UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Anuros de ilhas continentais: vicariância ou dispersão?

Iago Silva Ornellas

Vitoria, ES

Fevereiro, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Anuros de ilhas continentais: vicariância ou dispersão?

Iago Silva Ornellas

Orientadora: Leonora Pires Costa

Dissertação submetida ao Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal

Vitoria, ES

Fevereiro, 2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Universidade Federal no Espirito Santo que desde 2010 me fornece a estrutura e suporte necessário para eu alcançar meus objetivos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelos recursos aplicados ao Núcleo de Genética Aplicado à Conservação da Biodiversidade. À FAPES e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

A minha noiva Débora De'nadai Dalvi que durante toda minha trajetória acadêmica foi meu suporte emocional e a principal apoiadora de meus sonhos. Sua paciência e sua ajuda me auxiliaram não apenas fora da academia, porém se tornou imprescindível com incansáveis correções e sugestões certeiras durante toda a trajetória do mestrado.

A minha Orientadora Leonora Pires Costa, que me acolheu de braços abertos no laboratório mesmo sabendo que meu modelo experimental não possui pelos. Obrigado pela bagagem acadêmica despejada em mim e por toda experiência compartilhada.

Aos meus colegas de laboratório do Lamab que com grande trabalho de equipe torna o laboratório um ambiente amigável e colaborativo.

Ao Museu de Biologia Melo Leitão e Museu Nacional do Rio de Janeiro que me forneceram as amostras para meu estudo e todos aqueles que disponibilizaram as sequências on-line.

Gostaria de agradecer também a todos os professores do PPGBAN que estiveram comigo na minha jornada. Em especial Yuri Luiz Reis Leite, Sarah Maria Vargas e Valéria Fagundes que estiveram próximos a mim durante todo o percurso me auxiliando no laboratório, em questões burocráticas, ou com experiências compartilhadas.

A minha mãe por toda motivação e apoio. Você é minha principal professora e dedico não só essa, mas todas as conquistas a tudo que investiu em mim.

A todos amigos e familiares que de alguma forma estiveram envolvidos nesse processo.

Sumário

Resumo **3**

Introdução **5**

Materias e métodos **10**

Resultados **15**

Discussão **20**

Conclusão **27**

Anexos **29**

Referências **43**

RESUMO

A utilização de ilhas para estudos de eventos evolutivos trouxe importantes respostas para o entendimento de processos de isolamento de populações e colonização por poucos indivíduos fundadores. Porém, a maioria desses resultados foram observados em ilha oceânicas, que devido sua formação possui características extremas para estes fatores (isolamento e efeito fundador). Em ilhas continentais, a teoria de biogeografia de ilhas é menos aplicada, devido principalmente à sua proximidade com o continente e ao seu processo de formação. Seu tipo de formação e proximidade com o continente geram a manutenção e surgimento de espécies nas ilhas que seriam incapazes de se dispersar efetivamente pelo ambiente marinho. Anfíbios são intolerantes à ambientes salinos e altas temperaturas, sendo sua incapacidade de dispersão por ambientes marinhos bem aceita. Dessa forma, a presença de anuros em ilhas oceânicas é um evento extremante raro, porém, comum em ilhas continentais. A existência de sapos em ilhas continentais é atribuída a um evento vicariante durante a elevação do nível do oceano que ocasionou a formação da ilha. Examinamos as espécies *Thoropa miliaris* e *Adenomera marmorata* que estão presentes tanto em ilhas continentais quanto na porção costeira continental. Utilizamos a população insular residente de Ilha Grande na costa sul do Rio de Janeiro e diversas amostras do continente para entender os processos de isolamento e colonização da mesma. Através de análises moleculares com os marcadores mitocondriais 16s e Nd2 elucidamos informações sobre os efeitos da insularização na população, a possibilidade de eventos migratórios e se a colonização da ilha foi devido a um evento vicariante ou dispersivo. A perda da diversidade genética foi visualizada nas duas espécies, sendo condizente com animais isolados em ilhas, como já reportados em outros estudos. *T. miliaris* se comportou como o esperado para um anuro incapaz de se dispersar por ambiente marinho, apresentado alta divergência com a população costeira e migração tendendo à zero, com separação das populações datando a última grande elevação do nível do mar. Porém, *A. marmorata* apresentou resultados que indicam alta taxa migratória e uma colonização recente da ilha, compatível com eventos de colonização por dispersão.

Palavras-chave: Anfíbios, insular, populações, migração e vicariância

ABSTRACT

The use of islands for studies of evolutionary events has brought important answers for the understanding of processes caused by population isolation and colonization by few founding individuals. However, most of these results were observed on oceanic islands, which due to their

formation have extreme characteristics for these factors (isolation and founding effect). In continental islands, the theory of island biogeography is less applied, mainly because the short distance to the continent and its formation process. Their type of formation and proximity to the mainland generate appearance and permanence of species in the islands that would be incapable of effectively dispersing through the marine environment. Amphibians are intolerant to saline environments and high temperatures, being their inability to be dispersed through marine environments well accepted. Thus, the presence of anurans in oceanic islands is an extremely rare event, but common in continental islands. The existence of frogs in continental islands is attributed to a vicarious event during the elevation of the ocean that caused the formation of the island. We examined the species *Thoropa miliaris* and *Adenomera marmorata* that are present both in the continental islands and in the continental coastal portion. We used the resident island pollution of Ilha Grande on the south coast of Rio de Janeiro and several samples from the continent to understand the processes of isolation and colonization of the same. Through molecular analyzes with mitochondrial markers 16s and Nd2, we elucidate information about the effects of isolation on the population, the possibility of migratory events and whether island colonization was due to a vicarious or dispersive event. The loss of genetic diversity was visualized in both species, being compatible with isolated animals in islands, as already reported in other studies. *T. miliaris* behaved as expected for an anuran unable to be dispersed by marine environment, showing high divergence with the coastal population and migration tending to zero, with separation of the populations dating to the last great rise in sea level. However, *A. marmorata* presented results indicating a high migratory rate and a recent colonization of the island, compatible with events of colonization by dispersion.

Key words: Amphibians, insular, populations, migration and vicariance

INTRODUÇÃO

A biogeografia de ilhas acompanha a ciência evolutiva e ecológica desde o início do século XIX, com trabalhos seminais realizados por Alfred Russel Wallace e Charles Darwin (DARWIN, 1851; WALLACE, 1881). Embasados em trabalhos pioneiros, MacArthur e Wilson (1967), criaram ferramentas e teorias cruciais para explicar a diversidade e riqueza de espécies em ilhas, através dos processos de extinção, colonização e especiação. Devido a esses esforços sabe-se, atualmente, que as ilhas são modelos experimentais ideais, sendo pequenas o suficiente para quantificação de variáveis complexas, como variação de caracteres populacionais, e isoladas o suficientes para não sofrer interferência de variáveis externas (ABBOTT; GRANT, 1976; MAYR, 1963). Dessa forma, o que torna as ilhas ótimos modelos experimentais para o estudo de eventos evolutivos, ecológicos e biogeográficos, são: a capacidade de se amostrar eficientemente uma quantidade representativa de indivíduos; a forte estruturação genética populacional; e a sobrevivência dos indivíduos em ambiente análogo aos originários da espécie (LOSOS; SCHLUTER, 2000; MACARTHUR; WILSON, 1967; VELLEND, 2003).

A teoria de biogeografia de ilhas afirma que quanto mais afastadas da costa, menor será a probabilidade de ocorrência de fluxo gênico entre as populações insulares e costeiras, favorecendo o isolamento e consequente aumento da divergência genética entre elas (FRANKHAM, 1997; MACARTHUR; WILSON, 1967; VELLEND, 2003). Os primeiros trabalhos aplicando essa teoria concentraram-se em ilhas oceânicas (ilhas formadas pelo surgimento de magma ou por grandes cadeias de montanhas emersas), principalmente devido a intensificação das limitações naturais, ou seja, maior isolamento e ecossistema único, evidenciando processos como deriva genética e seleção natural (CALSBEEK; SMITH, 2003; FRANKHAM, 1997). Porém, além das características inerentes às ilhas oceânicas, outros fatores necessitam de análise para entender a dinâmica das espécies ali habitantes. Em ilhas oceânicas a possibilidade de um organismo coloniza-la depende do surgimento da ilha, e um

nível de sucessão ecológica suficientemente adequado para manutenção das espécies colonizadoras, necessitando-se considerar ainda a capacidade de dispersão em ambientes marinhos de cada espécie colonizadora (CASE; CODY, 1987).

Em geral, animais voadores, como pássaros e morcegos possuem uma grande capacidade de dispersão, sendo grupos comuns nas ilhas (ABBOTT; GRANT, 1976). Por outro lado, animais terrestres como répteis, apesar de possuírem capacidade de dispersão relativamente baixa através de barreiras marinhas, possuem ótima capacidade de persistência, o que justifica a presença, embora rara, de espécies desse grupo em ilhas (WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007). Já mamíferos não-voadores e anuros, que possuem tanto uma pobre capacidade de dispersão quanto de persistência, quando presentes em ilhas oceânicas, tornam-se verdadeiras incógnitas (CASE; CODY, 1987; WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007). Considerando a colonização de ilhas oceânicas por qualquer um dos grupos um evento raro e único, o estudo da atuação de forças evolutivas (seleção e/ou deriva) diferenciadas guiando a especiação dessas populações é recorrente (ABBOTT; GRANT, 1976; CASE; CODY, 1987; FRANKHAM, 1997; MACARTHUR; WILSON, 1967; VELLEND, 2003; ZIMMERMAN; BIERREGAARD, 1986).

Ilhas continentais possuem diferenças significativas quando comparadas às oceânicas. Devido à proximidade com o continente, essas ilhas são caracterizadas por elevado índice de *turnover*, causado por animais com alta vagilidade mantendo, em certas situações, o fluxo gênico com populações continentais (BITTKAU; COMES, 2005; JORDAN; SNELL, 2008; VELO-ANTÓN; ZAMUDIO; CORDERO-RIVERA, 2012). A formação desse tipo insular, em particular, também é diferenciada: ilhas oceânicas, em sua maioria, são formadas a partir de insurgência vulcânica, enquanto ilhas continentais se formam a partir da fragmentação de porções continentais cercadas por água, após o aumento no nível do mar (MARTIN; SUGUIO, 1975). Ilhas continentais são conhecidas também por possuírem sucessão ecológica em estado mais adiantado, devido a insularização de um ambiente já formado, enquanto ilhas oceânicas começam do ponto zero de sucessão ecológica. Ainda pode-se

considerar que grandes alterações nos níveis oceânico possam ter ocorrido mais de uma vez durante a vida de ilhas continentais, repetindo-se o contato das populações costeiras com as insulares (SUGUIO et al., 2005).

Tendo em consideração as características mencionadas, a dinâmica evolutiva de populações insulares das plataformas continentais difere consideravelmente quando comparado com as de ilhas oceânicas (BELL; DREWES; ZAMUDIO, 2015; CALSBEEK; SMITH, 2003; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; VELLEND, 2003). Na formação de ilhas continentais, pequenos fragmentos que permanecem acima do nível do mar são isolados, podendo conservar todo tipo de espécies que neles habitam, até mesmo aquelas que seriam incapazes ou improváveis de se dispersar via ambiente marinho. Dessa forma, pode-se supor que as espécies persistentes, ou seja as que efetivamente mantenham uma população viável na ilha, passarão pelo processo de efeito gargalo, ocasionado pelo evento de vicariância da separação insular do ambiente costeiro, diferentemente do que ocorre com espécies em ilhas oceânicas, que passarão pelo processo de efeito fundador (BITTKAU; COMES, 2005; BRASILEIRO; OYAMAGUCHI; HADDAD, 2007; FRANKHAM, 1997; WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007).

Em ilhas continentais se a população existente no momento do evento vicariante é pequena, e a migração é suficientemente baixa, previsões de tamanho da ilha e diversidade genética devem permanecer semelhantes às de ilhas oceânicas, porque ilhas menores irão suportar populações com tamanhos menores, e tais populações tendem a perder diversidade genética de forma relativamente rápida, pelo processo de deriva genética (FRANKHAM, 1997). A redução da diversidade genética em ilhas continentais já foi demostrada em vários trabalhos (e.g., BITTKAU; COMES, 2005; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; FRANKHAM, 1997; VELO-ANTÓN; ZAMUDIO; CORDERO-RIVERA, 2012).

Outra diferença se encontra na capacidade de migração de espécies para as ilhas. Devido a maior proximidade com a costa, ilhas continentais tendem a possuir uma maior probabilidade de colonização, que dependerá inteiramente da vagilidade dos organismos e do grau em que os ambientes marinhos agem como barreiras para a dispersão de cada tipo de indivíduo (CASE; CODY, 1987). Desta forma, se não existe capacidade de dispersão de organismos para a ilha, a distância da mesma com o continente não fará diferença, e aqueles que persistirem no novo ambiente insular serão isolados da população costeira, estando, portanto, sujeitos ao processo de deriva. Caso exista capacidade de dispersão, haverá fluxo gênico entre a população costeira e a insular, mantendo assim uma diversidade genética semelhante, o que ainda pode variar se o processo de dispersão for uni ou bidirecional (BROWN; GUTTMAN, 2002).

Anfíbios anuros possuem registros de ocorrência em quase todo habitat terrestre, com exceção dos polos, desertos, e ilhas oceânicas (FROST, 2014). Sua grande dependência de água doce e baixa capacidade osmorregulatória em água salgada impossibilita a sobrevivência destes indivíduos em ambientes salinos, o que corrobora a baixa capacidade migratória por meio oceânico, exemplificado pelas baixas taxas de colonizações insulares do grupo (DUELLMAN; TRUEB, 1994; JOHN MEASEY et al., 2007). Deste modo o ambiente marinho é considerado uma forte barreira de dispersão para estes organismos, entendendo-se que indivíduos presentes em ilhas da plataforma continental sejam provenientes de relictos isolados da população costeira (BROWN; GUTTMAN, 2002). No entanto, estudos recentes já demonstraram a existência, ainda que baixa, de algum nível de dispersão destes animais para ilhas continentais, mesmo ainda não tendo sido compreendido (DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; EVANS et al., 2003; VENCES et al., 2003).

Pela costa sudeste do Brasil existem diversas ilhas formadas pela incursão do oceano, sendo algumas provenientes de regiões que durante a última glaciação possivelmente eram ocupadas por Mata Atlântica (LEITE et al., 2016). Registros geológicos mostram também evidências de diversas incursões marítimas desde do Pleistoceno, com o último grande recuo ocorrendo a aproximadamente

15 mil anos (SUGUIO et al., 2005). Considerando a hipótese de que todos os indivíduos anfíbios-anuros presentes em ilhas da plataforma continental sejam relictos provenientes desse período de fragmentação e, devido a fisiologia dos mesmos que dificulta a dispersão em ambiente marítimos, considera-se instigante a avaliação de assinaturas genéticas de dispersão, divergência e isolamento populacional, a fim de desvendar a história natural por trás do isolamento de populações de anuros em ambientes de ilhas continentais. O presente trabalho utiliza as espécies de anuros *Adenomera marmorata* (Steindachner, 1867) e *Thoropa miliaris* (Spix, 1824) como modelos experimentais para investigar e melhor entender parte da história natural, evolução, dispersão, migração e colonização de populações insulares.

O estudo parte da premissa que indivíduos insularizados em ilhas da plataforma continental na porção sudeste da Mata atlântica, estão separados de suas populações continentais originárias pelo menos desde a última máxima glacial, quando estas eram conectados com o continente, devido sua incapacidade de migração por ambientes marinhos. Partindo dessa premissa, é esperado um forte isolamento geográfico, com acentuada deriva genética, controlada pelo tempo de separação da população costeira. Assim, a partir da análise de genes mitocondriais de populações continentais e insulares de *T. miliaris e A. marmorata* analisamos: (1) os efeitos do isolamento geográfico observados na genética destas populações continentais e insulares, (2) a possibilidade de eventos migratórios, (3) a hipótese que melhor explica a presença destas populações insulares, através de eventos de vicariância ou dispersão.

MATERIAL

Grupos investigados

Thoropa é um dos três gêneros de anfíbio-anura da família Cycloramphidae, que se distribui por toda Mata Atlântica na costa do Brasil, sendo composto por seis espécies descritas. *Thoropa miliaris* é a espécie com a maior distribuição dentro do gênero, distribuindo-se entre as latitudes -12.6 e -23.8 (de Salvador, no estado da Bahia, ao munícipio de São Paulo, estado de São Paulo), ocorrendo em simpatria com *T. taophora, T. lutzi* e *T. petropolitana* (FROST, 2014). Já as duas outras espécies do gênero, *T. saxatilis* e *T. megatympanum,* ocorrem sem sobreposição com as demais, ao sul (estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e na região central da Mata Atlântica (estado de Minas Gerais), respectivamente.

O gênero *Thoropa* é especialmente caracterizado pelo singular nicho reprodutivo em afloramentos rochosos com laminas d'água (ALMEIDA, 2015; FEIO; NAPOLI; CARAMASCHI, 2006). Outra característica do grupo é uma resistência a ambientes salinos, desconhecidos em outros anuros, bem como alimentação de invertebrados marinhos (ABE; BICUDO, 1991; HOPKINS; EDMUND D. BRODIE, 2015; SAZIMA, 1971). Tais características promovem a ocupação de nichos poucos explorados por anuros, incluindo ambientes insulares. Em trabalho realizado por Bittencourt-Silva (2013) com 49 espécies de anuros, *T. miliaris* foi identificada como a única espécie presente em todas as sete ilhas estudadas (no litoral do Rio de Janeiro).

Adenomera é um gênero de anfíbio-anura da família Leptodactylidae amplamente distribuído na América do Sul, composto por 18 espécies descritas. *Adenomera marmorata* é uma espécie de serapilheira com hábito noturno, visualizada principalmente durante dias chuvosos (IZECKSOHN; CARVALHO-E-SILVA, 2001). Possui distribuição na Mata Atlântica, ocorrendo no sudeste brasileiro do norte do Rio de Janeiro ao sul de Santa Catarina (FROST, 2014). *Adenomera marmorata* é a única espécie do gênero já visualizada em ilhas (BITTENCOURT-SILVA; DA SILVA; SILVA, 2013).

Área de estudo e material amostrado

O arquipélago ao sul do Rio de Janeiro é composto por diversas ilhas continentais formadas pela flutuações do nível do oceano e possui uma gama de 49 espécies de anuros registradas, sendo que *A. marmorata* não se encontra presente apenas em uma das sete ilhas investigadas no estudo de Bittencourt-Silva (2013). Ilha Grande é a mais distante ilha do arquipélago, chegando a 3 quilômetros de distância em relação ao continente, e a que possui a maior diversidade e abundância de anuros descritas (BITTENCOURT-SILVA; DA SIVA SIVA, 2013).

No trabalho foram utilizadas 28 amostras de tecidos de *T. miliaris* e 12 de *A. marmorata*, permutadas com o Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), provenientes de espécimes coletados em 14 e 6 localidades do Rio de Janeiro (Figuras 1 e 9), respectivamente. Sete sequências do gene ribossomal 16s de *A. marmorata* foram obtidas a partir da plataforma Genbank, todas de localidades continentais no estado do Rio de Janeiro. Outras duas sequências foram obtidas no GenBank: *Adenomera martinezi* (16s) *e Bufo haematiticus* (Nd2). Adicionalmente, mais 8 espécimes de *T. miliaris* e 12 de *A. marmorata* provenientes de diferentes localidades da Ilha Grande foram coletados no âmbito desse estudo durante o período entre 8 e 12 de março de 2017 em Ilha Grande, arquipélago da Costa Verde, sul do Rio de Janeiro (Tabelas 1 e 6).

As coletas foram autorizadas pelo SISBIO e pelo INEA com o número 52838-1 e 003/2017, respectivamente. As coletas dos espécimes foram realizadas no período noturno por meio de busca ativa. Após a captura, os animais foram sacrificados após aplicação de anestesia. Todos os indivíduos foram medidos e uma amostra de tecido hepático foi retirada, sucedendo-se a fixação do espécime com formaldeído 10%. O tecido hepático de cada indivíduo foi armazenado em álcool 95% e etiquetado, referenciado com o número de tombo do animal. Os espécimes coletados foram depositados no Museu de Biologia Melo Leitão do Instituo Nacional da Mata Atlântica em Santa Teresa, no estado do Espírito Santo.

Análises moleculares

Foram utilizadas 31 amostras de tecido de *T. miliaris* e 18 de *A. marmorata* para extração, amplificação e sequenciamento. As amostras de tecido foram submetidas ao protocolo de extração salina, descrito por Bruford et al. (1992) e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para checagem do sucesso da extração de DNA. As amostras com sucesso de extração foram averiguadas quanto à concentração de DNA por meio de espectofotometria (nanodrop) e corrigidas para 100ng/mL de DNA por solução.

Os marcadores mitocondriais *NADH dehydrogenase 2* (Nd2) e subunidade 16 (16S), foram amplificados através da clonagem in vitro pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados com o *kit BigDye Terminator* 3.1 (Applied Biosystems). As sequências foram obtidas por meio do sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Espírito Santo (NGACB-UFES).

O alinhamento foi realizado através do método MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) e, posteriormente, as sequências foram conferidas e corrigidas manualmente. O melhor modelo evolutivo foi calculado para cada marcador molecular utilizando-se o software JModelTest (POSADA, 2008).

A partir das sequências alinhadas foram geradas árvores de afinidade filogenética pelos algoritmos de Inferência Bayesiana (IB) por meio do software MrBayes (RONQUIST et al., 2012). A ánalise de IB foi realizada através do algoritmo de integração de Monte Carlo via cadeias de Markov, percorrendo 10 milhões de gerações, com árvores amostradas a cada 1000 gerações, descartando-se as 1000 primeiras como burn-in. As sequências do gene ribossomal 16s dos grupos externos para *T. miliaris, T. taophora* e *Cyicloramphus brasiliense,* foram consultadas através da plataforma Genbank com os códigos KU517261 e KM390777, respectivamente. As sequências do gene 16s dos grupos

externos, *A. martinezi* e *Leptodacylus fucus*, foram também adquiridas no Genbank com os códigos KU495119 e AY911281, respectivamente. Para o marcador mitocondrial Nd2 de *T. miliaris* foram utilizados como grupos externo *T. taophora* e *T. lutzi*. Para as análises referentes à *A. marmorta* foram utilizadas amostras de sequências provenientes do GenBank para os dois marcadores moleculares anteriormente mencionados, sendo utilizadas sequências disponibilizadas de *A. martinezi* e *L. fuscus* para o gene mitocondrial 16s e de *Bufo haematiticus* para o marcador ND2.

As distâncias genéticas foram calculadas pelo software MEGA 6 (TAMURA et al. 2013) utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P). Dados de dinâmica populacional foram estimados por meio de testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989), Fs de Fu (FU, 1997), diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (h) pelo programa Dnasp (LIBRADO; ROZAS, 2009). Índices de divergência genética (Fst) foram estimados por meio do software Arlequin (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005) .

O software IM (HEY; NIELSEN, 2004) foi usado para estimar o número efetivo de migrantes por geração (m), o tempo de divergência entre as populações (t) e o tamanho efetivo de cada população continental e insular, assim como o tamanho efetivo da população ancestral (Q1, Q2 e Q1a, respectivamente). Utilizou-se as amostras das populações de cada espécie, sem adição ou subtração de sequencias. Para a parametrização dos dados foi utilizado uma herança mitocondrial de 0,25 e modelo evolutivo de HKY. As taxas evolutivas foram retiradas de trabalhos pretéritos sendo utilizado 0,00005 para o gene Nd2 e 0,00001 para o gene 16s (BRUNES et al., 2010; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; PHILLIPS et al., 2006). Assumiu-se como tempo de geração de 4 anos para cada espécie (DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015). Foram feitos pelo menos 20 testes para cada espécie, variando valores de theta (entre 5 a 30), migração (variando de 5 a 0) e tempo máximo de divergência (variando de 500 a 30000) para encontrar a melhor distribuição de probabilidade (HEY; NIELSEN, 2004). Foi assumida uma migração simétrica

(m1=m2) para as duas espécies. Usou-se um *burn-in* e 500000 passos e gravação de resultados a cada meia hora.

RESULTADOS

Thoropa miliares

Da espécie *Thoropa miliares*, foram obtidas 36 sequências do gene mitocondrial 16s e 29 do marcador mitocondrial Nd2. Durante a análise genética inicial, verificou-se que 5 das 28 amostras cedidas pelo Museu Nacional do Rio de Janeiro como pertencentes à exemplares dessa espécie não eram compatíveis com a designação taxônomica registrada, sendo então aqui identificadas como referentes à *Thoropa lutzi e T. taophora.* Assim, devido à ausência de dados do marcador mitocondrial Nd2 em plataformas *online,* estas sequências foram então utilizadas como grupo externo para as análises filogenéticas (Tabela 1).

Todas as sequências utilizadas após tratamentos dos dados possuem porcentagem de confiança acima de 95%, segundo o software de processamento de sequências Seqabi2500. A matriz de dados do marcador 16s apresentou tamanho máximo de 553 pares de base (pb) enquanto Nd2 alcançou 893pb. As análises descritivas das sequências e populações encontram-se na Tabela 2. Os resultados apresentaram uma redução significativa da porcentagem de polimorfismo e diversidade nucleotídica nas amostras insulares quando comparada às da população continental, enquanto para diversidade haplotípica os dados são incongruentes entre genes (aumento do 16s e redução Nd2) (Figura 2). Apenas a população continental apresentou valores estatisticamente significativos para Fs de Fu, 0,056 ($P<0,05$, 16S) e D de Tajima, -2,20931 ($P < 0,05$, ND2). O valor de Fst considerando o gene 16s e Nd2 entre as populações indicou diferenciação genética muito acentuada, com o valores de 0,37960 e 0,38609, respectivamente ($P< 0,005$) (HARTL; CLARK, 1997).

Ambas populações, continental e insular, foram recuperadas como monofiléticas, de acordo com os dois marcadores mitocondriais (Figura 3 e 4). Estas foram separadas por mais de 95% de confiança, *a posteriori*. As amostras dos espécimes MNRJ 90119 e MNRJ 43385 (Tabela 1) que foram coletados em Rio Claro-RJ e Paraty-RJ, respectivamente, encontram-se externas aos clados formados

pelas amostras das populações continental e insular na análise filogenética que utilizou as sequências do gene 16s. Além disso, devido à dificuldade de identificação de espécies do gênero *Thoropa,* seis amostras foram consideradas como pertencentes a espécies irmãs: a amostra MNRJ 79590 foi classificada como *Thoropa taophora* e as amostras MNRJ 77400, MNRJ 44566, MBML-10500, MBML-10502 e MBML 10501 foram classificadas como *Thoropa lutzi*.

A árvore filogenética obtida a partir do gene 16s (Figura 3) apresentou topografia com uma politomia com três grupos: população insular, população continental e um terceiro grupo contendo as amostras de espécimes coletados em Paraty-RJ e Rio Claro-RJ. Todos os clados formados possuem suporte de probabilidade *a posteriori* acima de 95%. A árvore obtida a partir do gene Nd2 mostrou separação da população insular, com alto valor de suporte, localizando a população como clado basal relativo as amostras de *T. miliaris* e separou todo o restante das amostras da população continental como grupo irmão da população insular. Na população continental foram observados outros agrupamentos, porém, sem suporte.

As redes de haplótipos do gene 16s mostraram quatro grupos bem definidos (Figura 5). Os haplótipos: Hap_14, 5, 8, 13 foram considerados como pertencentes à espécies diferentes de *T. miliaris.* O grupo formado por *T. miliaris* se encontra distante de outras espécies com pelo menos 15 passos mutacionais. A população insular e a continental não compartilham haplótipos e estão separadas com pelo menos seis passos mutacionais. Na rede *median-joining* feita com o marcador Nd2 (Figura 6A), as populações se mostraram conservadas intrapopulacionalmente, com no máximo um passo separando cada haplótipo, porém com alta variação genética entre as populações. Os haplótipos Hap_10, 11,12 foram considerados como pertencentes a espécies diferentes de *T. miliaris.* As populações continental e insular apresentaram distância de 23 passos do haplótipo mais próximo do continente. As populações de *T. miliaris* do continente e insular não compartilham haplótipos. As redes haplotípicas baseadas no algoritmo de *minimum spanning* para o marcador 16S mostrou o

haplótipo central (Hap_1) presente na ilha, já para o gene Nd2 não foi identificado um haplótipo central (Figura 5B e 6B).

A divergência genética intrapopulacional insular para o marcador 16s foi em média 0,3% (± 0,2%), enquanto para amostras continentais foi de 0,45% (± 0,76%). A divergência média entre ilha e o continente foi de 1,8% (± 0,24%) (Tabela 3). As outras espécies utilizadas na análise mostraram divergência média de 4% (± 0,85%) em relação à *Thoropa miliaris.* Para o marcador Nd2 a divergência média intrapopulacional insular observada foi de 0,09% (± 0,15%) e de 2,62% (± 3,77%) na continental. As diferenças interpopulacionais entre ilha e continente foram de 9,4% (± 0,9%) e as divergências interespecíficas para este gene chegaram a 16,5%(± 0,4%) em média (Tabela 4).

As análises da história populacional feitas no software IM, estimaram valores de taxa de migração quase nulo (0,0015) e tempo de divergência da população de aproximadamente 17.691 anos, considerando o valor mais aceito na Cadeia de Markov a *posteriori.* Observou-se também nos resultados uma população consideravelmente menor na ilha do que no continente e uma população ancestral com quase 3x a soma das duas populações (Tabela 5). Os gráficos de probabilidade (Figura 7) mostraram uma distribuição normal para a estimativa do tamanho da população continental, insular e para o tempo de divergência das populações. Já a distribuição da taxa de migração apresentou forma típica de valores que tendem a zero (NIELSEN; WAKELEY, 2001).

Adenomera marmorata

Foram obtidas 30 sequências de gene mitocondrial 16s e 14 sequências do marcador Nd2 (Tabela 6). Todas as sequências utilizadas após tratamentos dos dados possuem porcentagem de confiança acima de 95% segundo o software de processamento de sequências Seqabi2500.

A matriz de dados do marcador 16s apresentou tamanho máximo de 615 pares de base enquanto Nd2 alcançou 875pb. As análises descritivas das sequências e populações encontram-se na Tabela 7. Para o gene 16s a população insular se mostrou menos diversa, tanto na porcentagem de polimorfismo,

diversidade nucleotídica ou na diversidade haplotípica (Figura 8). Porém, para o gene Nd2 observou-se o inverso, o mesmo marcador sempre apresentando valores maiores de diversidade para a ilha em relação às demais. Nenhum teste de neutralidade teve validade estatística. O valor de Fst para os genes 16s e Nd2 entre as populações indicaram diferenciação genética moderada e forte, com o valor de 0,09 e 0,24, respectivamente (HARTL; CLARK, 1997).

Os genes utilizados não foram capazes de encontrar relações filogenéticas com suporte *a posteriori* suficientes; todos os ramos formados obtiveram valores abaixo de 95%. Mesmo com a utilização de amostras extras, retiradas do Genbank, a árvore de inferência bayesiana mostrou-se irresoluta para relações entre as populações continental e a insular (Figura 10 e 11).

As redes de haplótipos obtidas através do algoritmo *median joining* (Figura 12), identificaram para o gene 16s, 9 haplótipos nas populações e 6 intermediários. O haplótipo com maior número de sequências possui 15, sendo que 11 dessas são provenientes de amostras coletadas no continente e 4 de espécimes insulares. Outros 2 haplótipos compartilharam 3 sequências, as demais apresentaram menos. Considerando o haplótipo com 15 sequências compartilhadas, o haplótipo com maior número de passos mutacionais de distância está a 10 passos e se encontra no continente. Na rede gerada a partir do marcador Nd2 (Figura 13) foram observados 7 haplótipos, sendo 4 presentes em Ilha Grande e os 3 demais no continente. Dos haplótipos insulares dois possuem 3 amostras, sendo estes aqueles com o com maior grau de compartilhamento. Ilha e continente não apresentaram compartilhamento de haplótipos e a topografia da rede apresentou uma separação de pelo menos 7 passos mutacionais entre a população insular e a continental. No algoritmo *minimum spanning* (Figura 12B e 13B) as relações acima descritas mostraram-se semelhantes; porém, nos dois marcadores genéticos existe uma tendência do haplótipo central estar localizado na ilha, sendo que na rede obtida com o marcador 16s o mesmo haplótipo é compartilhado com amostras continentais.

A divergência genética intraespecífica observada para o marcador 16s foi em média de 3% (± 2%), sendo semelhante à das amostras continentais de 3% (± 1,9%). A divergência média dentro da ilha foi de 0,5% (± 0,4%). Quando consideramos a divergência interpopulacional, ilha/continente observa-se 2% (± 2%) (Tabela 8).

Para o marcador Nd2 a divergência intrapopulacional insular média foi de 0,4% (± 0,2%) e no continente 0%. As diferenças interpopulacionais entre ilha e continente foi de 3% (± 0,2%). As divergências intraespecíficas para este gene chegaram a 2%(± 1,4%) de média (Tabela 9).

Foi encontrando uma taxa de migração de 0,63 indivíduos por geração e um tempo de divergência entre as populações irresoluto. A população ancestral mostrou-se menor que a população continental, enquanto a população insular apresentou valores menores do que as duas anteriores. As curvas de probabilidade possuíram uma distribuição normal, com exceção do tempo de divergência que, independentemente do valor colocado, não se adequou a amostra (Figura 14).

DISCUSSÃO

Efeitos genéticos do isolamento

Thoropa miliaris

Os dados observados para a população de *Thoropa miliaris* em ilha continental se comportaram semelhante aos esperados para populações de outros grupos animais em ilhas oceânicas. A baixa capacidade de dispersão explica a baixa diversidade genética encontrada na população insular, já documentado também em trabalhos anteriores (BELL et al., 2012; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015). A hipótese de um profundo isolamento é ainda corroborada com a ausência de compartilhamento de haplótipos, o alto valor do Fst e ramos fortemente suportados separando as populações.

Provavelmente a forte estruturação genética da população insular observada tanto em um gene altamente variável (16S) e em um altamente conservado (Nd2) não se deva apenas a formação da ilha e separação espacial das populações. Bell (2012) hipotetiza um isolamento ainda pretérito ao aumento dos níveis dos oceanos aumentando ainda o tempo de separação das populações. Essa hipótese é suportada no presente trabalho pelas amostras de Paraty que não se encontrarem na população insular ou na, aqui denominada, continental, mostrando que mesmo com uma conexão terrestre não necessariamente há dispersão entre as populações.

Populações insulares possuem limitações que não afetam metapopulações em terra firme, como depressão endogâmica, perda da variação genética, acumulação de mutação deletérias e seleção afrouxada (WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007). Estes eventos são responsáveis pela maior parte das extinções em ambientes insulares (FRANKHAM, 1997). Desde 1600 é calculado que de todas as espécie extintas, 60% sejam insulares, sendo a maioria reflexo de uma seleção afrouxada devido ausência de predadores e posterior inserção da caça predatória (FRANKHAM, 1997;

WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007). Anuros não sofrem com este tipo de caça, porém, como no caso de Ilha Grande, a ocupação de zonas habitáveis promove a redução do habitat desses indivíduos, intensificando ainda mais um processo de gargalo, já acentuado pela insularização (DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; ZIMMERMAN; BIERREGAARD, 1986), além também da inserção de espécies predadoras como gatos e cachorros. Para uma melhor compreensão sobre os prejuízos da baixa diversidade genética são necessários estudos mais aprofundados, que auxiliem para se entender, se a baixa diversidade genética está sendo causada por reflexo à longo prazo da insularização ou se está sendo acelerada por ações antrópicas.

Adenomera marmorata

As análises do gene mitocondrial 16S mostraram-se semelhantes aos resultados obtidos para *T. miliaris*, com um prejuízo nítido na diversidade genética da população ilha. A insularização dessa população provocou acentuada diminuição na diversidade nucleotídica e na porcentagem de polimorfismo da mesma. Características, como já mencionadas, que favorecem uma série de prejuízos a população em questão (FRANKHAM, 1997), como riscos impostos pela perda da diversidade que podem levar a população à um vórtex de extinção rápido e sem saída (HEYER et al., 2013). Assim como, é evidente que com o tempo de permanência de uma população em um ambiente isolado promova a estabilização de fatores como acúmulo de mutações deletérias ou depressão endogâmica (WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007) porém, ressaltando novamente, a diminuição do habitat e degradação ambiental causado pelo turismo predatório pode intensificar esses eventos.

Análises com o marcador Nd2 mostraram resultados opostos aos observados com o gene 16S no presente estudo, e a outros trabalhos com anfíbios em ilhas (BITTKAU; COMES, 2005; BLACKBURN et al., 2013; BROWN et al., 2013; FRANKHAM, 1997). Sendo verificado uma menor diversidade genética nos espécimes residentes no continente. Um provável viés dos dados causado

pela diminuta amostragem de exemplares continentais pode ter sido a causa destes resultados. Dessa forma uma reanálise com maior número amostral para concretização e posterior discussão dos dados é indicada.

Mesmo com sinais de proximidade genética, observado na rede de haplótipos, ausência de suporte na topologia da árvore baeysiana e baixo valor de Fst que demonstra baixa distância genética entre as populações, os sinais genéticos de insularização ainda podem ser vistos. O isolamento de um pequeno número indivíduos resulta em uma rápida perda da diversidade genética (FRANKHAM, 1997), antes mesmo de ser visualizado uma separação consistente da outra população. As consequências para tais resultados indicam ou uma colonização mais recente da população ou uma taxa de evolução mais lenta para essa espécie.

Possibilidade de eventos migratórios

Thoropa miliaris

A baixa capacidade de dispersão de anuros combinada a intolerância ao sal e ainda sua filopatria a sítios reprodutivos torna-os péssimos migrantes. Nossas análises moleculares corroboram a ideia de populações separadas com baixo ou quase nulo compartilhamento genético. Porém, a análise através de cadeia de Markov do Software IM mostrou uma possibilidade *a posteriori* de baixa chance de um evento migratório entre as populações. Duryea (2015) estimou resultados semelhantes analisando indivíduos da espécie irmã de *T. miliaris, a T. taophora.* Esses dados mostram que mesmo possuindo "elevada" resistência à ambientes salinos quando comparados à outros anuros (ABE; BICUDO, 1991; SAZIMA, 1971) e a ilha ter uma proximidade baixa a costa é improvável eventos migratórios e recorrentes. Uma possível explicação seria a hipótese de eventos migratórios via balsas naturais originadas a partir de tempestades, ou ainda, introdução antrópica não propositais (DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015). Ilha Grande é um ponto turístico famoso no Rio de Janeiro, sendo

visitada por milhares de barcos semanalmente, e *T. miliaris* é uma espécie já visualizada em regiões costeiras e também em zonas urbanizadas (FEIO; NAPOLI; CARAMASCHI, 2006). A possibilidade de balsas naturais ou introduções antrópicas não propositais não pode ser descartada, no entanto, devido a raridade de ocorrência desse evento, estimar como aconteceu torna-se inviável.

Adenomera marmorata

O compartilhamento de haplótipos e o baixo suporte dos ramos observados na árvore Baeysiana indicam uma proximidade atípica da população insular com a continental, não esperado em populações de anfíbios insularizados (BRASILEIRO; OYAMAGUCHI; HADDAD, 2007; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; JOHN MEASEY et al., 2007). Hipóteses como baixa taxa evolutiva do gene 16S, conservação genética devido a depressão endogâmica ou resposta de um efeito fundador podem explicar a proximidade genética entre as populações amostradas. Porém, análises no programa IM revelaram não só elevado índice de eventos migratórios, quando comparado com outros trabalhos (BELL et al., 2012; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015), como também o tempo médio do último ancestral das duas populações datando 4 mil anos. Esses resultados corroboram a hipótese de um contato secundário mais recente entre as populações, representadas pelo índice de migração e tempo médio do último ancestral. A hipótese de uma colonização posterior ao surgimento da ilha é viável, a datação do ancestral mais recente e a alta taxa de migração corroboram esta hipótese.

A hipótese de um evento vicariante com posterior manutenção da população, por repetidas migrações, faz-se improvável devido à dificuldade de dispersão do grupo. Porém, a ideia de uma balsa natural transportando um grupo de indivíduos, como um evento único torna-se viável, corroborada ainda com o modo de dispersão em grupo da espécie em Ilha Grande relatado no trabalho de Almeida-Gomes *et al* (2007). Este relato suporta a ideia que a espécie não tem um modo de locomoção solitário e sim, em grupos, facilitando a colonização por balsas naturais. Esta espécie, em Ilha Grande, foi coletada em um açude salino com alta abundância de indivíduos. Tempestades ou eventos que gerem

um deslocamento de massas de terras ou grandes quantidades de substrato pelo mar podem ter sido os responsáveis pelo alto nível de migração observados nos resultados. O alto nível de migração observado, diverge consideravelmente da espécie *T. miliaris, mostrando* um panorama desfavorável frente à hipótese de inserção antrópica, visto que este seria um evento raro e pontual, e dificilmente acarretaria em um compartilhamento genético tão amplo na população insular, como observado nos dados. Outro dado que corrobora a uma não inserção antrópica é que a ilha possui grande extensão, sendo que apenas a costa é urbanizada, com tais características, uma explicação via inserção antrópica esperar-se-ia que indivíduos coletados próximos às regiões urbanizadas possuíssem um *pool* gênico diferente daqueles coletados em áreas mais distantes, fato não observado. Outro ponto que refuta a ideia de inserção antrópica é a distância média com o último ancestral, que não confirma a presença de grande fluxo de barcos entre a ilha e o continente e ausência de espécimes mais aparentadas com a população costeira do que com a própria ilha.

Presença da população insular se deve a um evento vicariante ou dispersivo?

Thoropa miliaris

A existência de anfíbios em ilhas continentais sempre foi vinculada a relictos provenientes de conexões terrestres entre o que hoje é terra firme e a ilha (BRASILEIRO et al., 2007; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015; MAGESKI et al., 2015; SILVA; CARVALHO; BITTENCOURT-SILVA, 2008). Seu embasamento se dá em ilhas como Ilha Grande devido a diversidade de anuros ali encontrada, porém, essa hipótese nunca foi testada.

Na população insular de *T. miliaris* foram observados sinais genéticos típicos de animais isolados e com pequeno número apresentando o *pool* genético altamente estruturada. Além disso, a análise populacional demostrou um tempo de separação médio de 18 mil anos, época esta que a última máxima glacial (UMG) está datada. Sabe-se que durante a UMG houve redução dos níveis oceânicos

uma provável conexão entre a ilha e o continente (MARTIN; SUGUIO, 1975; SUGUIO et al., 2005). Apesar de possuírem observados níveis migratórios, mesmo que baixos, é improvável o sustento ou surgimento de uma população a partir de poucos migrantes. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de toda plataforma continental estar coberta pela Mata Atlântica durante UMG, como reportado no estudo Leite *et al* (2016). Seguindo a hipótese de uma expansão da floresta atlântica para a plataforma continental e a possibilidade das populações continentais serem ancestrais da população insular, como observado na rede de haplótipos *minimum spanning,* é viável hipotetizar sua origem via evento de dispersão Ilha-continente quando estes ainda eram conectados. Segundo Suguio et al. (2005), na época da UMG a região hoje conhecida como Ilha Grande, não era insularizada, mas um pico na plataforma continental. Outro fator a ser considerado é se a redução da diversidade genética e constante manutenção endogâmica geraria uma retenção de características genéticas ancestrais fazendo com que tenha um viés espacial, uma vez que os haplótipos podem ser "ancestrais", porém a população ancestral não se concentrava naquela localidade. Para *T. miliaris* o padrão genético encontrado e os resultados gerados trazem informações condizente com um evento vicariante, porém a dúvida que surge era onde a população ancestral estava localizada. A população ancestral migrou para o continente com o aumento do nível do mar, ou ela apenas foi separada pelo oceano? Independente desta resposta a população ancestral foi separada pelo aumento do nível do mar, porém onde estava localizada essa população que abre o paradigma de como era a ocupação da Mata Atlântica no que hoje é a plataforma continental submersa. Análises mais detalhadas com um maior número de modelos e marcadores genético podem trazer a resposta para essa pergunta.

Adenomera marmorata

A atribuição da presença desta espécie em Ilha Grande pode partir de dois panoramas: (1) Relicto anterior ao aumento do nível do mar; ou (2) Colonização através de evento migratório.

Se compararmos os resultados encontrados com *T. miliaris* e em outros trabalhos podemos identificar uma forte estruturação genética causada pelo isolamento (BELL et al., 2012; DURYEA; ZAMUDIO; BRASILEIRO, 2015). Dessa forma, devido ao alto compartilhamento e baixa estruturação genética, e ainda assim apresentando efeitos do isolamento no *pool* genético, a hipótese de uma colonização posterior ao surgimento da ilha é viável. A datação do ancestral mais recente e a alta taxa de migração corroboram esta ideia.

A hipótese de um evento vicariante e uma posterior manutenção por repetidas migrações faz-se improvável devido à dificuldade de dispersão. Porém, a ideia de uma balsa natural carregando um grupo de indivíduos colonizadores é plausível. Esta espécie, em Ilha Grande, foi coletada em um açude salino com alta abundância de indivíduos, e outros trabalhos já relataram uma alimentação a base de crustáceos (ALMEIDA-GOMES; VAN SLUYS; ROCHA, 2007). Sua presença em ambientes costeiros e salinos favorecem a tese de tempestades ou eventos geradores de deslocamento de massas de terras ou plantas pelo mar podendo ter sido a origem da presença desta espécie na ilha. A ideia de uma segunda conexão entre ilha e continente nos últimos 6 mil anos é negada por diversos estudos (ANGULO; LESSA; SOUZA, 2006; DE MAHIQUES et al., 2010; SUGUIO et al., 2005). Porém, sabe-se que flutuações do nível oceânico de 3 a 5 metros ocorreram (SILVA et al., 2014) durante esse período, e aceita-se que tais eventos causem grandes mudanças na topografia geológica, sendo ainda, um dos principais eventos erosivos e que causam mudanças nos cursos de rios, favorecendo o desprendimentos de massas terrestres e criação de possíveis balsas naturais (SILVA et al., 2014).

CONCLUSÃO

As duas populações mostraram padrões diferentes em seu aspecto histórico, porém se comportam de forma geneticamente semelhante. As duas populações insulares apresentam assinaturas genéticas típicas de populações isoladas, representando grupos que merecem uma maior atenção devido à alta vulnerabilidade que apresentam. Os reais efeitos da urbanização e do turismo predatório à Ilha Grande esforços de estudo para uma melhor conservação das populações insulares não só de anuros, mas como de todas as populações insulares, que em um geral mostram-se altamente vulneráveis.

Observou-se que a capacidade migratória por barreiras marinhas ainda se mostra muito baixa para grupo. A combinação de suas características fisiológicas ecológicas e comportamentais favorecem uma filopatria e aversão à dispersão por ambientes salinos. Porém, alternativas devem ser levadas em conta, como balsas naturais, grandes tempestades ou ações antrópicas promovendo efeitos diretos na dispersão do grupo.

A história natural de anuros insulares é erradamente aceita como um único processo de vicariância, os poucos estudos realizados com tais populações já demostraram padrões antes desacreditados. Este trabalho utilizou apenas dois modelos experimentais e mesmo assim propõe um padrão de colonização, que talvez não seja tão raro quando se pensa, pois, é muito provável que balsas naturais estejam diretamente ligadas a tais eventos colonizadores de grupos de anuros. Outros trabalhos também discutiram esta possibilidade ainda com distâncias muito maiores (BLACKBURN et al., 2013; JOHN MEASEY et al., 2007; POUX et al., 2005).

As considerações aqui discutidas e os resultados geraram informações novas e de suma importância para a conservação e entendimento das populações, abordando os efeitos da insularização e o prejuízo genético causado, e a antes não considerada possibilidade e eventos migratórios. A

hipótese de um evento colonizador da espécie *A. marmorata* sendo diferente do consenso de um evento vicariante, mostrou-se como um novo paradigma para presença de anuros em ilhas.

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1 - Lista de amostras utilizadas nas análises populacionais de *T. miliaris*, com as respectivas informações sobre identificação, modo de aquisição, espécies utilizadas nas análises, localidade de coleta e sucesso na obtenção das sequências dos genes 16s e Nd2 para cada amostra. MBML: Museu de Biologia Melo Leitão; MNRJ: Museu Nacional do Rio de Janeiro; ISO: número de catálogo do coletor - Iago Silva Ornellas.

Amostras	Aquisição	Espécie	Localidade	Gene 16s	Gene Nd2
ISO 35	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 36	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 37	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 39	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 40	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 41	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 42	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 64	Coletado	*Thoropa miliaris*	Ilha Grande - RJ	*	*
KM390777	Genbank	*Cycloramphus brasiliensis*	Rio de Janeiro - RJ	*	
KU517261	Genbank	*Thoropa taophora*	Ubatuba - SP	*	
MBML 10500	Museu	*Thoropa lutzi*	Santa Teresa - ES	*	*
MBML 10501	Museu	*Thoropa lutzi*	Santa Teresa - ES	*	*
MBML 10502	Museu	*Thoropa lutzi*	Santa Teresa - ES		*
MNRJ 40642	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	*
MNRJ 43385	Museu	*Thoropa miliaris*	Paraty - RJ	*	*
MNRJ 43617	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	*
MNRJ 44566	Museu	*Thoropa lutzi*	Teresópolis - RJ	*	*
MNRJ 58145	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	*
MNRJ 59036	Museu	*Thoropa miliaris*	Cantagalo - RJ	*	*
MNRJ 70701	Museu	*Thoropa miliaris*	Macaé - RJ	*	*
MNRJ 73080	Museu	*Thoropa miliaris*	Maricá - RJ	*	*
MNRJ 74077	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	
MNRJ 74078	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	
MNRJ 74658	Museu	*Thoropa miliaris*	Niterói - RJ	*	*
MNRJ 74743	Museu	*Thoropa miliaris*	Saquarema - RJ	*	*
MNRJ 75029	Museu	*Thoropa miliaris*	Maricá - RJ	*	*
MNRJ 75039	Museu	*Thoropa miliaris*	Maricá - RJ	*	*
MNRJ 76758	Museu	*Thoropa miliaris*	Saquarema - RJ	*	*
MNRJ 77400	Museu	*Thoropa lutzi*	Nova Iguaçu	*	*
MNRJ 77976	Museu	*Thoropa miliaris*	Maricá - RJ	*	*
MNRJ 79590	Museu	*Thoropa taophora*	Saquarema - RJ	*	
MNRJ 79591	Museu	*Thoropa miliaris*	Saquarema - RJ	*	
MNRJ 83107	Museu	*Thoropa miliaris*	Mesquita - RJ	*	*
MNRJ 86302	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	
MNRJ 87539	Museu	*Thoropa miliaris*	Petrópolis - RJ	*	
MNRJ 89896	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio de Janeiro - RJ	*	*
MNRJ 90119	Museu	*Thoropa miliaris*	Rio Claro - RJ	*	
Total	**3**	**4**	**15**	**36**	**28**

Tabela 2 - Resultados descritivos alcançados nas análises moleculares de *T. miliaris*, relacionando o gene amostrado, número de amostras ilha/continente, número máximo de pares de base obtidos (PB), porcentagem de polimorfismo encontrado em cada amostra, número de haplótipos, diversidade haplotípica (H) e diversidade nucleotídica (Pi), além do modelo evolutivo utilizado nas análises.

T. miliaris								
	Gene	Amostras	PB	Polimorfismo	Haplótipos	H	Pi	Modelo evolutivo
Continente	16s	22	546	5,45%	7	0,54	0,0078	GTR+G
Ilha	16s	8	534	0,61%	4	0,75	0,0026	
Continente	Nd2	16	893	9,72%	7	0,825	0,0224	HKY+G
Ilha	Nd2	7	893	0,22%	2	0,286	0,0006	

Tabela 3 - Valores referentes a média das distâncias genéticas entre as amostras de *C. braziliense*, *T. lutzi*, *T. taophora* e das populações continental e insular de *T. miliaris* posicionados na diagonal à esquerda, e respectivos valores de erro padrão na diagonal à direita, encontrados nas análises filogenéticas para o marcador mitocondriais 16s.

C. braziliense		0.01	0.01	0.01	0.01
***T. lutz*i**	0.08		0.01	0.01	0.01
T. taophora	0.08	0.04		0.01	0.01
Continente	0.09	0.05	0.03		0.01
Ilha	0.08	0.04	0.03	0.02	

Tabela 4 - Valores referentes a média das distâncias genéticas entre as amostras de *T. lutzi e* das populações continental e insular de *T. miliaris* posicionados na diagonal à esquerda, e respectivos valores de erro padrão na diagonal à direita, encontrados nas análises filogenéticas para o marcador mitocondriais ND2

***T. lutz*i**		0.02	0.02
Continente	0.18		0.02
Ilha	0.16	0.09	

Tabela 5 – Resultados das estimativas da população efetiva continental (Q1), insular (Q2) e população ancestral (QA), do tempo de divergência da população insular e continental (T) e taxa de migração por geração (M) para *T. miliaris*. HiPt: representa o valor máximo alcançado da probabilidade a posterior, sendo que 95Lo encontra-se 2,5% abaixo deste ponto e 95Hi 2,5% acima.

Value	**Q1**	**Q2**	**QA**	**T**	**M**
HiPt	24711.74	3484.56	83831.36	17691.8117	0.0015
95Lo	11244.85	1565.52	4511.41	10055.0584	0.0015
95Hi	48413.45	18836.81	130830.8	237121.188	0.2295

Tabela 6 - Lista de amostras utilizadas nas análises populacionais de *A. marmorata*, com as respectivas informações sobre identificação, método de aquisição, espécies utilizadas nas análises, localidade de coleta e sucesso na obtenção das sequências dos genes 16s e Nd2 para cada amostra.

Amostras	Aquisição	Espécie	Localidade	Gene 16s	Gene Nd1
ISO 53	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 54	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 55	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ		*
ISO 56	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 62	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	
ISO 63	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ		*
ISO 65	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	
ISO 66	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 67	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ		*
ISO 68	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 69	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
ISO 70	Coletado	*Adenomera marmorata*	Ilha Grande - RJ	*	*
MNRJ 58132	Museu	*Adenomera marmorata*	Rio de Janeiro - RJ	*	
MNRJ 75916	Museu	*Adenomera marmorata*	Saquarema - RJ	*	
MNRJ 76779	Museu	*Adenomera marmorata*	Saquarema - RJ	*	*
MNRJ 77181	Museu	*Adenomera marmorata*	Saquarema - RJ	*	*
MNRJ 77982	Museu	*Adenomera marmorata*	Maricá - RJ	*	*
MNRJ 81104	Museu	*Adenomera marmorata*	Mendes - RJ	*	*
MNRJ 89866	Museu	*Adenomera marmorata*	Paraty - RJ	*	
MNRJ 90945	Museu	*Adenomera marmorata*	Rio Claro - RJ	*	
MNRJ 90944	Museu	*Adenomera marmorata*	Rio Claro - RJ	*	
KC477242.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	Carambatangua -SP	*	
KM390798.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	Rio de Janeiro - RJ	*	
KU495114.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	São Sebastião -SP	*	
KU495116.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	Mogi das Cruzes -SP	*	
KU495117.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	São Sebastião -SP	*	
KU495118.1	Genbank	*Adenomera marmorata*	Cubatão - SP	*	
AY911281	Genbank	*Leptodactylus fuscus*	Luiz Antonio - SP	*	
KU495119	Genbank	*Adenomera martinezi*	Guarai - TO	*	
JN868019	Genbank	*Bufo haematiticus*	-		*
Total	**3**	**4**	**16**	**26**	**15**

Tabela 7- Resultados descritivos alcançados nas análises moleculares de *A. marmorata*, relacionando o gene amostrado, número de amostras, número máximo de pares de base obtidos (PB), porcentagem de polimorfismo encontrado em cada amostra, número de haplótipos, diversidade haplotípica (H) e diversidade nucleotídica (Pi), além do modelo evolutivo utilizado nas análises.

A. marmorata								
	Gene	Amostras	PB	Polimorfismo	Haplótipos	H	Pi	Modelo evolutivo
Continente	16s	16	615	10,98%	11	0,925	0,043	GTR+I
Ilha	16s	9	614	1,08%	3	0,556	0,003	
Continente	ND2	4	875	0,17%	2	0,667	0,001	HKY+I
Ilha	ND2	9	875	0,88%	4	0,806	0,004	

Tabela 8 – Valores referentes a média das distâncias genéticas entre as amostras de *L. fuscus*, *A. martinez*, e das populações continental e insular de *A. marmorata* posicionados na diagonal à esquerda, e respectivos valores de erro padrão na diagonal à direita, encontrados nas análises filogenéticas para o marcador mitocondriais 16s

L. fuscus		0.03	0.03	0.03
A. martinez	0.08		0.02	0.02
Continente	0.09	0.06		0.01
Ilha	0.08	0.06	0.02	

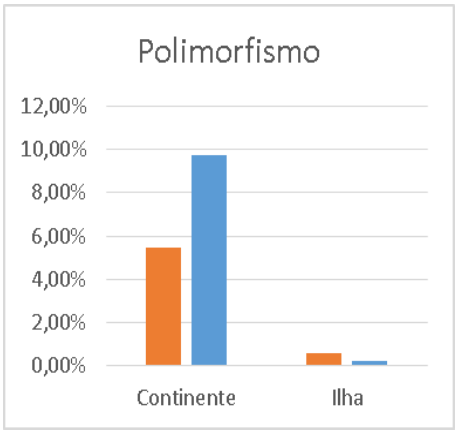
Tabela 9 – Valores referentes a média das distâncias genéticas entre as amostras de *B. haematiticus*, e das populações continental e insular de *A. marmorata* posicionados na diagonal à esquerda, e respectivos valores de erro padrão na diagonal à direita, encontrados nas análises filogenéticas para o marcador mitocondriais Nd2.

B. haematiticus		0.02	0.02
Continente	0.13		0.01
Ilha	0.11	0.03	

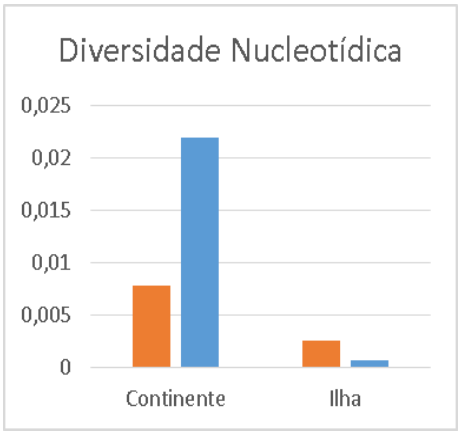
Resultados das estimativas da população efetiva continental (Q1), insular (Q2) e população ancestral (QA), do tempo de divergência da população insular e continental (T) e taxa de migração por geração (M) para *A. marmorata*. HiPt: representa o valor máximo alcançado da probabilidade a posterior, sendo que 95Lo encontra-se 2,5% abaixo deste ponto e 95Hi 2,5% acima.

Value	**Q1**	**Q2**	**QA**	**t**	**M**
HiPt	24379,57	1962,416	13986,52	19990	0,6275
95Lo	10177,88	585,2819	3658,012	1990	0,1225
95Hi	88760,58	16605,94	104074	19670	4,4875

A



B



C

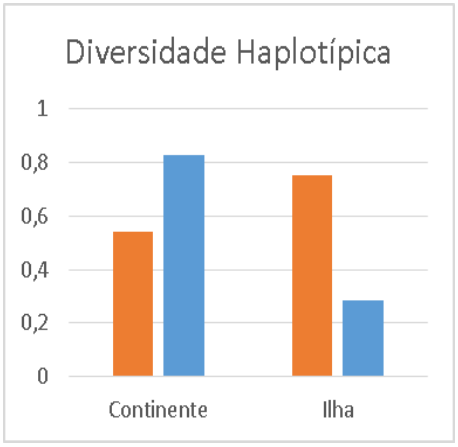


Figura 1: Gráficos representando as características descritivas das populações insular e continental da espécie *T. miliaris*. Gráfico A: Porcentagem de polimorfismo encontrada nas sequências; B: Índice de diversidade nucleotídica; C:Índice de diversidade haplotípica. As cores laranja e azul representam o gene 16s e Nd2, respectivamente

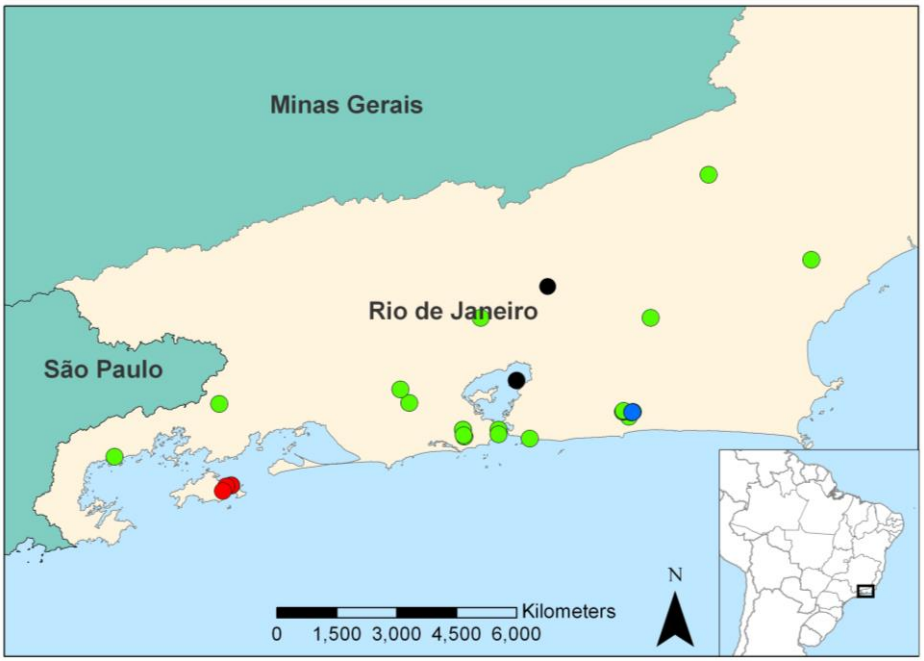


Figura 2: Região costeira do sudeste do Brasil, com as localizações referentes às coletas dos espécimes das amostras utilizadas nas análises genéticas do presente trabalho. Amostras consideradas como população insular em vermelho e população continental em verde. Amostras de *T. lutzi* em azul e de *T. taophora* em preto.

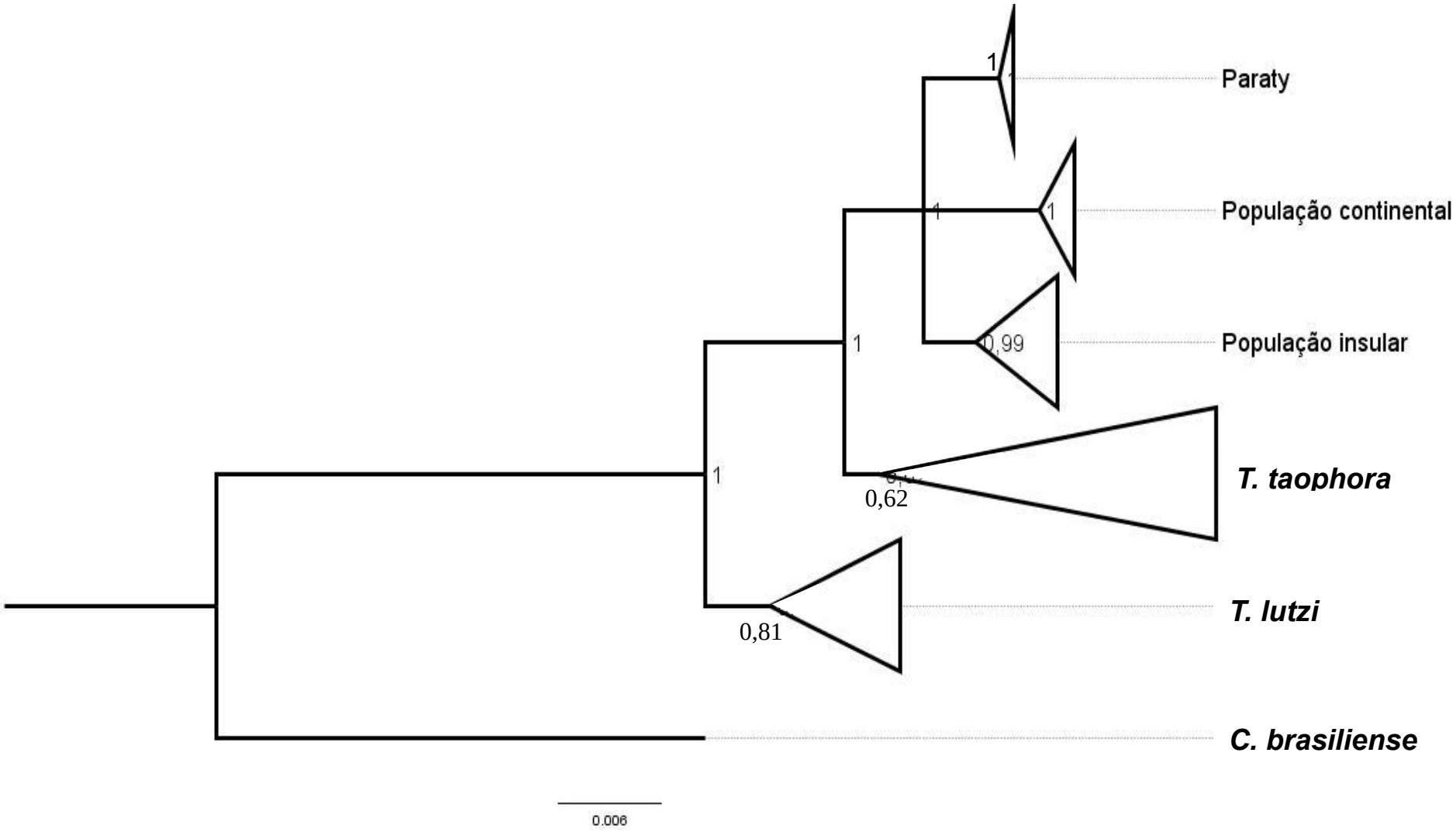


Figura 3: Arvore de inferência bayesiana do gene 16s da espécie *T. miliaris*. Os valores nos nós representam a probabilidade a posteriori do suporte do clado.

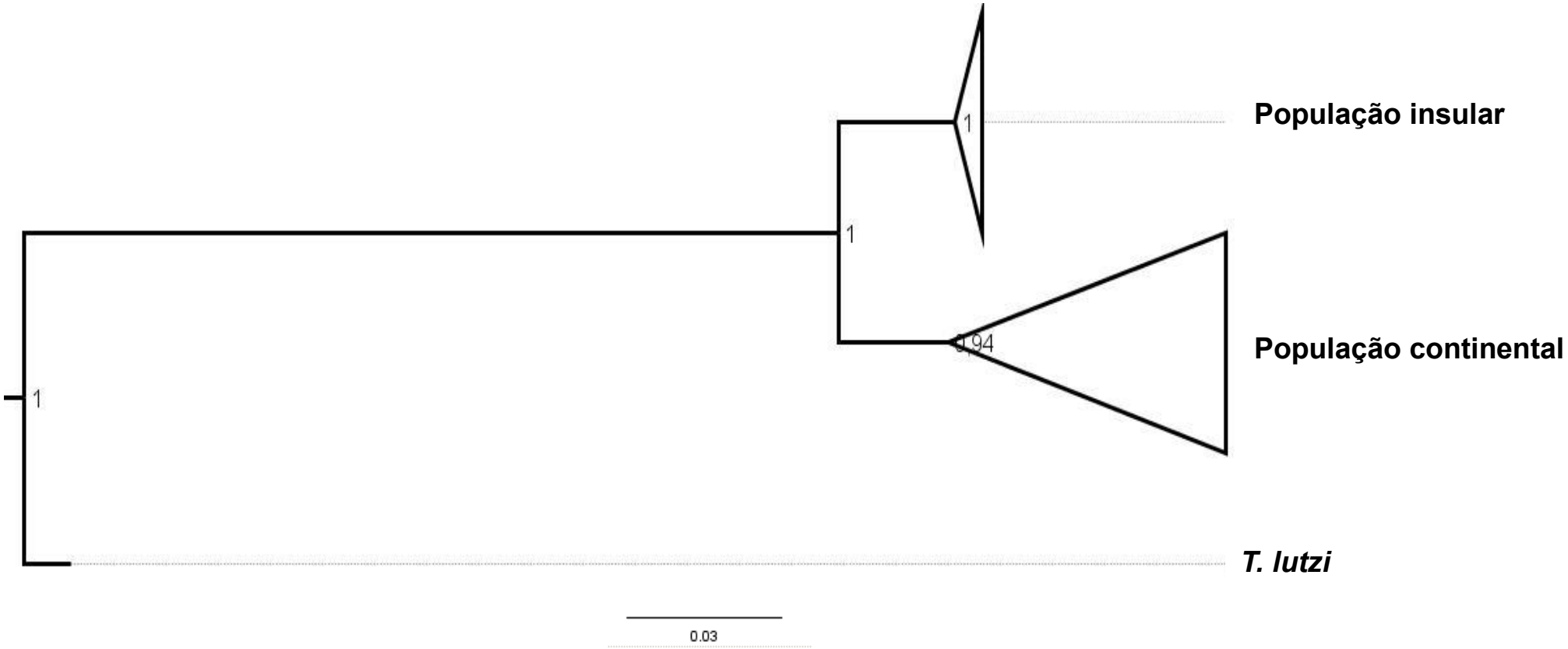


Figura 4: Arvore de inferência bayesiana do gene Nd2 da espécie *T. miliaris*. As amostras das populações foram colapsadas por não apresentarem suporte nos ramos. Os valores nos nós representam a probabilidade a posteriori do suporte do clado**.**

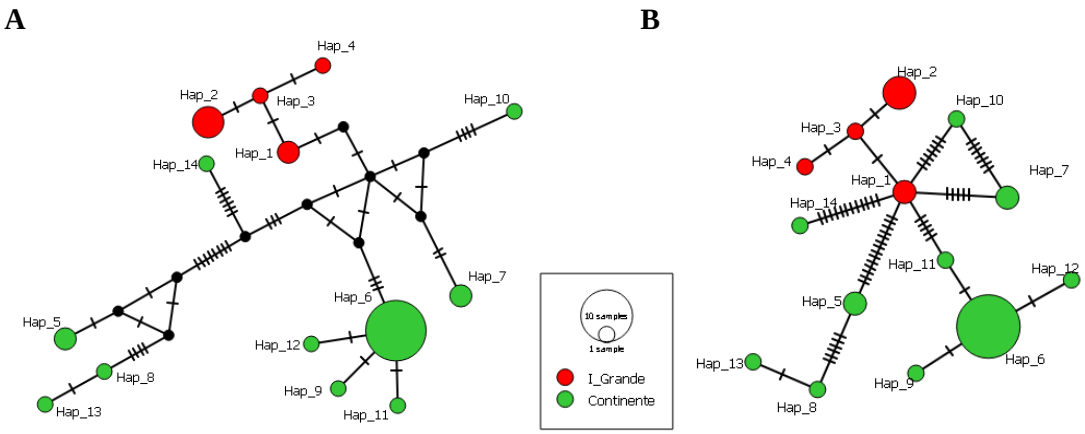


Figura 5: Redes de haplótipos obtidas com o marcador 16s de *T. miliaris* através dos algoritimos *median joing (A) e minimum spanning (B).*

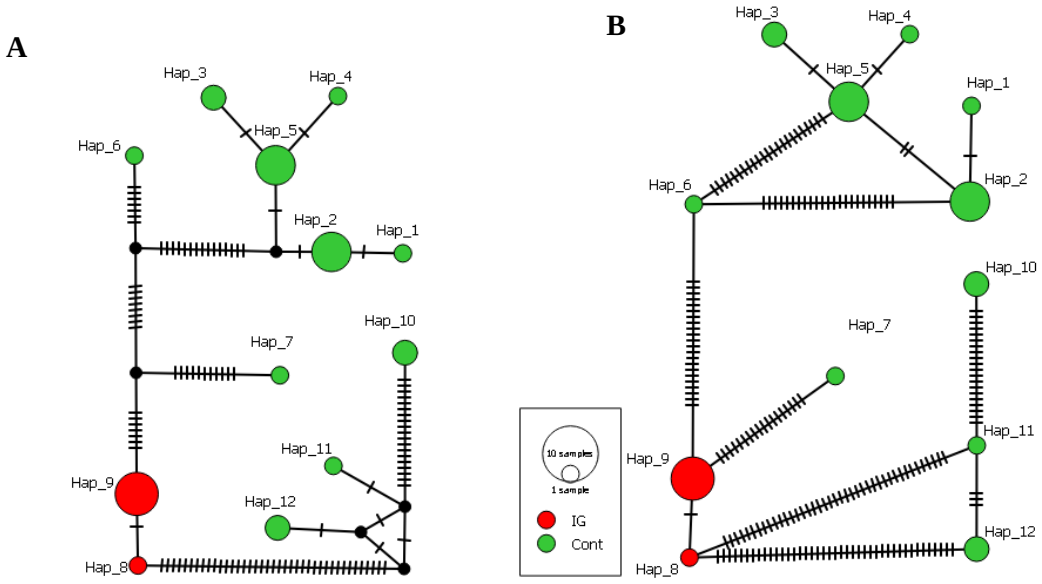


Figura 6: Redes de haplótipos obtidas com o marcador Nd2s de *T. miliaris* através dos algoritmos *median joing (A) e mini spanning* (B).

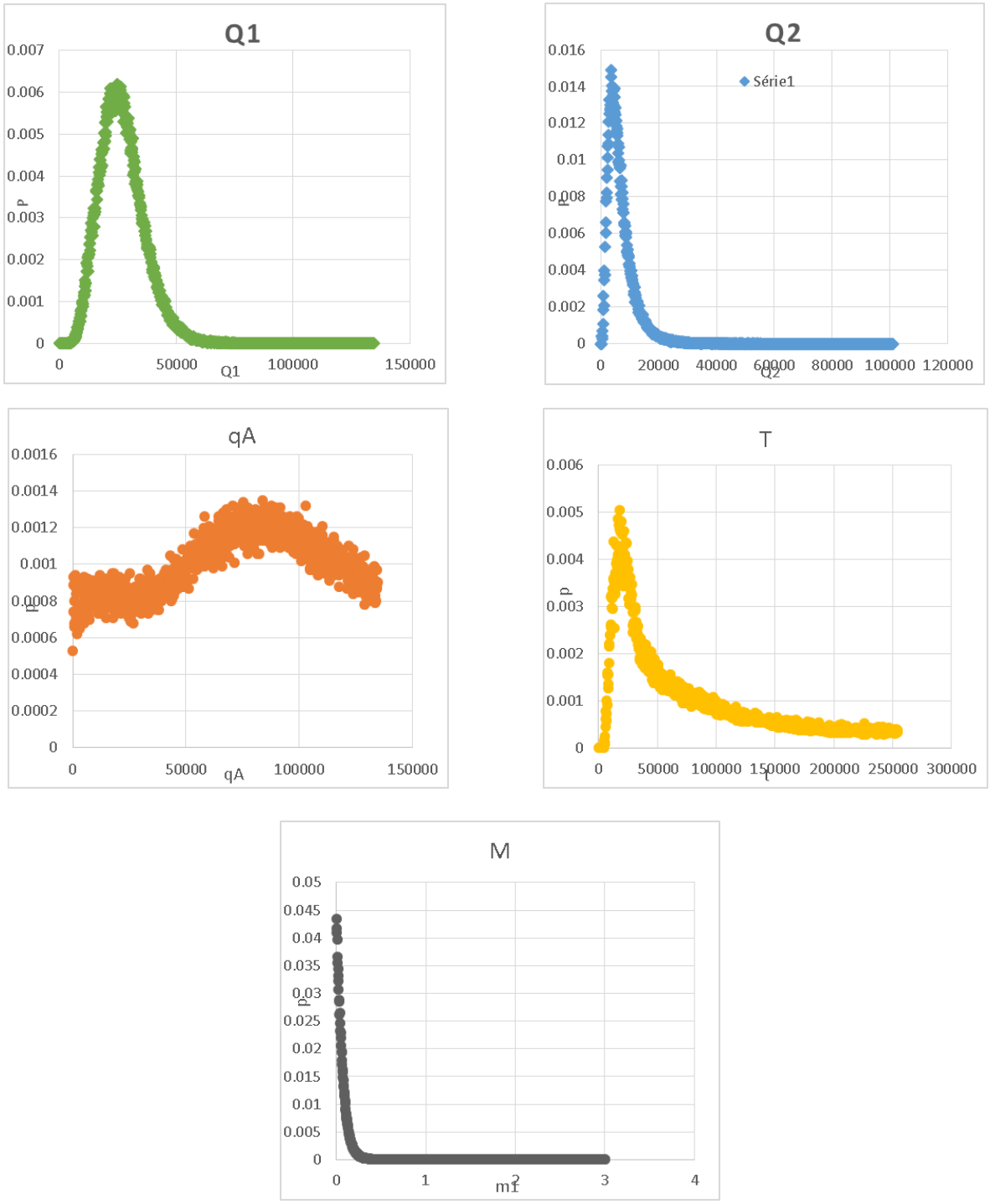


Figura 7: Histogramas de probabilidade a *posteriori* gerados pelo software IM a partir das sequências obtidas de amostras de *Thoropa miliaris*. Q1: População efetiva do continente, Q2: População efetiva da Ilha, QA: População efetiva ancestral, T: Tempo de divergência entre as populações e M: Taxa de migração por geração.

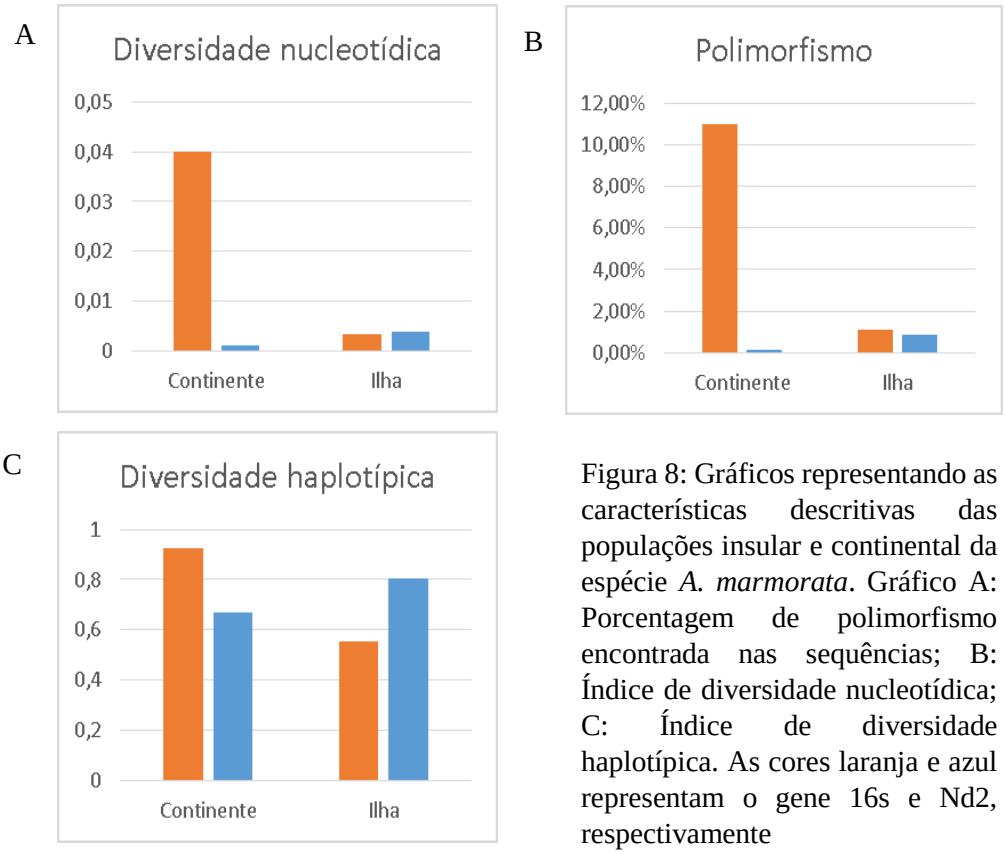


Figura 8: Gráficos representando as características descritivas das populações insular e continental da espécie *A. marmorata*. Gráfico A: Porcentagem de polimorfismo encontrada nas sequências; B: Índice de diversidade nucleotídica; C: Índice de diversidade haplotípica. As cores laranja e azul representam o gene 16s e Nd2, respectivamente

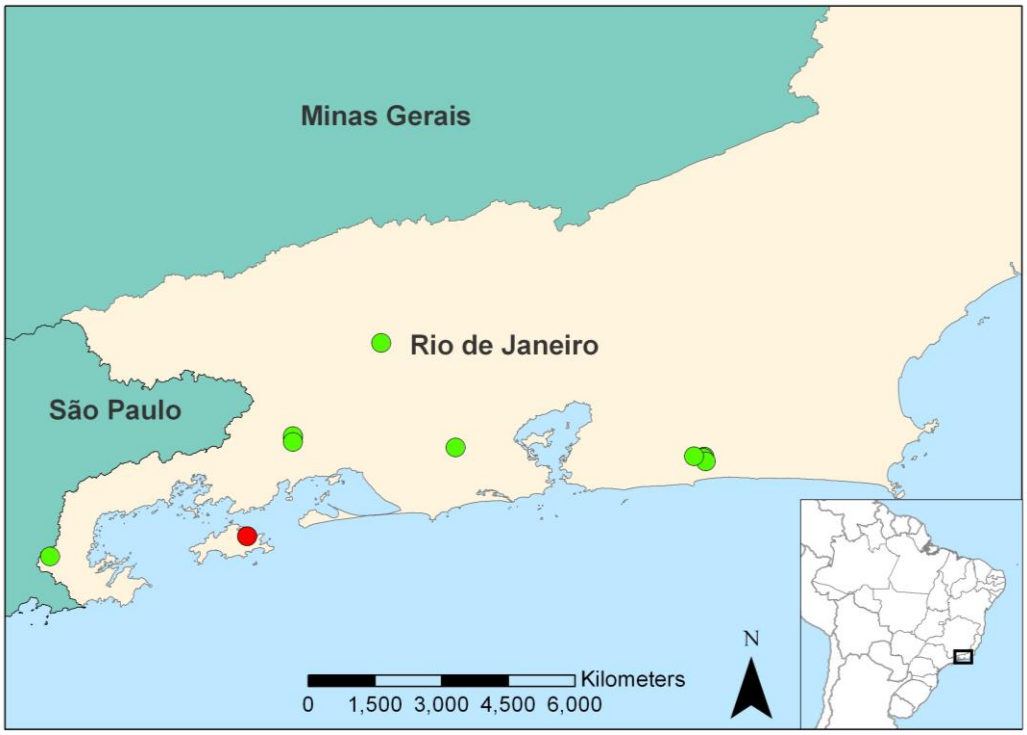


Figura 9: Região costeira do sudeste do Brasil, com as localizações referentes às coletas dos espécimes das amostras utilizadas nas análises genéticas do presente trabalho. Amostras consideradas como população insular em vermelho e população continental em verde de *A. marmorata*.

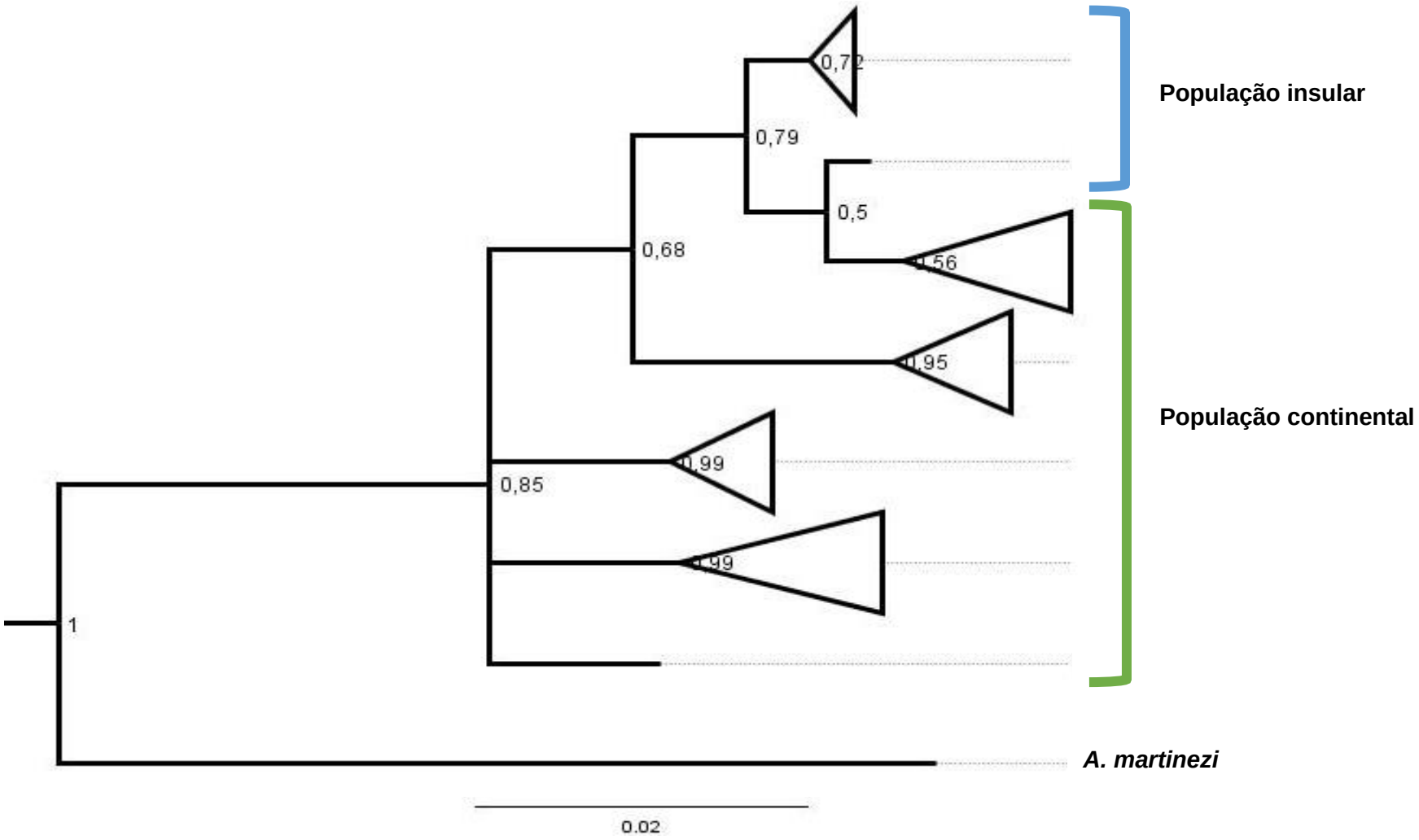


Figura 10: Árvore de inferência bayesiana obtida a partir do gene 16s de amostras da espécie *A. marmorata*. Os valores nos nós representam a probabilidade a posteriori do suporte do clado.

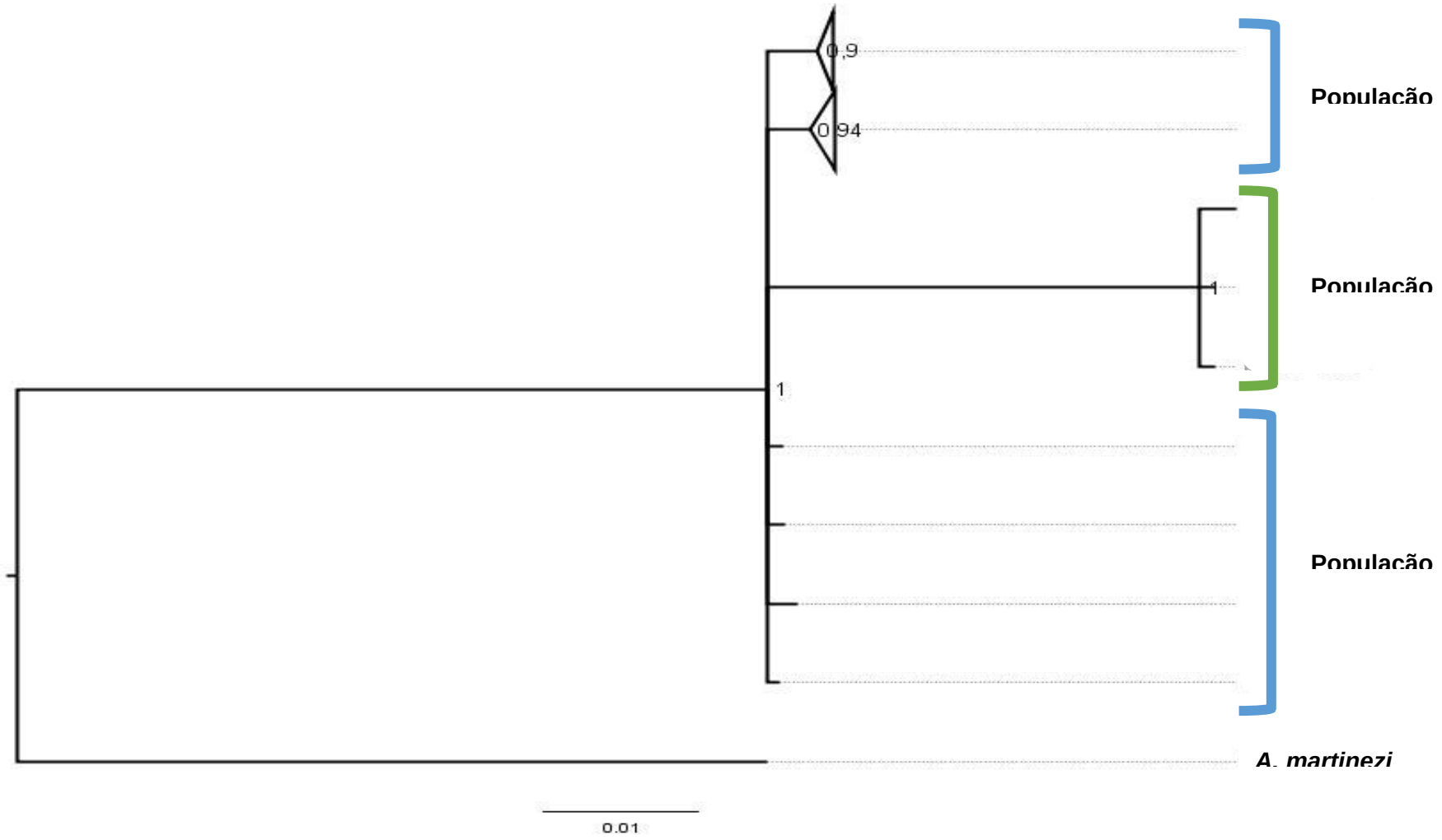


Figura 11: Arvore de inferência bayesiana obtida do gene Nd2 de amostras da espécie *A. marmorata*. Os valores nos nós representam a probabilidade a posteriori do suporte do clado.

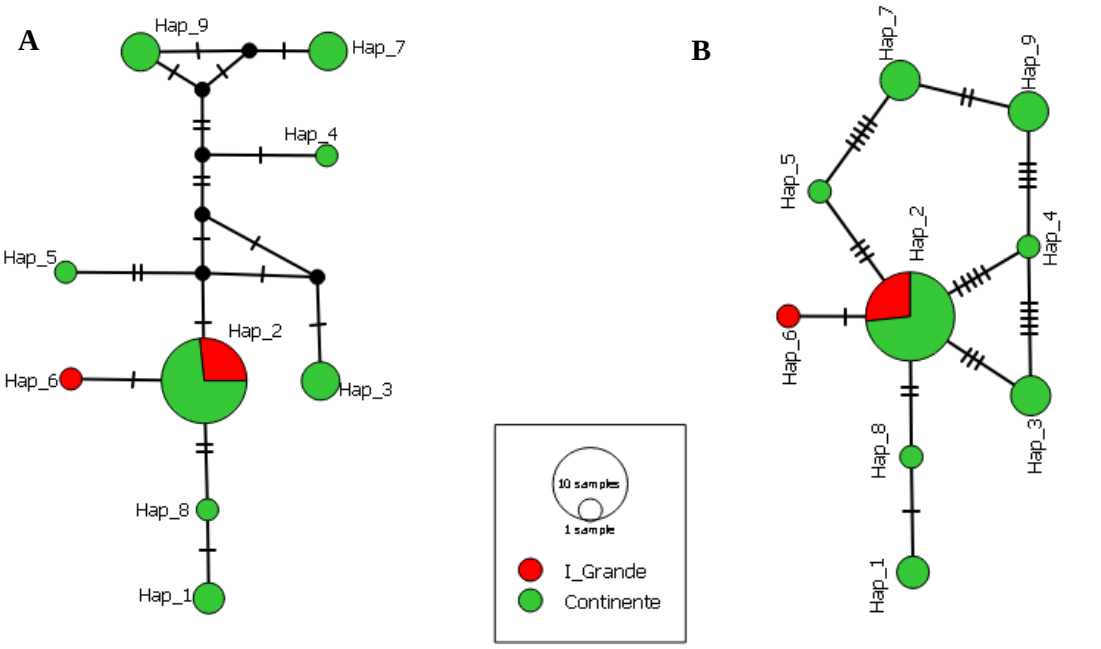


Figura 12: Redes de haplótipos obtidas com o marcador 16s de *A. marmorata* através dos algoritimos *median joing (A) e minimum spanning (B).*

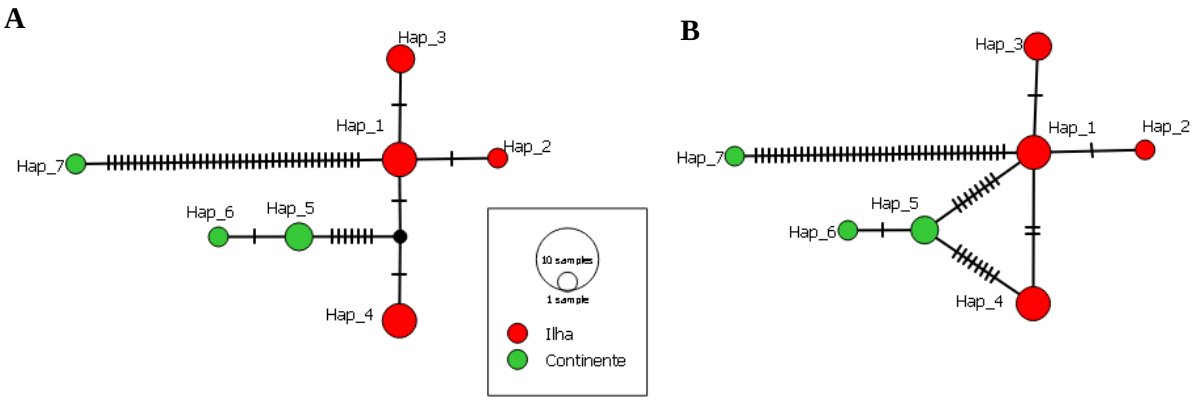


Figura 13: Redes de haplótipos obtidas com o marcador Nd2s de *A. marmorata* através dos algoritmos *median joing (A) e mini spanning* (B).

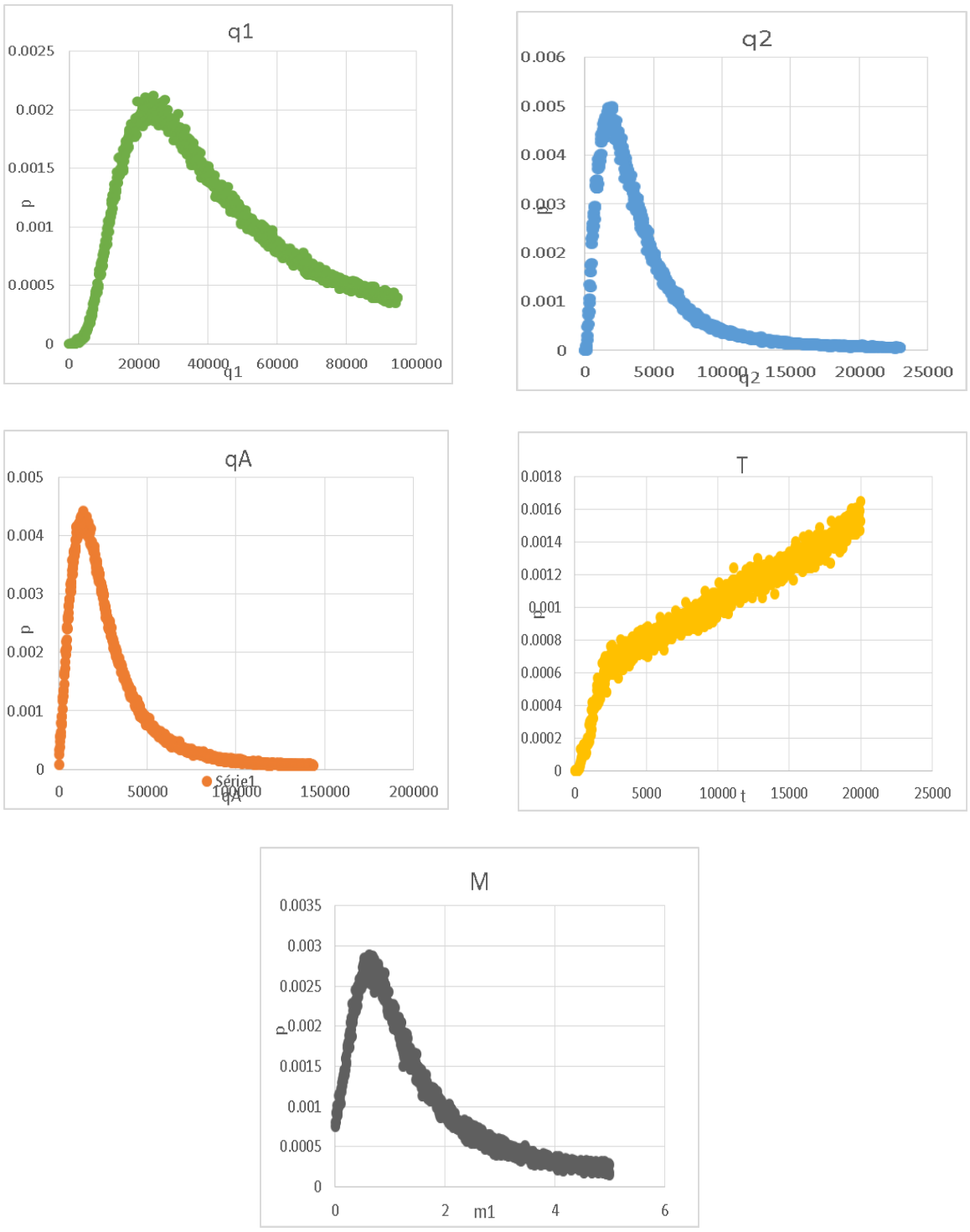


Figura 14*:* Histogramas de probabilidade a *posteriori* gerados pelo software IM a partir das sequências obtidas de amostras de *A. marmorata*. Q1: População efetiva do continente, Q2: População efetiva da Ilha, QA: População efetiva ancestral, T: Tempo de divergência entre as populações e M: Taxa de migração por geração

REFERÊNCIAS

ABBOTT, I.; GRANT, P. R. Nonequilibrial Bird Faunas on Islands. **The american Naturalist**, v. 110, n. 974, p. 507–528, 1976.

ABE, A. S.; BICUDO, E. P. W. Adaptations to Salinity and Osmoregulation in the Frog Thoropa miliaris (Amphibia, Leptodactilidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 227, n. 5/6, p. 313–318, 1991.

ALMEIDA-GOMES, M.; VAN SLUYS, M.; ROCHA, C. F. D. Ecological observations on the leaf-litter frog Adenomera marmorata in an Atlantic rainforest area of southeastern Brazil. **Herpetological Journal**, v. 17, n. 2, p. 81–85, 2007.

ALMEIDA, C. H. L. N. DE. **Reconstrução filogenética com base em morfologia interna e externa do gênero thoropa cope, 1865 (Anura, Cycloramphidae)**. [s.l: s.n.].

ANGULO, R. J.; LESSA, G. C.; SOUZA, M. C. DE. A critical review of mid- to late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. **Quaternary Science Reviews**, v. 25, n. 5–6, p. 486–506, 2006.

BELL, R. C. et al. Evolutionary history of Scinax treefrogs on land-bridge islands in south-eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 9, p. 1733–1742, 2012.

BELL, R. C.; DREWES, R. C.; ZAMUDIO, K. R. Reed frog diversification in the Gulf of Guinea: Overseas dispersal, the progression rule, and in situ speciation. **Evolution**, v. 69, n. 4, p. 904–915, 2015.

BITTENCOURT-SILVA, G. B.; DA SIVA SIVA, H. R. Insular Anurans (Amphibia: Anura) of the coast of Rio de Janeiro, southeast, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 2, p. 225–234, 2013.

BITTKAU, C.; COMES, H. P. Evolutionary processes in a continental island system: Molecular phylogeography of the *Aegean Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 4065–4083, 2005.

BLACKBURN, D. C. et al. An adaptive radiation of frogs in a southeast asian island archipelago. **Evolution**, 2013.

BRASILEIRO, C. A. et al. A new and threatened species of Scinax (Anura: Hylidae) from Queimada Grande Island, southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 55, n. 1391, p. 47–55, 2007.

BRASILEIRO, C. A.; OYAMAGUCHI, H. M.; HADDAD, C. F. B. A New Island Species of Scinax (Anura; Hylidae) from Southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 41, n. 2, p. 271–275,

2007.

BROWN, R. M. et al. Evolutionary Processes of Diversification in a Model Island Archipelago. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 2013.

BROWN, R. M.; GUTTMAN, S. I. Phylogenetic systematics of the *Rana signata* complex of Philippine and Bornean stream frogs: reconsideration of Huxley' s modification of Wallace' s Line at the Oriental – Australian faunal zone interface. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 76, p. 393–461, 2002.

BRUNES, T. O. et al. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 3, p. 1120–1133, 2010.

CALSBEEK, R.; SMITH, T. B. Ocean currents mediate evolution in island lizards. **Nature**, v. 426, n. December, p. 552–555, 2003.

CASE, T. J.; CODY, M. L. Testing Theories of Island Biogeography. **American Scientist**, v. 75, n. 4, p. 402–411, 1987.

DARWIN, C. **Geological Observations on Coral Reefs, Volcanic Islands, and on South America: Being the Geology of the Voyage of the Beagle, Under the Command of Captain Fitzroy**. [s.l: s.n.].

DE MAHIQUES, M. M. et al. The Southern Brazilian shelf: General characteristics, quaternary evolution and sediment distribution. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 2, p. 25–34, 2010.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. **Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae)**. [s.l: s.n.]. v. 4104

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. [s.l: s.n.].

DURYEA, M. C.; ZAMUDIO, K. R.; BRASILEIRO, C. A. Vicariance and marine migration in continental island populations of a frog endemic to the Atlantic Coastal forest. **Heredity**, v. 115, n. 3, p. 225–234, 2015.

EVANS, B. J. et al. Phylogenetics of fanged frogs: testing biogeographical hypotheses at the interface of the asian and Australian faunal zones. **Syst. Biol.**, v. 52, n. 6, p. 794–819, 2003.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FEIO, R. N.; NAPOLI, M. F.; CARAMASCHI, U. Considerações taxonômicas sobre Thoropa miliaris (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de Thoropa taophora (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro**, v. 64, n. 1, p. 41–60, 2006.

FRANKHAM, R. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? **Heredity**, v. 78 (Pt 3), p. 311–327, 1997.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (2 April 2014). Electronic Database accessible at .**

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of populations genetics**. 3th. ed. Sinauer: [s.n.].

HEY, J.; NIELSEN, R. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of Drosophila pseudoobscura and D. persimilis. **Genetics**, v. 167, n. 2, p. 747–760, 2004.

HEYER, W. R. et al. of Frog Populations in and Colonizations Extinctions , Southeast Brazil and Their Evolutionary. **Biotropica**, v. 20, n. 3, p. 230–235, 2013.

HOPKINS, G. R.; EDMUND D. BRODIE, J. Occurrence of Amphibians in Saline Habitats: A Review and Evolutionary Perspective. **The Herpetologists' League**, v. 29, n. 1, p. 1–27, 2015.

IZECKSOHN, E.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. **Anfíbios do Município do Rio de Janeiro**. [s.l: s.n.].

JOHN MEASEY, G. et al. Freshwater paths across the ocean: Molecular phylogeny of the frog Ptychadena newtoni gives insights into amphibian colonization of oceanic islands. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 1, p. 7–20, 2007.

JORDAN, M. A.; SNELL, H. L. Historical fragmentation of islands and genetic drift in populations of Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis* complex). **Molecular Ecology**, v. 17, n. 5, p. 1224–1237, 2008.

LEITE, Y. L. R. et al. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2016.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LOSOS, J. B.; SCHLUTER, D. Analysis of an evolutionary species-area relationship. **Nature**, v. 408, n. December, p. 847–850, 2000.

MACARTHUR, R. H; WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. [s.l: s.n.].

MAGESKI, M. et al. The island rule in the Brazilian frog Phyllodytes luteolus. **Sociedade Brasileira de Zoologia**, v. 35, n. 5, p. 329–333, 2015.

MARTIN, L.; SUGUIO, K. The State Of São Paulo Coastal Marine Quaternary Geology. **Anais da Academia brasileira de ciência**, v. 47, 1975.

MAYR, E. **Animal species and evolutionThe Eugenics review**, 1963.

NIELSEN, R.; WAKELEY, J. Distinguishing migration from isolation: A Markov chain Monte Carlo approach. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 885–896, 2001.

PHILLIPS, B. L. et al. Invasion and the evolution of speed in toads. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 803, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

POUX, C. et al. Asynchronous colonization of Madagascar by the four endemic clades of primates, tenrecs, carnivores, and rodents as inferred from nuclear genes. **Systematic Biology**, 2005.

RONQUIST, F. et al. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SAZIMA, I. The occurrence of marine invertebrates in the stomach contents of the frog Thoropa miliaris. **Ciência e Cultura**, v. 23, p. 647–648, 1971.

SILVA, A. L. C. DA et al. Sedimentary architecture and depositional evolution of the Quaternary coastal plain of Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Geology**, v. 44, n. 2, p. 191–206, 2014.

SILVA, H. R. DA; CARVALHO, A. L. G. DE; BITTENCOURT-SILVA, G. B. Frogs of Marambaia: a naturally isolated Restinga and Atlantic Forest remnant of southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 4, p. 0–0, 2008.

SUGUIO, K. et al. Paleoníveis do mar e paleolinhas da costa. In: **Quaternário do Brasil**. [s.l: s.n.]. p. 378.

VELLEND, M. Island Biogeography of Genes and Species. **The american Naturalist**, v. 162, n. 3, p. 358–365, 2003.

VELO-ANTÓN, G.; ZAMUDIO, K. R.; CORDERO-RIVERA, A. Genetic drift and rapid evolution of viviparity in insular fire salamanders (Salamandra salamandra). **Heredity**, v. 108, n. 4, p. 410–418, 2012.

VENCES, M. et al. Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical poison frogs:a molecular phylogenetic perspective. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 3, p. 215–226, 2003.

WALLACE, A. R. Island life. **Nature**, 1881.

WHITTAKER, R. J.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M. **Island Biogeography**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2007.

ZIMMERMAN, B. L.; BIERREGAARD, R. O. Relevance of the equilibrium theory of island biogeography and species-area relations to conservation with a case from Amazonia. **Journal of Biogeography**, v. 13, n. 2, p. 133–143, 1986.