

Unravelling the cryptic diversity and evolution of the dwarf
swamp frog *Pseudopaludicola mystacalis* (Anura,
Leptodactylidae) in open habitats of South America

Clara Ribeiro Porto^{1,*}, Cecil Pergentino Fazolato², Ricardo Marques³, Henrique
Batalha-Filho², Marcelo Felgueiras Napoli², Adrian Antonio Garda⁴, Maria Luiza
Silveira de Carvalho^{1,2}, Flora Maria de Campos Fernandes^{1,2}

1 - Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, Instituto
de Biologia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, 40170-115, Ondina, Salvador, Bahia, Brazil

2 - Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Evolução, Instituto
de Biologia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, 40170-115, Ondina, Salvador, Bahia, Brazil

3 - Universidade do Estado de Mato Grosso, 78690-000, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brazil

4 - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Botânica e
Zoologia, Avenida Senador Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, 59078-900, Natal, RN, Brazil

*Corresponding author; e-mail: clararp28@gmail.com

ORCID iDs: Porto: 0000-0002-5895-3870; Fazolato: 0000-0001-6829-9895; Marques: 0000-0002-4632-
8808; Batalha-Filho: 0000-0001-7191-2814; Napoli: 0000-0003-3843-0543; Garda: 0000-0002-1178-
1207; de Carvalho: 0000-0002-6887-2062; de Campos Fernandes: 0000-0003-0383-7984

Supplementary material

Table S1. List of 16S mitochondrial gene samples used in this study. Species name, locality (country: state or province: municipality or locality), haplotypes, tissue or specimen voucher, and Genbank deposit number. Collection acronyms: AAGARDA, Coleção do Laboratório de Anfíbios e Répteis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil; CHECOA, Coleção Herpetológica do Centro de Ecologia e Conservação Animal, Universidade Católica do Salvador, BA, Brazil; CFBH, Coleção "Célio F. B. Haddad", Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brazil; CZUFMT, Coleção Zoológica da UFMT – Setor Herpetologia-Amphibia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; DZSJRP, Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil; UFBA, Museu de História Natural da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil; ZUEC, Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil; LGE, Laboratório de Genética Evolutiva, Posadas, Misiones, Argentina.

Species	Locality	h	Voucher	Genbank
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Capital	H28	LGE5943	ON152720
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Capital	H28	LGE5944	ON152721
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Capital	H30	LGE5946	ON152722
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Capital	H30	LGE5947	ON152723
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Concepcion	H30	LGE2691	ON152724

<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Concepcion	H28	LGE3014	ON152725
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Concepcion	H30	LGE3017	ON152726
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: General Paz	H28	LGE1550	ON152727
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: General Paz	H28	LGE1551	ON152728
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: General Paz	H29	LGE1552	ON152729
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: General Paz	H30	LGE1740	ON152730
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Ituzaingó	H28	LGE1549	ON152731
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: Ituzaingó	H28	LGE2685	ON152732
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: San Miguel	H28	LGE1735	ON152733
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Argentina: San Miguel	H31	LGE1739	ON152734
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Camaçari	H1	UFBA12696	ON152735
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Camaçari	H2	UFBA12697	ON152736
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Camaçari	H5	UFBA12549	ON152737
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Camaçari	H5	UFBA12550	ON152738
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Camaçari	H6	UFBA12551	ON152739

<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Conde	H4	CHECOA3323	ON152740
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Conde	H3	CHECOA3326	ON152741
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Bahia: Formosa do Rio Preto	H33	UFBA447	ON152742
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Goiás: Uruacu	H35	CZUFMT778	ON152743
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H18	ZUEC13836	KJ147005
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H18	ZUEC13837	KJ147006
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H18	ZUEC13838	KJ147007
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H18	ZUEC13872	KJ147019
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H20	ZUEC13873	KJ147021
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Barreirinhas	H19	ZUEC20542	KJ147020
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Urbano Santos	H7	ZUEC13868	KJ147044
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Urbano Santos	H8	ZUEC13869	KJ146981
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Maranhão: Urbano Santos	H9	CFBH35858	KJ146982
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso do Sul: Paranaíba	H27	CFBH-T1374	KJ147009
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Carceres	H38	CZUFMT13669	ON152744

<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Carceres	H39	CZUFMT13670	ON152745
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Cuiabá	H36	ZUEC14147	KJ146983
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Cuiabá	H36	ZUEC14148	KJ146984
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Cuiabá	H37	ZUEC14149	KJ146985
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Mato Grosso: Poconé	H36	ZUEC14160	KJ146991
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Minas Gerais: Januária	H33	MTJ0478	ON152746
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Minas Gerais: Januária	H34	MTJ0479	ON152747
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	H32	ZUEC14128	KJ146999
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	H32	ZUEC14129	KJ147000
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	H32	ZUEC14130	KJ147001
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Pará: Primavera	H22	CZUFMT235	ON152748
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Pará: Primavera	H21	CZUFMT115	ON152749
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Pará: Primavera	H22	CZUFMT218	ON152750
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Ares	H14	AAGARDA3238	ON152751
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Ares	H13	AAGARDA3237	ON152752

<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Ares	H12	AAGARDA3240	ON152753
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Canguaretama	H12	AAGARDA2647	ON152754
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Canguaretama	H17	AAGARDA2619	ON152755
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Goianinha	H16	AAGARDA2397	ON152756
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Goianinha	H15	AAGARDA3137	ON152757
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Nisia Floresta	H10	AAGARDA6218	ON152758
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Nisia Floresta	H11	AAGARDA6219	ON152759
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: Rio Grande do Norte: Nisia Floresta	H12	AAGARDA6214	ON152760
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Icém	H24	DZSJRP8724	KJ147028
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Icém	H23	DZSJRP8725	KJ147038
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Icém	H23	DZSJRP8726	KJ147037
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Santa Fé do Sul	H26	DZSJRP8694	KJ147023
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Santa Fé do Sul	H26	DZSJRP8696	KJ147024
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Brazil: São Paulo: Santa Fé do Sul	H25	DZSJRP8704	KJ147022
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Vila Bela da Santíssima Trindade	–	ZUEC:14146	KJ147048

<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Vila Bela da Santíssima Trindade	–	ZUEC:13923	KJ147047
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	UFMT:8543	KJ146976
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	ZUEC:14140	KJ146975
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Vila Bela da Santíssima Trindade	–	ZUEC:13925	KJ147046
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Vila Bela da Santíssima Trindade	–	ZUEC:13924	KJ147045
<i>Pseudopaludicola ameghini</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	ZUEC:14138	KJ146977
<i>Pseudopaludicola boliviana</i>	Argentina: Chaco	–	MLP-DB5614	KJ147050
<i>Pseudopaludicola boliviana</i>	Argentina: Chaco: San Fernando, Antequera	–	MLP-DB5186	KJ147049
<i>Pseudopaludicola canga</i>	Brazil: Pará: Marabá	–	ZUEC:14334	KJ146989
<i>Pseudopaludicola canga</i>	Brazil: Pará: Marabá	–	ZUEC:14333	KJ146988
<i>Pseudopaludicola facureae</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14175	KJ146980
<i>Pseudopaludicola facureae</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14173	KJ146978
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	Brazil: Rio Grande do Sul: Porto Alegre	–	ZUEC:14165	KJ146974
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	Brazil: Rio Grande do Sul: Porto Alegre	–	ZUEC:14164	KJ146973
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	Brazil: Rio Grande do Sul: Porto Alegre	–	ZUEC:14162	KJ146972

<i>Pseudopaludicola mineira</i>	Brazil: Minas Gerais: Serra do Cipó	–	DZSJRP6437	KJ147025
<i>Pseudopaludicola mineira</i>	Brazil: Minas Gerais: Serra do Cipó	–	ZUEC:14318	KJ147026
<i>Pseudopaludicola murundu</i>	Brazil: São Paulo: Rio Claro	–	ZUEC:14286	KJ147032
<i>Pseudopaludicola murundu</i>	Brazil: São Paulo: Rio Claro	–	CFBH-T1467	KJ147008
<i>Pseudopaludicola murundu</i>	Brazil: São Paulo: Rio Claro	–	ZUEC:14284	KJ147031
<i>Pseudopaludicola murundu</i>	Brazil: São Paulo: Rio Claro	–	ZUEC:14288	KJ147030
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	ZUEC:14240	KJ147003
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	ZUEC:14239	KJ147002
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14292	KJ146995
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14291	KJ146994
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães	–	ZUEC:14241	KJ147004
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14294	KJ146993
<i>Pseudopaludicola serrana</i>	Brazil: Minas Gerais: Serra da Moeda	–	ZUEC:19553	KJ147053
<i>Pseudopaludicola serrana</i>	Brazil: Minas Gerais: Serra da Moeda	–	ZUEC:19554	KJ147052
<i>Pseudopaludicola serrana</i>	Brazil: Minas Gerais: Serra da Moeda	–	ZUEC:19556	KJ147051

<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	SMRP 266.6	KJ147043
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14172	KJ147042
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: São Paulo: Icém	–	DZSJRP6446	KJ147011
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: São Paulo: Icém	–	DZSJRP6456	KJ147010
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14171	KJ146987
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: Minas Gerais: Uberlandia	–	ZUEC:14169	KJ146986
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Brazil: Uruaçu: Goiás	–	UFMT:15754	KJ147055
<i>Leptodactylus latrans</i>	Paraguay: Parque Nacional San Rafael	–	KU 289191	DQ158417
<i>Adenomera thomei</i>	Brazil: Espírito Santo: Mimoso do Sul	–	CFBH10573	KC603946
<i>Adenomera andreae</i>	French Guiana: Parare Left	–	317AF	KC520683
<i>Pleurodema diplolister</i>	Brazil: Ceará: Viçosa do Ceará	–	CFBH 16144	JQ937185

Table S2. Primers, respective primer fragments, references, and annealing temperature of 16S mitochondrial gene.

Primer	Sequence 5' → 3'	Reference	Annealing
<i>12sL13</i>	TTAGAAGAGGCAAGTCGTAACATGGTA	Feller and Hedges (1998)	53°C
<i>16sTitus I</i>	GGTGGCTGCTTTTAGGCC	Titus and Larson (1996)	53°C
<i>16sL2A</i>	CCAAACGAGCCTAGTGATAGCTGGTT	Hedges (1994)	51°C
<i>16sH10</i>	TGATTACGCTACCTTTGCACGGT	Hedges (1994)	51°C
<i>16sAR</i>	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi et al. (1991)	53°C
<i>16SsBR</i>	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Palumbi et al. (1991)	53°C

Table S3. Molecular variance analysis (AMOVA) of 25 locality of *P. mystacalis*.

Source of variation	d.f.	% of variation	Fixation indices
Among groups	9	92.29	FSC = 0.270 ($p < 0.001$)
Among populations within groups	10	2.08	FST = 0.943 ($p < 0.001$)
Within populations	40	5.63	FCT = 0.922 ($p < 0.001$)

Table S4. Pairwise distance of uncorrected p-distance between bGYMC clusters of *P. mystacalis* for the mitochondrial 16S. The last column shows the variation within clusters.

(–) data not available.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Ingroup
Cluster A											0.000
Cluster B	0.05										0.002
Cluster C	0.05	0.01									0.000
Cluster D	0.04	0.03	0.03								0.003
Cluster E	0.04	0.03	0.03	0.01							0.000
Cluster F	0.04	0.03	0.03	0.01	0.01						0.001
Cluster G	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02					0.001
Cluster H	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01				–
Cluster I	0.04	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01			0.000
Cluster J	0.04	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		0.002
Cluster K	0.04	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.001

Table S5. Estimates of evolutionary divergence between sequences. The number of base substitutions per site from between sequences are shown. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood model [1]. This analysis involved 106 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1303 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [2].

1. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
2. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

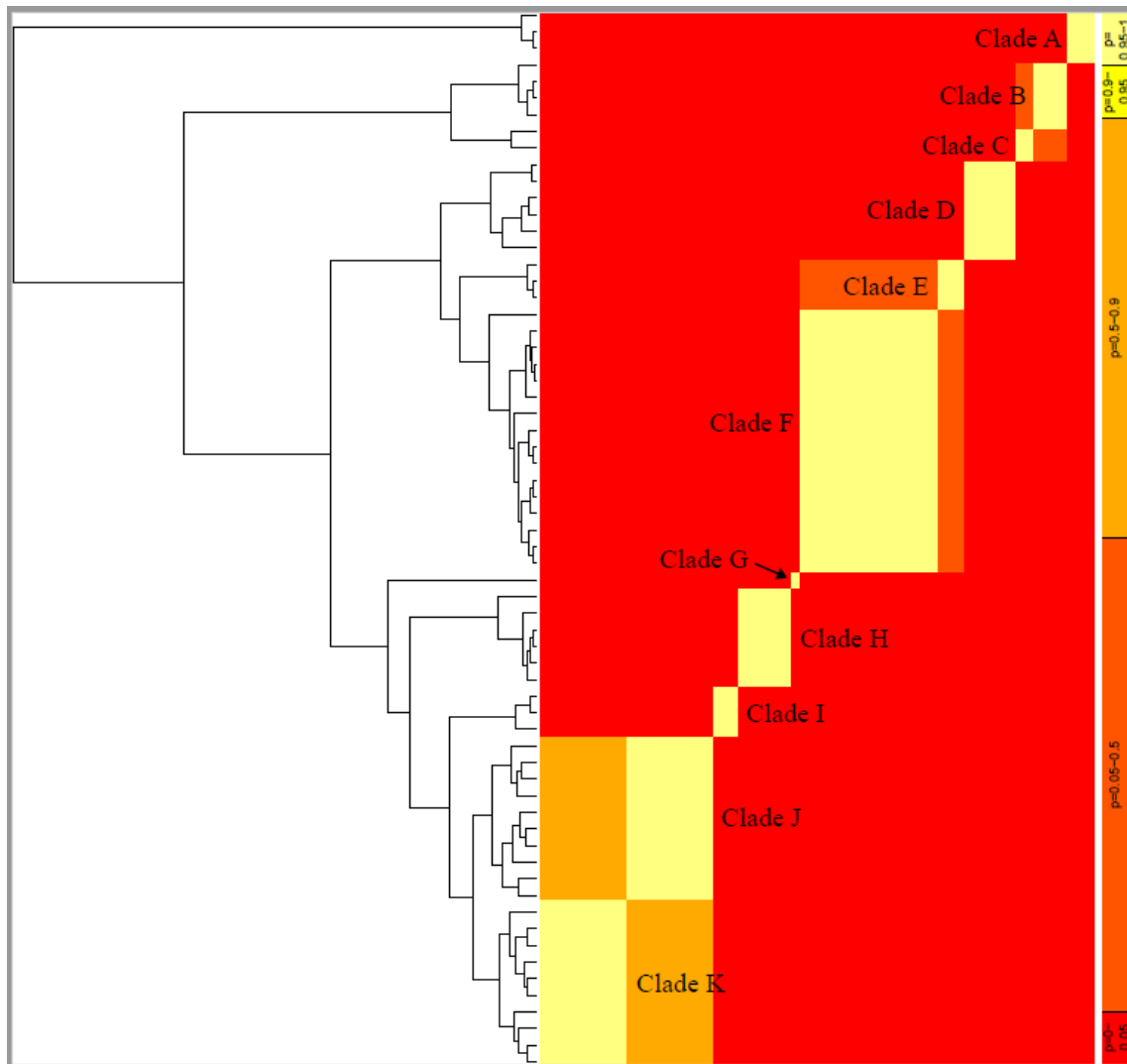


Figure S1. Heatmap of the Bayesian implementation of the general mixed yule-coalescent (bGYMC) for *P. mystacalis* samples. Recovered clusters are represented by yellow blocks. The scale on the right shows the correspondent posterior probability for each colour.

Figure S2. Bayesian reconstruction of the 16S gene tree of phylogenetic relationships between *P. mystacalis* and other species of *Pseudopaludicola*. Node numbers are posterior probabilities.

References

- Feller, A.E., Hedges, S.B. (1998): Molecular evidence for the early history of living amphibians. *Mol. Phylogenetics Evol.* **9**: 509–516.
- Hedges, S. B. (1994): Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the Acad. Nat. Sci.* **91**: 2621–2624.
- Palumbi, S.R., Martins, A., Romano, S., Mc-Millan, W.O., Stice, L., Grabawski, G. (1991): *The Simple Fool's Guide to PCR, version 2.0*. Honolulu: University of Hawaii, Privately published, compiled by S. Palumbi.
- Titus, T.A., Larson, A. (1996): Molecular phylogenetics of desmognathine salamanders (Caudata: Plethodontidae): A reevaluation of evolution in ecology, life history, and morphology. *Syst. Biol.* **45**: 451–472.