Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Caroline Norén Flynn

Modelagem de ocupação e genética populacional do anuro *Hylodes fredi* (Hylodidae) endêmico da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2022

Caroline Norén Flynn

Modelagem de ocupação e genética populacional do anuro *Hylodes fredi* (Hylodidae) endêmico da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Duarte da Rocha

Coorientadora: Prof.ª Dra. Luciana Ardenghi Fusinatto

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

F648 Flynn, Caroline Norén.

Modelagem de ocupação e genética populacional do anuro *Hylodes fredi* (Hylodidae) endêmico da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro/ Caroline Norén Flynn. - 2022.

78 f. : il.

Orientador:. Carlos Frederico Duarte da Rocha

Coorientadora: Luciana Ardenghi Fusinatto

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Anuro – Ilha Grande, Baía da (RJ) - Teses 2. Anuro - Genética - Teses. I. Rocha, Carlos Frederico Duarte da. II. Fusinatto, Luciana Ardenghi III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 597.8(815.3)

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte

Caroline N. Flynn

Assinatura

28/06/2022

Data

Caroline Norén Flynn

Modelagem de ocupação e genética populacional do anuro *Hylodes fredi* (Hylodidae) endêmico da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de maio de 2022.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Luciana Ardenghi Fusinatto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Carlos Frederico Duarte da Rocha (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Clarissa Coimbra Canedo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Dra. Mariana Lúcio Lyra

Instituto de Biologia – UNESP Rio Claro

_____

Prof.ª Dra. Gisele Lôbo Hajdu

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Dra. Tuliana Oliveira Brunes

CIBIO – InBIO – Universidade do Porto

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Christina e Michael, e minha irmã, Anna.

Obrigada por tanto. Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Christina e Michael, por todo amor, suporte e incentivo ao longo da minha trajetória dentro da Biologia e na vida. Agradeço a minha irmã, Anna, pelas conversas sensíveis e sinceras, e por todo apoio: quero sempre caminhar ao seu lado.

Um agradecimento especial aos meus orientadores: Fred, por ter me recebido tão bem lá em 2017, por ser sempre esse espírito otimista, e por todos ensinamento e oportunidades. Lu, por todas as horas dedicadas a me ensinar trabalho de bancada e análise de sequências, e pelos ensinamentos genéticos e pessoais. Obrigada pela confiança e pela troca.

Agradeço a Tati Motta-Tavares, por ter me levado ao meu primeiro campo piloto do projeto e me apresentado ao *Hylodes fredi*. Agradeço também todos que me ajudaram em campo e durante os perrengues, principalmente Cátia, Manu, Marlon e Fernanda. Sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível.

Agradeço aos meus amigos pelas conversas, risadas e acolhimento durante os tempos pandêmicos. Como é bom saber que não estamos sós.

A todos os membros do Laboratório de Ecologia de Vertebrados da UERJ que atravessaram meu caminho ao longo desses últimos anos.

Ao Átilla e a Nena pela colaboração e toda ajuda nas análises estatísticas do primeiro capítulo.

Agradeço ao professor Célio Haddad e o Laboratório de Herpetologia da UNESP Rio Claro, essa colaboração foi essencial na execução da etapa genética. Obrigada especial a Mari Lyra pelo carinho, ensinamento, e por me fazer ver bandas!!

Também, agradeço a professora Ana Carnaval e todos os integrantes do *Carnaval Lab* por terem me recebido de braços abertos no meio de uma pandemia. Meu tempo em NYC foi enriquecedor e inesquecível.

Agradeço à banca examinadora, composta quase inteiramente por mulheres, por aceitarem o convite e pelas sugestões.

Ao corpo docente, técnico e demais funcionários da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo apoio e pela dedicação à educação pública de qualidade.

A todos os moradores da Ilha Grande que ajudaram durante os trabalhos de campo, em especial Cristian do Aventureiro.

Ao Instituto Chico Mendes e ao Instituto Estadual do Ambiente (INEA) pelas licenças de pesquisa concedidas.

A toda equipe do INEA, do Parque Estadual da Ilha Grande, da Reserva Biológica da Praia do Sul, e do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável (CEADS) por todo suporte logístico.

À FAPERJ pelo apoio através do programa "Cientistas do Nosso Estado" (processos E-26/202.920/2015 e E-26/202.803/2018) em nome de Carlos Frederico Duarte da Rocha; e CNPq (processos 302974/2015-6, 424473/2016 e 304375/2020-9) em nome de Carlos Frederico Duarte da Rocha.

À CAPES pelas bolsas de mestrado (processo 88887.484117/2020-00) e capacitação no exterior (processo 88887.583202/2020-00) concedidas.

À FAPERJ pela bolsa Mestrado Nota 10 (processo nº 266413 de E-26/201.665/2021) concedida.

RESUMO

FLYNN, Caroline Norén. *Modelagem de ocupação e genética populacional do anuro* Hylodes fredi *(Hylodidae) endêmico da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro*. 2022. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Anfíbios são considerados o grupo de vertebrados terrestres mais ameaçado em termos de extinções de espécies. Em um contexto de países megadiversos, onde se desconhece o status de ameaça de grande parte das espécies, são categorizadas como dados insuficientes diversas espécies da família Hylodidade, incluindo *Hylodes fredi*, um anuro endêmico da Ilha Grande (Angra dos Reis, Rio de Janeiro), que tem sua área de vida associada a córregos florestais de água límpida. Apesar de diferentes aspectos da biologia e ecologia de *H. fredi* já terem sido estudados, nenhum deles considerou nos seus métodos o possível viés causado por problemas na detecção da espécie. Ademais, ainda não existem estudos de genética populacional com hilodídeos, e nada se sabe sobre a variação genética em *H. fredi*. Buscando entender melhor o grau de ameaça de *H. fredi*, e ajudar a guiar esforços de conservação para a espécie na Ilha Grande, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro buscou compreender melhor os fatores afetando a ocupação de *H. fredi* dentro dos riachos onde ocorre. Para isso, foi utilizada a abordagem de modelagem de ocupação numa escala mais fina, considerando a detecção imperfeita. Transectos perpendiculares foram estabelecidos em seis riachos com conhecida ocorrência da espécie, e subdivididos em dez plots amostrais. Modelos de ocupação foram criados utilizando o pacote UNMARKED R, e uma seleção de modelos foi feita. A espécie apresentou uma ocupação de 0.28 e detectabilidade de 0.25. Os melhores modelos sugerem que a ocupação de *H. fredi* aumenta proporcionalmente com a cobertura de pedras na paisagem, e inversamente com a cobertura de folhiço. Já, a detectabilidade diminuiu com o aumento da cobertura de folhiço, e foi afetada pela temperatura. Os resultados desse capítulo indicam que *H. fredi* possui uma ocupação restrita e reduzida aos córregos e suas margens próximas, havendo implicações para sua conservação. O segundo capítulo utiliza um marcador mitocondrial para realizar o primeiro estudo de genética populacional de *H. fredi*. Esse capítulo explora principalmente a diversidade genética e a possibilidade de haver estrutura genética populacional na espécie. Foi encontrada uma alta diversidade haplotípica (Hd= 0.876) e baixa diversidade nucleotídica (Π=0.006) para a região *ND2* na espécie como um todo. Os dados apontaram para uma estruturação genética em três grupos, mas que não refletiram os aspectos geográficos da ilha, como as microbacias e as vertentes. Cada grupo encontrado pode significar uma unidade evolutiva significativa para a conservação, e suas distribuições geográficas devem ser mais bem compreendidas em pesquisas futuras. Apesar dos resultados apontarem para uma alta diversidade genética dentro da espécie, são necessários novos estudos utilizando marcadores genéticos que captem a história evolutiva recente da espécie, e pesquisas que explorem o deslocamento por fêmeas e juvenis de *H. fredi* na paisagem. Os dados reforçam a importância de não se relaxar os esforços de conservação para a espécie.

Palavras-chave: Mata Atlântica. Anura. Uso de microhabitat. Probabilidade de detecção. Variação genética. Estrutura genética. Espécie endêmica.

ABSTRACT

FLYNN, Caroline Norén. *Occupancy modeling and population genetics of the frog* Hylodes fredi *(Hylodidae) endemic from Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.* 2022. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Amphibians are considered the most threatened group of terrestrial vertebrates in terms of species extinction. Considering megadiverse countries, where the conservation status of most species is unknown, several species of the Hylodidae family are categorized as data deficient, including *Hylodes fredi*, a stream-dwelling endemic frog from Ilha Grande (Angra dos Reis, Rio de Janeiro). Although different aspects of the biology and ecology of *H. fredi* have already been studied, none of them considered in their methods the possible bias caused by problems in the detection of the species. Furthermore, there are still no population genetics studies with *Hylodes* species, and there is no information on the genetic variation in *H. fredi*. Seeking to better understand the threat level of *H. fredi* and to help guide conservation efforts for the species on Ilha Grande, this thesis was divided in two chapters. The first chapter sought to better understand the factors affecting the occupation of *H. fredi* within the streams where it occurs. For this, the occupancy modeling approach was used on a finer scale, considering the imperfect detection. Perpendicular transects were established in six streams with known occurrence of the species, and each stream was subdivided into ten sampling plots. Single-species and single-season occupancy models were created with the UNMARKED R package, and model selection was performed. The species had an occupancy of 0.28 and detectability of 0.25. The best models suggest that *H. fredi* occupancy increases proportionally with the rock cover in the landscape, and inversely with leaf litter cover. On the other hand, detectability lowered with an increase in leaf litter cover and was affected by the air temperature. The results of this chapter indicate that *H. fredi* has a restricted and reduced occupation to streams and their nearby banks, with implications for its conservation. The second chapter uses a mitochondrial maker to perform the first population genetic study of *H. fredi*. This chapter mainly explores genetic variation and the possibility of genetic population structure in the species. A high haplotype diversity (Hd= 0.876) and low nucleotide diversity (Π=0.006) were found for the *ND2* gene region in the species as a whole. The data suggest that *H. fredi* is structured in three groups, but that did not reflect the geographic aspects of the island, such as microbasins and slopes. Each genetic group found may represent a significant evolutionary unit for conservation, and their geographic distribution should be better understood. Although the results point to a high genetic variation within the species, further studies are needed using genetic markers that capture the recent evolutionary history of the species, and research that explores the displacement by females and juveniles of *H. fredi* in the landscape. The data reinforce the importance of not relaxing conservation efforts for the species.

Keywords: Atlantic Forest. Anura. Microhabitat use. Detection probability. Genetic variation. Genetic structure. Endemic species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 - Location of Ilha Grande (C and D) in the state of Rio de Janeiro (B), within Brazil (A). The lines in D represent the island drainage system and triangles show the sampled streams……..... 25

Table 1 - Top ten ranked single-season occupancy and detectability models estimated for *Hylodes fredi* in Ilha Grande, southeast Brazi……..... 28

Figure 2 - Relationship between the occupancy of *Hylodes fredi* and rock cover (A) and litter cover (B)……... 29

Figure 3 - Relationship between the detectability of *Hylodes fredi* and leaf litter cover (A) and air temperature (B)……..… 29

Figura 4 - Mapa da Ilha Grande, localizada no município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, mostrando os conhecidos córregos com ocorrência do anfíbio anuro *Hylodes fredi*..... 42

Tabela 2 - Informações sobre os pontos de coleta das amostras de tecido de *Hylodes fredi* que foram sequenciadas, a partir de 15 locais de ocorrência da espécie em córregos na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro..... 43

Figura 5 - Mapa elaborado com uso do ArcMap (ArcGis 10.5) com os pontos (córregos onde foram coletadas amostras de tecido do anuro *Hylodes fredi* ao longo da paisagem na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro..... 44

Tabela 3 - *Primers* utilizados para amplificação do DNA mitocondrial de *Hylodes fredi*, tamanho em pares de bases (pb), temperaturas de anelamento utilizadas durante as reações de PCR (Ta) e respectivas fontes bibliográficas..... 45

Tabela 4 - Estatísticas sumárias obtidas para todas as sequências do gene *ND2* e para os grupos HF2 e HF3 de *H. fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 50

Tabela 5 - Análises de variância molecular (AMOVA) entre (A) os grupos definidos pela rede de haplótipos, (B) as quatro vertentes da ilha, e (C) as dez microbacias amostradas na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 51

Figura 6 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre os três grandes grupos de haplótipos encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro..... 52

Figura 7 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre as dez microbacias amostradas da Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro..... 53

Figura 8 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre as quatro vertentes amostradas da Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro..... 54

Figura 9 - Distribuição geográfica dos três grupos genéticos, com a respectiva rede de haplótipos, identificados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, localizada no município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 55

Figura 10 - Gráficos da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças pareadas entre todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 do gene *ND2* de *Hylodes fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 56

Tabela 6 - Testes de Neutralidade feitos com todas as sequências e com os grupos HF2 e HF3 encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 57

Figura 11 - *Bayesian Skyline Plot* estimado no programa BEAST para todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro..... 58

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	14
1	**ROCKS, LEAF LITTER, AND AIR TEMPERATURE INFLUENCE OCCUPANCY AND DETECTABILITY OF AN INSULAR ATLANTIC FOREST FROG**	20
1.1	**STUDY AIM**	23
1.2	**METHODS**	24
1.2.1	**Study area**	24
1.2.2	**Field Sampling**	24
1.2.3	**Environmental Covariates**	26
1.2.4	**Data Analysis**	26
1.3	**RESULTS**	28
1.4	**DISCUSSION**	31
2	**ESTRUTURA E VARIABILIDADE GENÉTICA DO ANURO ENDÊMICO *HYLODES FREDI* (HYLODIDAE) NA ILHA GRANDE, ANGRA DOS REIS, RJ**	35
2.1	**OBJETIVOS**	40
2.1.1	**Objetivos específicos**	40
2.2	**MATERIAIS E MÉTODOS**	41
2.2.1	**Área de Estudo**	41
2.2.2	**Amostragem**	42
2.2.3	**Análise molecular**	45
2.2.4	**Análises das sequências**	46
2.2.4.1	Estatísticas descritivas e estruturação genética	46
2.2.4.2	História demográfica dos grupos	47
2.2.4.3	Tamanhos efetivos populacionais e taxas de imigração	48
2.3	**RESULTADOS**	50
2.3.1	**Estatísticas Descritivas**	50
2.3.2	**Estruturação Genética**	50
2.3.3	**História demográfica dos grupos**	55
2.3.4	**Tamanhos efetivos populacionais e taxas de imigração**	59
2.4	**DISCUSSÃO**	60

2.4.1 **Polimorfismos**..... 60
2.4.2 **Estruturação populacional**..... 61
2.4.3 **História Demográfica e Expansão Populacional**..... 63
2.4.4 **Tamanhos Efetivos Populacionais e Imigração**..... 64
2.4.5 **Limitações do estudo e orientação futuras**..... 65
2.4.6 **Conservação de *H. fredi* na Ilha Grande**..... 66
CONCLUSÕES GERAIS..... 68
REFERÊNCIAS 69

INTRODUÇÃO GERAL

A crise da biodiversidade e os desafios para a conservação dos anfíbios

Nos últimos anos, uma grande perda de espécies de quase todas as classes de plantas e animais ao redor do mundo tem sido documentada e denominada crise da biodiversidade. Diversos pesquisadores das áreas da ecologia e da biologia da conservação alertam a sociedade dizendo que estamos na fase inicial do sexto maior episódio de extinções na história do planeta Terra, e que estamos perdendo espécies numa taxa alarmante (COLLINS; CRUMP, 2009). Os anfíbios apresentam um caso particularmente preocupante, visto que é o grupo de vertebrados terrestres sob maior ameaça atualmente. Segundo os dados disponíveis, há 8.457 espécies de anfíbios descritas (FROST, 2021), sendo que 40% destas estão ameaçadas (em comparação com 25% dos mamíferos e 14% das aves em ameaça) (IUCN, 2022).

Diferentes fatores consequentes da ação humana podem reduzir a biodiversidade de anfíbios. As alterações nas paisagens naturais como fragmentação e perda de habitat são fenômenos globais e um dos principais motivos para a perda de espécies (MYERS et al., 2000). A introdução de espécies exóticas, principalmente em ilhas, pode ter efeitos devastadores na flora e fauna nativas (PIMENTEL, 2011; ZUG; VITT; CALDWELL, 2013). Com os avanços nos meios de produção, principalmente na área agrícola, houve um aumento significativo no uso de inseticidas e herbicidas. O uso destes, assim como de outros químicos, afetam todos os estágios de vida dos anfíbios, reduzindo a sobrevivência de indivíduos(COLLINS; CRUMP, 2009). Além disso, a acidificação ambiental pode ter uma ação sinérgica com outros poluentes, e alterar a fisiologia dos anfíbios, diminuindo seu sistema imunológico, tornando os mais suscetíveis a patógenos. A redução global da camada de ozônio tem resultado num aumento da radiação ultravioleta, que também pode afetar os estágios iniciais do desenvolvimento e aumentar a mortalidade de embriões (ZUG; VITT; CALDWELL, 2013). As mudanças climáticas podem exercer efeitos diretos, como elevadas temperaturas que podem levar à morte de indivíduos, e secas que impossibilitam o funcionamento fisiológico dos organismos (DEUTSCH et al., 2008). Os efeitos indiretos incluem diminuição na abundância de presas e aumento na densidade de predadores, e alterações em padrões reprodutivos sazonais, aumentando a competição e diminuindo o recrutamento. Estresses decorrentes desses extremos climáticos podem também enfraquecer o sistema inume dos anfíbios (COLLINS; CRUMP, 2009).

Scheele et al. (2019) observaram que o impacto dos quitrídeos sobre os declínios dos anfíbios pode ser maior do que se acreditava. O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da doença quitridiomicose, contribuiu para o declínio de pelo menos 501 espécies de anfíbios (6.5% das espécies de anfíbios descritas). Essa representa a maior perda de biodiversidade associada a patógenos já documentada. Esses declínios são proporcionais à quantidade de espécies em cada uma das classes de anfíbios, sendo os anuros os mais afetados (93% dos declínios severos são em anuros, que representam 89% de todas as espécies de anfíbios). Para muitas espécies, a quitridiomicose é a principal causadora do declínio populacional, já em outras, a doença atua junto com a perda de habitat, mudanças climáticas e espécies invasoras (SCHEELE et al., 2019).

Dispersão e fluxo gênico em anfíbios

Os deslocamentos, independentemente de sua natureza, envolvem potenciais custos para anfíbios (WELLS, 2007). O custo de se deslocar através do espaço é decorrente do gasto energético e da exposição a predadores e diferentes condições ambientais. Denomina-se dispersão o deslocamento unidirecional de um indivíduo de seu sítio natal para o sítio reprodutivo, ou o deslocamento entre sítios reprodutivos (BAGUETTE; BENTON; BULLOCK, 2012). A dispersão de juvenis e adultos é importante, pois é o principal mecanismo responsável pelo fluxo gênico dentro e entre populações.

Anfíbios, por conta de suas características fisiológicas, possuem menor vagilidade e capacidade dispersiva comparada a outros táxons (BLAUSTEIN et al., 1994). Inclusive, assume-se que muitas das espécies de anfíbios apresentem filopatria natal, onde os indivíduos têm a tendência de retornar ao seu sítio natal para reproduzir (WELLS, 2007). Esse alto nível de filopatria somada a uma baixa vagilidade dos adultos pode levar ao aumento do endocruzamento, por conseguinte à perda de variação genética dentro de uma população. Essas duas características também podem gerar diferenciação entre populações, especialmente se as pressões seletivas forem diferentes em cada local.

Apesar das características citadas acima, alguns Anuros podem apresentar altas distâncias dispersivas, já tendo sido recordadas distâncias maiores que 10km (CAYUELA et al., 2018). Alguns estudos mostraram que em espécies com forte filopatria e onde os machos são muito territoriais, os indivíduos juvenis e fêmeas são os principais responsáveis pela dispersão (SHIELDS, 1982; WELLS, 2007).

Endemismos e pequenos tamanhos populacionais

A distribuição geográfica é um fator de especial relevância ao considerar a vulnerabilidade de uma espécie. Ela costuma ser superestimada, visto que as espécies são limitadas a habitats específicos dentro dos limites de sua extensão. Quanto menor a área de distribuição de uma espécie, mais ameaçada ela estaria (PIMM et al., 2014). Os anfíbios são um grupo que apresenta altas taxas de endemismo, elevando, portanto, sua vulnerabilidade. Assim, em muitos casos uma extinção local pode significar uma extinção global da espécie.

Endemismos podem estar muitas vezes associados a pequenos tamanhos populacionais. Assim, além de se conhecer a distribuição geográfica das espécies, o entendimento do status e processos demográficos podem ser fundamentais para o manejo de populações. Ao passo que o tamanho populacional vai se tornando menor, as populações podem se tornar mais sujeitas a fatores estocásticos como flutuações demográficas e variações nas condições do ambiente (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Do ponto de vista genético, pequenas populações podem perder variabilidade genética através de processos como a deriva gênica ou da depressão endogâmica, o que às vezes pode ter efeitos deletérios sobre as populações. O efeito da endogamia em pequenas populações pode levar a diminuição na fecundidade e reduzir sua performance reprodutiva. Isso, por sua vez, tende a diminuir ainda mais o tamanho populacional, reduzindo a habilidade de persistência da população. Esse processo é conhecido como vórtex de extinção (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

A atual crise de biodiversidade que estamos enfrentando requer que sejam estabelecidas prioridades para conservação. Ainda é tradicional o uso da abordagem taxonômica da diversidade para a definição de áreas prioritárias ou de estratégias de manejo, entretanto, é crescente o reconhecimento da importância de se considerar também a diversidade sob perspectivas funcionais e evolutivas. As principais preocupações da genética de conservação giram em torno de manter o fitness e a capacidade de responder evolutivamente às mudanças ambientais (MORITZ, 2002). Os genes, as espécies e os ecossistemas são os três níveis primários de biodiversidade reconhecido pela Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD, do inglês *Convention on Biological Diversity*), mas há também um quarto nível, as populações. Dentro de espécies, a identificação e proteção de populações locais geneticamente distintas deve ter um foco prioritário na conservação, pois a conservação de diversas populações distintas é crucial para maximizar o potencial evolutivo e minimizar os riscos de extinção (HUGHES; DAILY; EHRLICH, 1997; LUCK; DAILY; EHRLICH, 2003).

A descrição da estrutura genética de uma população é muito usada na conservação. Em espécies com limitada capacidade de dispersão, com filopatria ou com distribuições que possuem fortes barreiras para o fluxo gênico, é esperado que haja estruturação populacional (WELLS, 2007). É importante identificar essas unidades populacionais, pois estas podem ter um pool genético distinto e apresentar adaptações locais (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). O isolamento reprodutivo no longo prazo é um dos principais critérios usados para identificar unidades populacionais de conservação (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). A identificação de unidades dentro de espécies pode ajudar a guiar esforços de conservação. O conceito de Unidades Evolutivas Significativas (ESU, *Evolutionarily Significant Unit)* se refere a uma população ou grupo de populações que merecem manejo separado ou prioridades de conservação, devido à elevada distinção tanto genética, quanto ecológica (MORITZ, 1994). Quanto mais longo for o isolamento e mais diferente for o ambiente, maior a chance de as populações representarem unidades distintas que requerem preservação e manejo em separado (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). O objetivo de determinar essas unidades é poder assegurar que as principais linhagens históricas dentro das espécies sejam protegidas e que os processos evolutivos inerentes sejam mantidos (MORITZ, 2002).

Hylodes fredi, um anfíbio endêmico de uma ilha em um 'hotspot' de biodiversidade

O Estado do Rio de Janeiro preserva 20,33% de remanescentes florestais do bioma Mata Atlântica (BERGALLO et al., 2009). Por conta de sua elevada biodiversidade e aos endemismos de diversos taxóns, o estado se destaca como território estratégico para a conservação desse bioma e isso inclui a conservação dos anfíbios (VAN SLUYS et al., 2009). A Ilha Grande é a terceira maior ilha da costa do Brasil (19.300 hectares) e está localizada no município de Angra dos Reis, na costa do estado do Rio de Janeiro. A Ilha Grande é uma ilha continental formada no limite do Pleistoceno com o Holoceno, quando o nível do mar subiu gradualmente, e a sua baía começou a ser submersa. Entre 6.500 e 7.000 anos atrás, a região foi de fato isolada do continente, e a ilha como conhecemos hoje foi formada (GAMA et al., 2009).

Na Ilha Grande, até o presente, é conhecida a ocorrência de 37 espécies de anfíbios anuros, pertencentes a 12 famílias (ROCHA et al., 2018), entre as quais duas são endêmicas da ilha – *Proceratophrys tupinamba* (PRADO; POMBAL, 2008) e *Hylodes fredi* (CANEDO; POMBAL., 2007). O gênero *Hylodes* é endêmico da Mata Atlântica e possui 26 espécies distribuídas entre os estados Espírito Santo e Rio Grande do Sul (DE SÁ et al., 2015;

MALAGOLI et al., 2017; SAZIMA; BOKERMANN, 1982). As florestas da Ilha Grande constituem o único local do planeta onde é conhecida a espécie *Hylodes fredi* (CANEDO; POMBAL, 2007; MOTTA-TAVARES et al., 2019). Esse constitui um dos exemplos mundiais de endemismo em escala reduzida já que é uma espécie restrita aos apenas cerca de 19 km² da Ilha Grande (MOTTA-TAVARES et al., 2019). Essa espécie foi descrita em 2007 (CANEDO; POMBAL, 2007), e seu girino em 2010 (LAIA et al., 2010).

Estudos apontam que *Hylodes fredi* só vive em córregos florestais de água cristalina e de fundo rochoso sem sinais de poluição (MOTTA-TAVARES et al., 2019). Ao contrário de muitos anfíbios florestais com potencial de ocupar toda a área coberta por florestas, a área efetiva de ocupação desta espécie é restrita aos córregos. Com isso, sua real área de ocupação reduz-se às pequenas bacias hidrográficas da ilha e, nestas, apenas aos córregos de águas límpidas e fundo pedregoso. Na medida em que a qualidade da água do córrego é alterada, por exemplo com poluição, a espécie desaparece do córrego e é localmente erradicada (MOTTA-TAVARES, 2016). Isso por um lado mostra que *H. fredi* constitui um excelente indicador da qualidade da água dos córregos que ocupa, mas que também possui uma elevada vulnerabilidade, devido à sua limitada área de ocupação.

Por esse motivo, tem sido sugerido que o grau de ameaça, dos anfíbios da família Hylodidae é maior do que o suposto atualmente, devido à elevada restrição de habitat que as espécies possuem, vivendo confinadas em córregos e com acentuada redução em termos da área de ocupação (ALMEIDA-GOMES et al., 2014). Atualmente a maioria das espécies de anfíbios hilodídeos estão categorizados na lista vermelha da IUCN (2022) como “Dados Insuficientes”, por haver poucas informações disponíveis sobre sua ecologia populacional. Quando se considera a área efetiva de ocupação, essas espécies poderiam passar à categoria de ameaçadas, com base nos mesmos critérios da IUCN (ALMEIDA-GOMES et al., 2014). Além disso, a restrição a riachos, e a filopatria característica dos hilodídeos os tornam mais vulneráveis a certas doenças, como a quitridiomicose aumentando ainda mais seu grau de ameaça (RUGGERI et al., 2015).

Diferentes aspectos da biologia de *H. fredi* já foram estudados, como sua atividade e a sua influência por fatores ambientais (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002), dieta (ALMEIDA-GOMES et al., 2007), distribuição e ocupação no habitat (MOTTA-TAVARES, 2016), e parasitismo por ácaros (HATANO et al., 2007). Apesar desses estudos terem avançado no conhecimento sobre a ecologia da espécie, nenhum deles considerou nos seus métodos o possível viés causado por problemas na detecção de *H. fredi*. Ademais, ainda não

existem estudos de genética populacional com hilodídeos, e nada se sabe sobre a variabilidade genética em *H. fredi*.

Buscando entender melhor o grau de ameaça de *Hylodes fredi*, e ajudar a guiar esforços de conservação para a espécie na Ilha Grande, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo foi escrito na forma de um manuscrito em inglês para submissão à revista científica *Wildlife Research* e buscou compreender melhor os fatores afetando a ocupação de *H. fredi* dentro dos riachos onde ocupa. Nele respondemos as seguintes perguntas: (1) Quais microhabitats *H. fredi* mais ocupa? (2) Qual é a probabilidade de detecção da espécie? (3) Qual a correlação das covariáveis de habitat e ambientais com a ocupação e detectabilidade de *H. fredi*?

O segundo capítulo utiliza um marcador mitocondrial para realizar o primeiro estudo de genética populacional de *H. fredi*. Esse capítulo explora a diversidade genética e a possibilidade de haver estrutura genética populacional na espécie. Também, busca avaliar a história demográfica de *H. fredi*. Por fim, avaliamos as implicações dos nossos resultados na conservação da espécie endêmica da Ilha Grande.

1 ROCKS, LEAF LITTER, AND AIR TEMPERATURE INFLUENCE OCCUPANCY AND DETECTABILITY OF AN INSULAR ATLANTIC FOREST FROG

ABSTRACT

Species of the tropical frog Family Hylodidae tend to be restricted to streams and hence have a small occupancy area. *Hylodes fredi* (CANEDO; POMBAL, 2007), a diurnal stream-dwelling species endemic to the Atlantic Forest in Ilha Grande, southeast Brazil, is one such species. Due to scarce population studies, it is also categorized as Data Deficient (DD) in the IUCN Red List. To generate a fine-scale occupancy model for *H. fredi* while accounting for imperfect detection, we systematically described the microhabitats preferentially occupied by the species. To analyze the fine-scale occupancy and detectability of *H. fredi*, we sampled six streams where the species is known to occur. Perpendicular transects were established in each stream, and further subdivided into ten sampling plots. Single-species and single-season occupancy models were created with the UNMARKED R package, and model selection was performed based on the Akaike information criterion. We observed the species in 70 of the 275 sampled sites, which resulted in a naïve occupancy of 0.28 and detectability of 0.25. The best models suggest that *H. fredi* occupancy increases proportionally to rock cover and inversely with leaf litter cover. Detectability lowered with an increase in leaf litter cover and was affected by the air temperature. The data demonstrate that *H. fredi* has a strict and reduced occupancy, mostly limited to the stream's margins, which has conservation implications.

Keywords: *Hylodes*, Atlantic Forest, detection probability, microhabitat, occupancy modeling, population ecology.

Manuscript to be submitted to the scientific journal *Wildlife Research.*

INTRODUCTION

Most frog species evolved to have nocturnal activity, while the number of diurnal species is much smaller (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Frogs that are active during the day experience comparatively higher risks of desiccation due to insolation, lower air relative humidity, and higher environmental temperatures (SHOEMAKER et al., 1992). Minimizing these risks, many diurnal frogs are associated with streams and shallow rivulets inside the forests where the aquatic environment, including the water spray, provides the needed humidity to survive (WELLS, 2007). This stream-association present in many diurnal frogs markedly affects their occurrence and distribution in space, resulting in a reduced occupancy area which is usually restricted to the channel of streams and their adjacent portions, rarely reaching all regions of the forest (ALMEIDA-GOMES et al., 2015; ALMEIDA-GOMES et al., 2014; ALMEIDA-GOMES & ROCHA, 2014; DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Hylodidae is a tropical frog family with mostly diurnal species (FROST, 2021; HADDAD et al., 2013; SEGALLA et al., 2019). It is endemic to the Atlantic Rainforest Biome in Brazil and comprises four genera: *Crossodactylus* Duméril & Bibron, 1841 (13 sp.), *Megaelosia* Miranda-Ribeiro, 1923 (1 sp.), *Phantasmarana* Vittorazzi, Augusto-Alves, Neves-da-Silva, Carvalho-e-Silva, Recco-Pimentel, Toledo, Lourenço, and Bruschi, 2021 (6 sp.), and *Hylodes* Fitzinger, 1826 (26 sp.) (FROST, 2021). In the forests of southeastern and southern Brazil, species of *Hylodes* are usually associated to the channels of small streams and rivulets and supposedly narrow adjacent portions of these waterbodies (DA SILVA; BENMAMAN, 2008), which greatly reduces species effective occupancy area in space. Because of this tight association with stream microhabitats, assessments of the conservation status of these species often suffer from an overestimation of their effective occupancy area, and consequently underestimate their extinction threat; this may impose higher risks for their persistence and conservation (ALMEIDA-GOMES et al., 2014).

Hylodes fredi Canedo & Pombal, 2007 is a diurnal, stream-dwelling frog, endemic to Ilha Grande, a continental island situated on the southeastern Brazilian coast (CANEDO; POMBAL, 2007). The species is known to occur exclusively in first and second order and unpolluted streams in the island's Atlantic Rainforest, where they show considerable site fidelity, tending to remain at a same microsite over successive days (MOTTA-TAVARES et

al., 2019; ROCHA; VAN SLUYS; HATANO, 1997). Air temperature and the amount of light reaching the streams have been shown to positively affect the number of calling males (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002). In Ilha Grande, while the sympatric *Crossodactylus gaudichaudii* Duméril & Bibron uses local stream habitats horizontally, *H. fredi* occurs mainly on rocks, using the habitat vertically (ALMEIDA-GOMES et al., 2007).

Presently, *H. fredi*, along most Hylodidae species, is listed as "Data Deficient" in the IUCN Red List (IUCN 2021) due to scarce information on its population ecology. Previous surveys were conducted almost strictly on the stream channels of Ilha Grande and failed to control for imperfect detection of individuals (MACKENZIE et al., 2006). Occupancy models have been traditionally used to understand the spatial distribution of species, dealing with detection and non-detection (binary) data (MACKENZIE et al., 2006). Over the last decades, there has been a push to correct these data while acknowledging imperfect detection. Most species are not easily detected, many can have cryptic habits, or hide in between crevices, or be fossorial. In some cases, these species can be (mistakenly) reported as absent from a certain area, when they were just not detected; accounting for imperfect detection is hence crucial when conducting occupancy studies (MACKENZIE et al., 2006). In the case of *H. fredi*, because the simplest way to detect species presence is through male advertisement calls and given that males generally call continuously from rocks from sunrise to sunset (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002), it is likely that the previous studies were biased in terms of microhabitat use.

1.1 STUDY AIM

In the present study, we conduct the first occupancy modeling for a Hylodidae species while accounting for imperfect detection. Considering streams where the species is already known to occur, we investigated *Hylodes fredi* occupancy at a finer scale, exploring areas further into the forest yet adjacent to the margins of the stream. Specifically, we aimed to answer the following questions: (1) What microhabitats does *H. fredi* most occupy? (2) What is the species detection probability? (3) How do habitat and environmental covariates correlate with the occupancy and detectability of *H. fredi*?

1.2 METHODS

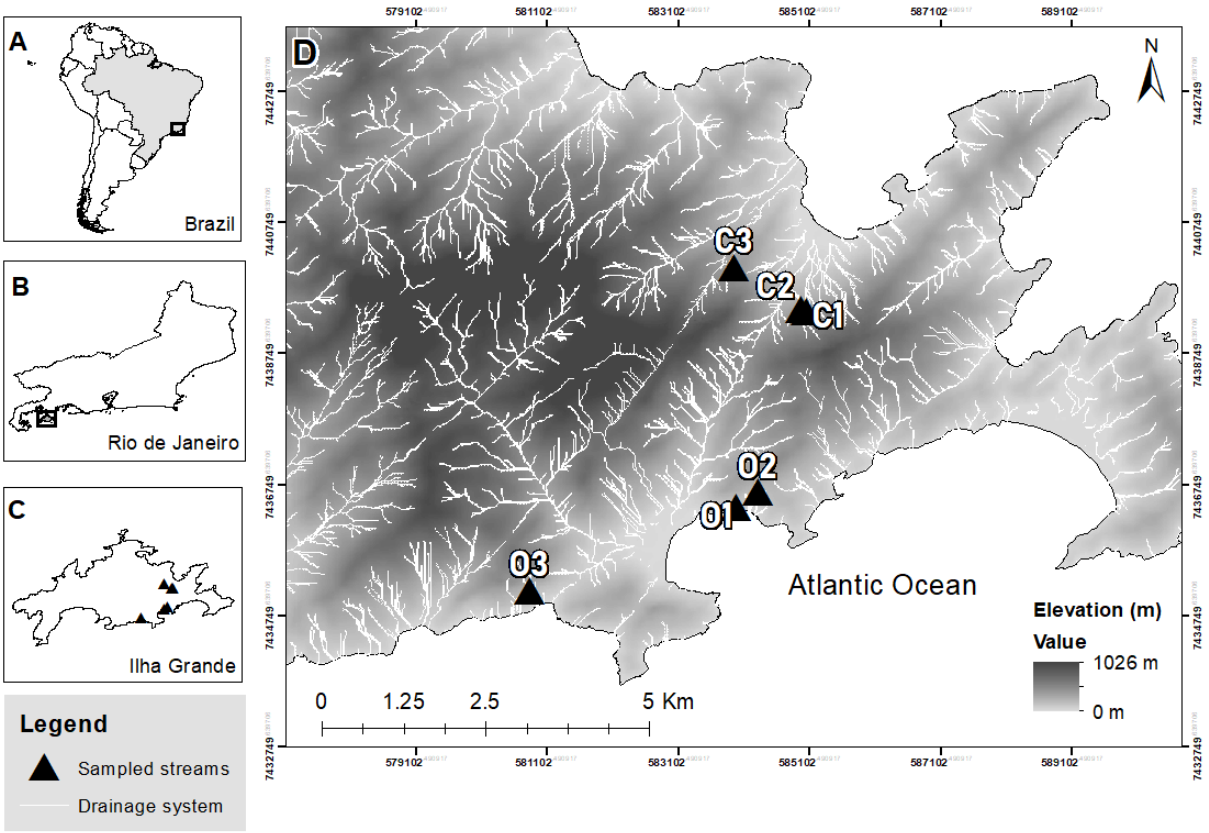
1.2.1 Study area

Ilha Grande (23°11'S, 44°12'W) is a continental island located in the municipality of Angra dos Reis, on the southwest coast of the state of Rio de Janeiro, Brazil (Figure 1). The island has an area of 193 km² and harbors one of the largest Atlantic Forest remnants (INEA, 2011). The local annual rainfall is about 2,200 mm and the mean annual temperature is around 21°C (INEA, 2011). The predominant type of vegetation in the area is the ombrophilous dense rain forest, but coastal habitats with sandy soils (restingas), flooded forests, and mangroves can also be found (ALHO; SCHNEIDER; VASCONCELLOS, 2002). The island has an oceanic and a continental slope, which differ in microclimatic conditions (GAMA et al., 2009).

1.2.2 Field Sampling

Fieldwork was carried out during the rainy season, in December 2020 and January 2021, when the species is most active (MOTTA-TAVARES et al., 2019). To analyze the fine-scale occupation and detectability of *Hylodes fredi* in Ilha Grande, we selected six streams with previous occurrence records (Figure 1C-D) (MOTTA-TAVARES et al., 2019). The distance between the adjacent streams was at least 90 meters (average distance of 1,6 km) to avoid spatial pseudoreplication and ensure that it was possible to estimate occupancy and detectability at a finer scale. Three of these streams were in the continental slope of the island: Ponto Estrada I (C1), Ponto Estrada II (C2) and Ponto Pico do Papagaio (C3), while the other three were in the oceanic slope: Ponto Caxadaço I (O1), Ponto Caxadaço II (O2) and Ponto Parnaioca (O3) (Figure 1D).

Figure 1 - Location of Ilha Grande (C and D) in the state of Rio de Janeiro (B), within Brazil (A, in gray). The lines in D represent the island drainage system and triangles show the sampled streams. Labels indicate sampling locations: Ponto Estrada I (C1), Ponto Estrada II (C2), Ponto Pico do Papagaio (C3), Ponto Caxadaço I (O1), Ponto Caxadaço II (O2) and Ponto Parnaioca (O3)



To survey areas that encompass a gradient from the stream channel towards the inside portions of the forest, five perpendicular transects were established in each stream, with a 20 m distance between them. To delimitate each transect, we first marked the central point of the stream. Then, using a laser tape measure (Bosh GLM 40), we established 15 m distance outwards of both sides of the stream margins. This ensured that each transect was 30 m long and cut the stream transversely. To estimate occupancy and detection at a finer scale, each transect was subdivided into ten sampling plots. Each plot had a 3x3 m dimension and constituted a sampling site, totaling 275 sampling plots.

During surveys, a pair of researchers walked through each transect, conducting a careful visual search for individuals of *H. fredi*, combined with auditory search, oriented by the species call. Every time an individual was detected, its presence and the respective plot were recorded. When there was doubt whether the detected individual was situated inside the sampling unit or not, the observation was not used to estimate finer scale occupancy. Surveys

along the transversal transects were repeated two to three times, with an interval of a minimum of two hours and a maximum of two days between each survey.

1.2.3 Environmental Covariates

During fieldwork, we measured the air temperature (°C) and the air relative humidity (%) at each visit (sampling occasion). We also collected site covariate data, as follows: stream depth (in cm), stream current speed (m/s) for each transect, and microhabitat composition (%) for each plot unit. Mean stream depth (in cm) of transects was estimated as an average of the five measurements taken in different portions of the stream channel, using a meter stick (INPA, 2012). An index of stream current speed was estimated with a meter stick, a table tennis ball, and a stopwatch. In the center of the stream´s channel of each transect, we timed how many seconds it took for the floating ball to complete a one-meter distance (INPA, 2012). To estimate the percentage of coverage by the different microhabitat composition at each sampling unit, a downward photograph from each site, perpendicular to the forest floor, was taken using an ultra-wide lens smartphone. To assure that the photos always represented a similar amount of area, all pictures were taken by one person, using the same smartphone and within the same distance from the ground (1,20 m). An object 10 cm long was placed on the ground to use as a reference of surface and focal objects dimensions. Images were analyzed using a 10x10 grid in the program imageJ version 1.53h (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), where the coverage of each microhabitat type in forest stream areas (rocks, vegetation, leaf litter, bare ground, sand, tree trunks, branches, and roots) was carefully measured and later used to estimate percentages. This procedure allowed us to characterize the microhabitat composition of each sampling unit as a continuous variable (%).

1.2.4 Data Analysis

Based on Mackenzie et al. (2006), we estimated site occupancy (Ψ) and the detection probability (P) for *H. fredi* with two possible outcomes: 1) the site was occupied, and the

species was detected (Ψ × P), and 2) the species was present but not detected (Ψ × [1 – P]). Therefore, the data collected during fieldwork were transformed into a species detection (1) and non-detection (0) matrix. This matrix contains the species detection history to estimate occupancy and detection.

To analyze how each environmental covariate may be affecting species occupancy and detection probabilities, single-species and single-season occupancy models were created with the UNMARKED package version 1.1.1 (FISKE; CHANDLER, 2011) in the program R version 4.1.2 (R Core Team 2021). Top adjusted models were selected using Akaike's information criterion adjusted for a small sample size (AICc). All models with a ΔAICc value < 2 were equivalent. To choose the best model to test our hypotheses, we also used the weight (Akaike weight) for each model, which corresponds to the amount of evidence in favor of a given model. We performed 2000 bootstraps to assess the adjustment fit (z) and the overdispersion parameter (cˆ).

1.3 RESULTS

We obtained 89 independent detections of *H. fredi* and observed the species in 70 of the 275 sites, which resulted in a naïve occupancy (N detected/N sampled) of 0.28 and detectability of 0.25. From the 20 occupancy models produced (the ten top adjusted models are shown in Table 1), the three best-adjusted models (delta AIC < 2) suggested that rock cover (%) and litter cover (%) affect occupancy, while litter cover (%), and air temperature (ºC) affect detection probability (Table 1). The three top models have approximately the same weight, and about 75% of the variance in the occupancy and detection probability was explained by these covariates jointly (Akaike weight – AICcw – ca. 0.75).

Table 1 – Top ten ranked single-season occupancy and detectability models estimated for *Hylodes fredi* in Ilha Grande, southeast Brazil. Covariates: microhabitat types (rock, litter, vegetation, bare ground) and air temperature (temp). Ψ = occupancy, p = probability of detectability, AICcw = Akaike weight. C-hat = 1.23 obtained with 2,000 bootstraps and model adjustment fit = 0.62

Model	**AICc**	**ΔAICc**	**AICcw**	**Number of parameters**
Ψ(rock;litter) p(litter;temp)	429.15	0	0.256	6
Ψ(rock) p(litter;temp)	429.55	0.4	0.253	5
Ψ(litter) p(litter;temp)	431.12	1.97	0.247	5
Ψ(.) p(litter;temp)	435.16	6.01	0.094	4
Ψ(rock;litter;bareground) p(litter;temp)	435.98	6.83	0.075	7
Ψ(rock;bareground) p(litter;temp)	437.11	7.96	0.043	6
Ψ(litter;bareground) p(litter;temp)	437.62	8.47	0.021	6
Ψ(bareground) p(litter;temp)	439.58	10.43	<0.01	5
Ψ(rock;litter;veg) p(litter;temp)	441.25	12.1	<0.01	7
Ψ(rock;litter;bareground;veg) p(litter;temp)	443.34	14.19	<0.01	8

Occupancy in forest stream areas was best described by two of the 10 site covariates tested: (1) rock coverage (rock, in percentage), which had a positive relationship whereby occupancy increased with a higher proportion of rocks (Ψ = 0.1 to 0.75; Figure 2A); and (2)

leaf litter coverage (litter, in percentage), which had a negative relationship whereby occupancy increased as the litter coverage decreased (Ψ = 0.50 to 0; Figure 2B).

Detectability in forest stream areas was also affected by two covariates: (1) litter coverage, which had a negative relationship whereby detectability decreased in sites with a higher percentage of litter cover (p = 0.62 to 0.20; Figure 3A); and (2) air temperature (temp, in Cº), which predicted a variable trend. The detectability increased successively with the increase in air temperature, but more strongly up to 23.45 °C and then more slowly until reaching the limit of 26.5°C, from which it successively dropped to less than 50% (Figure 3B).

Figure 2 - Relationship between the occupancy of *Hylodes fredi* and rock cover (A) and litter cover (B)

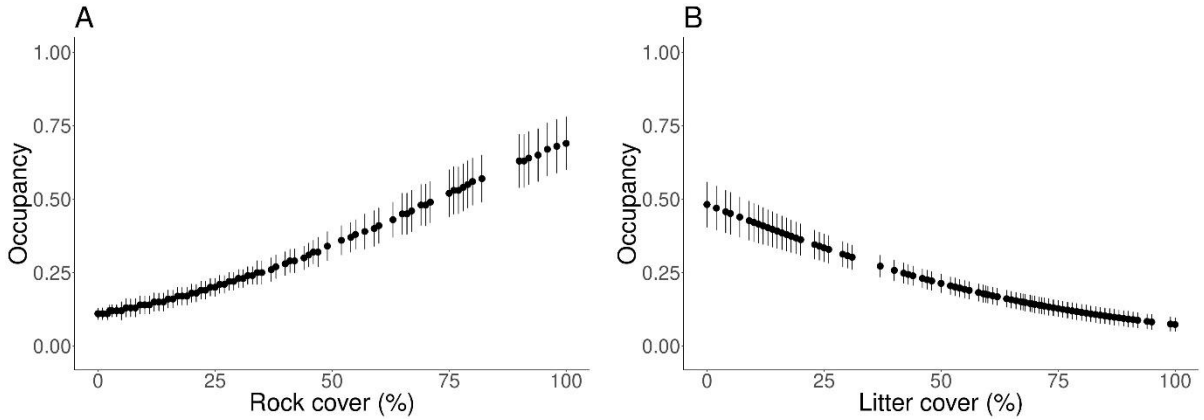
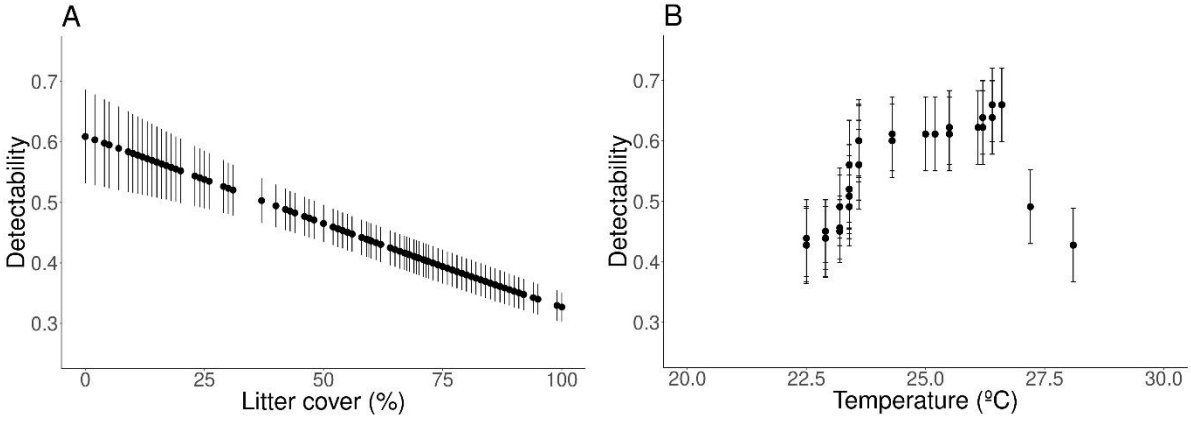


Figure 3 - Relationship between the detectability of *Hylodes fredi* and leaf litter cover (A) and air temperature (B)



The effect of other covariates was also tested, nevertheless, they had much lower significance than the rock occupancy model. A negative relationship was observed between occupancy and the percentage of bare ground (Table 1).

1.4 DISCUSSION

Our data showed that the fine-scale occupancy of *H. fredi* increased with the higher degree of rock cover in forest stream areas and decreased with the higher degree of litter cover on the forest floor. This corroborates what is known about the species ecology: *H. fredi* is a diurnal riparian species, associated with small and shallow rocky bottom streams in Ilha Grande (ALMEIDA-GOMES et al., 2007; MOTTA-TAVARES et al., 2019). The males are conspicuously territorial and during the breeding season (September – May) individuals emit calls usually established on top of rocks which are located inside or at the border of streams (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002). In this sense, pieces of rocks are commonly used as territories and their crevices can offer places to hide from predators. Therefore, it can be expected that the higher availability of rocks in the stream environment can support a larger number of individuals, especially males. *Hylodes fredi* tadpoles are habitat specialists and are found only in forest rocky streams, with clear shallow backwaters and with high levels of dissolved oxygen (FATORELLI; NOGUEIRA-COSTA; ROCHA, 2018; LAIA et al., 2010). Also, since this is a diurnal species, it can be exposed to higher temperatures and direct sunlight, which can be harmful to amphibians (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Thus, the association with rocks inside the stream channel, which is usually where the stream water passes through, may provide appropriate conditions for physiological maintenance of individuals and prevent desiccation (DUELLMAN; TRUEB, 1986; SHOEMAKER et al., 1992), which is especially important for diurnal frogs.

Conversely, frog occupancy decreased with the increase in leaf-litter coverage on the forest floor**.** Usually, as the presence of streams reduces tree coverage, the amount of leaf litter increases as one moves away from the stream margins towards the inner forest. Many riparian frog species are strictly restricted to the stream's channels and their nearby margins (ALMEIDA-GOMES et al., 2014) which seems to be the reason for a decreased occupancy of *H. fredi* with an increased litter cover away from streams. Most parcels with such high litter coverage were found in a further distance from the stream center, where favorable conditions as water, air humidity, and rocky microhabitats have probably decreased, and thus, fewer individuals of *H. fredi* tend to occupy.

Our results are in accordance with previous studies of leaf-litter frogs in other forested areas in Ilha Grande (ROCHA et al., 2001; ROCHA et al., 2000; VAN SLUYS et al., 2007). While the leaf litter frog community was intensively sampled across multiple years, using both large and small plots established on the forest floor, no *H. fredi* was encountered on any occasion. Only when rocky streams were sampled in areas deep into the forest, *H. fredi* was present (FATORELLI; NOGUEIRA-COSTA; ROCHA, 2018; HATANO, 2004a; MOTTA-TAVARES et al., 2019). Our field observations agree with that observation, showing that individuals of *H. fredi* only tend to be found in the forest when there is a rocky stream with clear and moving water.

Detectability was reduced with an increase in leaf litter cover on the forest floor. One possible explanation is that it is harder to perceive the presence of the individuals when they are on the leaf litter. Some reasons certain frog species tend to have low detectability may include comparatively small body size, a potential level of camouflage when on the litter due to their coloration, secretive habits, or rarity in nature, which may result in them becoming less perceptible during visual encounter surveys (DE SÁ et al., 2015; LIMA et al., 2019). In the case of *H. fredi*, which is not rare in stream environments of the island, the dorsal coloration may concur to explain the decrease in detectability as one moves towards the stream margins and away from the stream. Such dorsal coloration resembles somewhat that of the leaf litter, which in turn, may confer some grade of camouflage to individuals, reducing their detectability. Since it is difficult to detect the frogs from far away, they may run away before the researchers get close enough to note their presence.

It is important to consider that we were not able to distinguish between males, females, and juveniles during surveys (except when there were calling males), which precludes us from analyzing possible sex and age differences in microhabitat use. Conversely, because field observations have shown that individuals of *H. fredi* do not tend to remain under the leaf litter when active, secretive habits seem not to be an explanation for lower frog detectability. In addition, individuals found on the leaf litter were usually moving and thus, in the case of males, were not emitting calls (pers. obs. authors) which may reduce the opportunity of frog detection. Since *H. fredi* is a well-known diurnal frog (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002), we did not perform nocturnal surveys, which would probably show a different occupation pattern when inactive. Individuals of some *Hylodes* species, such as *H. phyllodes* (HEYER et al., 1990) and *H. nasus* (DE OLIVEIRA MACHADO et al., 2016), are known to remain perched on vegetation when inactive during the nocturnal period, a way of occupation considerably different from when they are active.

We found an increase in detectability as air temperature increased - more strongly up to 23.45 °C and then more slowly until reaching the limit of 26.5°C -, but a successive decrease after that. We suggest that such increase and further decrease may result from the effect of air temperature on the physiology of *H. fredi*, which can operate better at intermediate environmental temperatures. Anurans are ectothermic, have permeable skin, and particularly sensitive to external environmental factors; very low or high temperatures can reduce anuran activity (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Specifically for *H. fredi*, Hatano et al. (2002) found that the number of calling males was positively and significantly related to mean air temperature. When temperatures are not appropriate, males tend to reduce activity and may even not emit calls, making it more difficult to detect the species.

Although the relationship between occupancy and the percentage of uncovered forest floor was not statistically strong, the model shows that detectability decreased in sites with higher percentage of bare ground. Just as leaf litter coverage, bare ground was also mostly found in parcels further into the forest, where we believe individuals tend less to occur. Besides that, the bare ground supposedly makes individuals comparatively more exposed and visible to predators, and the lack of vegetation or litter can hinder body temperature maintenance on a micro-scale. Hatano (2004b) observed that males and females of *H. fredi* (previously referred to as *H. phyllodes*) differ in their microhabitats used, with males predominantly using rocks and woody snags in rivers and streams, while females mainly use the litter of the forest floor at stream margins. These differences in behavior among sexes may affect detectability.

We consider that this form of spatial use by *H. fredi* in the forest, living restricted to rocky bottom streams with clear water, has important implications both in terms of population isolation and species conservation. For one, it means that each stream and watershed may potentially hold a population, with few or no migrants. We expect this to confer some degree of genetic isolation from frogs in other watersheds in the island. However, only genetic studies specifically designed to assess the effective degree of isolation (or not) promoted by population segments living in different micro basins will be able to answer these questions. In terms of conservation, since our data show that the occupation of *H. fredi* is restricted to the interior of the stream channel, with just some small portion of the nearby forested margins being occupied, the effective area of occupation of the species in the overall forest environment constitutes a tiny portion of that of the forest as a whole. Assessments of the degree of threat and conservation status of species should therefore use the effectively occupied area to infer its degree of threat risk. Species with similar life form and use of space

as *H. fredi* must potentially be at a higher threat degree than currently considered: their conservation status must be currently underestimated (see ALMEIDA-GOMES et al. 2014).

We conclude that *Hylodes fredi* occupancy increased with the higher degree of rock cover in forested stream areas and decreased with the higher degree of litter cover on the forest floor, whereas frog detectability decreased with an increase in leaf litter cover and was affected by air temperature in the microhabitat. The present study further investigated this island endemic species microhabitat use and fine-scale distribution, demonstrating its strict and reduced occurrence, with occupancy mostly limited to the stream's margins, which has conservation implications. One of the major goals of population ecology is to understand where and how individuals are distributed (KREBS, 2014), and occupancy models are often used to access this information. However, most species are not easily detected, therefore, it is paramount to account for imperfect detection when conducting occupancy studies. Here, we have presented the first occupancy modeling and detectability estimation for a Hylodidae species. Our data can provide insights into future occupancy modeling studies and help define conservation guidelines for the endemic *Hylodes fredi* and other species with similar occupancy patterns.

2 ESTRUTURA E VARIABILIDADE GENÉTICA DO ANURO ENDÊMICO *HYLODES FREDI* (HYLODIDAE) NA ILHA GRANDE, ANGRA DOS REIS, RJ

RESUMO

A diversidade genética de uma espécie pode determinar seu potencial evolutivo e sua viabilidade futura. Ela é resultado de processos de curto e longo prazo, e existem barreiras modernas e históricas ao fluxo gênico. A topografia e a presença de corpos hídricos são alguns fatores que influenciam no fluxo gênico e que causam divergências genéticas intraespecíficas em anfíbios, podendo gerar populações estruturadas. Apesar de haver diversos estudos sobre a ecologia de *H. fredi*, nada se sabe sobre a diversidade genética presente na espécie. Neste capítulo foram utilizadas 66 sequências do gene mitocondrial *ND2* para realizar o primeiro estudo de genética populacional com o anuro *H. fredi*. Estudos prévios apontam que a espécie possui área de ocupação restrita a córregos florestais de água límpida e de fundo rochoso, e que ela apresenta comportamento territorialista, o que traz o pressuposto de uma forte filopatria e baixo fluxo gênico entre riachos. A partir deste pressuposto associado à geografia da Ilha Grande, formada por quatro vertentes hidrográficas com microbacias distintas, foram testadas as seguintes hipóteses: (I) As populações de *H. fredi* espalhadas pela ilha apresentariam algum grau de estrutura genética, (II) Havendo estrutura, esta pode estar relacionada ao isolamento geográfico entre as microbacias onde ocorrem, (III) A configuração das microbacias na ilha pode reforçar o isolamento geográfico das populações e intensificar a estruturação genética populacional, (IV) Processos demográficos históricos na ilha podem ter resultado em diferentes níveis de variabilidade genética entre as populações de *H. fredi*. Os resultados apontaram para uma alta diversidade haplotípica (Hd= 0.876) e baixa diversidade nucleotídica (Π=0.006) para a região *ND2* na espécie como um todo. A rede de haplótipos e AMOVA apontaram para uma estruturação genética em três grupos (denominados aqui de HF1, HF2 e HF3), porém não houve concordância da distribuição geográfica destes com as microbacias e vertentes da ilha. Os dados também indicaram que a espécie passou por um processo de expansão populacional no passado. Cada grupo encontrado pode significar uma unidade evolutiva significativa para a conservação, e suas distribuições geográficas devem ser mais bem compreendidas em pesquisas futuras. O grupamento HF1 requer atenção especial devido a sua raridade na Ilha Grande. Apesar dos resultados apontarem para uma alta diversidade genética dentro da espécie, são necessários novos estudos utilizando outros tipos de marcadores genéticos, e é importante que não se relaxem os esforços de conservação para *H. fredi*.

INTRODUÇÃO

A diversidade genética de uma espécie pode determinar seu potencial evolutivo e sua viabilidade futura (BEEBEE, 2005; FRANKHAM, 2005). Diferentes forças atuam sobre a variação genética de uma população: a mutação e o fluxo gênico podem trazer novas combinações alélicas, aumentando a variação genética. Já, a deriva gênica e o endocruzamento, cujos efeitos são maiores em pequenas populações, costumam remover essa variação (SLATKIN, 1987). A maioria das espécies na natureza estão subdivididas (estruturadas) em populações locais, portanto a variação genética de uma espécie pode ser repartida em variação entre populações e dentro de populações (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). A distribuição da variabilidade genética entre essas populações locais é determinada por processos históricos, como mudanças na geografia e flutuações climáticas passadas, e seus efeitos na história demográfica da espécie. Aspectos ecológicos, como características da história de vida e capacidade dispersiva, também são determinantes na distribuição da diversidade (BARROW et al., 2021).

Dispersão pode ser definida como um movimento unidirecional de indivíduos de seu sítio natal para seu sítio reprodutivo, ou entre sítios reprodutivos (MATTHYSEN, 2012; VAN DYCK; BAGUETTE, 2005). Em termos ecológicos, a dispersão vai influenciar na demografia de uma espécie, trazendo novos imigrantes que ingressam na população. Já em termos evolutivos, a dispersão quando é seguida por reprodução, caracterizando uma dispersão efetiva (*effective dispersal*) resulta no compartilhamento de genes, podendo trazer novas variantes genéticas para uma determinada população. Esse fluxo gênico afeta o tamanho efetivo populacional (Ne), que, por sua vez, atua no controle dos efeitos da deriva gênica e da eficácia da seleção natural sobre uma população.

Existem diferentes aspectos paisagísticos que podem facilitar ou dificultar a dispersão de indivíduos, e, consequentemente o fluxo gênico, em uma espécie. Para anfíbios, os principais fatores que influenciam na dispersão e que causam divergência genética intraespecífica, são a topografia, presença de corpos hídricos, tipo de macrohabitat, e urbanização (CAYUELA et al., 2018; RODRÍGUEZ et al., 2015). Por um lado, a presença de montanhas e de paisagens urbanas geralmente promovem restrições ao fluxo gênico (FUNK et al., 2005; GUARNIZO; CANNATELLA, 2013; SCHMIDT; GARROWAY, 2021; WEI et

al., 2021). Por outro lado, rios e tipo de cobertura vegetal podem tanto dificultar quanto facilitar a dispersão, dependendo das características ecológicas da espécie (ROBERTSON; LIPS; HEIST, 2008; SANTANA-CORNÉLIO et al., 2020). Também, é importante considerar o fator tempo ao se analisar as causas da variação genética de uma espécie. A diversidade genética observada atualmente é resultado de processos de curto e longo prazo, e existem barreiras modernas e históricas ao fluxo gênico (BALL et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

Visto que a dispersão é um processo não-aleatório, o fluxo gênico é assimétrico e isso pode resultar em uma diferenciação entre populações, resultando em uma população estruturada. Em especial, estudos com organismos de riacho mostram uma estrutura populacional genética geralmente associada à rede de drenagem onde estão distribuídos (HUGHES et al., 1995, 1996; MEFFE; VRINJENHOEK, 1988). Mesmo a estrutura genética sendo maior em populações separadas por barreiras dispersivas, como rios e montanhas (FUNK et al., 2005), ela também pode ocorrer na ausência dessas barreiras. Isso ocorre, pois a estrutura genética populacional é determinada por outros fatores além do fluxo gênico entre populações. A seleção atuando sobre as populações, os eventos históricos que alteraram a distribuição da espécie, a extinção de populações locais, e a ocorrência de gargalos genéticos em populações de tamanho pequeno também são responsáveis pela estruturação (WELLS, 2007).

Há uma forte tendência de espécies com distribuição restrita, como as endêmicas e insulares, possuírem menores tamanhos populacionais (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Populações pequenas são tradicionalmente prioridade de esforços de conservação, pois são mais suscetíveis à extinção devido a fatores estocásticos ambientais e demográficos (FRANKHAM, 2005; STACEY; TAPER, 1992). Nessas populações, a deriva gênica atua mais fortemente, e há maior chance de endocruzamento, levando a uma perda de diversidade genética e à possibilidade de fixação de alelos deletérios, respectivamente. Esse processo tem sérias implicações para a viabilidade e adaptabilidade da espécie para cenários e condições futuras, sendo conhecido como vórtex de extinção (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

Hylodes fredi (Hylodidae) é uma espécie de anuro endêmica da Ilha Grande, que vive em pequenos córregos florestais com água límpida, cristalina e sem sinais de poluição (MOTTA-TAVARES, 2016). Assim como a maioria das espécies de hilodídeos, *H. fredi* não possui uma categoria definida em termos do seu grau de ameaça na Lista Vermelha da IUCN, sendo considerada “Dados Deficiente” (IUCN, 2022). Essa ausência de status de categorização se deve em grande parte pelo número restrito de estudos populacionais com a

espécie. Até então alguns aspectos da ecologia de *H. fredi* já foram estudados, como sua atividade e a sua influência por fatores ambientais (HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002), dieta (ALMEIDA-GOMES et al., 2007), distribuição e ocupação no habitat (MOTTA-TAVARES, 2016), e parasitismo por ácaros (HATANO et al., 2007). Estudos mais recentes indicam que os indivíduos de *H. fredi* possuem uma alta especificidade de habitat e uma ocupação restrita aos canais dos córregos e próximos às suas margens na floresta (Capítulo 1; FLYNN, 2022). Esse padrão de ocupação encontrado levanta questões relacionadas ao grau de conectividade existente entre as diferentes populações locais da espécie dispersas ao longo da paisagem da ilha.

A Ilha Grande (IG) fica situada no município de Angra dos Reis, no estado do Rio de Janeiro, e é a terceira maior ilha da costa brasileira (BASTOS; CALLADO, 2009). Nela está abrigado o maior remanescente insular da Mata Atlântica, um bioma com forte histórico de degradação e considerado um *hotspot* de diversidade (ALHO; SCHNEIDER; VASCONCELLOS, 2002; OLIVEIRA, 2002). O perfil topográfico da IG divide-a em quatro principais vertentes de drenagem, cada uma contendo um conjunto de microbacias (GAMA et al, 2009). Considerando a paisagem da ilha e a ecologia da espécie, pode se imaginar que cada microbacia abrigaria uma população de *Hylodes fredi*. Como a ocupação da espécie é caracteristicamente restrita aos córregos, as regiões de mata separando cada microbacia poderiam servir como uma barreira à dispersão, supostamente havendo reduzida ou mesmo ausência de troca de genes entre as populações de cada microbacia. Além disso, a presença de montanhas, separando a ilha em vertentes, também pode dificultar o movimento dos indivíduos tanto por conta do gasto energético para se deslocar em áreas inclinadas, quanto por existência de eventuais diferenças em microescala na temperatura e umidade.

Até então não existem disponíveis estudos de genética populacional com espécies do gênero *Hylodes*, e não há informações sobre a diversidade genética em *H. fredi*. Acessar populações de uma perspectiva genética permite medir a quantidade de variação existente dentro delas, compreender melhor os padrões de troca genética intraespecífica, e identificar possíveis unidades de manejo genéticas (SMITH; WAYNE, 1996). Portanto, para obter um quadro mais completo do grau de ameaça de uma espécie, é essencial que se tenha alguma informação genética.

O presente estudo tem como objetivo utilizar um marcador mitocondrial para explorar a genética populacional do anuro *Hylodes fredi* na Ilha Grande. Em específico, o estudo busca testar as seguintes hipóteses: (I) As populações de *H. fredi* espalhadas pela ilha devem apresentar algum grau de estrutura genética para o fragmento de gene mitocondrial *ND2* (II).

Havendo estrutura genética, esta pode estar relacionada ao isolamento geográfico entre as microbacias onde ocorrem, (III) A configuração geográfica das microbacias na ilha, distribuídas em quatro vertentes de drenagem, pode reforçar o isolamento geográfico das populações entre as microbacias, intensificando a estruturação genética populacional, (IV) Processos demográficos históricos na ilha podem ter resultado em diferentes níveis de variabilidade genética entre as populações de *H. fredi*. Ao final, buscamos discutir as implicações dos nossos resultados para a conservação de *H. fredi*.

2.1 OBJETIVOS

O presente capítulo tem como objetivo principal realizar o primeiro estudo de genética populacional do anuro endêmico da Ilha Grande, *Hylodes fredi*, utilizando um marcador mitocondrial.

2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a variabilidade genética em *H. fredi* para o fragmento de gene mitocondrial *ND2*;
- Testar a existência de estrutura genética em *H.fredi* para o fragmento de gene mitocondrial *ND2*;
- Avaliar se a estrutura genética em *H. fredi* apresenta coerência geográfica com as vertentes e microbacias da Ilha Grande;
- Avaliar, com base no DNA mitocondrial, sinais de expansão demográfica em *H. fredi;*
- Investigar flutuações demográficas, efetivos populacionais e taxas de migração históricos em *H. fredi;*
- Interpretar os padrões encontrados com base na ecologia e história natural de *H. fredi;*
- Avaliar as implicações da variabilidade e estrutura genética da espécie endêmica da Ilha Grande para a sua conservação.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Área de Estudo

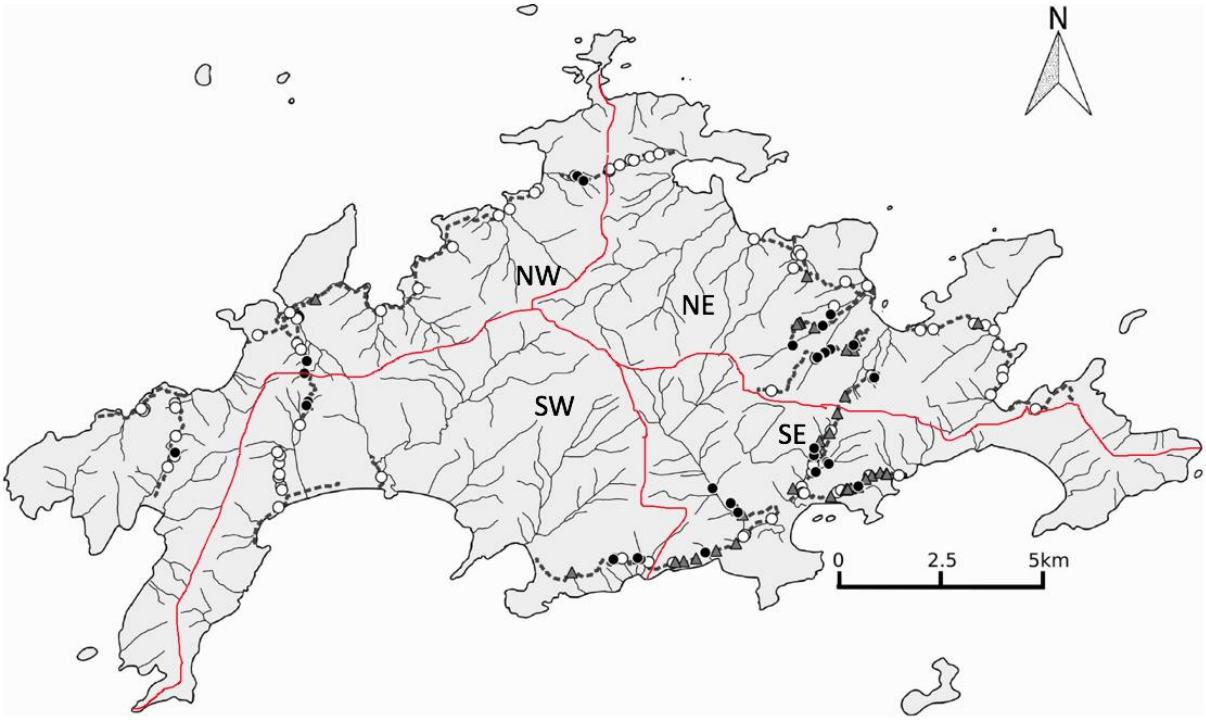
O estudo foi conduzido na área de endemismo da espécie alvo, a Ilha Grande (23°11'S, 44°12' W), situada no município de Angra dos Reis, sul do estado do Rio de Janeiro, Brasil. A Ilha Grande (IG) é a terceira maior ilha Brasileira e a maior da costa do estado do RJ, com 193 km^2, e abriga o maior remanescente insular do bioma Mata Atlântica. Ela está predominantemente dentro do domínio fito fisionômico Floresta Ombrófila Densa, possuindo trechos de floresta em diferentes graus de conservação, além de restingas, matas alagadiças e manguezais (BASTOS; CALLADO, 2009; OLIVEIRA, 2002).

Ao longo dos séculos de ocupação da IG o ambiente insular sofreu alteração, o que em grande parte cessou com o estabelecimento de Unidades de Conservação na área, como a Reserva Biológica da Praia do Sul, o Parque Estadual Marinho do Aventureiro, o Parque Estadual da Ilha Grande e a Área de Proteção Ambiental de Tamoios (APA Tamoios). Os remanescentes florestais, que por longos períodos estiveram sob diferentes graus de perturbação e degradação nos séculos passados, iniciaram um consistente processo de regeneração e hoje se encontram em diferentes estágios de recomposição (OLIVEIRA, 2002).

Ilhas continentais, como a IG, são conectadas ao continente, mas em termos de relevo, foram formadas após o aumento do nível do mar (transgressões marinhas) (MARTIN; SUGUIO, 1975). No que diz respeito à topografia da Ilha Grande, a maior parte do território está situado abaixo dos 500 metros de altitude. Porém, na porção centro-leste da Ilha se concentram as maiores altitudes, havendo dois principais pontos, o Pico do Papagaio (989m) e a Pedra d'água (1.011m) (GAMA et al., 2009). Consequentemente, existem dois grandes divisores de drenagem na Ilha Grande, que possuem seus altos topográficos interligados. Há o divisor Leste-Oeste (E-W) que conecta a Ponta dos Castelhanos (extremo leste), passando pela Serra do Papagaio, Pedra D'água, até a Ponta dos Meros (extremo sudoeste). Há também o divisor Norte-Sul (N-S), que liga a ponta do Saco da Freguesia (norte), intercepta na Pedra D'água o divisor E-W, descendo entre as praias da Parnaioca e de Dois Rios (sul) (GAMA et al., 2009). A interseção desses dois divisores compartimenta as vertentes da Ilha Grande em

quatro segmentos: vertentes Nordeste, Noroeste, Sudoeste e Sudeste. As vertentes Nordeste e Noroeste estão voltadas para o continente (encostas interiores) e as Sudeste e Sudoeste compreendem as encostas oceânicas (Figura 4). Sabe-se que as vertentes voltadas ao mar aberto (SE e SW) se encontram frontalmente expostas a entrada de frentes frias. Nesse sentido, a escarpa oceânica pode parcialmente barrar o efeito direto da frente fria, e tornar as vertentes continentais mais protegidas (GAMA et al., 2009).

Figura 4 – Mapa da Ilha Grande, localizada no município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, mostrando os conhecidos córregos com ocorrência do anfíbio anuro *Hylodes fredi*



Legenda: Os círculos pretos indicam córregos em que foi registrada a ocorrência de *Hylodes fredi*. Os triângulos em cinza indicam riachos onde foram registrados a vocalização da espécie. Os círculos brancos indicam que não houve registro da espécie no local. As linhas pontilhadas pretas se referem às trilhas percorridas pela autora, e as inteiras representam o sistema hidrológico da Ilha Grande. O mapa também mostra as quatro vertentes da ilha (NE, NW, SE e SW).
Fonte: adaptado de Gama et al., 2009 e Motta-Tavares *et al*., 2019

2.2.2 Amostragem

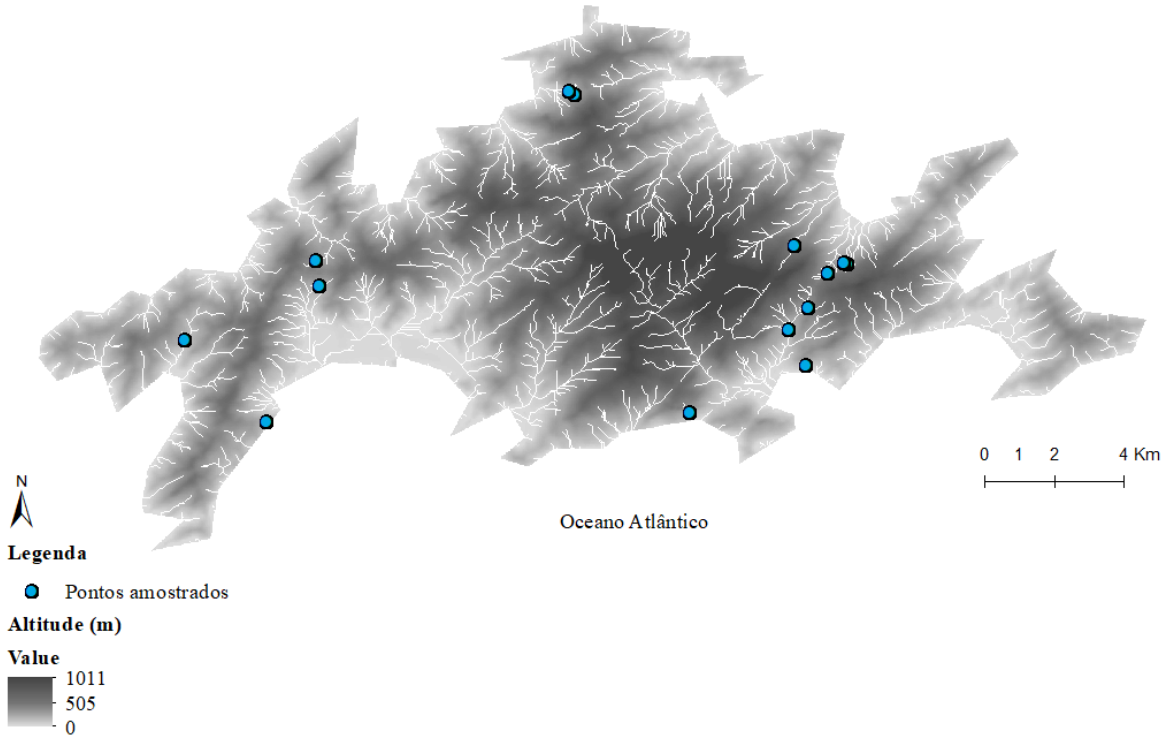
No estudo amostramos pontos de ocorrência de *Hylodes fredi* em cada uma das quatro vertentes da ilha. Inicialmente, identificamos os riachos ocupados por *H. fredi* no ambiente insular de acordo com Motta-Tavares et al. (2019) (Figura 4), onde fizemos buscas por

indivíduos da espécie. Adicionalmente, identificamos outras localidades de potencial ocorrência para complementar as buscas. Realizamos sete expedições a campo durante a estação chuvosa, entre setembro de 2017 e março de 2020. Nessas expedições, coletamos um total de 74 amostras de tecido de *Hylodes fredi* em 15 diferentes pontos, todos localizados em córregos na Ilha Grande (Tabela 2). Uma das localidades corresponde a um novo registro de local de ocupação na ilha pela espécie, na região da praia do Aventureiro. Os pontos de coleta estão indicados na Figura 5.

Tabela 2 - Informações sobre os pontos de coleta das amostras de tecido de *Hylodes fredi* que foram sequenciadas, a partir de 15 locais de ocorrência da espécie em córregos na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro

Localidade/ Microbacia	Código do Ponto	Vertente	Latitude	Longitude	Amostras por ponto	Amostras por vertente
Araçatiba	ARA	NW	23S 10' 19"	44W 20' 26"	4	14
Bananal	BAN1		23S 06' 28"	44W 14' 28"	1	
	BAN2		23S 06' 31"	44W 14' 23"	6	
Praia Longa	LON		23S 09' 05"	44W 18' 24"	3	
Estrada Continental (EC)	EC1	NE	23S 09' 09"	44W 10' 09"	4	17
	EC2		23S 09' 08"	44W 10' 11"	4	
	EC3		23S 09' 08"	44W 10' 12"	1	
	EC4		23S 09' 17"	44W 10' 27"	1	
Pico do Papagaio	PP		23S 08' 52"	44W 10' 58"	7	
Aventureiro	AV	SW	23S 11' 36"	44W 19' 10"	2	8
Praia do Sul	PSUL		23S 09' 29"	44W 18' 21"	6	
Caxadaço	CAX	SE	23°S 10' 43"	44W 10' 47"	11	27
Estrada Oceânica (EO)	EO1		23S 09' 49"	44W 10' 45"	1	
	EO2		23S 10' 10"	44W 11' 03"	5	
Parnaioca	PAR		23S 11' 27"	44W 12' 36"	10	
N Total: 10	15	4			66	66

Figura 5 – Mapa elaborado com uso do ArcMap (ArcGis 10.5) com os pontos (córregos) onde foram coletadas amostras de tecido do anuro *Hylodes fredi* ao longo da paisagem na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro



Fonte: A autora, 2022.

Cada córrego representativo da microbacia estudada foi percorrido buscando localizar indivíduos de *H. fredi* ali ocorrentes. As buscas foram tanto auditivas quanto visuais e feitas sempre por duas a quatro pessoas. Considerando o hábito diurno da espécie, percorremos os riachos de potencial ocorrência da espécie começando 7 h e terminando 17 h. Quando um indivíduo era localizado, tentávamos capturá-lo para a retirada de tecido. Os indivíduos capturados tiveram o sexo identificado, através da análise de presença ou ausência dos sacos vocais presente nos machos e coloração geral do ventre, que difere entre os sexos. Para fins da análise molecular, retiramos como amostra de tecido a falange distal do artelho IV do membro posterior direito. Aplicamos uma pequena quantidade de anestésico (Lidocaína 2%) sobre os artelhos antes de sua incisão. Os mesmos foram retirados com tesoura cirúrgica esterilizada e armazenados em etanol absoluto para posterior análise de genética molecular. Um indivíduo representativo da espécie foi coletado em cada um dos córregos estudados e fixado para posterior depósito como material testemunho. Estes indivíduos sofreram eutanásia através da aplicação cutânea de lidocaína 5%. Posteriormente foram fixados em formalina 10% e armazenados em etanol 70%. Tanto para a retirada de tecido quanto para a coleta, seguimos as recomendações de

boas práticas de pesquisa com anfíbios de Beaupre et al. (2004). O ponto de ocorrência de cada indivíduo, assim como cada riacho em que *H. fredi* foi coletado foi devidamente georreferenciado utilizando um GPS Garmin 62sc, registrando as coordenadas em UTM e datum WGS84.

2.2.3 Análise molecular

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para a digestão dos tecidos e extração do DNA utilizamos tanto o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) seguindo os protocolos do fabricante, quanto a extração de DNA por Acetato de Amônio seguindo os protocolos de Lyra et al. (2017). Para a caracterização da variabilidade genética em *Hylodes fredi* utilizamos sequências do fragmento do gene mitocondrial da subunidade 2 da enzima NADH dehydrogenase (*ND2*), uma região do DNA mitocondrial com maior variabilidade esperada (BOORE, 1999). Os primers utilizados para amplificação desta região estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - *Primers* utilizados para amplificação do DNA mitocondrial de *Hylodes fredi*, tamanho em pares de bases (pb), temperaturas de anelamento (Ta) utilizadas durante as reações de PCR e respectivas fontes bibliográficas.

Marcador/Primers	Sequência do Primer (5'-3')	pb	Ta (C°)	Fonte
ND2				
L4437	AAG CTT TCG GGC CCA TAC C	27	50	Macey et al., 1997
H5540	TTT AGG GCT TTG AAG GC	23	50	Macey et al., 1997

A região do *ND2* foi amplificada na Universidade Estadual Paulista de Rio Claro (UNESP Rio Claro), em parceria formada com pesquisadores do Laboratório de Herpetologia, do Instituto de Biociências. A PCR foi feita com o uso da Master Mix Ampliqon (Ampliqon A/S, Odense M, Denmark), com os ciclos seguindo as seguintes condições: 3 minutos de desnaturação inicial a 95ºC; 35 ciclos de desnaturação a 94ºC por 20 s, anelamento a 50°C por 20 s, e extensão a 60ºC por 1 min 30 s; seguidos por 3 minutos de extensão final a 60ºC. Os produtos foram preparados para sequenciamento através do seguinte protocolo de purificação: Mix de 0.5 unidades de Fosfatase Alcalina termo sensível (FastAP) e 1 unidade de

Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific Inc.) diluídos em 2.45 µl de água pura por PCR, incubados por 30 minutos a 37°C, seguidos por 5 min a 95°C (LYRA; HADDAD; AZEREDO-ESPIN, 2017). Os produtos da PCR purificados foram sequenciados com o kit de sequenciamento Big Dye Terminator 3.0 (Applied Biosytems) em um sequenciador ABI 3730 da Macrogen Inc (Seoul, Coréia do Sul).

Todos eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram editados inicialmente com o auxílio do programa ChromasPro v.2.1.8 (Technelysium Pyt Ltd.) e reunidos em um arquivo fasta editável no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). Os alinhamentos foram computados com o auxílio do MAFFT v.7. (KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). Fizemos um alinhamento de nucleotídeos no programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) com cada sequência para garantir que se estava trabalhando com a espécie de interesse.

2.2.4 Análises das sequências

2.2.4.1 Estatísticas descritivas e estruturação genética

Para realizar a descrição das estatísticas sumárias relacionadas ao polimorfismo das sequências, utilizamos o programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para visualizar a genealogia e estruturação dos haplótipos de *ND2*, calculamos redes de haplótipos pelo método da Parcimônia Estatística (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992) no programa TCS v.1.2.1 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) e Adesão Mediana (*Median-Joining*) (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999) no programa Network v.5 (Fluxus Technology Ltd.). Para melhor representação gráfica da rede de haplótipos, utilizamos o programa Haploviewer, que utiliza a topografia de árvores filogenéticas para estimar as genealogias de haplótipos. Estimamos a árvore, cuja topografia foi utilizada no Haploviewer, pelo método de *Maximum Likelihood* para representação das distâncias genéticas (distâncias *p*) no programa MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Para testar a estrutura genética tanto dos grupos observados a partir da rede de haplótipos quanto dos grupos hipotéticos com base nas vertentes e microbacias, utilizamos a

Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) no programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), usando 10,000 iterações. A AMOVA foi estruturada de três formas: i. definimos cada grupo encontrado na rede de haplótipos como uma população e avaliamos a hierarquia na variação entre eles; ii. definimos cada uma das quatro vertentes da ilha como uma população; iii. definimos cada uma das dez microbacias amostradas como uma população. Os valores de F_{ST} pareados gerados na AMOVA foram extraídos e transformados em um gráfico para melhor visualização de quais populações se diferenciam mais entre si, utilizando o programa RStudio 2021.09.01 (RSTUDIO TEAM, 2020).

2.2.4.2 História demográfica dos grupos

Para testar sinais históricos de expansão populacional em *H. fredi* e nos principais grupos encontrados a partir da rede de haplótipos, foram utilizados testes de neutralidade (FAHEY; RICKLEFS; DEWOODY, 2014) calculados no programa DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009). O primeiro conjunto de testes de neutralidade abrangeu: D de Tajima (TAJIMA, 1989), D* e F* de Fu e Li (FU; LI, 1993; FU, 1997), e R_2 (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002). Todos eles utilizam estatísticas de Classe I, e usam frequências de mutação e excessos de mutações raras para testar hipóteses demográficas. Em geral, populações em expansão apresentam mutações raras em excesso (FAHEY; RICKLEFS; DEWOODY, 2014). Além desses testes, foram gerados gráficos de *Mismatch Distribution* com base em um modelo nulo de expansão populacional (HARPENDING, 1994; SLATKIN; HUDSON, 1991), uma estatística de Classe III que mostra a distribuição do número observado das diferenças entre pares de sequências. O valor de SSD (soma do desvio dos quadrados) é usado para comparar o ajuste da distribuição *mismatch* esperada. Em geral, o gráfico da *Mismatch Distribution* apresenta um padrão multimodal em casos de estabilidade populacional histórica, e um padrão de distribuição unimodal em populações que passaram por um crescimento populacional recente (FAHEY; RICKLEFS; DEWOODY, 2014; ROGERS; HARPENDING, 1992).

Também foi realizada para todas as sequências e para cada um dos grupos principais, análise *Bayesian Skyline* Plot (BSP) usando o pacote BEAST (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007), que utiliza procedimentos de amostragem de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*)

para estimar uma distribuição a posteriori do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo. Essa amostragem é feita diretamente a partir das sequências de DNA, dado qualquer modelo de substituição nucleotídica (DRUMMOND et al., 2005). Nesse estudo, foi selecionado o modelo de substituição nucleotídica mais simples, Jukes-Cantor (JC69), e foi estabelecida uma taxa de mutação de 14.8×10^{-9} (CRAWFORD, 2003). As cadeias MCMC tiveram 100 milhões de iterações. O programa Tracer (RAMBAUT et al., 2018) foi usado para avaliar a convergência das análises MCMC, com valores do tamanho efetivo da amostra (ESS) maiores que 200.

2.2.4.3 Tamanhos efetivos populacionais e taxas de imigração

Por fim, foi usado o programa de inferência bayesiana Migrate-n v.4 (BEERLI; PALCZEWSKI, 2010), que permite usar dados de sequência e, baseado na teoria de coalescência (KINGMAN, 1982), estimar tamanhos efetivos populacionais e taxas de imigração históricas em cada grupo (SARAMASIN et al., 2017). O tamanho efetivo populacional (Ne) é o tamanho que a população ideal (*sensu* Wright-Fisher) teria que ter para sofrer a mesma quantidade de deriva gênica que a população sendo estudada (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013; WRIGHT, 1939). Uma população ideal consiste em: (1) ter uma mesma proporção entre machos e fêmeas, (2) todos os indivíduos terem a mesma probabilidade de contribuir com descendentes para a próxima geração, (3) ter tamanho populacional constante, (4) ter gerações discretas, que não se sobrepõem (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Em populações reais algumas dessas suposições podem ser violadas, e geralmente o tamanho efetivo é menor do que o da população censo. O Ne é um dos parâmetros mais importantes a serem estimados na biologia da conservação, visto que permite avaliar a viabilidade de populações na natureza.

As análises no Migrate-n foram rodadas usando uma taxa de mutação constante, o modelo de mutação JC69, o método *Slice Sampling* como proposta de distribuição dos parâmetros, uma cadeia MCMC de 10,000, e *burn-in* de 1,000. Os valores de ESS da corrida estavam todos na casa dos milhares. O programa Migrate-n permite estimar os valores dos parâmetros Θ e M, sendo que Θ representa o tamanho populacional efetivo escalonado pela taxa de mutação por geração, como mostrado a seguir:

$$\theta_i = xN_e\mu \quad (1)$$

onde x = 1 para dados de DNA mitocondrial. O parâmetro M representa a taxa de imigração por geração dividida pela taxa de mutação por geração usando a equação:

$$M_i = m/\mu \quad (2)$$

sendo que adotamos para o gene ND2 um μ igual a 14.8 x 10^{-9} (CRAWFORD, 2003). O parâmetro M é uma medida de quanto a imigração é mais importante do que a taxa de mutação para trazer novos variantes para a população (BEERLI, 2016). A partir dos parâmetros Θ e M, foi possível estimar o número de imigrantes por geração usando a equação:

$$N_m = \theta M \quad (3)$$

Estimamos também o tamanho efetivo populacional das fêmeas para cada grupo, usando a equação:

$$Nef = \theta/\mu \quad (4)$$

O grupo HF1 não foi levado em conta tanto nas análises de história demográfica, quanto nas de estimativa de taxas de imigração e tamanhos efetivos populacionais, visto que o grupo era composto de apenas uma amostra.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estatísticas Descritivas

Coletamos, amplificamos e sequenciamos um total de 66 amostras para o fragmento do gene mitocondrial *ND2*. As estatísticas descritivas foram calculadas e podem ser encontradas na Tabela 4. A descrição dos polimorfismos dentro de cada grupo (ver resultados da Figura 9 e Tabela 5) mostrou que apesar do grupo HF2 ter maior tamanho amostral (N=40) que o grupo HF3 (N=25), ambos apresentaram o mesmo número de haplótipos (h=13) (Tabela 5). Dos 27 haplótipos encontrados, um deles estava presente em 27 sequências, representando cerca de 40% de todos os indivíduos amostrados.

Tabela 4 – Estatísticas sumárias obtidas para todas as sequências do gene *ND2* e para os grupos HF2 e HF3 de *H. fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Fragmento	Tamanho (pb)	N	S	h	Hd (DP)	Π (DP)
ND2	955	66	44	27	0.876 (0.001)	0.0066 (0.000)
Grupo HF2	955	40	16	13	0.688 (0.079)	0.0015 (0.000)
Grupo HF3	955	25	15	13	0.920 (0.033)	0.0032 (0.000)

Legenda: N é o número de sequências, S é o número de sítios polimórficos, h é o número de haplótipos, Hd é a diversidade haplotípica, e Π é a diversidade nucleotídica. DP significa desvio padrão.

2.3.2 Estruturação Genética

As redes de haplótipos recuperaram estrutura genética para o *ND2*, indicando a existência de três haplogrupos denominados aqui de: HF1, HF2 e HF3 (Figura 9). A AMOVA realizada com esses três grupos mostrou uma maior fonte de variação entre os grupos (80.7%) do que dentro dos grupos (19.3%) ($P < 0.00$) (Tabela 5). Os valores de F_{ST} pareados também foram significativos e próximos a 1 quando considerados os três grupos (Figura 6). Todos

esses resultados deram suporte à estruturação encontrada na rede de haplótipos. Por outro lado, as AMOVAs separando as sequências por microbacias e por vertentes da ilha mostraram uma maior fonte de variação dentro dos grupos do que entre grupos (P < 0.00), indicando uma ausência de estruturação genética relacionada a esses fatores geográficos (Tabela 5 e Figuras 7 e 8).

Tabela 5 - Análises de variância molecular (AMOVA) entre (A) os grupos definidos pela rede de haplótipos, (B) as quatro vertentes da ilha, e (C) as dez microbacias amostradas na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro

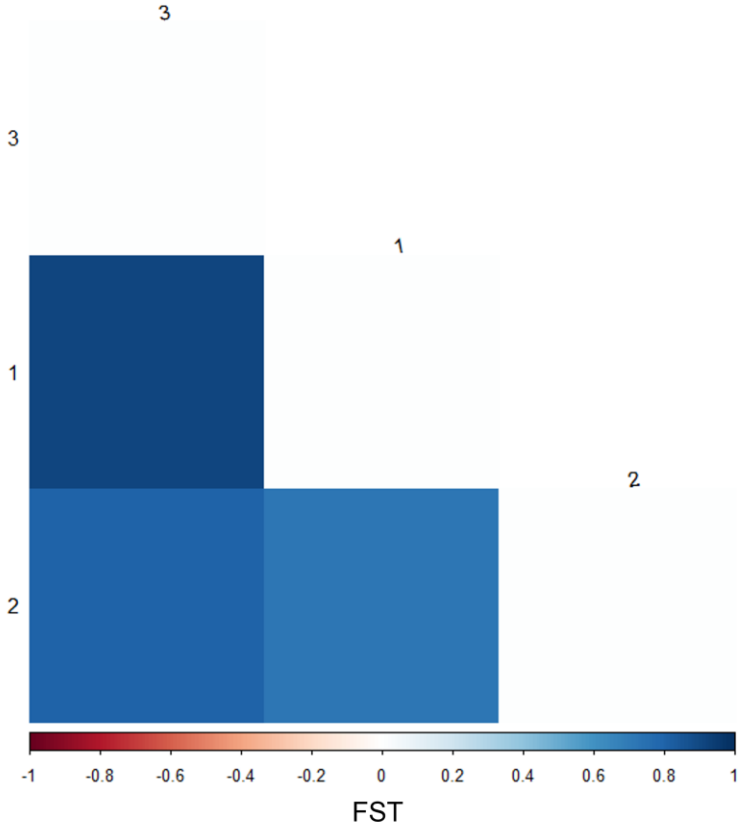
(A) Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os grupos da rede de haplótipos				
Fonte de variação	GL	SQ	CV	Variação (%)
Entre grupos	2	140.73	4.297 Va	80.69
Dentro dos grupos	63	64.78	1.028 Vb	19.31
Total	65	205.51	5.325	
F (Índice de fixação)	F_{ST}: 0.806		*P*-valor = 0.000	

(B) Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as vertentes da ilha				
Fonte de variação	GL	SQ	CV	Variação (%)
Entre grupos	3	49.48	0.899 Va	26.32
Dentro dos grupos	62	156.03	2.516 Vb	73.68
Total	65	205.51	3.415	
F (Índice de fixação)	F_{ST}: 0.263		*P*-valor = 0.000	

(C) Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as microbacias				
Fonte de variação	GL	SQ	CV	Variação (%)
Entre grupos	9	89.86	1.228 Va	37.31
Dentro dos grupos	56	115.51	2.065 Vb	62.69
Total	65	205.51	3.294	
F (Índice de fixação)	F_{ST}: 0.373		*P*-valor = 0.000	

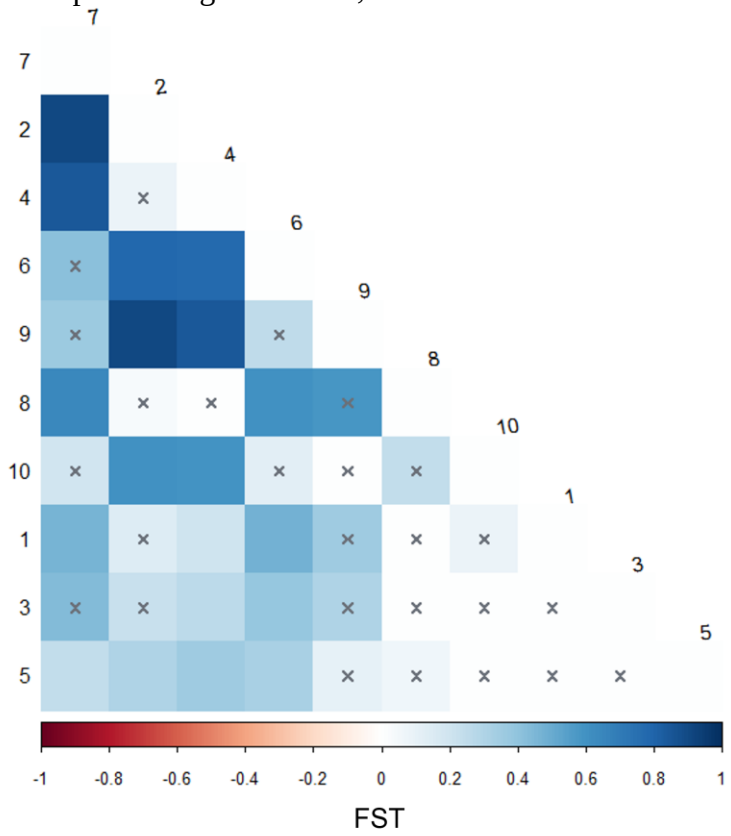
Legenda: GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; CV = componentes e variância.

Figura 6 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre os três grandes grupos de haplótipos encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro



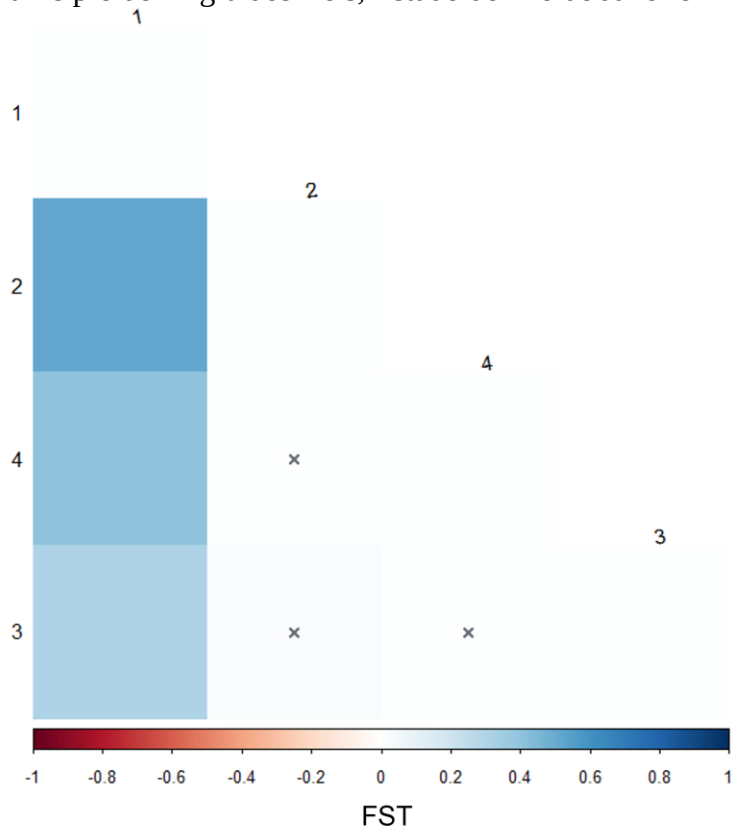
Legenda: 1=HF2, 2=HF3, 3=HF1. Todos os valores foram estatisticamente significativos.

Figura 7 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre as dez microbacias amostradas da Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro



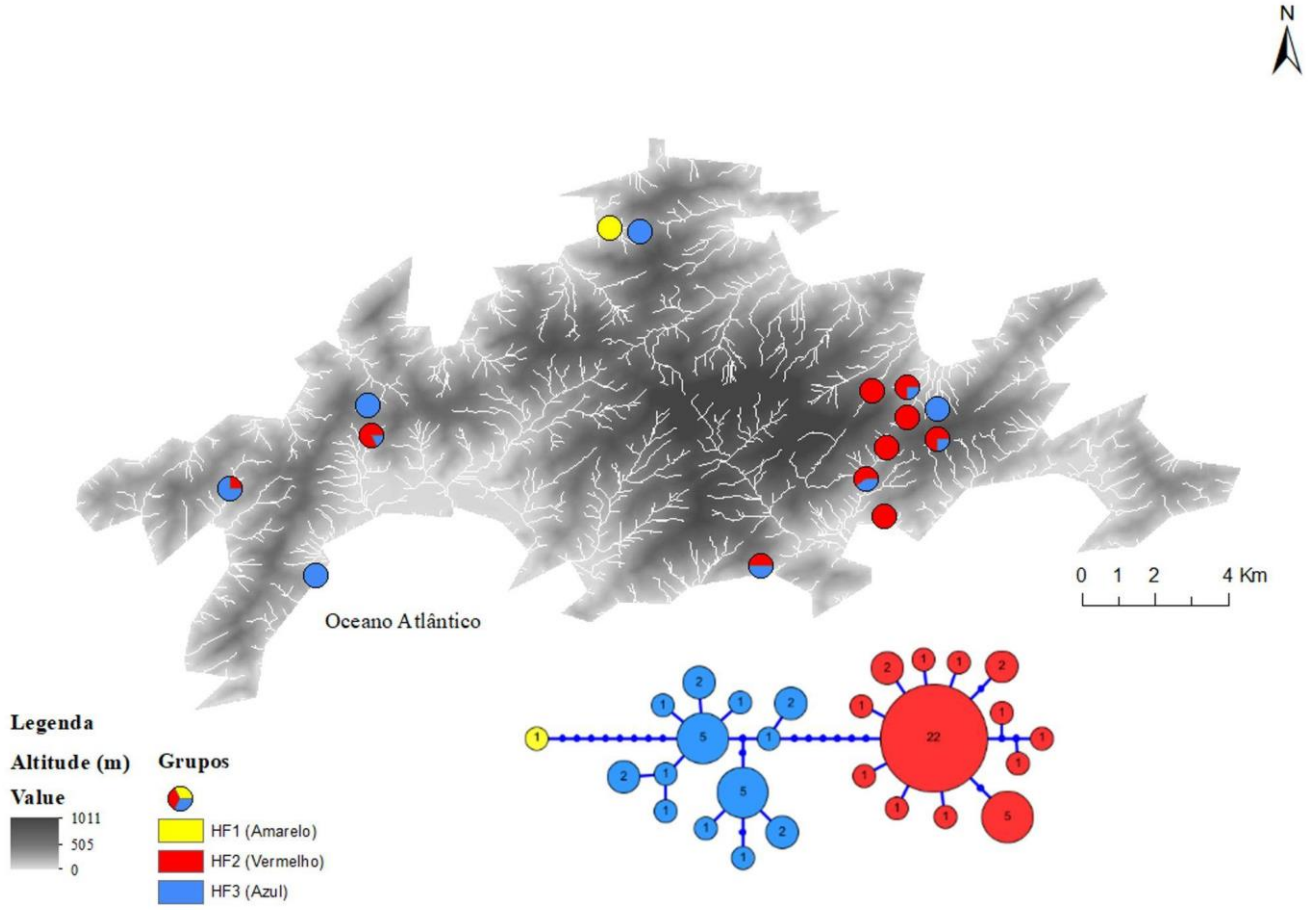
Legenda: 1=ECs, 2=PP, 3=EOs, 4=CAX, 5=PAR, 6=BAN, 7=LON, 8=PSUL, 9=AV, 10=ARA. O “x” indica valores de F_{ST} não significativos.

Figura 8 - Valores dos índices de fixação F_{ST} pareados entre as quatro vertentes amostradas da Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro



Legenda: 1=NW, 2=NE, 3=SW, 4=SE. O “x” indica valores de F_{ST} não significativos.

Figura 9 – Distribuição geográfica dos três grupos genéticos, com a respectiva rede de haplótipos, identificados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, localizada no município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro



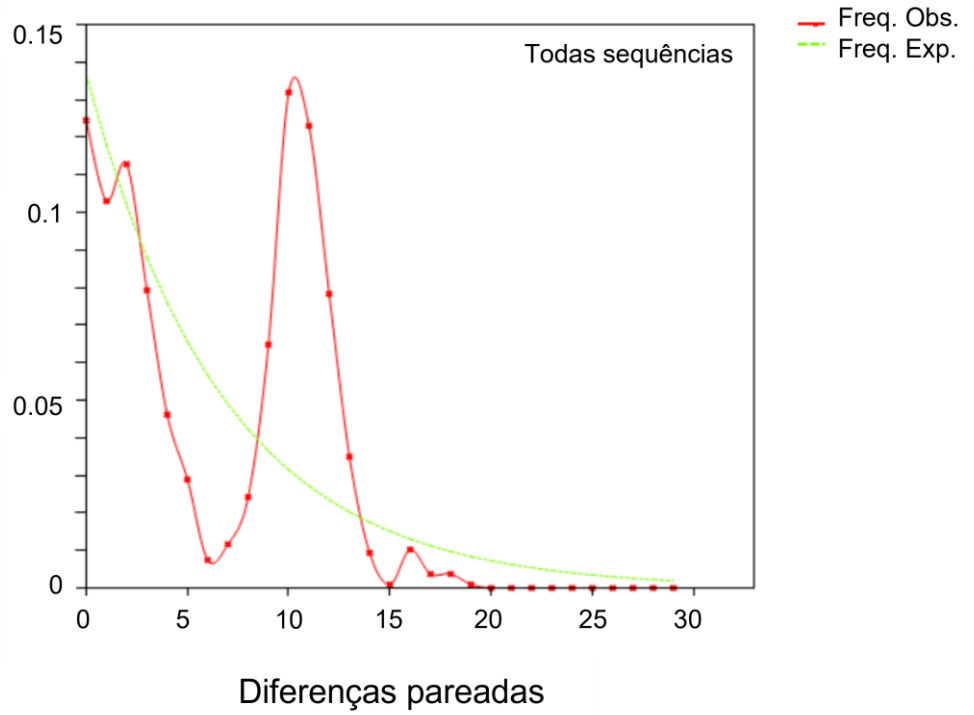
Legenda: A rede de haplótipos gerada no programa HaploViewer também pode ser visualizada: cada círculo representa um haplótipo; os números em cada círculo representam o número de vezes que o haplótipos foi amostrado; o tamanho do círculo representa a frequência proporcional ao número total de haplótipos em escala logarítmica; e cada ponto entre as linhas representa um passo mutacional.
Fonte: A autora, 2022

2.3.3 História demográfica dos grupos

Dentre os testes de neutralidade realizados com todas as 66 sequências do marcador *ND2*, apenas o D* de Fu e Li foi significativo ($P < 0.05$) (Tabela 6). Os testes de neutralidade também foram calculados para os grupos HF2 e HF3. Para ambos os grupos, os valores de D de Tajima, F* e D* de Fu e Li foram negativos, e os valores de R_2 foram próximos a zero (Tabela 6), sinalizando uma possível expansão após uma contração populacional. Porém,

apenas o HF2 apresentou valores de D de Tajima e de R_2 estatisticamente significativos (P<0.05) (Tabela 6). Os gráficos de *Mismatch Distribution* estão contidos na Figura 10.

Figura 10 – Gráficos da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças pareadas entre todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 do gene *ND2* de *Hylodes fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro (continua)



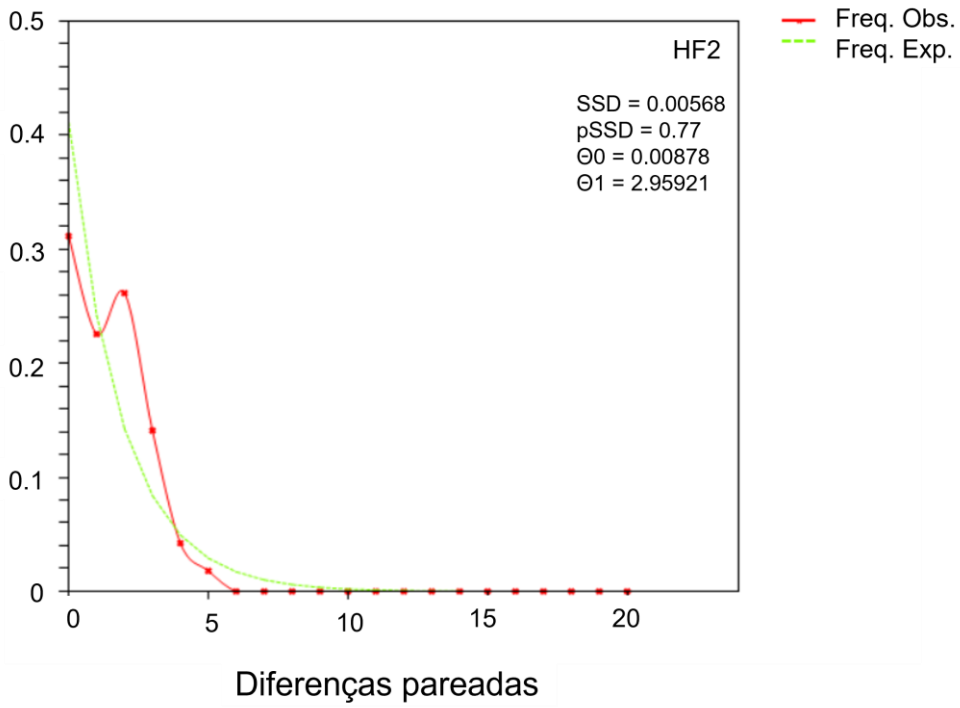
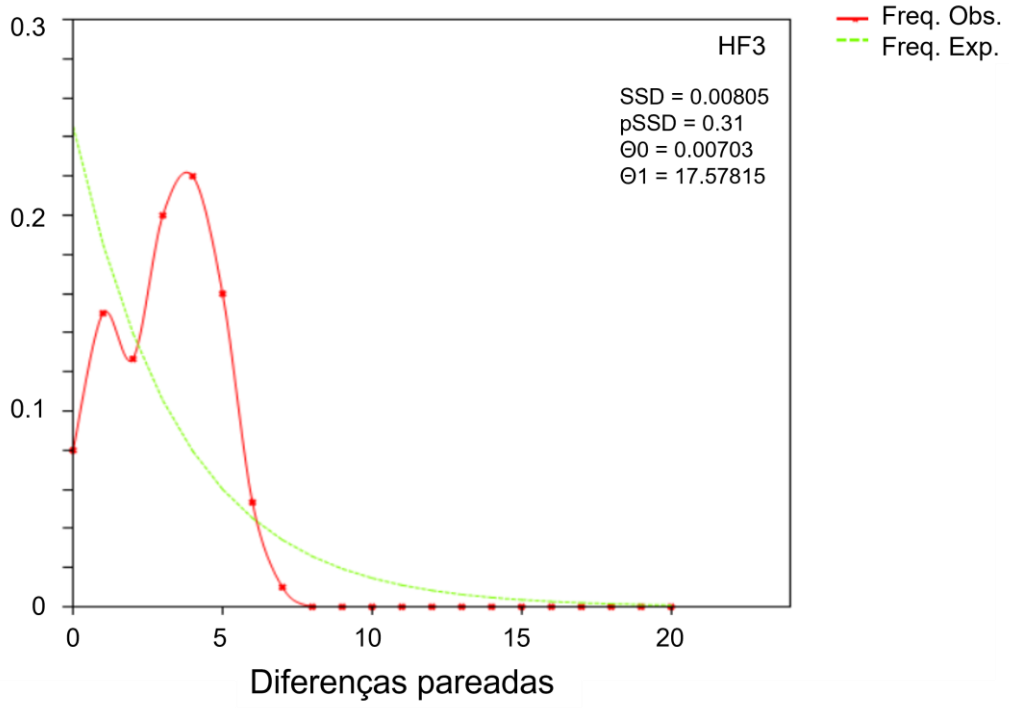


Figura 10 – Gráficos da análise de *Mismatch Distribution* de diferenças pareadas entre todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 do gene *ND2* de *Hylodes fredi* na Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro (conclusão)



Legenda: O eixo x indica o número de diferenças pareadas entre as sequências comparadas. O eixo y mostra as frequências de cada valor. O gráfico em vermelho mostra a frequência observada de diferenças par a par entre as sequências, e a linhas em verde mostra a frequência esperada sob o modelo de expansão populacional. SSD: teste do desvio da soma dos quadrados (*Sum Squared Deviation*); Θ0 = tamanho populacional antes da expansão; Θ1 = tamanho populacional após a expansão.

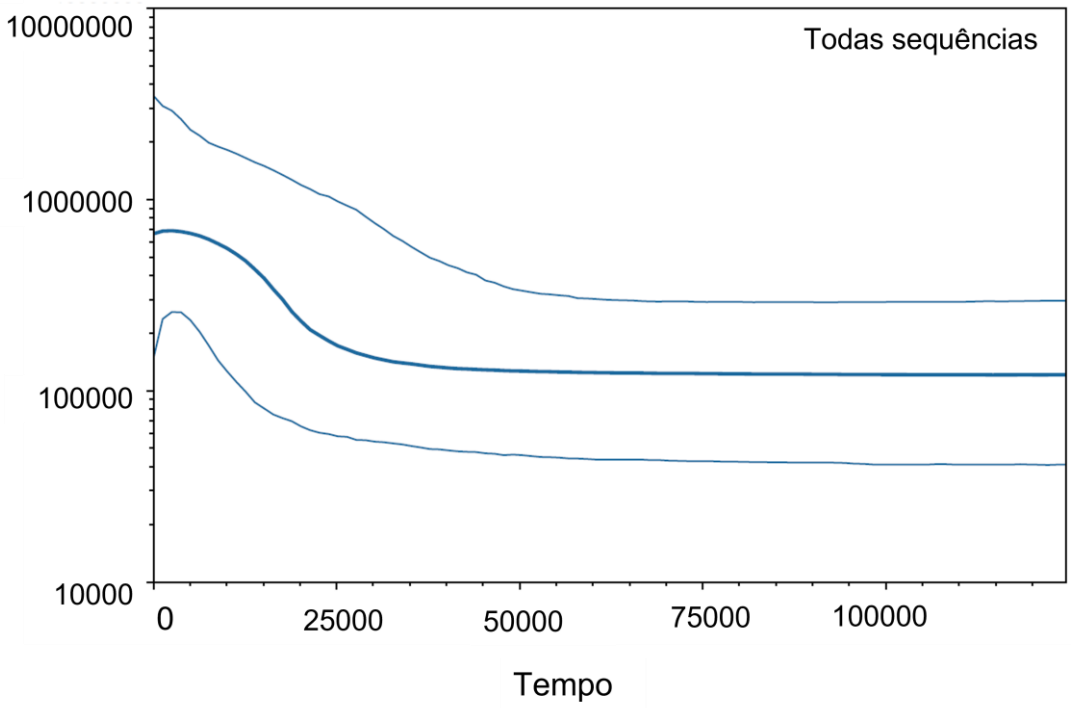
Os resultados da análise de *Bayesian Skyline Plot* de todas as sequências e dos grupos HF2 e HF3 estão representados na Figura 11. Em todos os gráficos de BSP é possível notar que houve um aumento no tamanho populacional efetivo, sendo esse padrão mais fortemente identificado no grupo HF3.

Tabela 6 - Testes de Neutralidade feitos com todas as sequências e com os grupos HF2 e HF3 encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro

Testes de Neutralidade				
Grupos	Tajima's D	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	R_2
Todas sequências	-1.04392	-2,49800 *	-2,32732	0,0689
Grupo vermelho (HF2)	-1.99295 *	-2.11136	-2.28888	0.0403*
Grupo azul (HF3)	-0.79253	-0.68905	-0.77664	0.0929

Legenda: Os valores com * apresentaram um *p*-valor < 0.05

Figura 11 – *Bayesian Skyline Plot* estimado no programa BEAST para todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro (continua)



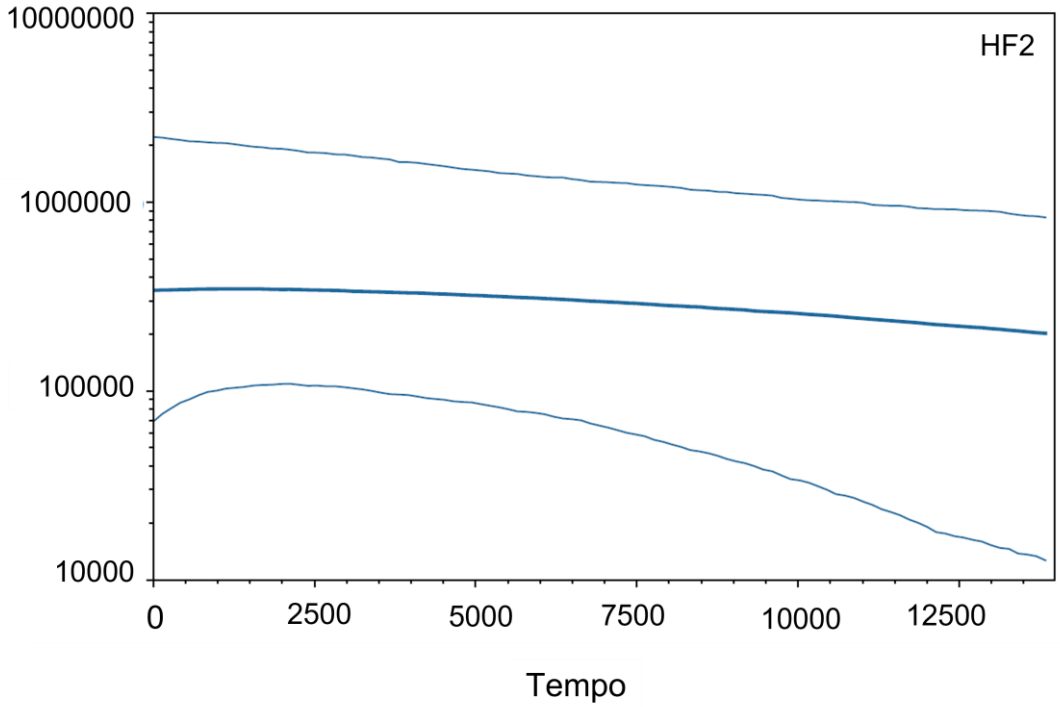
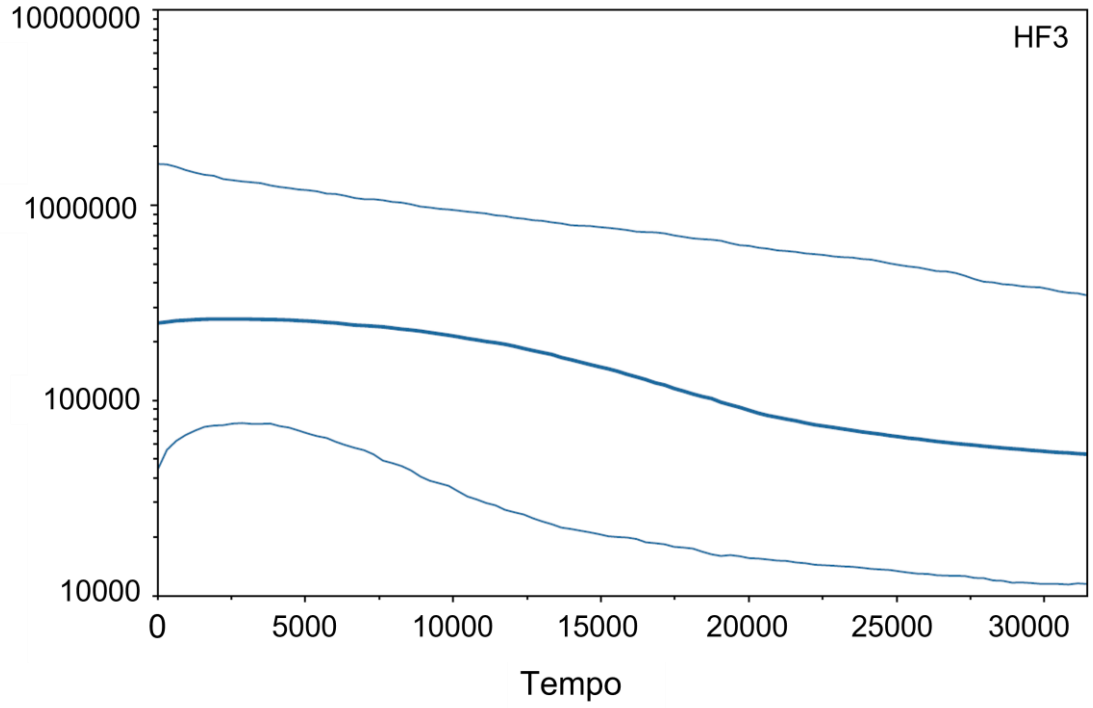


Figura 11 – *Bayesian Skyline Plot* estimado no programa BEAST para todas as sequências e os grupos HF2 e HF3 encontrados para o gene *ND2* em *Hylodes fredi* na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro (conclusão)



Legenda: O eixo x indica tempo (anos), e o eixo y indica o tamanho populacional efetivo (Nef) de cada grupo. A estimativa média e ambos os limites HPD (maiores densidades posteriores) de 95% aparecem nos gráficos. A escala temporal está diferente em cada gráfico.

2.3.4 Tamanhos efetivos populacionais e taxas de imigração

O valor médio do tamanho populacional efetivo Θ foi maior para o grupo HF2 (Θ=0.00616) do que para o grupo HF3 (Θ=0.00483) e as taxas de imigração M em HF2 ($M_{2\rightarrow1}$) e HF3 ($M_{1\rightarrow2}$) foram de 130.8 e 140.1, respectivamente. Com esses valores foi possível estimar o tamanho populacional efetivo das fêmeas (Nef) e o número de imigrantes por geração. O tamanho populacional efetivo das fêmeas estimado para grupo HF2 (Nef = 416,216 indivíduos) foi maior em comparação ao estimado para o grupo HF3 (Nef = 326,351 indivíduos), e o número de imigrantes estimado por geração também foi maior em HF2 (0.863) do que em HF3 (0.628).

2.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de genética populacional para o anuro *Hylodes fredi*, endêmico da Ilha Grande. Encontramos um forte sinal de estruturação genética para o gene mitocondrial *ND2*, não sendo correspondente às microbacias ou vertentes de drenagem da ilha.

2.4.1 Polimorfismos

Apesar de *Hylodes fredi* ser uma espécie endêmica da Ilha Grande e com restrita área de ocupação, os resultados dos polimorfismos sumários mostraram que a espécie apresenta uma variação genética relativamente alta dentro da ilha. O gene *ND2* apresentou uma alta diversidade haplotípica (0.876) e baixa diversidade nucleotídica (0.0066), com valores parecidos com encontrados em outros estudos que utilizaram DNA mitocondrial em anfíbios (YAN et al., 2013, *Cytb* com Hd = 0.9821 e π = 0.0406; HUANG et al., 2017, *Cytb* com Hd = 0.861 e π = 0.0242; PEERACHIDACHO; POMCHOTE; TANDAVANITJ, 2021, *ND2* com Hd = 0,7714 e 0.6538, π = 0.001785 e 0.0007). Segundo Peerachidacho et al. (2021), o padrão encontrado de alta diversidade de haplótipos e baixa diversidade de nucleotídeos pode sugerir uma pequena população que possivelmente passou por um crescimento populacional num período curto, no qual foi permitido o aparecimento de mutações que gerassem diferenciação genética, mas que não foi tempo suficiente para acumular diferenças nos nucleotídeos (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2009). Essa explicação é coerente com os resultados dos testes de neutralidade e análise *Bayesian Skyline Plot*, que indicaram um processo de expansão populacional dentro da espécie.

2.4.2 Estruturação populacional

A rede de haplótipos indicou um claro sinal de estruturação genética em *Hylodes fredi*, que está dividido em três haplogrupos. Porém, diferente da nossa hipótese inicial, tanto a rede de haplótipos, quanto as Análises de Variância Molecular indicaram que essa estruturação no *ND2* não pode ser explicada por uma restrição à dispersão e ao fluxo gênico causados pelas microbacias ou vertentes. Essa falta de coerência geográfica associada à estrutura genética encontrada pode ter algumas explicações. A primeira é que as microbacias e as vertentes da ilha não atuam como barreiras à dispersão e ao fluxo gênico. Sabe-se que não é necessário haver muita troca de genes para causar mistura entre populações, inclusive seria preciso de apenas um migrante por geração para evitar os efeitos deletérios da deriva gênica (MILLS; ALLENDORF, 1996; FRANKHAM; BALLOU; BRISCO, 2010). Então, por mais que os indivíduos de *H. fredi* possuam uma ocorrência fortemente associada aos riachos onde ocupam, havendo poucos indivíduos se movimentando nas regiões de mata afastada dos córregos (ver Capítulo 1; FLYNN, 2022), é possível que os poucos indivíduos que de fato se deslocam para longe do riacho (provavelmente as fêmeas e os juvenis), dispersem para outras microbacias e vertentes, possibilitando o fluxo gênico entre as populações de cada localidade.

Outras espécies de anuro ripárias apresentam conectividade entre bacias hidrográficas: um estudo de fluxo gênico entre subpopulações de *Centrolene prosoblepon* encontrou que a espécie é capaz de se deslocar longas distâncias e em direção montante dentro do rio, e que há conexão entre populações de bacias hidrográficas adjacentes (ROBERTSON; LIPS; HEIST, 2008). As autoras discutem que o resultado encontrado também sugere a possibilidade de deslocamento terrestre dos indivíduos (ROBERTSON; LIPS; HEIST, 2008). Um outro possível fator promovendo fluxo gênico em anuros reofílicos seria a ocorrência de grandes torrentes e trombas d'água durante a estação chuvosa, que podem promover uma movimentação rio abaixo não intencional de adultos e principalmente girinos dentro de uma mesma bacia hidrográfica.

A hipótese de que as vertentes da Ilha Grande poderiam atuar como reforço do isolamento nas microbacias partia da premissa que a altitude, correlacionada com variáveis como temperatura e umidade, serviria como barreira ao fluxo gênico (FUNK et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2015). Mas, por mais que existam dois grandes picos topográficos (Pico do Papagaio e Pedra d'Água), a maior parte da ilha se encontra em altitudes até 500 metros, que talvez não seja alto o suficiente para impedir a dispersão dos indivíduos entre as

vertentes. Além disso, alguns estudos indicam que além da elevação, a complexidade topográfica é um fator importante na determinação da diversidade genética e estrutura filogeográfica em espécies de anfíbios (NALI et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 2015). Nesse sentido, é possível que a topografia da Ilha Grande não apresente alto grau de complexidade, porém são necessários outros tipos de análise para poder explorar a possibilidade de isolamento por resistência (MCRAE, 2006).

A Ilha Grande possui uma ampla rede de drenagem, havendo rios de diferentes ordens, que aumentam ainda mais de número durante a estação chuvosa quando riachos temporários são formados. Então, outra possível explicação para o resultado encontrado é que apesar da espécie ter sua ocupação restrita aos córregos e às áreas de mata próximas a eles, a existência de muitos riachos distribuídos na ilha pode facilitar a dispersão dos indivíduos entre diferentes áreas, pois confere a umidade e temperatura necessárias para o metabolismo dos indivíduos (CAYUELA et al., 2018). Um estudo realizado com o anuro *Eleutherodactylus cooki* discute a existência de um alto fluxo gênico mediado pela hidrologia. Os autores mencionam a existência de riachos subterrâneos, que formam túneis que podem fornecer proteção, alimento, umidade e uma rota dispersiva para juvenis (BURROWES; JOGLAR, 1999). Sabemos que na Ilha Grande também existem esses canais subterrâneos, pois é muito comum encontrar pontos sem água correndo onde é possível ouvir indivíduos de *H. fredi* vocalizando. Portanto, não se pode descartar a opção desses túneis subterrâneos também servirem como canais de comunicação entre as diferentes microbacias.

Uma explicação alternativa é a de que não houve tempo suficiente para as populações de cada microbacia e vertente se diferenciarem geneticamente ao ponto de apresentarem uma estrutura nos genes mitocondriais marcada pela atual geografia.

Mesmo os resultados indicando a ausência de estrutura genética populacional associada às microbacias ou às vertentes, a rede de haplótipos mostrou uma clara estruturação de *H. fredi* na Ilha Grande em três principais grupos (aqui chamados de HF1, HF2 e HF3), que foi suportada pela AMOVA. O gráfico mostrando os valores de F_{st} entre as microbacias (Figura 6) indica que a vertente noroeste (NW), composta pelas localidades Praia Longa, Araçatiba e Bananal, é a mais geneticamente distinta para o gene *ND2* em *H. fredi*. Também, é a vertente que apresenta menor predominância do grupo de haplótipos HF2 (Figura 9). Esses resultados indicam que possivelmente o lado NW configure uma barreira mais forte ao fluxo gênico comparado às outras três vertentes, mas infelizmente não foram encontrados outros estudos de genética populacional na Ilha Grande para fins comparativos.

2.4.3 História Demográfica e Expansão Populacional

Os resultados dos testes de neutralidade mostraram que apenas o grupo HF2 teve valores significativos de Tajima D negativo e R_2 próximo a zero. Isso ocorre quando a maioria dos indivíduos são idênticos geneticamente, e aqueles que não são, se diferenciam por apenas um sítio polimórfico. Esse padrão é indicativo de uma recente expansão populacional, que estaria de acordo com a rede de haplótipos, onde o grupo HF2 apresenta um formato de estrela. O haplótipo mais frequente também pertence ao grupo HF2 (vermelho), e ele pode representar um haplótipo ancestral, enquanto os demais haplótipos são variações mais recentes deste.

O gráfico de *Mismatch Distribution* também indicou um sinal de expansão populacional dentro dos grupos HF2 e HF3, assim como as análises de BSP. Porém esta última análise indicou para um maior sinal de expansão em HF3 em relação à HF2. Essa falta de concordância entre os testes de neutralidade e o gráfico BSP pode se dar por alguns motivos: o tamanho amostral de cada grupo pode não ter sido grande o suficiente para os testes detectarem um sinal de expansão populacional; foi utilizado apenas um loci para explorar as histórias demográficas e isso pode afetar a análise BSP (DRUMMOND et al., 2005).

De forma geral, há sinal de expansão populacional de *H. fredi* na Ilha Grande. Provavelmente, *H. fredi* pertencia antes a uma espécie ancestral de *Hylodes* também distribuída no continente, mas com as oscilações no nível do mar nos últimos 420 mil anos, algumas populações foram ficando isoladas na área da atual Ilha Grande, e com o tempo se diferenciaram formando uma nova espécie. Por mais que se estime que a Ilha Grande se isolou completamente do continente apenas entre 6,500 e 7,000 anos atrás (SUGUIO et al., 2018), existe a possibilidade de o processo de diferenciação das populações ser pretérito a isso. Estudos com Jararacas (gênero *Bothrops*) sugerem que o processo de insularização dessas espécies na costa do sudeste brasileiro tenha sido um processo dinâmico e contínuo, com pelo menos seis grandes períodos de conexão e desconexão entre as ilhas e o continente devido às oscilações eustáticas durante o final do Pleistoceno e início do Holoceno (aproximadamente 11.650 anos atrás) (BARBO et al., 2022; GRAZZIOTIN et al., 2006). Portanto, pode ter ocorrido um efeito fundador na Ilha Grande, onde alguns indivíduos representantes de uma espécie ancestral formaram uma nova população com menor diversidade genética em comparação com a população parental (ALLENDORF; LUIKART;

AITKEN, 2013; MAYR, 1942). Essa população fundadora que perdeu variação genética, pode posteriormente ter passado por um processo de expansão populacional recente, que explicaria o valor de D de Tajima negativo e os outros testes de história demográfica.

2.4.4 Tamanhos Efetivos Populacionais e Imigração

Os resultados obtidos através do programa Migrate-n sugerem que as populações não estão isoladas, havendo troca de genes entre os grupos HF2 e HF3. As estimativas de número de imigrantes por geração indicaram que o grupo HF2 recebe mais imigrantes vindos de HF3, do que o contrário. Em geral, considera-se que a migração de dez ou mais indivíduos por geração seja o suficiente para homogeneizar o pool gênico, impossibilitando a detecção de divergência genética entre populações (MILLS; ALLENDORF, 1996). Os tamanhos populacionais efetivos das fêmeas estimados (HF2 com Nef = 416,216 e HF3 com Nef = 326,351) não destoaram dos valores encontrados em outros estudos que também usaram o Migrate-n para estimar Nef a partir de sequências de *ND2*. Um estudo usando 192 sequência de *ND2* do anuro *Feirana taihangnica*, endêmica às montanhas Qinling na Ásia, encontrou um Nef total de 779,487 (WANG et al., 2013). Usando 224 sequências de *ND2* de *Feirana quadranus*, Wang et al., (2012) encontraram um Nef total de 2,043,076 utilizando uma taxa de mutação igual a 1.625E-8 (0.65E-8 * 2.5). Já, Carstens (2004) obteve valores de Θ para a salamandra *Dicamptodon aterrimus* próximos aos nossos (0.00604 e 0.0032), e então, estimaram um tamanho efetivo de 30,200 e 16,000 indivíduos para cada população estudada.

Ao comparar valores de Ne, é importante considerar a taxa de mutação utilizada: por não haver uma taxa de mutação do gene *ND2* específica para *Hylodes fredi* disponível, usamos uma taxa baseada em sequências de três espécies do gênero *Eleutherodactylus* presente no artigo de Crawford (2003). Porém, as taxas de mutação podem variar muito entre espécies de anfíbios (CRAWFORD, 2003). Portanto, é necessário interpretar os valores de Nef estimados aqui com cautela, e analisá-los de forma mais comparativa em vez de em números absolutos. Nesse sentido, é importante também reiterar que o programa Migrate-n estima tamanhos populacionais efetivos históricos e que os números obtidos aqui não revelam o tamanho da população consenso atual (SARAMASIN et al., 2017; SMITH; WAYNE, 1996). Apesar de todos cuidados que devem ser tomados ao interpretar os valores de Nef

estimados, os resultados são indicativos de que os grupos genéticos HF2 e HF3 encontrados na ilha apresentam uma considerável variabilidade genética.

2.4.5 Limitações do estudo e orientações futuras

A principal limitação do presente estudo é em relação ao tipo de marcador genético utilizado. As análises de genética populacional foram feitas com base somente em um fragmento de gene mitocondrial. Além disso, é importante levar em consideração que o DNA mitocondrial possui herança matrilinear, então conta apenas a história evolutiva das fêmeas (AVISE, 2009; AVISE et al., 1987; BRITO; EDWARDS, 2009; EDWARDS et al., 2016). Isso pode ser problemático principalmente em espécies que apresentam dispersão enviesada entre sexos. No caso de *H. fredi*, acredita-se que as fêmeas sejam as principais responsáveis por mediar a troca de genes, visto que os machos apresentam comportamento fortemente territorial (CAYUELA et al., 2018; HATANO; ROCHA; SLUYS, 2002). Além disso, marcadores mitocondriais mesmo possuindo taxas mais elevadas que muitos marcadores nucleares, ainda assim não são ideais para explorar processos genéticos mais recentes (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013; SCHLÖTTERER, 2004). Estudos de genética populacional que utilizam tanto marcadores mitocondriais quanto nucleares podem encontrar resultados discordantes, porém complementares (LUCATI et al., 2020). Portanto, para estudos futuros será importante utilizar marcadores nucleares que possam contar também a história evolutiva dos machos, e marcadores como microssatélites e SNPs que possam capturar melhor a variação existente dentro da espécie, e gerar informações mais contemporâneas relacionadas às barreiras ao fluxo gênico e à conectividade entre populações numa escala mais fina (ALLENTOFT; O'BRIEN, 2010; JEHLE; ARNTZEN, 2002).

Outra limitação do estudo é em relação à amostragem, que foi feita baseada na conhecida distribuição da espécie na ilha. Se observarmos o mapa com os pontos de coleta e o mapa no qual ele foi baseado, de Motta-Tavares et al. (2019), há uma porção da Ilha Grande que ainda não foi amostrada para a ocorrência de *H. fredi* e que poderia conter córregos com ocorrência deste anuro. Estudos futuros devem considerar explorar essas outras porções da IG, pois existe a possibilidade de haver outras populações e que não se tenha amostrado todos os grupos genéticos existentes na ilha.

O grupo HF1 (amarelo) também requer um cuidado específico ao ser analisado. O haplótipo desse grupo foi encontrado em um único indivíduo em um córrego na trilha do Bananal (ponto BAN1). Esse haplótipo não foi encontrado em nenhum outro ponto amostrado, nem mesmo no ponto BAN2 que fica poucos metros acima. É importante aumentar o tamanho amostral nesse ponto para poder analisar que haplótipos os outros indivíduos dessa localidade apresentam e poder melhorar a compreensão sobre o grupo HF1 definido neste estudo.

Existem diferentes formas de se acessar informações de tamanho populacional e fluxo gênico numa espécie. Aqui foram utilizados dados genéticos para estimar os tamanhos populacionais efetivos e o fluxo gênico para *Hylodes fredi*. Marcadores moleculares possibilitam investigar a história evolutiva de longo prazo e de fluxo gênico histórico dentro da espécie, porém seria interessante agregar essa informação realizando uma abordagem voltada para a área de Ecologia de Populações, com dados de campo de captura, marcação e recaptura para poder investigar padrões de deslocamento individuais em uma janela mais curta do tempo (ROBERTSON; LIPS; HEIST, 2008).

2.4.6 Conservação de *H. fredi* na Ilha Grande

As principais preocupações de conservação com espécies endêmicas com área efetiva de ocupação limitada são geralmente relacionadas aos efeitos do endocruzamento e da deriva gênica sobre pequenas populações. Mesmo *H. fredi* apresentando todas essas características, a espécie parece apresentar, com base no fragmento de gene mitocondrial estudado, grande variabilidade genética expressa tanto em diversidade genética (Hd) quanto nos valores de tamanho populacional efetivo. Mesmo com essa variabilidade genética, foram encontrados dentro da espécie três grupamentos genéticos distintos, que podem significar Unidades Evolutivas Significativas (*ESUs*) para a conservação. Cada grupo deve ser analisado cuidadosamente e suas distribuições geográficas devem ser mais bem compreendidas em estudos futuros. O grupamento HF1 merece atenção especial, pois parece ser raro na IG.

Atualmente, a Ilha Grande possui quatro Unidades de Conservação (UCs): o Parque Estadual Marinho do Aventureiro, o Parque Estadual da Ilha Grande, a Área de Proteção Ambiental de Tamoios (APA Tamoios) e a Reserva Biológica da Praia do Sul, que pode apenas ser acessada por pesquisadores e por funcionários do Inea. Felizmente, essas UCs

protegem a maior parte da área florestada da IG, onde são localizados os córregos com ocorrência de *H. fredi.*

Considerando as projeções de cenários futuros de aquecimento global, e as decorrentes mudanças nos padrões de precipitação na Mata Atlântica (IPCC, 2021), é importante que não se relaxem os esforços de conservação para *H. fredi* apenas por esse estudo não ter apresentado preocupantes níveis de diversidade genética na espécie (ver subsecção 2.5.5 de Limitações do estudo e orientações futuras). É essencial que as UCs da Ilha Grande sejam apropriadamente manejadas e monitoradas para continuar garantido a viabilidade da espécie no futuro.

CONCLUSÕES GERAIS

Na presente dissertação foi realizada o primeiro estudo de modelagem de ocupação, e de genética populacional com uma espécie de *Hylodes.* Os resultados do primeiro capítulo indicaram que a ocupação em fina escala de *H. fredi* é afetada positivamente pela presença de pedras, e negativamente pela presença de folhiço, e que a detectabilidade diminui com o aumento de folhiço e é afetada pela temperatura do ar. No segundo capítulo, foi encontrado uma alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica para o gene mitocondrial *ND2*. Os dados apontaram para uma estruturação genética em três haplogrupos, mas que não refletiram os aspectos geográficos da ilha, como as microbacias e as vertentes. Seria interessante e importante pesquisas futuras explorarem o deslocamento por fêmeas e juvenis de *H. fredi*, visto que eles são os possíveis responsáveis por mediar a troca de genes entre as populações. Também, próximos estudos devem incluir marcadores moleculares de herança biparental, e que consigam captar melhor a história evolutiva mais recente dentro da espécie.

REFERÊNCIAS

ALHO, C. J. R.; SCHNEIDER, M.; VASCONCELLOS, L. A. Degree of threat to the biological diversity in the Ilha Grande State Park (RJ) and guidelines for conservation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 375–385, 2002.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.; AITKEN, S. N. **Conservation and the Genetics of Populations**. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2013.

ALLENTOFT, M. E.; O'BRIEN, J.. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A review. **Diversity**, v. 2, p. 47–71, 2010.

ALMEIDA-GOMES, M.; ROCHA, C.F.D.; VIEIRA, M.V.. Anuran community composition along two large rivers in a tropical disturbed landscape. **Zoologia**, v. 32, n. 1, p. 9–13, 2015.

ALMEIDA-GOMES, M. et al. Diet and microhabitat use by two Hylodinae species (Anura, Cycloramphidae) living in sympatry and syntopy in a Brazilian Atlantic Rainforest area. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 97, n. 1, p. 27–30, 2007.

ALMEIDA-GOMES, M.; LORINI, M.L.; ROCHA, C.F.D.; VIEIRA, M.V.. Underestimation of Extinction Threat to Stream-Dwelling Amphibians due to Lack of Consideration of Narrow Area of Occupancy. **Conservation Biology**, v. 28, n. 2, p. 616–619, 2014.

ALMEIDA-GOMES, M.; ROCHA, C.F.D. Landscape connectivity may explain anuran species distribution in an Atlantic forest fragmented area. **Landscape Ecology**, *[S. l.]*, v. 29, n. 1, p. 29–40, 2014.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Research Tool. **Journal of Molecular Biology**, 1990.

AVISE, J.C. Phylogeography : retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3–15, 2009.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific Phylogeography : The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489–522, 1987.

BAGUETTE, M.; BENTON, T.G.; BULLOCK, J.M. **Dispersal Ecology and Evolution**. 1st ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2012.

BALL, S.E. et al. Islands within an island: Population genetic structure of the endemic Sardinian newt, *Euproctus platycephalus*. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1190–1211, 2017.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A.. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BARBO, F.E.; BOOKER, W.W.; DUARTE, M.R.; CHALUPPE, B.; PORTES-JUNIOR, J.

A.; FRANCO, F.L.; GRAZZIOTIN, F.G. Speciation process on Brazilian continental islands, with the description of a new insular lancehead of the genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). **Systematics and Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. 1–25, 2022.

BARROW, L.N.; MASIERO DA FONSECA, E.; THOMPSON, C.E.P.; CARSTENS, B.C. Predicting amphibian intraspecific diversity with machine learning: Challenges and prospects for integrating traits, geography, and genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 8, p. 2818–2831, 2021.

BASTOS, M.; CALLADO, C.H. **O ambiente da Ilha Grande**. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, 2009.

BEEBEE, T. J. C. Conservation genetics of amphibians. **Heredity**, v. 95, p. 423–427, 2005.

BEERLI, P. **Migrate Documentation.** Tallahassee, 2016. Disponível em: < https://peterbeerli.com/migrate/download_version4/migratedoc4.x.pdf>

BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, v. 185, n. 1, p. 313–326, 2010.

BERGALLO, H.G.; FIDALGO, E. C.; ROCHA, C. F. D.; UZÊDA, M. C.; COSTA, M. B.; ALVES, M.A.S.; VAN SLUYS, M.; SANTOS, M. A.; COZZOLINO, A. C. R. **Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto Biomas, 2009.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W.P. Amphibian Declines : Judging Stability , Persistence , and Susceptibility of Populations to Local and Global Extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, n. 1, p. 60–71, 1994.

BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1999.

BRITO, P.H.; EDWARDS, S.V. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetica**, v. 135, p. 439–455, 2009.

CANEDO, C.; POMBAL-JR., J.P. Two New Species of Torrent Frog of the Genus *Hylodes* (Anura, Hylodidae) With Nuptial Thumb Tubercles. **Herpetologica**, v. 63, n. 2, p. 224–235, 2007.

CARSTENS, B.C. **Comparative Phylogeography of Mesic Forest Amphibians**. 2004.148 f. Dissertation (Doctor of Philosophy, College of Graduate Studies) University of Idaho, Idaho, December 2004.

CAYUELA, H. et al. Determinants and consequences of dispersal in vertebrates with complex life cycles: A review of pond-breeding amphibians. **Quarterly Review of Biology**, v. 95, n. 1, p. 1–36, 2018.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

COLLINS, J.P.; CRUMP, M.L. **Extinction in our times - Global Amphibian Decline**. New York: Oxford University Press, 2009.

CRAWFORD, A.J. Relative Rates of Nucleotide Substitution in Frogs. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, n. 6, p. 636–641, 2003.

DA SILVA, H.R.; BENMAMAN, P. Uma nova espécie de *Hylodes* Fitzinger da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil (Anura: Hylodidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 89–99, 2008.

DE SÁ, F.P. et al. A New Species of *Hylodes* (Anura, Hylodidae) and its Secretive Underwater Breeding Behavior. **Herpetologica**, v. 71, n. 1, p. 58, 2015.

DEUTSCH, C. A. et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 18, p. 6668–6672, 2008.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 214, p. 1–8, 2007.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L.. **Biology of Amphibians**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994.

EDWARDS, S.V. et al. Reticulation, divergence, and the phylogeography-phylogenetics continuum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 29, p. 8025–8032, 2016.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010.

FAHEY, A.L.; RICKLEFS, R.E.; DEWOODY, J. A. DNA-based approaches for evaluating historical demography in terrestrial vertebrates. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 112, p. 367–386, 2014.

FATORELLI, P.; NOGUEIRA-COSTA, P.; ROCHA, C.F.D. Characterization of tadpoles of the southward portion (oceanic face) of Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil, with a proposal for identification key. **North-Western Journal of Zoology**, v. 14, n. 2, p. 171–184, 2018.

FISKE, I.J..; CHANDLER, R.B. Unmarked: An R package for fitting hierarchical models of wildlife occurrence and abundance. **Journal of Statistical Software**, v. 43, n. 10, p. 1–23,

2011.

FRANKHAM, R.. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, p. 131–140, 2005.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCO, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2nd ed. Cambridge University Press, 2010.

FROST, D.R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1**. 2021. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001 Disponível em: < https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acesso em: 10 de abril de 2022.

FU, Y.X.; LI,W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693–709, 1993.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.

FUNK, W. C. et al. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 483–496, 2005.

GRAZZIOTIN, F.G. et al. Phylogeography of the *Bothrops* jararaca complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969–3982, 2006.

GUARNIZO, C.E.; CANNATELLA, D.C. Genetic divergence within frog species is greater in topographically more complex regions. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 4, p. 333–340, 2013.

HADDAD, C. F. B. et al. **Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica - Diversidade e Biologia**. 1 ed. Anolis Books, 2013.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARPENDING, H. C. Signature of Ancient Population Growth in a Low-Resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. **Human Biology**, v. 66, n. 4, p. 591–600, 1994.

HATANO, F.H. Ecologia de *Hylodes phyllodes* (Anura: Leptodactylidae), em uma área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ: Dinâmica, dieta e parasitismo. Tese de Doutorado, Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 173p. 2004.

HATANO, F.H.; ROCHA, C.F.D.; VAN SLUYS, M. Environmental Factors Affecting Calling Activity of a Tropical Diurnal Frog (Hylodes phyllodes : Leptodactylidae). **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 2, p. 314–318, 2002.

HATANO, FH; GETTINGER, D.; VAN SLUYS, M.; ROCHA, D. Parasitismo de *Hylodes phyllodes* (Anura: Cycloramphidae) por hannemania sp. (Acari: Trombiculidae) en una zona del bosque de atlántico, Ilha Grande, Sudeste Brasil. **Parasite**, v. 14, n. 1, p. 107–112, 2007.

HEYER, W.R. et al. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 231–410, 1990.

HUANG, Z.S. et al. Phylogeographical structure and demographic expansion in the endemic alpine stream salamander (Hynobiidae: Batrachuperus) of the Qinling Mountains. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1871, p. 1–13, 2017.

HUGHES, J. M. et al. Genetic differentiation among populations of *Caridina zebra* (Decapoda: Atyidae) in tropical rainforest streams, northern Australia. **Freshwater Biology**, v. 36, n. 2, p. 289–296, 1996.

HUGHES, J. M. et al. Genetic differentiation and dispersal among populations of *Paratya australiensis* (Atyidae) in rainforest streams in southeast Queensland, Australia. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 14, n. 1, p. 158–173, 1995.

HUGHES, J.B.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity: Its extent and extinction. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 689–692, 1997

INEA, Instituto Estadual do Ambiente. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Ilha Grande.** Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < http://www.inea.rj.gov.br/biodiversidade-territorio/conheca-as-unidades-de-conservacao/parque-estadual-da-ilha-grande/>

INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. **Roteiro para Levantamentos e Monitoramento de Peixes em grades e módulos RAPELD do PPBio**. 2012. Disponível em: < https://ppbio.inpa.gov.br/manuais>

IPCC. **Climate Change 2021 - the Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: Cambridge University Press, 2021.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3.** 2022. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org.>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2022.

JEHLE, R.; ARNTZEN, J. W. Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. **Herpetological Journal**, v. 12, p. 1–9, 2002.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2019.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, v. 13, p. 235–248, 1982.

KREBS, C.J. **Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance**. 6th. ed. San Francisco: Pearson, 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K.. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LAIA, R.C. et al. Tadpole of *Hylodes fredi* (Anura; Hylodidae), a frog endemic to an Atlantic Forest island (Ilha Grande, Rio de Janeiro state), Brazil. **Zootaxa**, v. 64, n. 2640, p. 62–64, 2010.

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

LIMA, N.G.S. et al. Dynamic and diverse amphibian assemblages: Can we differentiate natural processes from human induced changes? **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 2019.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P.. **Ecological genetics: Design, analysis, and application.** New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

LUCATI, F. et al. Multiple glacial refugia and contemporary dispersal shape the genetic structure of an endemic amphibian from the Pyrenees. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 15, p. 2904–2921, 2020.

LUCK, G.W.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity and ecosystem services. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 7, p. 331–336, 2003

LYRA, M.L.; HADDAD, C.F.B.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 5, p. 966–980, 2017.

MACEY, J.R. et al. Two Novel Gene Orders and the Role of Light-Strand Replication in Rearrangement of the Vertebrate Mitochondrial Genome. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 91–104, 1997.

DE OLIVEIRA MACHADO, A. et al. Diet, Diel Activity Pattern, Habitat Use, and Reproductive Effort of *Hylodes nasus* (Anura: Hylodidae) in One of the World's Largest Urban Parks (Tijuca National Park), Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 11, n. 2, p. 127–135, 2016.

MACKENZIE, D.I. et al. Occupancy estimation and modeling: Inferring patterns and dynamics of species occurrence. Elsevier Publishing. 313 p. 2006.

MALAGOLI, L.R. et al. Notes on the breeding behaviour of the Neotropical toadlet *Dendrophryniscus brevipollicatus* (Anura: Bufonidae), a bromeliad phytotelmata specialist. **Herpetology Notes**, v. 10, n. January, p. 31–39, 2017.

MARTIN, L.; SUGUIO, K.. The State Of São Paulo Coastal Marine Quaternary Geology. **Anais da Academia brasileira de ciência**, v. 47, p. 249–263, 1975.

MATTHYSEN, E. Multicausality of dispersal: a review. *In*: CLOBERT, J.; BAGUETTE, M.; BENTON, T.G.; BULLOCK, J.M. (org.). **Dispersal Ecology and Evolution**. Oxford University Press, p. 462. 2012.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1942.

MCRAE, B.H. Isolation By Resistance. **Evolution**, v. 60, n. 8, p. 1551–1561, 2006.

MEFFE, G.K.; VRINJENHOEK, R.C. Conservation Genetics in the Management of Desert Fishes. **Conservation Biology**, v. 2, n. 2, p. 157–169, 1988.

MILLS, L.S.; ALLENDORF, F.W. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1509–1518, 1996.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Tree**, v. 9, p. 373–375, 1994.

MORITZ, C. Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. **Systematic biology**,v. 51, n. 2, p. 238–254, 2002.

MOTTA-TAVARES, T. **O endemismo em escala reduzida no espaço geográfico , na altitude e no habitat : estudo de caso do anuro de riacho *Hylodes fredi* Canedo e Pombal-Jr . 2007 na Ilha Grande , Rio de Janeiro Rio de Janeiro**. 2016. Dissertação de Mestrado Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 73p. 2016.

MOTTA-TAVARES, T. et al. Geographic and altitudinal distribution of the insular endemic frog *Hylodes fredi* (Anura : Hylodidae) of the Atlantic coast of southeastern Brazil. **Journal of Coastal conservation**, v. 23, p. 615-621, 2019.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NALI, R.C. et al. Topography, more than land cover, explains genetic diversity in a Neotropical savanna tree frog. **Diversity and Distributions**, p. 1–15, 2020.

OLIVEIRA, R.R. Ação antrópica e resultantes sobre a estrutura e composição da Mata Atlântica na Ilha Grande, RJ. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 33–58, 2002.

BURROWES, P.A.; JOGLAR, R.L. Population Genetics of the Puerto Rican Cave-Dwelling Frog , *Eleutherodactylus cooki*. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 4, p. 706–711, 1999.

PEERACHIDACHO, P.; POMCHOTE, P.; TANDAVANITJ, N.. Population Genetic Structure of *Tylototriton panhai* Nishikawa, Khonsue, Pomchote and Matsui, 2013 (Urodela: Salamandridae) from Phu Hin Rong Kla National Park, Thailand. **Proceedings of RSU International Research Conference**, p. 520–526, 2021.

PIMENTEL, D. **Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species**. 2nd. ed. New York: Taylor & Francis, 2011.

PIMM, S. L. et al. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. **Science**, v. 344, n. 6187, 2014.

RAMBAUT, A. et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.

RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against

population growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 12, p. 2092–2100, 2002.

ROBERTSON, J.M.; LIPS, K.R.; HEIST, E.J. Fine scale gene flow and individual movements among subpopulations of *Centrolene prosoblepon* (Anura: Centrolenidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 56, n. 1, 2008.

ROCHA, C. F. D.; VAN SLUYS, M.; HATANO, F. H. Geographic distribution. *Hylodes phyllodes* (Leaf frog).**Herpetological Review**, n. 28, p. 208, 1997.

ROCHA, C.F.D. et al. Activity of Leaf-Litter Frogs : When Should Frogs Be Sampled ? **Journal of Herpetology**, v. 34, n. 2, p. 285–287, 2000.

ROCHA, C.F.D. et al. Estimates of forest floor litter frog communities: A comparison of two methods. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 14–21, 2001.

ROCHA, C.F.D. et al. The Herpetofauna from Ilha Grande (Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil): updating species composition, richness, distribution and endemisms. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 58, p. 25, 2018.

RODRÍGUEZ, A. et al. Genetic divergence in tropical anurans: deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. **Evolutionary Ecology**, v. 29, p. 765–785, 2015.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 552–569, 1992.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R.** Boston, MARStudio, PBC, 2020. Disponível em:<http://www.rstudio.com/.>

RUGGERI, J. et al. Seasonal variation in population abundance and chytrid infection in stream-dwelling frogs of the Brazilian Atlantic Forest. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.

GAMA, S.V.G.; SILVA, L.G.A.E.; SALGADO, C.M. Geologia, relevos e solos. *In*: BASTOS, M.; CALLADO, C.H. (org.). **O ambiente da Ilha Grande**. Rio de Janeiro: UERJ/CEADS, p. 21–64. 2009.

SANTANA-CORNÉLIO, G. et al. The genetic structure of *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae) mirrors traits of their life history. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales**, v. 44, n. 172, p. 729–739, 2020.

SARAMASIN, P. et al. The problem of estimating recent genetic connectivity in a changing world. **Conservation Biology**, v. 31, n. 1, p. 126–135, 2017.

SAZIMA, I.; BOKERMANN, W.C.A. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 5: *Hylodes otavioi* sp. n.(Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 42, n. 4, p. 767–771, 1982.

SCHEELE, B.C. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459–1463, 2019.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - Just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63–69, 2004.

SCHMIDT, C.; GARROWAY, C.J. The population genetics of urban and rural amphibians in North America. **Molecular Ecology**,v. 30, p. 3918–3929, 2021.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. **Nat Methods.**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SEGALLA, M.V. et al. Lista de espécies brasileiras/Brazilian amphibians: List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 1, n. 8, p. 65–96, 2019.

SHIELDS, William M. **Philopatry, inbreeding, and the evolution of sex**. SUNY Press, 1982.

SHOEMAKER, V. H. et al. Exchange of water, ions and respiratory gases in terrestrial amphibians. *In*: FEDER, M.; BURGGREN, W. (org.). **Environmental Physiology of the Amphibians**. The University of Chicago Press, p. 125–150. 1992.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, p. 555–562, 1991.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787–792, 1987.

SMITH, T.B.; WAYNE, R.K. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford University Press, 1996.

STACEY, P.B.; TAPER, M. Environmental Variation and the Persistence of Small Populations. **Ecological Applications**, v. 2, n. 1, p. 18–29, 1992.

BEAUPRE, S.J. et al. **Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research.** Second Edition. Revised by Herpetological Animal Care and Use Commitee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists., 2004.

SUGUIO, K. et al. Paleoníveis do Mar e Paleolinhas de Costa. *In*: SOUZA, C.R.G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A.M.S.; De OLIVEIRA., P.E. (org.). **Quaternário do Brasil**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 114–127, 2018.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, p. 619–633, 1992.

VAN DYCK, H.; BAGUETTE, M. Dispersal behaviour in fragmented landscapes: Routine or special movements? **Basic and Applied Ecology**, v. 6, p. 535–545, 2005.

VAN SLUYS, M. et al. Ecological parameters of the leaf-litter frog community of an Atlantic

Rainforest area at Ilha Grande, Rio de Janeiro state, Brazil. **Austral Ecology**, v. 32, n. 3, p. 254–260, 2007.

VAN SLUYS, M. et al. Anfíbios nos remanescentes florestais de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro. *In*: BERGALLO, H.G.; ROCHA, C.F.D.; UZÊDA, M. C.; COSTA, M. B.; ALVES, M.A.S.; VAN SLUYS, M.; SANTOS, M. A.; COSTA, T. C. C.; COZZOLINO, A. C. R. (org.). **Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto Biomas, p. 175–182, 2009.

WANG, B. et al. Postglacial colonization of the Qinling Mountains: Phylogeography of the swelled vent frog (*Feirana quadranus*). **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

WANG, B. et al. Phylogeographic patterns of mtDNA variation revealed multiple glacial refugia for the frog species *Feirana taihangnica* endemic to the Qinling Mountains. **Journal of Molecular Evolution**, v. 76, n. 3, p. 112–128, 2013.

WEI, X. et al. Long-term urbanization impacts the eastern golden frog (*Pelophylax plancyi*) in Shanghai City: Demographic history, genetic structure, and implications for amphibian conservation in intensively urbanizing environments. **Evolutionary Applications**, v. 14, n. 1, p. 117–135, 2021.

WELLS, K.D. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. The University of Chicago Press, 2007.

WRIGHT, S. Statistical genetics and evolution. *In*: **Exposés de Biométrie et de Statistique Biologique.** Paris: Hermann et Cie, p. 5–64. 1939.

YAN, F. et al. Geological events play a larger role than Pleistocene climatic fluctuations in driving the genetic structure of *Quasipaa boulengeri* (Anura: Dicroglossidae). **Molecular Ecology**, v. 22, n. 4, p. 1120–1133, 2013.

ZHANG, D.R. et al. Shared response to changes in drainage basin: Phylogeography of the Yunnan small narrow-mouthed frog, *Glyphoglossus yunnanensis* (Anura: Microhylidae). **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 1567, p. 1567–1580, 2020.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. 4th ed. Academic Press, 2013.