beges espalhados. Superfície dorsal das pernas e braços com barras transversais escuras contrastadas com fundo claro. Região inguinal e partes ocultas das coxas apresentam machas verdes claro com formato ameboides.



**Figura 7.** *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. em vida, proveniente do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, município de Ervália, Minas Gerais. Foto: Leandro Avelar.

**Coloração após fixação** – A coloração geral do dorso e ventre permanece. O padrão de manchas dorsais e as faixas brancas próximas do olho permanecem nítidos. As manchas das coxas e região inguinal perdem a pigmentação verde claro.

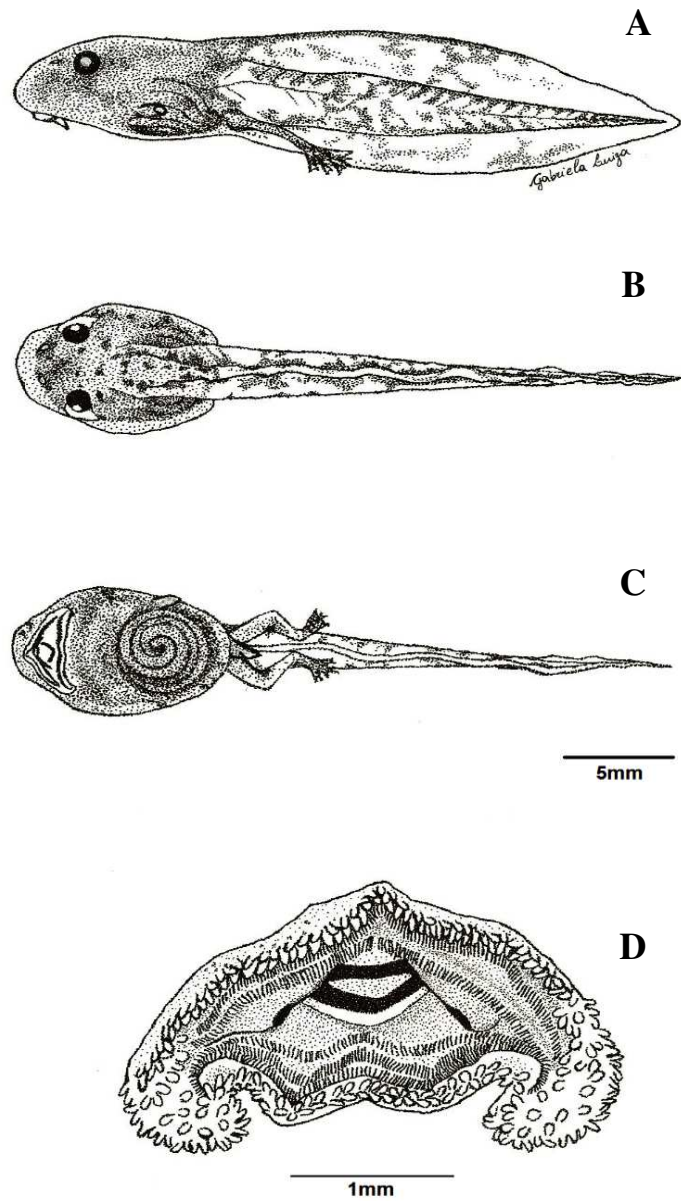
**Variação** – As principais diferenças observadas entre os exemplares analisados está relacionada à coloração da região ventral, que apresenta variação de intensidade de cor, desde creme com pontos esbranquiçados a marrom com manchas beges. Dentes vomerianos podendo apresentar fileiras de 5 a 6 dentículos. Além disso, as fêmeas são relativamente maiores que os machos em todos os caracteres morfométricos examinados (Tabela 3).

**Descrição do girino** (Figura 8, Figura 9) – Corpo oval, ligeiramente deprimido e alongado com focinho arredondado. Olhos posicionados dorsolateralmente, afastados entre si. Narinas dorsais de formato oval, situadas um pouco mais próxima do olho que do focinho. Espiráculo curto, com abertura pequena voltada para a cauda e para o dorso, sinistro, situado pouco abaixo do meio do corpo. Tubo anal curto, preso ao lado direito da membrana inferior da cauda, abrindo para esse mesmo lado. Cauda mais alta que o corpo. Nadadeira dorsal e ventral igualmente desenvolvida, surgindo no terço final do corpo um pouco antes da inserção da musculatura. Musculatura caudal com afilamento gradativo e extremidade afilada. Disco oral ventral modificado em tudo protractil, circundado por duas fileiras de papilas pequenas. No bordo lateral as papilas são mais numerosas e de formas arredondadas. Fórmula dentária 2(2)/3, as fileiras de dentículos anteriores e posteriores apresentam o mesmo comprimento; bico córneo preto com bordo serrilhado, sendo a maxila em forma de “M” e a mandíbula em forma de “U”.

**Coloração do girino em vida** – Corpo de cor marrom, coberto por manchas douradas com aspecto marmoreado. Região ventral translúcida permitindo a visualização do intestino posicionado ventralmente. Cauda bege claro, quase transparente com manchas douradas e marrons mais concentradas na musculatura da cauda que nas nadadeiras. O olho apresenta cor castanho, com uma faixa dourada circulando toda a íris (Figura 9).

**Comparação com outras espécies** – A ausência de um gap dorsal anterior na linha de papilas marginais difere *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. agilis*, *O. argyreornata*, *O. aromothyella*, *O. berthae*, *O. brieni*, *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. carnevallii*, *O. catharinae*, *O. centralis*, *O. goya*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. jureia*, *O. kautskyi*, *O. littoralis*, *O. longilínea*, *O. luizotavioi*, *O. machadoi*, *O. melanodactyla*, *O. muriciensis*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. skaios*, *O. trapicheiroi* e *O. tripui* (apresentam gap dorsal). A fórmula da linha do dente 2 (2) / 3 difere girinos de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. ariadne*, *O. machadoi*, *O. rizibilis*, *O. skuki* e *O. trapicheiroi* que exibem a fórmula da linha do dente 2/3, 2 (2) / 3 (1) e 2 (2) / 3 (3), respectivamente. As papilas marginais bisseriada diferem os girinos de *O. “Serra do Brigadeiro”* sp. nov. de *O. argyreornata*, *O. berthae*, *O. canastrensis*, *O. carnevallii*, *O. catharinae*, *O. humilis*, *O. littoralis*, *O. machadoi*, *O. melanodactyla*, *O. obtriangulata*, *O. ranki*, *O. rizibilis*, *O. skuki* e *O. trapicheiroi* e *O. tripui* (papilas marginais unisseriadas nestas espécies), *O. albicans*, (fileira de papilas marginais unisseriadas na região dorsal e bisseriada na região ventral), e *O. hiemalis* (fileira de papilas marginais bisseriada na região dorsal e unisseriada na região ventral). As papilas submarginais numerosas diferem *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. albicans*, *O. angrensis*, *O. argyreornata*, *O. catharinae*, *O. humilis*, *O. machadoi*, *O. obtriangulata*, *O. trapicheiroi* e *O. tripui* (papilas submarginais esparsas). *O. melanodactyla* (presença de poucas e esparsos ou ausentes), *O. luizotavioi*, *O. pombali* e *O. rizibilis* (papilas submarginais formando fileiras), e *O. berthae* que não apresenta papilas submarginais. Difere de *O. catharinae* e *O. tripui* pelo espiráculo ventrolateral (espiráculo dessas espécies se abre na linha média do corpo). O focinho arredondado em vista lateral difere o girino de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. de *O. argyreornata*, *O. hiemalis*, *O. humilis*, *O. machadoi* e *O. skuki* (truncado nestas espécies), *O. obtriangulata* (inclinado) e *O. pombali* (inclinado para truncado).

**Coloração do girino fixado** – A pigmentação dourada do corpo e do olho desaparece por completo. O corpo torna-se esbranquiçado com fundo marrom claro quase que transparente. A região da cauda torna-se amarela na musculatura e esbranquiçada nas nadadeiras. O ventre torna-se branco, porém os ainda são visíveis e o intestino torna-se marrom escuro. As manchas da cauda não desaparecem, contudo, perdem um pouco da cor.



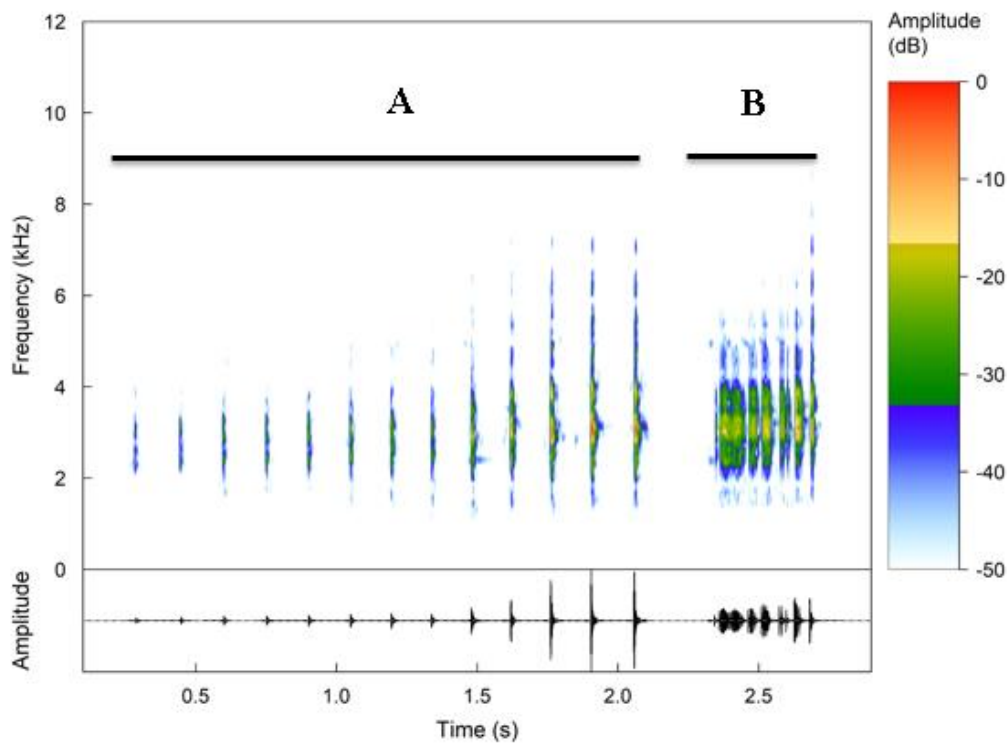
**Figura 8.** Girino de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. no estágio 37 de acordo com Gosner (1960). (A) Vista lateral, (B) Vista dorsal e (C) Vista ventral, (D) Disco oral.



**Figura 9.** Girino de *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. em vida. Foto: Clodoaldo Assis Lopes.

**Vocalização** – Nós gravamos 51 vocalizações de três machos de *Oloolygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. no dia 13 de novembro de 2017, por volta das 21h, temperatura do ar 16,7°C, todos em um riacho localizado no interior do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, município de Ervália, Minas Gerais, Brasil. Esta espécie possui dois tipos de cantos, os quais denominamos canto “A” (canto de anúncio) e canto “B” (canto territorial) (Tabela 5, Figura 10). O canto “A” possui de 5 a 37 notas multipulsionadas, com duração de 0,003 à 0,041s ( $\bar{X}$  = 0,015s  $\pm$  0,005, n=30). Cada nota apresenta de um a oito pulsos ( $\bar{X}$  = 4,75 pulsos/nota  $\pm$  1,63, n= 466) e a taxa de emissão de pulsos por segundo varia de 73,17 a 714,29 ( $\bar{X}$  = 348,17 pulsos/s  $\pm$  108,03, n=466). O intervalo entre as notas é de 0,068 a 0,312 s ( $\bar{X}$  = 0,136  $\pm$  0, 018, n= 438). A frequência dominante atinge de 2296,9 a 4312,5 ( $\bar{X}$  = 3030,5 Hz  $\pm$  394,1, n=468).

O canto “B” é composto por uma única nota de 16 a 63 pulsos por nota ( $\bar{X}$  = 34,86  $\pm$  14,15), com duração de 0,18 a 0,78s ( $\bar{X}$  = 0,40s  $\pm$  0,14), podendo formar grupos de pulsos. Cada nota pode apresentar de 3 a 12 grupos de pulsos ( $\bar{X}$  = 34,86 grupos de pulsos  $\pm$  14,15), frequência dominante podendo variar de 2343,80 a 3750,00Hz ( $\bar{X}$  = 3012Hz  $\pm$  325,76), frequência mínima de 2203,10 a 2859,40Hz ( $\bar{X}$  = 2445,49Hz  $\pm$  158,46) e frequência máxima de 3328,10 a 4828,10Hz ( $\bar{X}$  = 3843,42Hz  $\pm$  166,81).



**Figura 10.** Espectrograma, oscilograma e espectro de potência dos cantos tipo “A” e “B” de *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. gravado no dia 13 de novembro de 2017 (MZUFV18773), no Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil.

**Molecular** – *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” é filogeneticamente relacionada a *Ololygon* ‘Mimoso do Sul’, e formam um clado irmão de *O. tripui*. A distância genética (distância-p) entre as duas linhagens é de 3,5% e 5,3%, respectivamente.

**História Natural** – *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. é encontrada durante todo o ano, com maior abundância nos meses mais frios entre maio e agosto. Machos e fêmeas são encontrados no interior de matas de galeria, próximos à margens de riacho. Os machos utilizam como sítio de vocalização vegetação herbácea e arbustos próximos da água. As desovas são depositadas pelas fêmeas em riachos, em áreas de remanso onde água apresenta menor correnteza.

**Distribuição geográfica** – *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” possui distribuição restrita a riachos no interior do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, nos municípios de Araponga e Ervália, Minas Gerais, e no município de Simonésia, Minas Gerais, Brasil.

***Ololygon* “Nova Lima” sp. nov.**

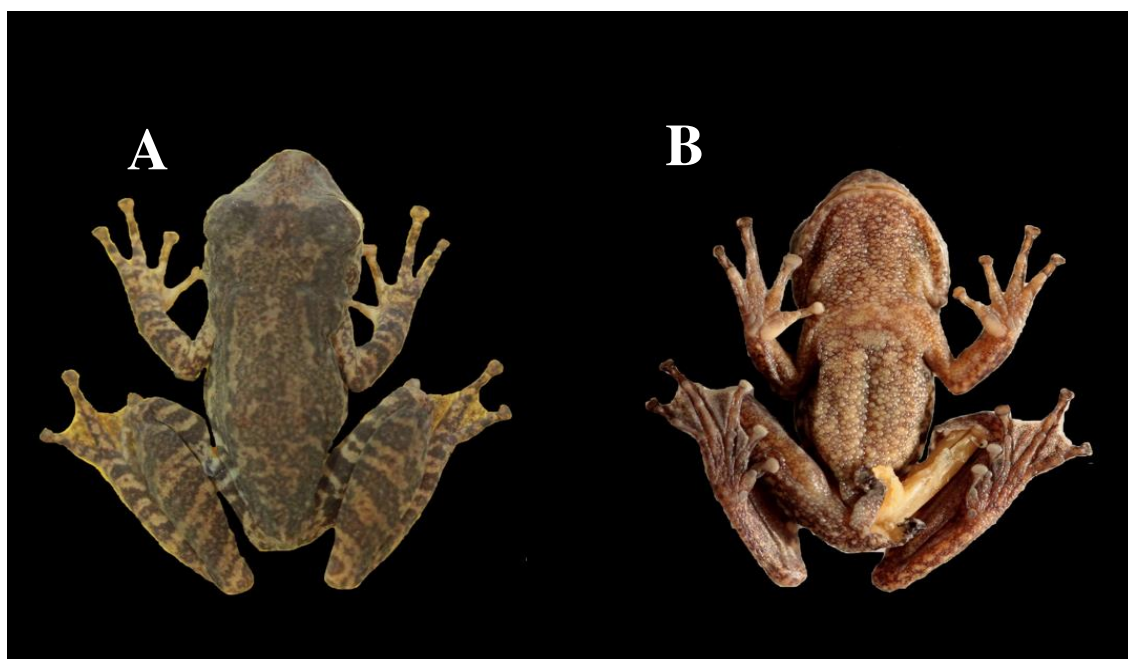
Figuras 11-12

**Holótipo** – MCN 020589, macho adulto coletado em Rego dos carrapatos, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil (19°58'52.45”S 43°51'21.77”O), em 24 de maio de 2017, por Souza-Pinto, F.C.

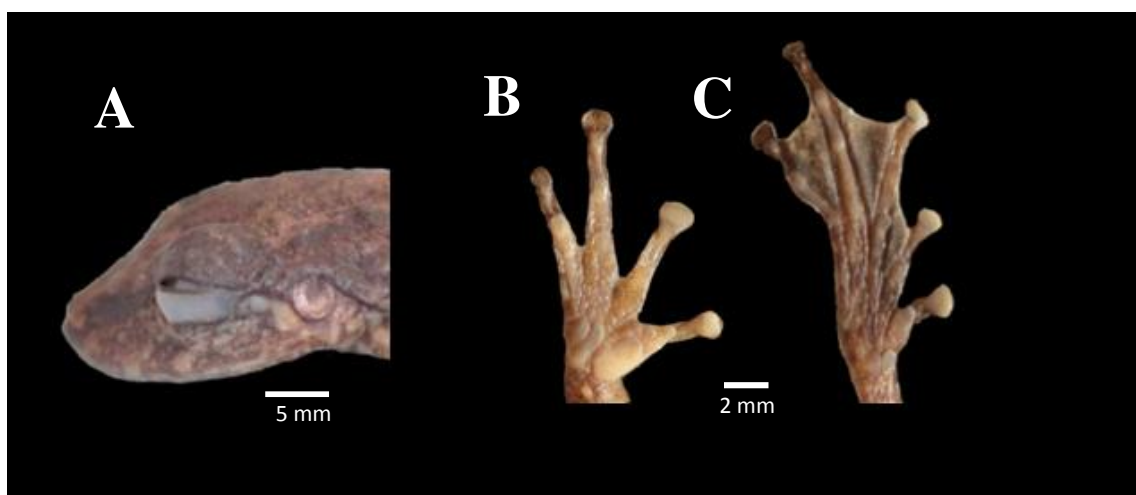
**Paratopótipo** – MCN 20593, MCN 20592 machos adultos coletados com o holótipo MCN 020589.

**Parátipo** – MCN 75, macho adulto, coletado em 24 de maio de 1989, MCN 423, macho adulto, coletado em 22 de julho de 1990, MCN 20291, macho adulto, coletado em 24 de novembro de 2015, no município de Nova Lima, Minas Gerais, Brasil (19°58'52.45”S 43°51'21.77”O).

**Diagnose** – A nova espécie é diagnosticada pela seguinte combinação de caracteres: (1) porte médio (machos 21,9-35,7mm), (2) mancha interocular de cor escura de formato trapezoidal, (3) focinho arredondado em vista dorsal e protuberante em vista lateral, (4) canto rostral levemente marcado e côncavo, região loreal côncava e oblíqua (5) ventre de cor creme com diversos pontos e manchas beges espalhados, (6) superfícies dorsais anteriores e posteriores dos braços e pernas apresentam faixas transversais escuras.



**Figura 11.** *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (holótipo, macho, MCN 020589, CRC 24,78mm): (A) Vista dorsal e (B) Vista ventral.



**Figura 12.** *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. (holótipo, macho, MCN 020589): (A) Vista lateral da cabeça; (B) Vista ventral da mão direita e (C) Vista ventral do pé direito.

**Comparações com outras espécies** – *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. diferencia das espécies do grupo *O. perpusilla* por apresentar membrana entre os dedos II e III (membrana extremamente reduzida nas espécies do grupo *O. perpusilla*). Por apresentar machos maiores *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. difere de *O. agilis*, *O. argyreornata*, *O. berthae*, *O. centralis*, *O. machadoi*, *O. melanodactyla* e *O. skuki* (CRC 21,9–35,7 mm; 12,0–21,2 mm de CRC de machos combinados para estas espécies). O canto rostral pouco marcado, difere *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. de *O. carnevalli*, *O. Luizotavioi*, *O. pombali*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov., *O. skaios*, *O. skuki*, *O. strigilata* e *O. tripui* (canto rostral bem marcado nessas espécies). A presença de fenda vocal diferencia *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. de *O. ariadne* e *O. skaios*, que não possuem. Por não apresentar saco vocal notavelmente expandido externamente, *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. difere de *O. aromothyella*, *O. berthae* e *O. rizibilis* (espécies com saco vocal expandido externamente). A mancha interocular de formato trapezoidal difere *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. de *O. aromotyella*, *O. berthae*, *O. caissara*, *O. flavoguttata*, *O. heyeri*, *O. humilis*, *O. kaustkyi*, *O. littoralis*, *O. machadoi*, *O. muriciensis*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. e *O. tripui* (mancha interocular em forma de W, nessas espécies). O antebraço não hipertrofiado diferencia *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. de *O. aromothyella*, *O. goya*, *O. jureia* e *O. skaios* (machos com antebraço hipertrofiado). A ausência de uma glândula inguinal diferenciada externamente distingue *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. de *O. ariadne*, *O. brieni*, *O. caissara*, *O. canastrensis*, *O. catharinae*, *O.*

*centralis*, *O. flavoguttata*, *O. jureia*, *O. hiemalis*, *O. longilinea*, *O. luizotavioi*, *O. obtriangulata*, *O. rizibilis* e *O. tripui* (hipertrofiada em *O. centralis* e externamente diferenciada nas outras espécies, muitas vezes cercadas por uma dobra).

**Descrição do holótipo** – Corpo de tamanho médio, cabeça mais longa que larga (comprimento da cabeça equivale a 38,9% do CRC, largura da cabeça equivale 31,5% do CRC); focinho arredondado em vista dorsal e protuberante em vista lateral; narina protuberante imediatamente antes da ponta do focinho, localizadas lateralmente, separadas entre si por distância equivalente a 41,8% do diâmetro do olho. Olhos grandes posicionados lateralmente, diâmetro do olho 30,8% do comprimento da cabeça e 11,5% do comprimento rostro-cloacal (CRC); distância olho-narina aproximadamente 47% do comprimento da cabeça; mancha interocular em forma de um trapézio; canto rostral pouco marcado quase côncavo, região loreal côncava e oblíqua; tímpano de formato arredondado, com diâmetro de 30,3% do diâmetro do olho; prega supratimpânica levemente marcada; língua larga e alongada, e não está presa as bordas laterais e posterior da boca; fenda vocal presente; coanas elípticas, duas séries transversais de quatro dentes vomerianos posicionados entre as coanas, saco vocal não expandido externamente. Antebraços mais curtos e largos que os braços; margens externas dos antebraços lisa; tubérculo metacarpal interno único e elíptico; tubérculo metacarpal externo grande e bilobado; tubérculos subarticulares arredondados, tubérculos supranumerários pequenos e arredondados; membrana intergital ausente entre os dedos II e III, e vestigial entre os outros dedos; discos adesivos dos dedos elípticos, comprimento relativo dos dedos II <III <V<IV; A área glandular na margem medial do dedo II desenvolveu-se formando uma almofada nupcial não pigmentada. Tubérculo metatarsal interno único, arredondado; tubérculo metatarsal externo único, pequeno e redondo; tubérculos subarticulares simples, arredondados, tubérculos supranumerários simples, arredondados. Comprimento relativo dos artelhos I <II <V≤III<IV dedos com fórmula das membranas interdigitais dos pés I — III<sup>+</sup> — 1<sup>1/2</sup>III<sup>+</sup> — 2IV<sup>2</sup> — 2<sup>+</sup>V. Discos adesivos pequenos, mais largos que longos. Superfície dorsal pouco granulada, com maior disposição de grânulos na região ventral.

**Medidas do holótipo (mm)** – CRC 24,78; CC 9,58; LC 7,81; CF 10,03; CT 13,42; CTA 6,34; CP 10,47; CU 7,04; CA 4,82; CM 7,41; DO 2,63; DN 0,16; DT 0,87; DIO 4,47; DOF 4,25; DON 2,87; DIN 0,89; LD3A 0,96; LD4A 0,66.

**Coloração após fixação** – Região dorsal marrom, com manchas de cor castanho de formato indefinido, apresentando entre os olhos uma mancha escura de formato trapezoidal. Superfícies dorsais anteriores e posteriores dos braços e pernas, apresentam faixas transversais escuras. O ventre possui coloração creme com pontos beges. Nos flancos e nas partes ocultas das coxas, manchas de coloração marrom em fundo creme.

**Variação** – Os indivíduos analisados são semelhantes entre si em relação a morfologia. A principal diferença entre os indivíduos está relacionada a coloração da região ventral que pode variar desde cor creme a castanho escuro.

**Girino** – Desconhecido.

**Vocalização** – Desconhecida.

**Molecular** – *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov, é filogeneticamente relacionada ao clado formado por *O. tripui*, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” e *Ololygon* “Mimoso do Sul”, com distâncias genéticas entre as linhagens variando de 5,6% e 6,9%.

**Distribuição geográfica** – A distribuição de *Ololygon* “Nova Lima” restringe-se a áreas de matas contendo corpos d’água, no município de Nova Lima, Minas Gerais, Brasil.

## **Discussão**

As espécies do grupo *Ololygon catharinae* são morfologicamente semelhantes entre si, e apresentam poucas variações interespecíficas na morfologia externa (e.g. Carvalho-e-Silva, Gomes & Peixoto, 1995; Pombal et al. 1995; Conte et al. 2007), o que dificulta a identificação correta das espécies. No presente estudo observamos que utilizar apenas caracteres morfológicos e morfométricos para comparar espécies do grupo *O. catharinae*, não são suficientes, uma vez que além de apresentarem morfologias muito semelhantes, estas espécies podem apresentar variações e/ou padrões morfológicos, identificáveis somente por meio de uma análise mais pluralista. Dessa forma, se faz

necessária a utilização de outras fontes de dados (larvais, bioacústicos e moleculares), reforçando a importância do uso da taxonomia integrativa.

Com relação aos dados bioacústicos, o canto de anúncio em anuros é espécie-específico (Gerhardt & Davis 1988), considerado um ótimo caminho para a avaliação das diferenças e afinidades taxonômicas (Gerhardt & Huber, 2002; Martins & Jim, 2003; Köhler et al. 2017). Contudo, muitas vezes essas variações entre espécies, não são muito evidentes, principalmente se tratando de espécies crípticas (Tonini et al. 2014, Hepp et al. 2015, Orrico et al. 2017). A partir das análises do canto das espécies *O. tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov., verificamos que apesar de existir sobreposição entre os parâmetros analisados, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov., apresenta uma maior amplitude nos valores de parâmetros que são considerados diagnósticos. Essa sobreposição de valores entre parâmetros acústicos já foi observada para outras espécies do grupo (e.g. *Ololygon carnevallii*, Folly 2017). Segundo Köhler et al. (2017) descrições de cantos de anuros, sempre que possível, devem ser acompanhadas por informações moleculares dos espécimes gravados, visto o grau elevado de diversidade críptica neste grupo.

A relação filogenética entre os espécimes analisados, foi congruente com os resultados obtidos nas análises morfológicas, morfométricas e bioacústicas. Encontramos quatro linhagens distintas, incluindo *O. tripui* e outras três inétidas, *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov., *Ololygon* “Nova Lima” sp. nov. e *Ololygon* “Mimoso do Sul”. Um dos métodos utilizados para identificar limites genéticos entre as espécies foi a distância genética para o gene COI, que é uma medida estatística de quantificação das diferenças genéticas entre grupos. Segundo Lyra *et al.* (2017), valores a partir ou próximos de 6% para o gene COI, representam distâncias genéticas entre espécies. *Ololygon* “Mimoso do Sul” apresentou valores representativos de distancia-p entre as outras linhagens e, por isso, essa população representa uma nova linhagem, mas optamos por não descrevê-la como uma nova espécie no presente estudo, devido ao pouco material disponível (apenas dois indivíduos).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os valores de distância genética para o gene COI entre *O. tripui* e *Ololygon* “Serra do Brigadeiro” sp. nov. (3,5%), diferenças na morfologia larval e adulta e no canto de anúncio evidenciaram a existência da nova espécie de *Ololygon*. Peixoto, et al. (2016) também encontraram diferenças nas marcações de Ag-NOR e FISH entre *O. tripui* e *Ololygon* “Serra do

Brigadeiro” sp. nov., indicando a ocorrência de rearranjos cromossômicos, envolvendo as regiões organizadoras do nucléolo entre essas espécies. Além disso, caso as duas espécies tenham se divergido recentemente, é possível que elas não tenham acumulado diferenças fixas em suas sequências do gene COI (Funk & Omland 2003), o que resultou no baixo valor de distância-p. De acordo com Zaidan (2014), a utilização de mais de um marcador mitocondrial para acessar os valores de distância genética intra e interespecíficos se faz necessário, pois esses marcadores podem apresentar taxas de evolução diferentes.

A distribuição geográfica das espécies determinadas neste estudo coincide com complexos serranos do bioma Mata Atlântica do sudeste do Brasil. Padrão de distribuição semelhantes foram encontrados para outras espécies (e.g. *O. flavoguttata*, Cruz & Feio 2007; *O. fuscovarius*, Garey & Provete 2016; *O. albicans*, *O. argyreornata*, *O. catharinae*, Campos & Lourenço de Moraes, 2017). Contudo, dado o alto nível de endemismo da Mata Atlântica (Carnaval & Moritz, 2008) e o número crescente de novas espécies do grupo *Oloolygon catharinae* descritas (Pombal Jr. et al. 2010; Cruz et al. 2011; Lourenço et al. 2013, 2014, 2016; Nogueira et al., 2016; Andrade et al. 2018), a diversidade taxonômica do grupo é claramente subestimada. No presente estudo, demonstramos que evidências moleculares são importantes ferramentas que podem ajudar a revelar a verdadeira diversidade do grupo *Oloolygon catharinae* e as relações entre suas espécies.

### **Agradecimentos**

A prof<sup>a</sup> Luciana Barreto Nascimento (Puc-Minas) e prof. Jorge Abdala Dergan (Beagle-UFV) pela doação das amostras de tecidos. Aos queridos amigos Guilherme Ramos da Silva, Maria das Graças de Castro Sedano e Valdeir de Castro Sedano pelo carinho, ajuda e suporte durante os trabalhos de campo no Espírito Santo. Ao Joaquim pela confecção do mapa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

## Referências

- Andrade, S.P., Santos, D.L., Rocha, S.F., Pombal Jr., J. P., Vaz-Silva, W. (2018) A new species of the *Oloolygon catharinae* species group (Anura: Hylidae) from the Cerrado biome, State of Goiás, Central Brazil. *Zootaxa*, 4425 (2), 283–303. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4425.2.5>
- Avise, J.C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. 2<sup>a</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- Baker, C.S. & Palumbi, S.R. (1994). Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*. (265): 1538–1539.
- Baldissera-Jr., F.A., Oliveira, P.S.L. & Kasahara, S. (1993). Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia: Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Revista Brasileira de Genética* 16(2): 335-345.
- Bioacoustics Research Program (2014) Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software. Version 1.5. The Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven> (Janeiro 2019).
- Brusquetti, F. & Lavilla, E.O. (2006): Lista comentada de los anfibios de Paraguay. *Cuadernos de Herpetologia* 20 (2): 3–79.
- Carnaval, A.C., & Moritz, C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* (35): 1187–1201.
- Campos, F.S., & Lourenço-de-Moraes, R. (2017). Anurans from the mountain chain Serra do Mar: A critical area for amphibian conservation in the Atlantic Forest, Brazil. *Herpetology Notes* 10:547–560. Available at <https://biotaxa.org/hn/article/view/31357>. Archived by WebCite at <http://www.webcitation.org/6xbHNS54r> on 1 March 2018.
- Carvalho-e-Silva, S.P., Gomes, M.R. & Peixoto, O.L., (1995). Descrição dos girinos de *Scinax angrensis* (B. Lutz, 1973) e de *Scinax kautskyi* (Carvalho e Silva e Peixoto, 1991) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia* 55: 61–65.
- Conte, C.E., Nomura, F., Rossa-Feres, D.C., D'Heursel, A. & Haddad, C.F.B. (2007). The tadpole of *Scinax catharinae* (Anura Hylidae) with description of the oral morphology, and a review of tadpoles from *Scinax catharinae* group. *Amphibia-Reptilia*. 28: 177–192.
- Cruz, C.A.G., & Feio, R.N. (2007). Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *Herpetologia no Brasil II*. In: Nascimento LB

and Oliveira ME (Eds), *Sociedade Brasileira de Herpetologia*, 1<sup>a</sup> ed., Belo Horizonte, Brasil, p. 117-126.

Cruz, C.A.G., Nunes, I. & Lima, M.G. (2011): A new *Scinax* Wagler belonging to the *S. catharinae* clade (Anura: Hylidae) from the State of Alagoas, northeastern Brazil. *Zootaxa* 3096: 18–26.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772 DOI 10.1038/nmeth.2109.

Duellman, W. E. (1970). The Hylid frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History, University of Kansas 1: 1-753.

Duellman, W.E. (2001). The Hylid Frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca, 2v., xvi, 1158pp, 92 pls.

Duellman, W. E. Marion, A. B. & Blair, H. S. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104 (1), 001–109.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8):1969–1973 DOI 10.1093/molbev/mss075.

Faivovich, J. (2002): A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* 18: 367–393.

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 the Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin American Museum of Natural History*, 294, 1–240.

Feio, R. N. Santos, P. S. Cassini, C. S. Dayrell, J. S. Oliveira, E. F. (2008) Anfíbios da Serra do Brigadeiro – MG. *MG BIOTA*, Belo Horizonte, 1: 1 abr/maio.

Folly, H.S.G. (2017). Taxonomia e História Natural de *Ololygon carnevallii* Caramaschi & Kisteumacher, 1989 (Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. 89p. Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Francisco, M.R., Gibbs, H.L., Galetti, M. Lunardi, V.O. & Galetti-Jr., P.M. (2007). Genetic structure in a tropical lek-breeding Bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology* (16): 4908-4918.

Frost, Darrel 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. (Fevereiro, 2019).

- Funk, D.J., Omland, K.E. (2003). Species – level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397- 423.
- Funk, W.C., Caminer, M., Santiago R. & Ron, S.R. (2011). High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc. R. Soc. B* doi:10.1098/rspb.2011.1653.
- Garey, M.V., & Provete, D.B. (2016). Species composition, conservation status, and sources of threat of anurans in mosaics of highland grasslands of southern and southeastern Brazil. *Oecologia Australis* 20:94–108. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2016.2002.07>
- Gerhardt, H.C. & Davis, M.S. (1988). Variation in the coding of species identify in the advertisement calls of *Litoria verreauxi* (Anura: Hylidae). *Evolution*. 42: 556-563.
- Gerhardt, H. C. & Huber, F. 2002. Acoustic Communication in Insects and Anurans: common problems and diverse solutions. The University of Chicago press, Chicago. 2001. 531p.
- Gontijo-Pascutti, A.H.F., Y. Hasui, M. Santos, A.V. Soares, Jr., & I.A. Souza. (2012). As serras do Mar e da Mantiqueira. Pp. 549–571 in *Geologia do Brasil* (Y. Hasui, C.D.R. Carneiro, F.F.M. Almeida, and A. Bartorelli, eds.). Beca, Brazil.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryo and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190.
- Heyer, W. R. Rand, A. S. Cruz, C.A.G. Peixoto, O. L. & Nelson, C. E. (1990). Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31, 231-410.
- Hepp, F., Carvalho-e-Silva, S.P., Carvalho-e-Silva, A.M.P.T., & Folly, M. (2015). A fifth species of the genus *Euparkerella* (Griffiths, 1959), the advertisement calls of *E. robusta* Izecksohn, 1988 and *E. tridactyla* Izecksohn, 1988, and a key for the *Euparkerella* species (Anura: Brachycephaloidea: Craugastoridae). *Zootaxa* 3973 (2): 251–270
- Köhler, J., Jansen, M., Rodríguez, A., Kok, P.J.R., Toledo, L.F., Emmrich, M., Glaw, F., Haddad, C.F.B., Rödel, M.-O. & Vences, M. (2017) The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251: 1–124. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4251.1.1>
- Kumar S., Stecher G., & Tamura K. (2016). MEGA7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

- Laufer, G., Piñeiro-Guerra, J.M., Pereira-Garbero, R., Barreneche, J.M. & Ferrero, R. (2009): Distribution extension of *Scinax aramothyella* (Anura, Hylidae). *Biota Neotropica* (9): 275–278.
- Leigh, J., Bryant, D. (2015). POP-ART: full-feature software for haplotype network construction, *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110–1116
- Lourenço, A. C. C., Nascimento, L. B. & Pires, M. R. S. (2009). A new species of *Scinax* Catharinae species group (Anura, Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brasil. *Herpetologica*, 65 (4), 468-479.
- Lourenço, A. C. C., Carvalho, A. L. G, Baêta, D., Pezzuti, T. L. & Leite, F. S. F. (2013). A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from Serra da Canastra, southeastern State of Minas Gerais, Brazil. *Zootaxa*, 3613 (6), 573-588.
- Lourenço, A.C.C., Luna, M.C. & Pombal-Jr, J.P. (2014): A new species of the *Scinax catharinae* Group (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. *Zootaxa* 3889 (2): 259–276.
- Lourenco, A. C. C., Zina, J., Catroli, G. F., Kasahara, S., Faivovich, J., & Haddad, C. F. (2016): A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. *Zootaxa* 4154(4): 415-435.
- Nogueira, L., Solé, M., Siqueira, S., Affonso, P.R.A.D.M., Strüssmann, C. & Sampaio, I. (2016): Genetic analysis reveals candidate species in the *Scinax catharinae* clade (Amphibia: Anura) from Central Brazil. *Genetics and molecular biology* 39(1): 49-53.
- Mângia, S., Santana, D.J., Cruz, C.A.G., & Feio, R.N. (2014). Taxonomic review of *Proceratophrys melanopogon* (Miranda-Ribeiro, 1926) with description of four new species (Amphibia, Anura, Odontophrynidae). *Boletim Museu Nacional Nova Série Zoológica* 531: 1-33.
- Martins, I. A. & Jim, J. (2003). Bioacoustic analysis of advertisement call in *Hyla nana* and *Hyla sanborni* in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 63(3): 507-516.
- Nascimento, L.B.; Wachlevski, M. & Leite, F.S.F. (2005). Anuros. In: Silva, A.C.; Pedreira, L.C.V.S.F.; Abreu, P.A.A. (eds.). Serra do Espinhaço Meridional. Belo Horizonte: *O Lutador*, p. 209-230.
- Neves, M.O., Pereira, E., Sugai, J.L.M.M., Rocha, S.B., Feio, R.N. & Santana, D.J. (2018). Distribution pattern of anurans from three mountain complexes in southeastern Brazil and their conservation implications. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(2): 1611–1623
- Orrico, V.G.D., Nunes, I., Matted, C., Fouquet, A., Lemos, A.W., Rivera-Correa, M., Lyra, M.L., Loebmann, D., Pimenta, B.V.S., Caramaschi, U., Rodrigues, M.T., &

- Haddad, C.F.B. (2017). Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species within *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). *Salamandra* 53(1): 99–113
- Pereyra, M.O., Borteiro, C., Baldo, D., Kolenc, F. & Conte, C.E. (2012). Advertisement call of the closely related species *Scinax aromothyella* Faivovich 2005 and *S. berthae* (Barrio 1962), with comments on the complex calls in the *S. catharinae* group. *Herpetological Journal* 22: 133 –137.
- Peixoto, M. A., Oliveira, M. P., Feio, R. N., & Dergam, J. A. (2016). Karyological study of *Oloolygon tripui* (Lourenço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comparative cytogenetics*, 10(4), 505-516. doi:10.3897/CompCytogen.v10i4.9176
- Pombal JR, J. P., Haddad, C. F. B. & Kasahara, S. (1995). Uma nova espécie de *Scinax* (Anura, Hylidae) do Sudeste do Brasil, com comentários sobre o gênero. *Journal of Herpetology* 29 (1): 1–6.
- Pombal Jr., J.P. Carvalho Jr., R.R., Canelas, M.A.S. & Bastos R.P. (2010): A new *Scinax* of the *S. catharinae* species group from Central Brazil (Amphibia: Anura: Hylidae). *Zoologia* 27: 795–802.
- Pugliese, A. (2002). Revisão Taxonômica do complexo de *Scinax duartei* (B. Lutz, 1951) (Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado em Zoologia. 142p. Museu Nacional do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Tonini, J.F.R., Forlani, M.C., de Sá, R.O. (2014). A new species of *Chiasmocleis* (Microhylidae, Gastrophryinae) from the Atlantic Forest of Espírito Santo State, Brazil. *ZooKeys* 428: 109–132
- Santana, D.J.; São Pedro V.A.; Hote P.S.; Roberti H.M.; Sant’anna A.C.; Figueiredo de Andrade C.A. & FEIO R.N. (2010). Anurans in the region of the High Muriaé River, state of Minas Gerais, Brazil. *Herpetology Notes*, 3: 1–10.
- Silva, G., Luna-Dias, C., Hepp, F., & Silva, S. (2013). First record of *Scinax tripui* Lourenço, Nascimento and Pires, 2010 (Amphibia: Anura: Hylidae) from Espírito Santo state, Brazil. *Check List*, 9(3), 645-646. doi:<http://dx.doi.org/10.15560/9.3.645>
- Thomé, M.T.C., Zamudio, K.R., Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B., Baldissera, J.R. F.A., & Alexandrino, J. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetic Evolution* 55(3): 1018-1031.

Thorpe, R.S. 2002. Geographic variation. In: M. D. Pagel (Ed.), *Encyclopedia of Evolution*. Oxford University Press, U.K, 430-435.

Stoeckle, M.Y. & Herbert, P.D.N. (2008). Barcode of Life. *Scientific American*, INC, 82-88.

Zaidan, F.C. (2014). Caracterização molecular de três espécies de *Trachycephalus* (Anura: Hylidae): investigando potenciais híbridos interespecíficos. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. 73p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal), Universidade Federal do Espírito Santo.

## Apêndice I

### *Material examinado*

#### *Ololygon tripui*

**BRASIL: Minas Gerais: Ouro Preto-** fêmeas (LZV 1711A, LZV 2490A, LZV 2825A, LZV 3023A, MCN 7755, MCN 7756, MCN 7758, MCN 7760, MCN 7761), machos (LZV 7741A, LZV 7747A, LZV 756A, LZV 758A, LZV 763A, LZV 764A, LZV 769A, LZV1710A, LZV2495A, LZV2824A, LZV2833A, MCN 7742, MCN 7745, MCN 7746, MCN 7748, MCN 7749, MCN 7750, MCN 7751, MCN 7757, MCN 7759); **Ouro Branco-** fêmeas (LZV 1752A, MCN 6679, MZUFV 7041, MZUFV 7022, MZUFV 7567, MZUFV 7571), machos (MCN 6272, MZVUFV 7570); **Caeté-** machos (MCN 17039, MCN 17043); **Congonhas-** machos (MCN 18387, MCN 18919, MCN 18386, MCN 18292); **Santa Bárbara-** machos (MCN 4808).

#### *Ololygon “Serra do Brigadeiro” sp. nov.*

**BRASIL: Minas Gerais: Parque Estadual Serra do Brigadeiro:** fêmeas (MZUFV 6298, MZUFV 12103, MZUFV 11511, MZUFV 7681, MZUFV 12104, MZUFV 7681, MZUFV 12798, MZUFV 7656, MZUFV 18562, MZUFV 9860), machos (MZUFV 3095, MZUFV 3092, MZUFV 7684, MZUFV 18745, MZUFV 18746, MZUFV 18747, MZUFV 9863, MZUFV 12187, MZUFV 19264, MZUFV 8035, MZUFV 12401, MZUFV 758, MZUFV 763, MZUFV 764, MZUFV 769, MZUFV 1710).

#### *Ololygon “Nova Lima” sp. nov.*

**BRASIL: Minas Gerais: Nova Lima:** machos (MCN 64, MCN 75, MCN 138, MCN 363, MCN 423, MCN 1762, MCN 20291, MCN 20592, MCN 20593, MCN 20589).

#### *Ololygon “Mimoso do sul”*

**BRASIL: Espírito Santo: Mimoso do Sul:** machos (MZUFV 18752, MZUFV 18753).

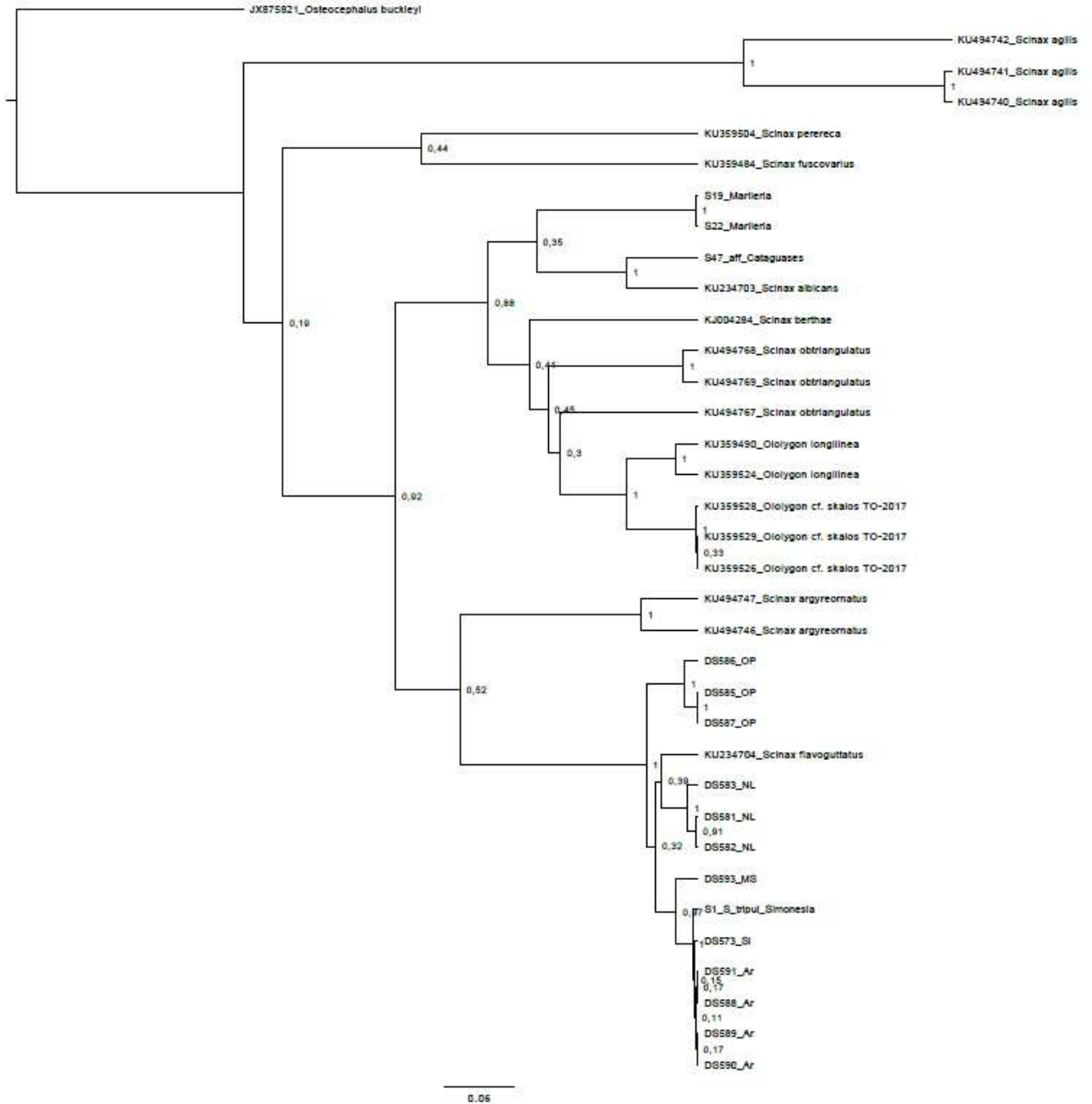
## Apêndice II

**Tabela S1.** Espécimes de *Ololygon* utilizados nas análises moleculares.

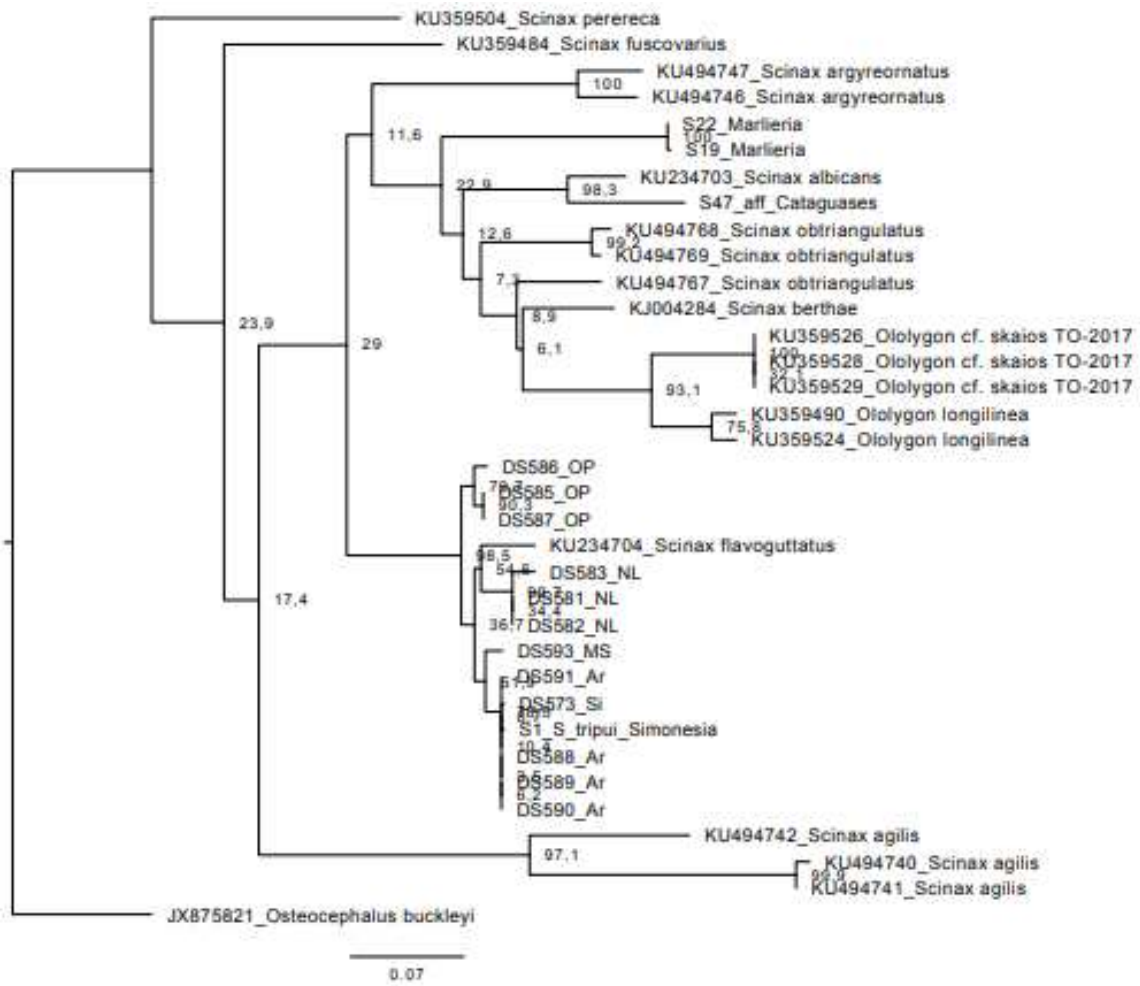
Espécies	Localidade	Voucher	Número de	Referência
			acesso- GenBank COI	
<i>S. agilis</i>	Passo de Camarajibe, Alogas, Brasil	CFBHT01137	KU494742.1	Lyra et al. 2016
<i>S. agilis</i>	Paraju, Espírito Santo, Brasil	CFBHT09033	KU494741.1	Lyra et al. 2016
<i>S. agilis</i>	Linhares, Espírito Santo, Brasil	CFBHT05276	KU494740.1	Lyra et al. 2016
<i>S. perereca</i>	Delfim Moreira, Minas Gerais, Brasil	CT619	KU359504.1	Granato-Neto et al. 2015
<i>S. fuscovarius</i>	Alfenas, Minas Gerais, Brasil	CT2263	KU359484.1	Granato-Neto et al. 2015
<i>S. albicans</i>	Terezópolis, Rio de Janeiro, Brasil	–	KU234703	Chaves et al. 2015
<i>S. berthae</i>	Itapua, Alto Vera, Paraguai	IIBPH1396	KJ004284	Brusquetti et al. 2014
<i>S. obtriangulatus</i>	Sao Luis do Paraitinga, São Paulo, Brasil	CFBHT01172	KU494767	Lyra et al. 2016
<i>S. obtriangulatus</i>	Sao Jose do Barreiro, São Paulo, Brasil	CFBHT14394	KU494768	Lyra et al. 2016
<i>S. obtriangulatus</i>	Santo Antonio do Pinhal, São Paulo, Brasil	CFBHT00864	KU494769	Lyra et al. 2016
<i>O. longilinea</i>	Guaxupé, Minas Gerais, Brasil	CT667	KU359490	Granato-Neto et al. 2015
<i>O. longilinea</i>	Boa Esperança, Minas Gerais, Brasil	CT958	KU359524	Granato-Neto et al. 2015
<i>O. cf. skaios</i>	Formoso, Minas Gerais, Brasil	CT2157	KU359526	Granato-Neto et al. 2015
<i>O. cf. skaios</i>	Chapada Gaúcha, Minas Gerais, Brasil	CT1649	KU359528	Granato-Neto et al. 2015
<i>O. cf. skaios</i>	Chapada Gaúcha, Minas Gerais, Brasil	CT1650	KU359529	Granato-Neto et al. 2015

<i>S. argyreornatus</i>	Vitória, Espírito Santo, Brasil	CFBHT02212	KU494747	Lyra et al. 2016
<i>S. argyreornatus</i>	Ubatuba, São Paulo, Brasil	CFBHT02773	KU494746	Lyra et al. 2016
<i>S. flavoguttatus</i>	Rio de Janeiro, Brasil	–	KU234704	Chaves et al. 2015
<i>O. tripui</i>	Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18748	–	Presente estudo
<i>O. tripui</i>	Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18749	–	Presente estudo
<i>O. tripui</i>	Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18750	–	Presente estudo
<i>O. tripui</i>	Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18751	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Nova Lima" <i>sp. nov.</i>	Nova Lima, Minas Gerais, Brasil	T1966	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Nova Lima" <i>sp. nov.</i>	Nova Lima, Minas Gerais, Brasil	T1967	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Nova Lima" <i>sp. nov.</i>	Nova Lima, Minas Gerais, Brasil	T1968	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Nova Lima" <i>sp. nov.</i>	Nova Lima, Minas Gerais, Brasil	T1969	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Serra do Brigadeiro" <i>sp. nov.</i>	Araponga, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18745	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Serra do Brigadeiro" <i>sp. nov.</i>	Araponga, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18746	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Serra do Brigadeiro" <i>sp. nov.</i>	Araponga, Minas Gerais, Brasil	MZUFV18747	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Mimoso do sul"	Mimoso do sul, Espírito Santo, Brasil	MZUFV18752	–	Presente estudo
<i>Ololygon</i> "Mimoso do sul"	Mimoso do sul, Espírito Santo, Brasil	MZUFV18753	–	Presente estudo
<i>Osteocephalus buckleyi</i>	Cando, Província de Napo, Equador	QCAZ 24446	–	Ron et al. 2012
S19_Marlieria	Marliéria, Minas Gerais, Brasil	S19	–	Folly et al. 2017
S22_Marlieria	Marliéria, Minas Gerais, Brasil	S22	–	Folly et al. 2017

## Material Suplementar



**Figura S1.** Árvore de gene obtida a partir de inferência bayesiana para o gene COI de todas as espécies de *Oligolygon* disponíveis no Genbank e das sequências obtidas no presente estudo.



**Figura S2.** Árvore de gene obtida a partir de Verossimilhança para o gene COI de todas as espécies de *Oloolygon* disponíveis no Genbank e das sequências obtidas no presente estudo.