

Leonardo Leite Ferraz de Campos

**MORFOLOGIA E FILOGEOGRAFIA DE POPULAÇÕES DE  
*ISCHNOCNEMA HENSELII* (AMPHIBIA:  
BRACHYCEPHALIDAE) DA PORÇÃO SUDESTE E SUL DA  
MATA ATLÂNTICA BRASILEIRA**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Ecologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Ecologia  
Orientador: Prof. Dr. Selvino Neckel  
de Oliveira

Florianópolis-SC  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Campos, Leonardo Leite Ferraz de  
Morfologia e filogeografia de populações de  
*Ischnocnema Mensei* (Amphibia: brachycephalidae)  
da porção sudeste e sul da Mata Atlântica brasileira  
/ Leonardo Leite Ferraz de Campos ; orientador,  
Selvino Neckel de Oliveira, 2019.  
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Ecologia. 2. Ecologia. 3. Filogeografia. 4.  
Modelagem de nicho. 5. Morfometria geométrica. I.  
Oliveira, Selvino Neckel de. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Ecologia. III. Título.

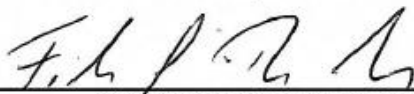
Leonardo Leite Ferraz de Campos

**“Morfologia e filogeografia de populações de *Ischnocnema henselii* (AMPHIBIA: BRACHYCEPHALIDAE) da porção sudeste e sul da Mata Atlântica brasileira”**

Por

**Leonardo Leite Ferraz de Campos**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (011/2019/PPGECO) do Programa de Pós-Graduação em Ecologia - UFSC.



---

Prof. Dr. Fábio Gonçalves Daura Jorge  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Banca examinadora:



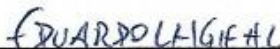
---

Dr. Selvino Neckel de Oliveira  
(Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador



---

Dr. Luiz Fernando Ribeiro (Pontifícia Universidade Católica do Paraná)



---

Dr. Eduardo Luis Hettwer Giehl (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.

Este trabalho é dedicado à memória de  
Pongo - *You'll always be my candle in  
the window.*



## AGRADECIMENTOS

Aprendi com minha família que o maior sucesso que uma pessoa pode alcançar é o sucesso intelectual, que a maior ostentação que poderia almejar é a do aprendizado. Então, não poderia deixar de agradecê-los por cada reunião que os nervos saltavam à pele e minhas tias e tios, mãe, pai e irmãos, primas e primos discutiam política e ciência, defendiam cada um o seu ponto de vista com argumentos tão felizes que me faziam acreditar, de fato, que a discussão e conversa são a chave para uma vida mais harmoniosa e igualitária. Mas, não há que se discutir, que sempre temos lados opostos e escolhamos nossos preferidos. Então, meu agradecimento especial vai para meus pais [Ezequiel e Valdete], meus irmãos [Adriano e Felipe] e meus queridos padrinhos e prim@ [Roberto, Mari, Gabi e Igor], não só porque vocês são as pessoas que eu mais amo no mundo, mas, também, porque são as pessoas mais críticas, conscientes e justas que eu tive o prazer de me relacionar – a luta de vocês é a minha inspiração e força.

Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador Dr. Selvino Neckel de Oliveira pela oportunidade de fazer parte do laboratório de Herpetologia da UFSC, seus ensinamentos tem sido essenciais para o meu desenvolvimento como pesquisador.

Ao Dr. Marcio Roberto Pie por ter confiado na ideia, discutido e ter se disponibilizado a ajudar na extração e sequenciamento do material genético, com certeza o trabalho ganhou um novo corpo e olhar com sua experiência e sugestões. Agradeço, também, ao seu aluno Daniel Rivadeneira por ter disponibilizado um pouco de seu tempo de mestrado para realizar os trabalhos de bancada.

Agradeço aos responsáveis por ceder os materiais genéticos e espécimes, das coleções científicas CFBH, MCP, CAUC e CHUFSC que, mesmo com todas as adversidades sócio-políticas, mantêm da melhor forma possível esses dados tão importantes para a ciência e conservação.

Agradeço aos membros da pré-banca e banca por doar o seu precioso tempo para poder ajudar e contribuir com o presente trabalho.

Agradeço aos professores e pós-docs do programa de pós-graduação em Ecologia pelos ensinamentos e discussões.

Nós [biólogos] estamos acostumados com ambientes hostis. Somos constantemente postos a superar obstáculos e nos proteger em campo durante nossas pesquisas. O ambiente acadêmico é, muitas vezes,

tido como hostil e desafiador e novamente temos que aprender a lidar com as adversidades. Depois desses dois anos tenho certeza que o “EPI” mais importante para mantimento da saúde mental e física dentro da academia são os amigos e colegas que fazemos durante esse tempo. Portanto, se hoje termino essa fase, é porque vocês estiveram comigo durante todo o processo. Então, agradeço a todos os colegas do LEAR pelas risadas nas reuniões de sexta-feira enquanto comíamos as alfaces orgânicas do Selvino com pão, pelas críticas ao trabalho e ajudas em campo e em laboratório. Gostaria, principalmente, de agradecer aos amig@s da pós-eco que sempre estiveram dispostos a largar as suas tarefas para tomar uma cerveja, jogar sinuca, tocar um violão e falar sobre a vida nos momentos de felicidade e estresse.

Agradeço aos meus grandes amig@s Luiz, Kauan, Mai e Maca por terem sido meus irmãos durante os últimos dois anos – vocês sabem o quanto são importantes na minha vida.

Finalmente, existe uma pessoa que teve grande impacto na minha forma de enxergar o mundo e que eu gostaria de ter sua companhia por muito mais tempo- Brisa, você é Maravilhosa!

*“Don’t forget that the boy drowned in the pond that the statistician told him was on average only 20cm deep. Averages mask individual variation — that’s the whole point of an average. We have already said that a lot of alleles are on average selectively neutral — on average it makes no difference which allele an individual has. But it can make a very big difference in some conditions, with positive effects in one environment and negative in another. Yet, on average, the effects will cancel out. This does not mean that the allele has the same effects in all conditions.”*

(Jablonka & Lamb, 2005)





## RESUMO

O período quaternário foi marcado por constantes oscilações climáticas e inúmeros autores têm as relacionado à diferenciação e extinção de diversos grupos de organismos. Essas oscilações, somadas às complexidades geográficas da Mata Atlântica (MA), resultaram em um dos domínios com maior riqueza e endemismo do planeta. Entretanto, o tempo e modo da origem da diversidade, assim como o entendimento de como esses impactos afetaram os padrões demográficos das espécies é ainda limitado, principalmente na porção sul dessa área. O presente estudo tem como objetivo principal caracterizar morfológica e filogeograficamente grupos populacionais de *Ischnocnema henselii* ao longo de seu gradiente de distribuição da Mata Atlântica da região Sudeste e Sul do Brasil. Para isso, foram amplificadas e sequenciadas 38 segmentos do gene mitocondrial 16S rRNA somados a 57 sequências provenientes da plataforma GenBank, totalizando 95 sequências que cobriram toda a distribuição da espécie e foram empregadas em análises de sua estrutura e demografia genética. Além disso, 76 espécimes foram utilizados para análises fenotípicas intrapopulacionais e 236 pontos de ocorrência para modelagem de nicho climático potencial da espécie. Os resultados revelam que para *I. henselii* os remanescentes florestais da Serra Geral e Serra do Mar parecem ser importantes para a manutenção da estabilidade e continuidade das populações ao longo do tempo, sendo que linhagens mais ancestrais são provenientes de ambientes úmidos e estão distribuídas na região de transição entre Floresta com Araucárias e Floresta Atlântica costeira localizada na porção da Serra do Mar dos estados de Santa Catarina e Paraná. Isso corresponde aos resultados de modelagem de nicho que previram áreas de maior estabilidade climática de distribuição potencial nessas regiões. Esses achados corroboram que a origem da diversidade na Mata Atlântica é resultado da intensa dinâmica climática e topográfica de sua paisagem.

**Palavras-chave:** Filogeografia; Coalescência; Refúgios ecológicos; Inferências demográficas; Modelos de distribuição de espécies.



## ABSTRACT

The quaternary period was marked by constant climatic oscillations and numerous authors have related to the differentiation and extinction of several groups of organisms. These oscillations, added to the geographical complexities of the Atlantic Forest (MA), have resulted in one of the most rich and endemic areas of the planet. However, the time and mode of origin of diversity, as well as the understanding of how these impacts affected the demographic patterns of species is still limited, especially in the southern portion of that domain. The present study has as main objective to characterize morphologically and phylogeographically population groups of *Ischnocnema henselii* along its distribution gradient of the Atlantic Forest of the Southeastern and Southern region of Brazil. For this, 38 segments of the mitochondrial 16S rRNA gene were amplified and sequenced along 57 sequences from the GenBank platform, totaling 95 sequences that covered the entire distribution of the species and were used in analyzes of their structure and genetic demography. In addition, 76 specimens were used for intrapopulation phenotypic analyzes and 236 points of occurrence for modeling the potential climatic niche of the species. The results reveal that for *I. henselii* the forest remnants of Serra Geral and Serra do Mar seem to be important for the maintenance of the stability and continuity of the populations over time, with more ancestral lineages coming from humid environments and distributed in the region between the Araucaria Forest and the Atlantic Coastal Forest located in the Serra do Mar portion of the states of Santa Catarina and Paraná. This corresponds to the results of niche modeling that predicted areas of greater climatic stability in these regions. These findings corroborate that the origin of diversity in the Atlantic Forest is a result of the intense climatic and topographic dynamics of its landscape.

**Keywords:** Phylogeography; Spatial Coalescence; Refuge Hypothesis; Demographic Inference; Species Distribution Models.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do complexo de espécies de *Ischnocnema guentheri*, demonstrando as relações entre os haplótipos das espécies *I. henselii* e *I. guentheri* e quatro espécies candidatas (CS1, CS2, CS3 e CS4). Reprodução da figura 2 de Gehara et al. (2013). ..... 20

Figura 2. Distribuição geográfica e haplotípica dos grupos populacionais de *I. henselii*. As cores representam os distintos grupos: verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP; os símbolos indicam cada um dos 21 haplótipos; e as regiões em cinza mais escuro representam as Ecorregiões Mata de Araucárias e Floresta Atlântica Costeira. As abreviações correspondem aos estados brasileiros (SP – São Paulo, PR – Paraná, SC – Santa Catarina e RS – Rio Grande do Sul) e o Núcleo de missões na Argentina (AR)..... 29

Figura 3. Rede de haplótipos usando *Median-Joining* dos cinco grupos populacionais de *I. henselii* (verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP). Círculos menores em azul indicam variações e os números a quantidade de sequências de cada haplótipo. O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de indivíduos sequenciados. .... 31

Figura 4. A) Árvore de coalescência para as populações de *I. henselii* (análise TMRCA). B) *Extended Bayesian Skyline Plot* dos tamanhos efetivos populacionais de *I. henselii*. O eixo X de ambos os gráficos representa o tempo (em milhares de anos). As cores da figura A representam os cinco grupos populacionais do presente estudo: verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP..... 33

Figura 5. Predições dos modelos de distribuição de *I. henselii* para os tempos: presente; 6ka (Médio-Holoceno); 21ka (UMG); 130ka (Último Máximo Interglacial). A legenda representa células com maior (em vermelho) e menor adequabilidade climática (em branco) para a espécie..... 35

Figura 6. Análise de Correspondência Canônica das formas dos indivíduos de *I. henselii* de quatro grupos populacionais em (A) vista dorsal e em (B) vista lateral. As cores dos pontos e das elipses (95% de intervalo de confiança) demonstram cada uma dos quatro grupos populacionais utilizados para análise: verde, COAST; amarelo, ARAUC; vermelho, ILHA e; azul, SMARSP. Os grids de deformação representam os valores extremos positivos e negativos da variação da

forma associadas com o primeiro e segundo eixo canônico, N=75. Os pontos em vermelho nas imagens no canto inferior esquerdo de cada uma das figuras (A e B) indicam os pontos anatômicos (*landmarks*) utilizados para a análise de forma. ....37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diversidade genética dos grupos populacionais de *I. henselii* baseados nas sequências utilizadas nas análises realizadas no *software* Arlequin 3.5.2.2 e parâmetros demográficos provenientes do *software* LAMARC 2.1.10. .... 32

Tabela 2. Valores de migração para as combinações par a par entre os grupos populacionais de *I. henselii* conforme resultados do *software* LAMARC. Os números da coluna **Combinações** indicam os pares dos grupos populacionais comparados, conforme COAST = 1; RGRS = 2; ARAUC = 3; ILHA=4; SMARSP = 5. .... 34





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	Objetivo geral.....	19
1.2	Objetivos específicos .....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
2.1	Sistema de estudo, amostragem e procedimentos de sequenciamento .....	21
2.2	Diversidade genética, parâmetros demográficos, tempo de divergência e flutuações gênicas. ....	22
2.3	Modelo de distribuição potencial de <i>Ischnocnema henselii</i> ..	24
2.4	Morfometria geométrica como padrão fenotípico.....	26
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
3.1	Diversidade genética, tempo de divergência e parâmetros demográficos. ....	28
3.2	Modelo de distribuição de <i>I. henselii</i> .....	35
3.3	Morfometria geométrica como padrão fenotípico.....	36
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>



## INTRODUÇÃO

A Filogeografia, termo cunhado por Avise em 1987, é o ramo da biologia evolutiva que procura entender os padrões de distribuição das linhagens intraespecíficas, interespecíficas proximamente relacionadas ou crípticas, bem como, os processos e relações entre essas linhagens. Este campo é relativamente novo e surge na expectativa de integrar a filogenia e a genética de populações com o objetivo de entender como os processos microevolutivos (adaptação, mutação, deriva e seleção natural) e macroevolutivos (radiações adaptativas) se conectam (AVISE, 1987; 2000). Os primeiros trabalhos filogeográficos baseavam-se exclusivamente no uso de DNA mitocondrial (mtDNA) animal, uma vez que o mtDNA apresenta características que facilitam o seu uso nos estudos dessa área, tais como: herança uniparental (sem recombinação), alta taxa de mutação (tipicamente ~1%/milhão de anos; BROW et al., 1979), genes pequenos e não apresenta região repetitiva (para mais detalhes ver revisões de AVISE, 2009 e BRITO & EDWARDS, 2009) - fatores que diminuem o tempo para a homogeneização das mudanças entre as seqüências de regiões geográficas distintas.

Na tentativa de aumentar ainda mais a precisão e prover *insights* na descrição e entendimento dos padrões de diversificação, os estudos filogeográficos passaram a utilizar novos marcadores genéticos (GARRICK et al., 2015) e outras ferramentas como a modelagem de nicho climático e a descrição de variações fenotípicas (HICKERSON et al., 2010), as quais se tornaram essenciais para elucidar de forma mais apurada a história de vida das espécies. Assim, diversos trabalhos surgiram com o uso dessas novas técnicas como ferramenta para

entender os padrões ecológicos (BEHEREGARAY, 2008; KNOWLES & MADDISON, 2002).

Na Mata Atlântica (MA) os padrões de diversidade das espécies são frequentemente explicados por variações geográficas e diferenciação por alopatria (vicariância). Entretanto, alguns estudos tem mostrado que as variações climáticas que ocorreram ao longo do tempo podem ter contribuído para alterações fenotípicas, genéticas e de distribuições das populações de diferentes táxons como anfíbios (CARNAVAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2009), aves (D'HORTA et al., 2011), mamíferos (LARA & PATTON, 2000) e abelhas (BATALHA-FILHO et al., 2010). Por outro lado, para táxons com alto grau de endemismo (restrição populacional) ou grande capacidade de dispersão (trocas gênicas constantes entre as linhagens) os grupos populacionais podem se estruturar de forma a homogeneizar as diferenças e, então, descrever padrões genéticos e fenotípicos similares (ZAMUDIO et al., 2016). Mais recentemente, com o aumento de trabalhos da área, estudos com diversos grupo, como anfíbios (THOMÉ et al., 2010; AMARO et al., 2012; CARNAVAL et al., 2014), aves (CABANNE et al., 2013) e mamíferos (LEITE et al., 2016) têm desafiado essa teoria demonstrando que as variações climáticas não apresentam papel importante na dinâmica dos grupos nessas áreas e que a MA não foi fragmentada durante as glaciações (THOMÉ et al., 2014).

Com isso, algumas hipóteses tem sido levantadas para explicar os padrões gerais da diversidade das espécies da MA. Entre estas, destacamos a: 1) **hipótese de barreiras fisiográficas**, que prevê que rios e morfoestruturas (i.e. cadeias de montanhas; WALLACE, 1952) atuaram como barreiras geográficas impedindo o fluxo gênico entre

populações e o conseqüente isolamento, causando diversificação genética como resposta a estes isolamentos (SILVA & STRAUDE, 1996; PAZ et al., 2018); 2) **hipótese de refúgios**, descrita primeiramente para explicar os padrões de distribuição de aves na Amazônia (HAFER, 1969); sustenta que variações significativas de temperatura e umidade que ocorreram em determinados períodos promoveram instabilidades climáticas regionais. Essas oscilações resultaram na retração das florestas durante baixas temperaturas (ciclos glaciais) e expansão ao longo de temperaturas mais amenas (ciclos interglaciais; HAFER, 1969; AB'SABER, 2000; CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009; CARNAVAL et al., 2014). Isso combinada com variações geológicas (HOORN et al., 2010; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013) tem sido apontado como a força motriz da diversificação e distribuição de organismos Neotropicais; 3) **hipótese de gradientes ecológicos** (ENDLER, 1977), que relaciona a quebra de barreiras latitudinais devido à gradientes ecologicamente diferentes podendo promover a seleção divergente (sem vicariância).

Dentro desse escopo, os trabalhos se voltaram para a tentativa de explicar os padrões de diversificação originados pelas mudanças climáticas do período quaternário (BEHEREGARAY, 2008, TURCHETTO-ZOLET et al., 2013; VANZOLINI & WILLIAMS, 1981; AB'SABER, 2000; CARNAVAL & MORITZ, 2008). Há diferentes explicações para as causas e os fatores que possam ter dado início ou término a essas variações climáticas nesse período, tais como: as mudanças no relevo, alterações por radiação, por efeitos de meteoros ou vulcanismo, ciclo solar e teoria de Milankovitch (para uma revisão

mais aprofundada sobre as causas e efeitos das variações climáticas do quaternário no hemisfério-sul ver SALGADO-LABOURIAU, 1994).

De fato, o quaternário foi marcado por estágios de instabilidade climática a nível global, com maior intensidade durante o pleistoceno (WEBB & BARTLEIN, 1992), especialmente o Último Máximo Glacial (UMG ; ~21.000 ka) caracterizado pela diminuição nas temperaturas médias mundiais (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013) e o médio-Holoceno (~6.000 ka) no qual as oscilações do nível do mar possivelmente resultaram em inundações ao longo na costa oceânica oriental brasileira (ANGULO & LESSA, 1997; ANGULO et al. 2006; CLARK et al., 2009). No Brasil, a instabilidade climática do pleistoceno causou relativa diminuição da umidade e redução da temperatura em altitudes elevadas (AB'SABER, 2000). Estudo feito por Ab'Saber (2000) sugeriu que o aumento do frio em regiões de grandes altitudes levou a escassez de regiões úmidas levando a expansão de plantas xerófitas na região sul do Brasil, que ganharam espaços anteriormente ocupados por plantas higrófitas. Devido à aridificação, principalmente da costa brasileira, a MA ficou restrita a regiões que mantiveram a umidade e a pluviosidade estáveis e mais acentuadas em serras litorâneas e relevos residuais intra-depressionais. Sugere-se que formação destes remanescentes de MA foi possível devido às características orográficas onde os microclimas e altos níveis de umidade facilitaram a permanência da floresta (AB'SABER, 2000; BEHLING et. al., 2002).

A partir desse quadro de fragmentação da flora higrófitas da MA, espécies da fauna que dependiam das características desse tipo de habitat (elevada umidade e pluviosidade e temperaturas moderadas a

altas) se mantiveram em remanescentes florestais que conservavam características para a sua sobrevivência (AB'SABER, 2000; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Essa fauna possivelmente acumulou diferenças genéticas significativas, dentro e entre populações, resultando em mudanças na dinâmica populacional (HEWITT, 2000, 2004; RÉ et al., 2014). Turchetto-Zolet et al. (2013) demonstraram que durante os períodos glaciais passados cerca de 87% das populações de animais associadas a áreas de floresta (e.g. mamíferos, anfíbios e aves) apresentaram sinais de fragmentação populacional e posterior expansão durante os ciclos interglaciais.

Devido à grande variedade de estruturas morfológicas, de mecanismos fisiológicos e adaptações ambientais, os anuros ocupam todos os ambientes terrestres, exceto regiões com frios extremos e baixa pluviosidade (ver mapa de distribuição do grupo em JENKINS et al., 2013). A maioria das espécies está distribuída em regiões com níveis de umidade elevados e temperaturas moderadas para facilitar trocas gasosas entre a pele e o ambiente (DUELLMAN & TRUEB, 1994).

Estudos de filogeografia e filogenética envolvendo anuros têm evidenciado a influência das oscilações climáticas do quaternário sobre a diversificação do grupo na Mata Atlântica (CARNAVAL et al., 2009; PIE et al., 2018; BRUNES et al., 2015). A espécie de anuro foco deste estudo, *Ischnocnema henselii* (PETERS, 1870) pertencente à família Brachycephalidae Günther, 1858 e é endêmica da Mata Atlântica. Gehara et al., (2013), usando dados moleculares e acústicos indicaram que *I. henselii* faz parte do complexo de espécies *I. guentheri*. Esse complexo inclui pelo menos seis espécies, das quais quatro são candidatas (possíveis novas espécies) e outras duas espécies estão bem



delimitadas: *I. guentheri*, restrita à Floresta da Tijuca (Rio de Janeiro) e *I. henselii* com distribuição entre o estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do sul (Figura 1).

Considerando a ampla distribuição sul-sudeste de *I. henselii* na Mata Atlântica, a sua independência dos corpos de água para reprodução, sua dependência da umidade da floresta e a dinâmica da Mata Atlântica nessa região, nossa hipótese é que os efeitos das variações paleo-climáticas que ocorreram no pleistoceno restringiram as populações de *I. henselii* a remanescentes tropicais com condições para sua sobrevivência da Serra do Mar, Serra Geral e porção da MA de São Paulo (CARNAVAL & MORITZ, 2008; THOMÉ et al., 2010; CARNAVAL et al., 2014), permanecendo isoladas até ocorrer novamente a estabilidade climática que propiciou a expansão das florestas úmidas. O período em isolamento possivelmente restringiu o fluxo gênico das populações emergentes devido às barreiras para a troca de material genético e, conseqüentemente, a diferenças filogeográficas nas populações (**estruturação genética**) – onde linhagens antigas do pleistoceno dominam matas de terras altas e aglomerados mistos antigos; enquanto, que as linhagem mais recentes ocupam as planícies. Esse panorama filogeográfico reforçaria a ideia de as montanhas tropicais servirem como reservatórios e geradores de linhagens e espécies (FJELDSA & LOVETT, 1997, PIE et al., 2018; GEHARA et al., 2013).

## 1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos eventos paleoclimáticos e ecológicos sobre a morfologia e filogeografia de grupos populacionais de *Ischnocnema henselii* ao longo de seu gradiente de distribuição da Mata Atlântica da região Sudeste e Sul do Brasil.

## 1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar Morfológica e Filogeograficamente grupos populacionais desta espécie;
- Verificar possíveis refúgios da espécie no Quaternário Superior e comparar resultados de outros trabalhos;
- Modelar o potencial nicho climático passado de seus grupos populacionais, a fim de melhor compreender a história evolutiva do grupo.

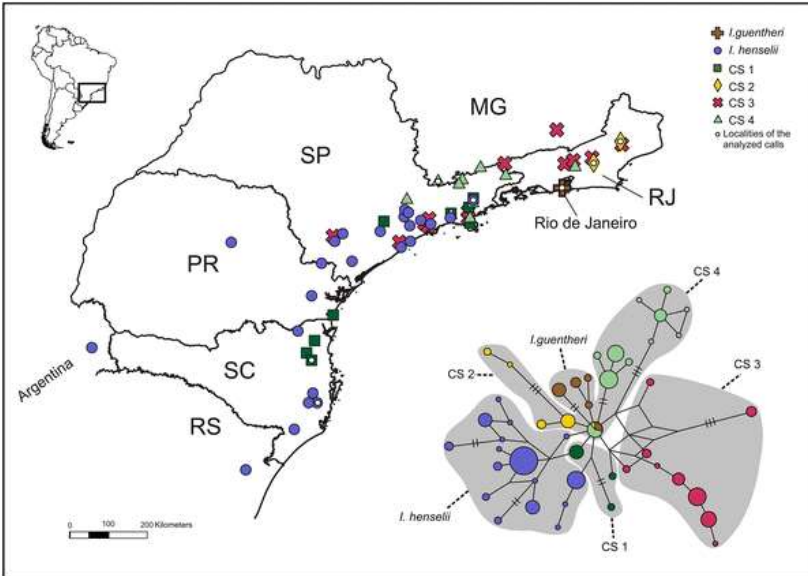


Figura 1. Distribuição do complexo de espécies de *Ischnocnema guentheri*, demonstrando as relações entre os haplótipos das espécies *I. henselii* e *I. guentheri* e quatro espécies candidatas (CS1, CS2, CS3 e CS4). Reprodução da figura 2 de Gehara et al. (2013).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Sistema de estudo, amostragem e procedimentos de sequenciamento

*Ischnocnema henselii* é encontrado, no Brasil, entre os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e na província de *Misiones* na Argentina. É principalmente encontrado na serapilheira das áreas florestais, alimenta-se de uma variedade de pequenos artrópodes e deposita entre 22-40 ovos, sendo que os machos apresentam tamanho corpóreo médio de 13mm e as fêmeas 19mm (MARTINS et al., 2010).

A fim de entender a dinâmica da espécie os indivíduos foram agrupados em cinco grupos populacionais conforme a distribuição geográfica e ecorregião a qual pertenciam: I - **COAST**, com distribuição na região da Floresta Atlântica costeira do Sudeste a Nordeste do estado de Santa Catarina; II - **RGRS**, com ocorrência no extremo sul da Serra Geral no estado do Rio Grande do Sul; III - **ARAUC**, a qual se estende do extremo oeste da distribuição da espécie até o limite leste da ecorregião Floresta com Araucária; IV - **ILHA**, grupo restrito à ilha de Florianópolis em Santa Catarina; V - **SMARSP**, este grupo populacional ocorre no extremo nordeste da distribuição da espécie, no estado de São Paulo, e está inserida na ecorregião Floresta Atlântica Costeira (ver Figura 2).

Estes cinco grupos populacionais foram representados por 76 espécimes machos (devido ao dimorfismo sexual) para as análises morfométricas e 38 tecidos para as análises genéticas, cedidas por coleções Herpetológicas de Universidades brasileiras (conforme Tabela S1 - apêndice). Outras 57 sequências genéticas acessadas da plataforma NCBI (GenBank) foram agregadas às análises (proveniente do trabalho de GEHARA et al., 2013). No total, foram utilizadas 95 sequências de 44 localidades e incluídas em duas ecorregiões (conforme WWF: Floresta Atlântica Costeira e Floresta com Araucária). Extraíram-se DNA de músculo da perna e fígado dos 38 tecidos usando um protocolo padrão de extração (BRUFORD et al., 1992). Sequências de segmentos do gene mitocondrial 16S rRNA (16S) foram amplificadas usando o kit para PCR *BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems)* e obtidas utilizando o *3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®—USA)*. Todas as sequências foram verificadas manualmente e alinhadas usando o padrão do algoritmo *Muscle* (EDGAR, 2004) implementado no *software* MEGA v.7.0 (KUMAR et al., 2016).

2.2 Diversidade genética, parâmetros demográficos, tempo de divergência e flutuações gênicas.

Primeiramente, a fim de entender e avaliar nossas previsões sobre a estrutura e diversidade genética das populações, o número de haplótipos ( $k$ ), diversidade haplotípica ( $H_d$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e número de sítios polimórficos ( $ss$ ), foram estimados com auxílio do *software* Arlequin 3.5.2.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Para testar a hipótese de isolamento por distância (WRIGHT, 1943) entre os grupos populacionais, foi construída uma matriz de distância geográfica (em escala log) a partir do centroide dos pontos de distribuição de cada grupo populacional. Utilizando o teste de Mantel (MANTEL, 1967), essa matriz foi correlacionada com outra de diferenças genéticas entre todos os grupos (índice de fixação -  $F_{st}$  par a par) e avaliada por análise de variância molecular (AMOVA), usando as populações como preditoras (EXCOFFIER et al., 1992). Os testes de neutralidade Fu's  $F_s$  e D-Tajima (D) foram empregados para testar a hipótese de expansão populacional, com 10.000 permutações no Arlequin.

Adicionalmente, para cada grupo populacional foram estimados os parâmetros demográficos  $\theta$  (parâmetro mutacional) e  $M$  (taxa de migração) baseado no método Bayesiano usando as cadeias de Markov de Monte Carlo (MCMC) e implementado no *software* LAMARC 2.1.10 (KUHNER, 2006).

Para acessar a relação entre os diferentes haplótipos dos grupos populacionais foi gerada uma rede de haplótipos do gene 16S utilizando o método “median-joining” (BANDELT et al., 1999) do *software* MEGA v.7.0 (KUMAR et al., 2015) e visualizado no *software* HAPLOVIEWER (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>).

O tempo de divergência do ancestral mais comum (*time to most recent common ancestor* - TMRCA) foi estimado através do relógio molecular relaxado não correlacionado (*uncorrelated relaxed clock*) por cadeias de Markov de Monte Carlo (MCMC) utilizando o segmento mitocondrial 16S de todas as amostras no *software* BEAST2 (método baseado em coalescência; BOUCKAERT et al., 2014). Para a

construção das árvores foi utilizada uma taxa de substituição nucleotídica igual a 0.0006/sítio/Mya (conforme estimativa para o complexo *Ischnocnema parva*, ver GEHARA et al., 2017), calculando o melhor modelo de substituição com o *software* jModelTest. Foi utilizado o modelo de substituição GTR + I + G estimado no *software* MEGA v.7.0 (KUMAR et al., 2015) com 100.000.000 iterações por geração a cada 20.000 gerações, produzindo sete árvores, as quais foram concatenadas no *software* LogCombiner v1.8.4 (DRUMMOND & RAMBAUT 2007). O tamanho efetivo populacional e a convergências das árvores MCMC (valores de ESS > 100) foram analisadas no *software* TRACER 1.6 (RAMBAUT et al., 2018). Por fim, a árvore consenso foi inferida com o auxílio do *software* TreeAnnotator 1.8.4 (DRUMMOND et al., 2012). Os resultados das árvores foram editados usando o *software* FigTree 1.4.3 (RAMBAUT, 2016).

Finalmente, para avaliar a mudanças do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo foi realizada uma análise de coalescência com estimadores bayesianos (*Extended Bayesian skyline plot* ou EBSP; HELED & DRUMMOND, 2008) implementada no BEAST e mantendo-se os mesmos parâmetros utilizados na análise TMRCA.

### 2.3 Modelo de distribuição potencial de *Ischnocnema henselii*

Para inferir a distribuição geográfica potencial dos grupos populacionais de *I. henselii* durante os ciclos glaciais-interglaciais, foram gerados mapas de nicho ecológico potencial com dados da distribuição presente e projetados para o passado (para os períodos de

6ka, 21ka e 130ka). Para isso, foram acessados 238 pontos de ocorrência de *I. henselii* no banco de dados *speciesLink* (<http://splink.cria.org.br/>) e literatura (Tab. S2 – apêndice). Os dados de distribuição foram inspecionados para a remoção de pontos duplicados ou potencialmente incorretos. Além disso, para evitar autocorrelação espacial, os pontos com distância menores do que 10 km entre si foram excluídos. Assim, 87 pontos abrangendo toda a distribuição de *I. henselii* foram mapeados em grids de 0,5° x 0,5° (longitude x latitude) para gerar uma matriz de presença que foi utilizada para calibrar os modelos de distribuição.

Para cada um destes 87 pontos de ocorrência de *I. henselii* foram coletados dados de 19 variáveis bioclimáticas dos três tempos evolutivos e derivados do Modelo Comunitário de Sistema Climático (*Community Climate System Model* - CCSM), com resolução espacial igual a 0,5° x 0,5° (longitude x latitude). Estes dados foram obtidos no site ecoClimate (LIMA-RIBEIRO et al., 2015). Devido a ocorrência de correlação entre os dados, quatro variáveis climáticas foram selecionadas por análise fatorial: bio2 (Amplitude térmica diária); bio4 (Estacionalidade de temperatura); bio5 (Temperatura máxima do mês mais quente) e; bio17 (Precipitação do trimestre mais seco).

Conforme proposto por ANDERSON & RAZA (2010) a área de estudo para calibrar os modelos foi previamente definida (*buffer*) abrangendo o espaço climático sul (conforme CARNAVAL et al., 2014). Quatro algoritmos de presença ou presença-ausência foram utilizados para modelar a distribuição de *I. henselii* (*GLM*, *Maxent*, *Random Forest* e *SVM*). Os dados de ausência foram gerados aleatoriamente (pseudo-ausências) através do *grid* de distribuição da espécie, mantendo-se uma prevalência igual a 0,5 para calibrar os



pontos observados de presença-ausência. Além disso, os dados de presença foram particionados em dados de treino e teste (75% e 25%, respectivamente) com 50 repetições (*cross-validation*), sendo que em cada repetição diferentes combinações de treino e teste foram escolhidas com amostragem sem reposição. Os modelos foram inicialmente avaliados pela média dos valores de AUROC ou AUC (*Area Under the Receiver Operator Curve*) de cada *cross-validation* (para uma discussão detalhada ver PHILLIPS et al., 2006). Adicionalmente, os mapas previstos foram avaliados pelo conhecimento dos autores (do presente trabalho) sobre a distribuição conhecida da espécie. Por fim, os mapas de distribuição projetados para cada um dos os tempos (presente, 6ka, 21ka e 130ka) de cada um dos quatro modelos ajustados, foram agrupados pela média aritmética ponderada com os valores de AUC. Todas as análises foram realizadas no *software* R 3.5.0 (R CORE TEAM, 2018).

#### 2.4 Morfometria geométrica como padrão fenotípico

Para a morfometria geométrica foram tiradas fotografias da região cefálica de cada um dos 75 machos de *I. henselii* provenientes das 25 localidades (Tab. S1). Os indivíduos foram colocados sobre papel milimetrado e distante 6cm da lente da câmera. As fotos foram tiradas com uma câmera acoplada a um estéreo-microscópio *SteREO Discovery*<sup>®</sup> V.12. Com auxílio do *software* tpsdig2 (ROHLF, 2006) foram registradas as coordenadas de 13 pontos anatômicos (*landmarks*)

da região cefálica de cada indivíduo, incluindo sete pontos em plano dorsal (Figura 6-A) e seis em plano lateral (Figura 6-B). Os pontos do plano dorsal foram: 1 – extremidade anterior do lábio superior; 2 – nódulo nasal esquerdo; 3 – extremidade anterior do olho esquerdo; 4 – extremidade posterior do olho esquerdo; 5 – extremidade posterior do olho direito; 6 – extremidade anterior do olho direito; 7 – nódulo nasal direito; e os do plano lateral foram: 8 – extremidade anterior do lábio superior; 9 – nódulo nasal direito; 10 – extremidade anterior do olho direito; 11 – extremidade posterior do olho direito; 12 – extremidade superior timpânica direita; 13 – extremidade inferior timpânica direita (Figura 6).

Os pontos anatômicos foram utilizados para determinar a forma da cabeça dos indivíduos de cada grupo populacional (COAST, ARAUC, ILHA E SMARSP – ver seção 2.1). Os indivíduos do grupo RGRS foram excluídos desta análise devido à insuficiência amostral. A distribuição média do conjunto de formas de cada grupo populacional foi realizada através da análise de Procrustes generalizada (GPA) – que sobrepõe cada uma das formas, dentro de um conjunto de dados, ajustando o tamanho e a orientação no espaço (“*translation*”, “*rotation*” e “*uniformly scaling*”; GOWER, 1975).

Com auxílio do pacote *geomorph* 3.7.1 do software R 3.5.0 (R CORE TEAM, 2018) a relação entre as formas dos indivíduos dos grupos populacionais foi explorada por análise de correlação canônica (ACC) e teste de permutação par a par com 1000 permutações (ROHLF et al., 1996; MONTEIRO & KLINGENBERG, 2005). O objetivo dessa análise foi calcular o espaço tangencial ao longo dos eixos do conjunto de formas de Procrustes, a fim de encontrar as formas com maior

variação ao longo dos grupos definidos *a priori* (grupos populacionais). Por fim, para verificar se as diferenças entre as formas dos indivíduos dependia da alocação em grupos populacionais foi realizada uma ANOVA de Procrustes (KLINGENBERG & MCINTYRE 1998; KLINGENBERG et al. 2002) com 1000 repetições e nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

3.1 Diversidade genética, tempo de divergência e parâmetros demográficos.

O sequenciamento dos tecidos dos 95 indivíduos gerou 411pb, constituindo 158 sítios segregantes e 21 haplótipos (Figura 2). A diversidade haplotípica e nucleotídica variou de 0,0538 ( $\pm 0,0275$ ) a 0,0000 ( $\pm 0,0000$ ) entre os grupos populacionais (Tab. 1). O teste de neutralidade ( $F_s$  de  $F_u$ ) indicou uma diferença significativa para a maioria dos grupos populacionais, exceto para o ILHA (Tab. 1). Os resultados do teste D-Tajima indicou um quadro de expansão populacional para os grupos populacionais ARAUC e RGRS ( $D < 0$ ;  $p < 0.05$ ; Tabela. 1).

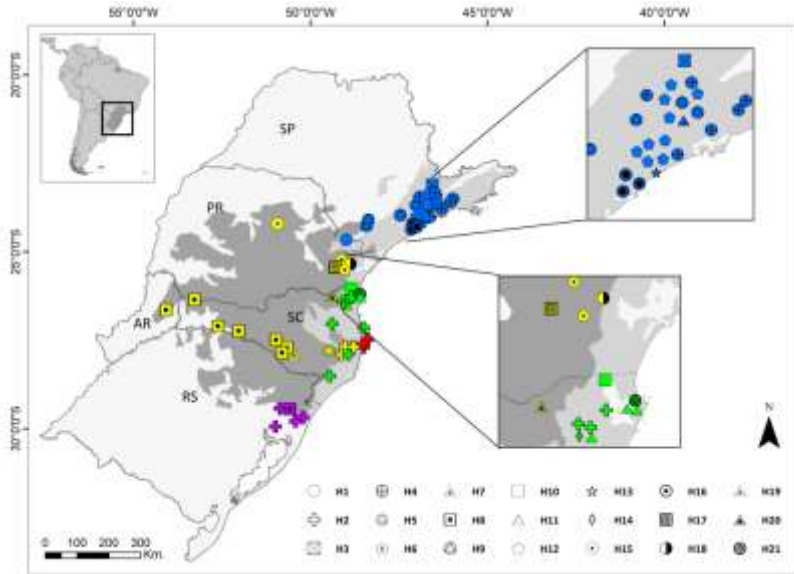


Figura 2. Distribuição geográfica e haplotípica dos grupos populacionais de *I. henselii*. As cores representam os distintos grupos: verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP; os símbolos indicam cada um dos 21 haplótipos; e as regiões em cinza mais escuro representam as Ecorregiões Mata de Araucárias e Floresta Atlântica Costeira. As abreviações correspondem aos estados brasileiros (SP – São Paulo, PR – Paraná, SC – Santa Catarina e RS – Rio Grande do Sul) e o Núcleo de misiones na Argentina (AR).

A diferenciação genética não apresentou correlação significativa com as distâncias geográficas entre os grupos populacionais (Teste de Mantel,  $r = 0,2518$ ;  $p = 0,1480$ ). O grupo populacional SMARSP foi o único que apresentou estrutura filogenética correspondente à sua distribuição geográfica (i.e. estrutura genética; Figura 2 e 3). O resultado da AMOVA ( $F_{st}$  par a par) demonstrou diferenças significativas entre os grupos populacionais ( $F_{st} = 0,27118$ ;  $P < 0,001$ ). A comparação dos  $F_{st}$  par a par indicou diferença genética maior entre os grupos COAST e

ARAUC ( $p = 0,01802$ ;  $\pm 0,0121$ ), sendo que SMARSP se diferenciou de todos os outros grupos ( $p \leq 0,05$ ; Tabela. S3 - apêndice).

O parâmetro mutacional ( $\theta$ ) apresentou baixos valores de mutação entre os grupos populacionais analisados ( $\theta_{\text{global}} = 0.068374$ , Tab.1). O número de migrantes entre grupos populacionais na maioria dos casos foi  $< 1$ , o que é considerado baixo, exceto para os grupos populacionais ARAUC e COAST, ILHA e COAST, SMARSP e COAST que tiveram valores  $> 1$  (Tab. 2).

O haplótipo H2 foi o mais frequente, aparecendo em quatro grupos populacionais, exceto na população SMARSP. Alguns haplótipos foram exclusivos de determinados grupos populacionais (e.g. haplótipo 5, exclusivo do grupo ARAUC; Figura 2). A região da Serra do Mar, que se estende desde a região norte do estado de Santa Catarina até o Rio de Janeiro, foi a que apresentou maior diversidade de haplótipos, abrangendo três grupos populacionais (COAST, ARAUC e SMARSP; Figura 2).

O tempo de divergência do ancestral comum, avaliado pelo TMRCA, indicou uma ancestralidade comum entre as linhagens no pleistoceno ( $\sim 1 \text{ Ma} \pm 0,6 \text{ Ma}$ ) com a coalescência dos grupos populacionais ARAUC (haplótipos H7 e H5) e COAST (haplótipos H11 e H21) com os haplótipos do outros grupos (Figura 4-A). A análise EBSP demonstrou evidências de tamanho populacional constante ao longo do tempo (Figura 4-B), com uma queda no início do Holoceno ( $\sim 11\text{ka}$ ).

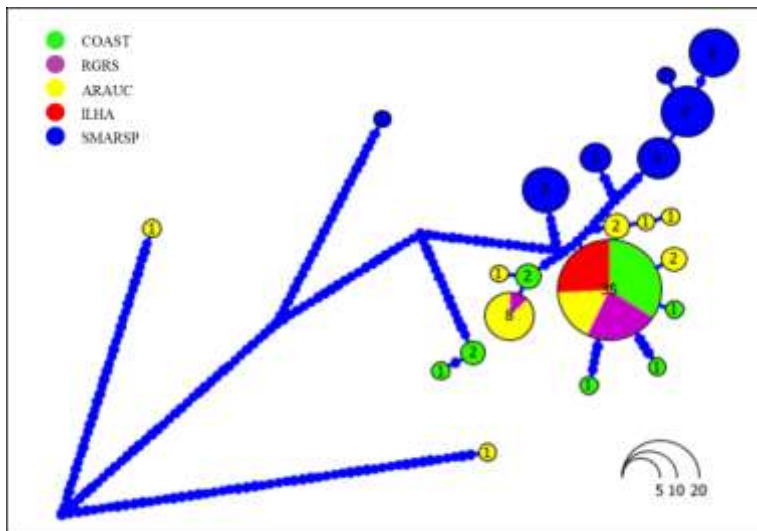


Figura 3. Rede de haplótipos usando *Median-Joining* dos cinco grupos populacionais de *I. henselii* (verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP). Círculos menores em azul indicam variações e os números a quantidade de sequências de cada haplótipo. O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de indivíduos sequenciados.

Tabela 1. Diversidade genética dos grupos populacionais de *I. henselii* baseados nas sequências utilizadas nas análises realizadas no *software* Arlequin 3.5.2.2 e parâmetros demográficos provenientes do *software* LAMARC 2.1.10.

Grupos									
Populacionais	N	k	ss	Hd (SD)	$\pi$ (SD)	F <sub>s</sub>	D	$\theta$	95%CI de $\theta$
				0,0262	0,0272				
COAST	20	6	44	(0,0802)	(0,0144)	-11,78**	-0,5918	0,0233	0,0123 – 0,1128
				0,0538	0,0538		-		
ARAUC	22	9	143	(0,0969)	(0,0275)	-8,11**	1,7519**	0,0563	0,0310 – 0,2581
				0,0231	0,0231				
SMARSP	35	7	66	(0,0780)	(0,0121)	-24,72**	-1,4984	0,0054	0,0027 – 0,0096
				0,0000					
ILHA	9	1	0	(0,0000)	0,0000 (0,000)	34,00	0,0000	5,68E <sup>-5</sup>	0,0001 – 0,0002
				0,0043	0,0043				
RGRS	9	2	8	(0,0307)	(0,0031)	-9,48**	-1,7975*	0,0020	0,0006 – 0,0051
GLOBAL	95	21	158	0,09 (0,11)	0,03 (0,02)	-24,15**	-1,1279	0,0684	0,0523 – 0,0927

N, número de amostras; k, número de haplótipos; ss, número de sítios polimórficos; Hd, diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica; ; F<sub>s</sub>, teste de neutralidade de Fu ; D, D-Tajima; SD, desvio padrão;  $\theta$ , parâmetro de coalescência (ou mutação); 95% CI, intervalo de confiança de 95%. \*p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01.

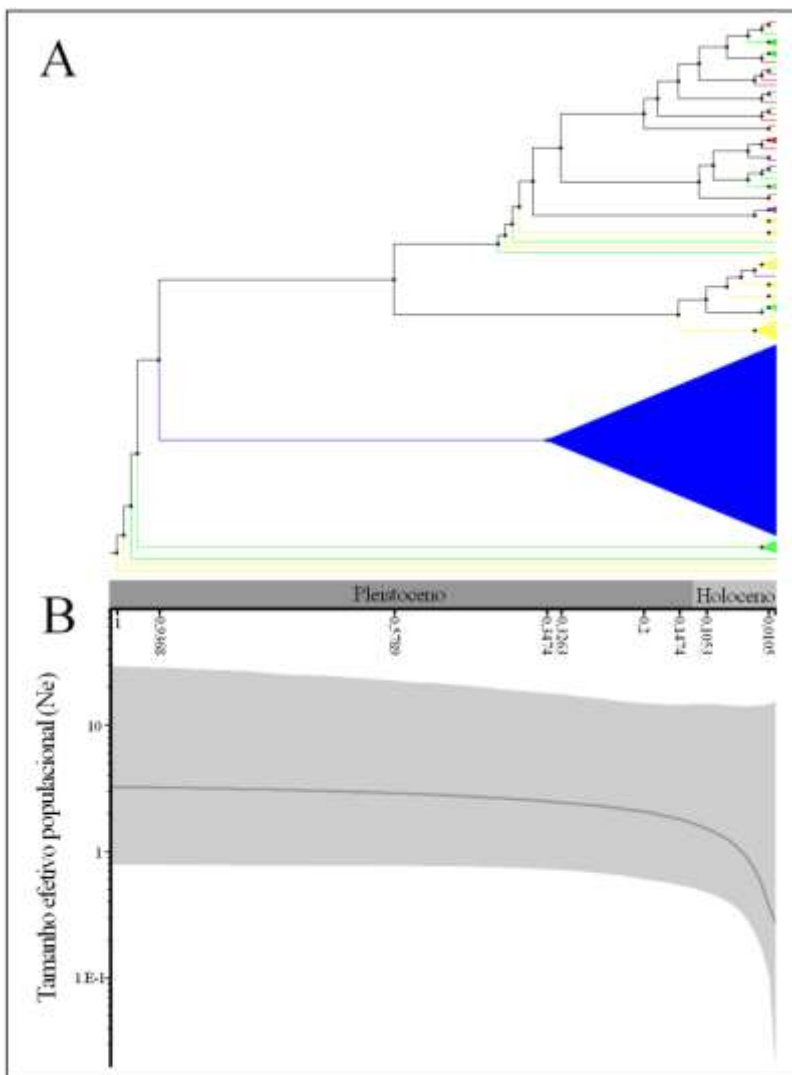


Figura 4. A) Árvore de coalescência para as populações de *I. henselii* (análise TMRCA). B) *Extended Bayesian Skyline Plot* dos tamanhos efetivos populacionais de *I. henselii*. O eixo X de ambos os gráficos representa o tempo (em milhares de anos). As cores da figura A representam os cinco grupos



populacionais do presente estudo: verde – COAST; roxo – RGRS; amarelo – ARAUC; vermelho – ILHA; azul – SMARSP.

Tabela 2. Valores de migração para as combinações par a par entre os grupos populacionais de *I. henselii* conforme resultados do *software* LAMARC. Os números da coluna **Combinações** indicam os pares dos grupos populacionais comparados, conforme COAST = 1; RGRS = 2; ARAUC = 3; ILHA=4; SMARSP = 5.

Combinações	Migração	IC	$\theta$	Migrantes	
M21	9,159	2,153	47,435	0,056	0,516
M31	57,183	22,861	95,503	6,056	<b>3,224</b>
M41	87,678	48,561	99,737	0,056	<b>4,943</b>
M51	21,030	5,368	52,998	0,056	<b>1,186</b>
M12	12,594	2,969	55,650	0,023	0,294
M32	30,910	7,659	91,271	0,023	0,722
M42	9,522	1,373	54,315	0,023	0,222
M52	34,803	15,677	76,503	0,023	0,812
M13	26,133	5,957	95,166	0,000	0,001
M23	82,225	26,021	99,928	0,000	0,005
M43	5,989	-1,319	82,163	0,000	0,000
M53	24,788	1,278	93,296	0,000	0,001
M14	93,890	44,786	100,276	0,002	0,191
M24	91,174	28,127	100,187	0,002	0,185
M34	8,544	-0,900	89,175	0,002	0,017
M54	4,048	-1,021	68,634	0,002	0,008
M15	92,993	38,304	100,372	0,005	0,510
M25	3,034	-0,627	45,667	0,005	0,017
M35	13,848	-0,485	94,355	0,005	0,076
M45	3,107	-0,158	44,494	0,005	0,017

Em **negrito**, maiores valores de número de migrantes.

### 3.2 Modelo de distribuição de *I. henselii*

O agrupamento dos modelos de distribuição de espécies demonstrou que *I. henselii* apresenta uma distribuição potencial (considerando valores de probabilidade  $> 0,6$ ) durante os quatro períodos (presente, 6 ka, 21 ka e 130 ka) e ao longo de uma grande área abrangendo os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul – com um relativo aumento na área durante o último máximo glacial (UMG). Entretanto, a região com maior adequabilidade climática dos modelos se encontra próximo à Serra Geral e Serra do Mar (Figura 5), independentemente do período.

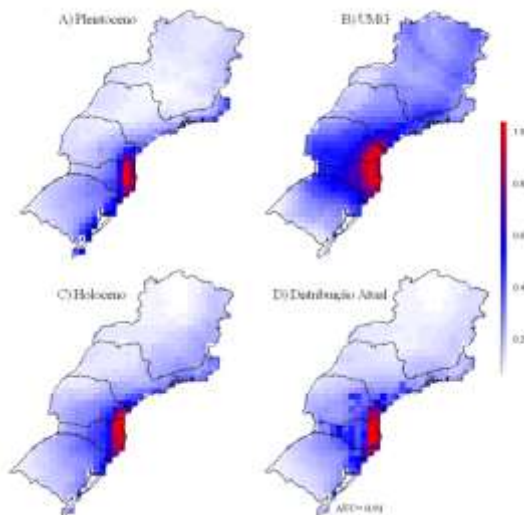


Figura 5. Predições dos modelos de distribuição de *I. henselii* para os tempos: presente; 6ka (Médio-Holoceno); 21ka (UMG); 130ka (Último Máximo

Interglacial). A legenda representa células com maior (em vermelho) e menor adequabilidade climática (em branco) para a espécie.

### 3.3 Morfometria geométrica como padrão fenotípico

A similaridade entre as formas da cabeça dos indivíduos de quatro grupos populacionais de *I. henselii* utilizadas para a análise morfométrica foi demonstrada pelos resultados da ACC (Figura 6 -A e B) e ANOVA. Os resultados da ANOVA não indicaram diferença significativa da forma da cabeça em vista dorsal ( $F = 1,65$ ,  $p = 0,03$ ), nem para a posição lateral ( $F = 1,20$ ,  $p = 0,45$ ), que também pode ser notado pelos resultados da CCA (Figura 6 - A).

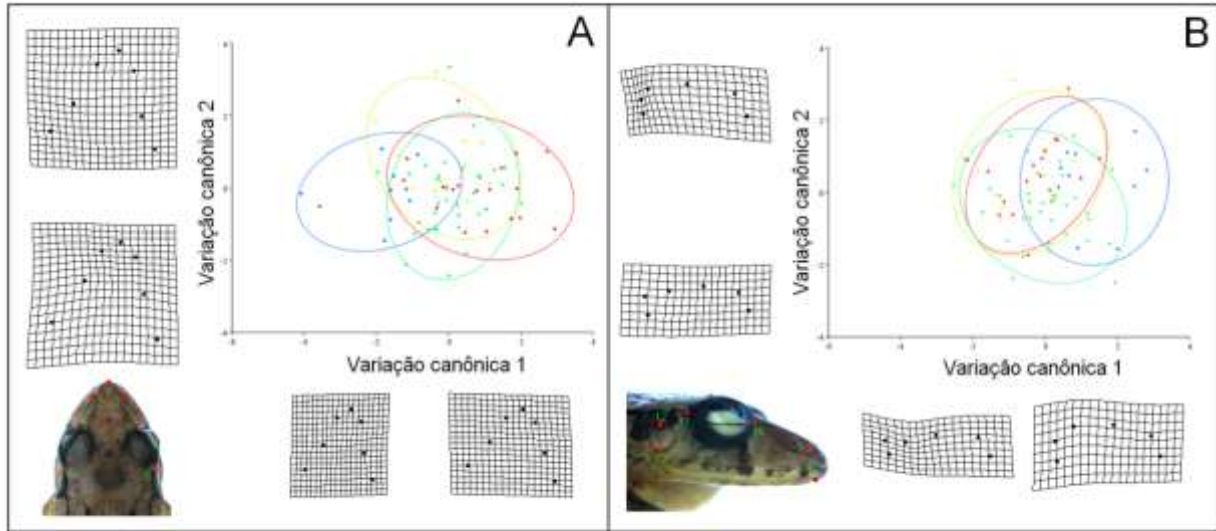


Figura 6. Análise de Correspondência Canônica das formas dos indivíduos de *I. henselii* de quatro grupos populacionais em (A) vista dorsal e em (B) vista lateral. As cores dos pontos e das elipses (95% de intervalo de confiança) demonstram cada uma dos quatro grupos populacionais utilizados para análise: verde, COAST; amarelo, ARAUC; vermelho, ILHA e; azul, SMARSP. Os grids de deformação representam os valores extremos positivos e negativos da variação da forma associadas com o primeiro e segundo eixo canônico, N=75. Os pontos em vermelho nas imagens no canto inferior esquerdo de cada uma das figuras (A e B) indicam os pontos anatômicos (*landmarks*) utilizados para a análise de forma.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que os remanescentes florestais da Serra do Mar e Serra Geral foram fundamentais para a manutenção da estabilidade e continuidade dos grupos populacionais de *I. henselii* ao longo do tempo. Essas evidências corroboram com o encontrado por Carnaval et al (2014) que previram regiões de estabilidade climáticas associadas às encostas de regiões montanhosas e subtropicais para a porção sul da Mata Atlântica. Isso indica que essas regiões foram fundamentais para a persistência e continuidade das populações da espécie, agindo em sua manutenção genética e fenotípica.

Neste estudo, os grupos populacionais da Serra do Mar e Serra Geral concentraram o maior número de haplótipos, com um deles (H2) amplamente distribuído nessa região. Apesar disso, os resultados dos índices de diversidade, AMOVA, rede de haplótipos e árvore de coalescência revelaram ausência de estrutura genética para *I. henselii*. Mesmo assim, algumas populações apresentam aglomerados de haplótipos com alguns exclusivos para cada uma das populações. Este padrão filogeográfico encontrado para *I. henselii*, apesar de não estar de acordo com a hipótese proposta no presente estudo (forte estrutura genética resultado do isolamento das populações nos períodos glaciais) é similar a outros achados (BATALHA-FILHO et al., 2012; PERES et al., 2015; FRANÇOSO et al., 2016).

Trabalhando com *Basileuterus leucoblepharus*, ave com distribuição na região sul da MA, Batalha-Filho et al (2012) foi o primeiro trabalho filogeográfico que indicou pouca estrutura genética para um organismo da MA – o que, posteriormente, também foi

demonstrado para a aranha *Araneus omnicolor* (PERES et al., 2015) e abelhas (FRANÇOSO et al., 2016). Os resultados do presente estudo e destes outros trabalhos são contrários a maior parte dos estudos para outros táxons nesta região (GRAZZIOTIN et al., 2006, CABANNE et al., 2007, CABANNE et al., 2008, CARNAVAL et al., 2009, MARTINS et al., 2010, BATALHA-FILHO et al., 2010, RIBEIRO et al., 2010, THOMÉ et al., 2010, D'HORTA et al., 2011; THOMÉ et al., 2014; BRUNES et al., 2015) que indicam retração populacional nos períodos glaciais e forte estrutura genética, possivelmente causados por eventos de vicariância (HEWITT, 2000).

A análise de TMRCA do gene 16S rRNA indica que as linhagens mais ancestrais de *I. henselii* tiveram uma divergência recente no final do pleistoceno (grupos populacionais ARAUC e COAST), as quais estão distribuídas no ecótono entre Mata de Araucárias e Floresta Atlântica Costeira – localizada na região da Serra do Mar dos estados de Santa Catarina e Paraná (Figura 2 e Figura 4-A). Proximamente relacionado a essas duas linhagens está o grupo populacional SMARSP (Figura 4-A) divergindo há aproximadamente 93 mil anos. Os demais grupos populacionais (ILHA e RGRS) apresentam um tempo de divergência mais recente (Figura 4-A). Esses resultados somados à baixa diversidade genética encontrada entre os grupos populacionais reforça a recente divergência encontrada para a espécie. Entretanto, estudos anteriores revelam uma diversidade mais tardia (entre Plioceno e Pleistoceno) para a maior parte das espécies de anfíbios Neotropicais (JETZ & PYRON, 2018).

A estrutura genética foi afetada espacialmente pela adequabilidade ambiental ao longo do tempo, com diversidade

haplotípica e nucleotídica alta na região central e menor nos limites da distribuição potencial da espécie. Isso sugere que essa é a região mais basal de sua distribuição geográfica, o que também pode ser confirmado pela análise do TMRCA, em que as linhagens mais ancestrais estão presentes no centro de distribuição da espécie. A diversidade mitocondrial alta entre os grupos populacionais é um indicativo de que esses grupos populacionais mantiveram fluxo gênico ao longo do tempo, possivelmente como efeito da persistência em refúgios amplos e contínuos ou da inexistência de gradientes ambientais restritivos. Além disso, o Teste D-Tajima e  $F_s$  de  $F_u$  foram negativos e significativos para os grupos ARAUC e RGRS, sugerindo que esses dois grupos estão em expansão. Esse resultado está de acordo com a hipótese de que tanto a floresta ombrófila densa (Mata Atlântica costeira), quanto a floresta ombrófila mista (Mata com Araucária) estão em expansão para o sul sobre os pampas (SALAZAR et al., 2007; LEDRU et al., 2016).

Contudo, o padrão demonstrado pela análise de tamanho efetivo populacional (EBSP) indica que *I. henselii* não parece ter sofrido com as variações climáticas pleistocênicas e/ou seus refúgios foram amplos e contínuos o suficiente para mantimento das linhagens ao longo de sua distribuição. Esse cenário é suportado pelos modelos de estabilidade climática proposto por Carnaval & Moritz (2008) e Carnaval et al (2009) e corroborados por outros estudos para espécies com micro-endemismo (PIE et al., 2013; FIRKOWSKI et al., 2016).

Efetivamente, os refúgios dos máximos glaciais são bastante relacionados com a ecologia e ambiente em que a espécie está inserida, podendo existir ou não e variar em tamanho e localização (MORITZ et al., 2000). Carnaval et al (2009) demonstraram que para anuros os

padrões filogeográficos são bastante variáveis entre as espécies. O padrão encontrado para *I. henselii* deve estar associado ao fato de esta espécie estar relacionada à diferentes ambientes ao longo de sua distribuição e história de vida, já que se espera que espécies com maior associação a fitofisionomias específicas tendem a ser menos tolerantes a variações climáticas. De fato, *I. henselii* ocupa desde regiões com características subtropicais, a regiões com climas mais extremos, demonstrando a sua alta tolerância ambiental.

Além disso, um trabalho de filogeografia e modelagem de nicho de 25 espécies de vertebrados identificou que a MA apresenta duas regiões climaticamente distintas (CARNAVAL et al., 2014), indicando que a porção sul deste domínio deve ter sofrido expansão no último máximo glacial (LEITE et al., 2016). Isso sugere que *I. henselii* é uma espécie tolerante ao frio, condizendo com a hipótese de que espécies de anfíbios (AMARO et al., 2012) e aves (BATALHA-FILHO et al., 2012) associadas às florestas de regiões montanhosas foram capazes de persistir no último máximo glacial e até ampliar sua distribuição (CARNAVAL et al., 2014).

Hewitt (2000) discute que a estrutura filogeográfica é mais pronunciada quando os grupos de uma espécie passam por períodos recorrentes de fragmentação e isolamento. Como consequência disso, a restrição do fluxo gênico tem grandes efeitos nas diferenças fenotípicas (LANDE, 1980). Em contraste, a uniformidade fenotípica é mais provável se o fluxo gênico for constante entre os grupos populacionais ao longo do tempo ou em caso de forte seleção estabilizante em que há conservação de nicho ancestral (ZAMUDIO et al., 2016). No presente estudo, os resultados indicam uniformidade fenotípica sem estrutura



genética entre os grupos populacionais. Isso sustenta o cenário de uma região com constante adequabilidade ambiental para *I. henselii*, com fluxo gênico entre as linhagens ao longo do tempo recente. Entretanto, como visto pela análise TMRCA, há uma parte da árvore que apresenta estrutura (com o grupo SMARSP em um grupo único). Então, temos uma parte da árvore com estruturação filogeográfica e outra sem estruturação, mas nos dois casos não há variação fenotípica entre os grupos populacionais.

Esses resultados podem ser derivados da retenção de polimorfismo ancestral ou efeito do uso de um único marcador no presente estudo (16S) e resultante de dois quadros em tempos distintos e complementares: I) com linhagens mais antigas (complexo de espécies crípticas *I. henselii*, ver GEHARA et al., 2013) derivadas dos refúgios da Serra do Mar do norte de São Paulo e Rio de Janeiro (modelo de refúgio de CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009; THOMÉ et al., 2010) e; II) expansão de linhagens mais recentes (grupo monofilético *I. henselii* utilizado no presente estudo) em regiões com estabilidade climática. De qualquer forma, os resultados rejeitam a hipótese de existência de retração durante ciclos glaciais e expansão ao longo dos ciclos interglaciais, indicando que o grupo monofilético *I. henselii* apresentou persistência e continuidade ao longo das variações climáticas do quaternário tardio.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a história demográfica das populações de *I. henselii* não suportam a teoria de redução de nicho e retração populacional durante os períodos glaciais do pleistoceno tardio. A ocupação de diferentes ambientes pela espécie e sua associação a encostas parece ter sido responsável pela estabilidade observada para a espécie. Essas observações são diferentes do encontrado para a maior parte dos táxons com grande distribuição na MA, sugerindo que mais estudos com abordagens filogeográficas e o uso de espécies com distribuição mais restritas são importantes para o entendimento da dinâmica da MA. Além disso, esses dados dão suporte à ideia de que a Serra Geral e a Serra do Mar tiveram papel importante na manutenção e diversificação das espécies.

## 6 REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N.. Spaces occupied by the expansion of bry climates in south america during the quaternary ice ages. *Revista do Instituto Geológico*, v. 21, n. 1-2, p. 71-78, 2000.
- AMARO, R. C.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; CARNAVAL, A. C.. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 62, n. 3, p. 880-888, 2012.
- ANDERSON, R. P.; RAZA, A.. The effect of the extent of the study region on GIS models of species geographic distributions and estimates of niche evolution: preliminary tests with montane rodents (genus *Nephelomys*) in Venezuela. *Journal of Biogeography*, v. 37, n. 7, p. 1378-1393, 2010.
- ANGULO, R. J.; LESSA, G. C. The Brazilian sea-level curves: a critical review with emphasis on the curves from the Paranaguá and Cananéia regions. *Marine Geology*, v. 140, n. 1, p. 141-166, 1997.
- ANGULO, R. J.; LESSA, G. C.; DE SOUZA, M. C. A critical review of mid-to late-Holocene sea-level fluctuations on the eastern Brazilian coastline. *Quaternary Science Reviews*, v. 25, n. 5, p. 486-506, 2006.
- ARAÚJO-VIEIRA, K.; LACERDA, J. V. A.; PEZZUTI, T. L. LEITE, F. S. F.; ASSIS, C. L.; CRUZ, C. A. G.. A new species of Hatchet-faced Treefrog *Sphaenorhynchus Tschudi* (Anura: Hylidae) from Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, southeastern Brazil. *Zootaxa*, v. 4059, n. 1, p. 96-114, 2014.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C.. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J.C.. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 2000.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A.. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BATALHA-FILHO, H.; CABANNE, G. S.; MIYAKI, C. Y.. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals

- demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 65, n. 3, p. 892-902, 2012.
- BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A.; TAVARES, M. G.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M.. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, v. 41, n. 5, p. 534-547, 2010.
- BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 17, p. 3754-3774, 2008.
- BEHLING, H.; ARZ, H. W.; PÄTZOLD, J.; WEFER, G.. Late Quaternary vegetational and climate dynamics in southeastern Brazil, inferences from marine cores GeoB 3229-2 and GeoB 3202-1. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 179, n. 3, p. 227-243, 2002.
- BERTOLUCI, J; RODRIGUES, M. T. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, v. 23, p.161-167. 2002.
- BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C. H.; XIE, D.; ... & DRUMMOND, A. J.. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.
- BRITO, P. H.; EDWARDS, S. V.. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, v. 135, n. 3, p. 439-455, 2009.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C.. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.
- BRUFORD, M.W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J.F.Y., BURKE, T., HOELZEL, A.R. Single locus and multilocus DNA fingerprint. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 225–270. 1992
- BRUNES, T. O.; THOMÉ, M. T. C.; ALEXANDRINO, J.; HADDAD, C. F.; SEQUEIRA, F.. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic forest. *Organisms Diversity & Evolution*, v. 15, n. 4, p. 695-710, 2015.

- BUSH, M. B.; OLIVEIRA, P. E.. The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotropica*, v. 6, n. 1, p. 0-0, 2006.
- CABANNE, G. S.; CALDERÓN, L.; TRUJILLO ARIAS, N.; FLORES, P.; PESSOA, R.; D'HORTA, F. M.; MIYAKI, C. Y. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. *Biological journal of the Linnean Society*, v. 119, n. 4, p. 856-872, 2016.
- CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y.. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 49, n. 3, p. 760-773, 2008.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y.. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 91, n. 1, p. 73-84, 2007.
- CABANNE, G. S.; SARI, E. H.; MEYER, D.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y.. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology*, v. 154, n. 2, p. 371-384, 2013.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, v. 323, n. 5915, p. 785-789, 2009.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, v. 35, n. 7, p. 1187-1201, 2008.
- CARNAVAL, A. C.; WALTARI, E.; RODRIGUES, M. T.; ROSAUER, D.; VANDERWAL, J.; DAMASCENO, R.; PRATES, I.; STRANGAS, M.; SPANOS, ZOE.; RIVERA, D.; PIE, M. R.; FIRKOWSKI, C. R.; BORNSCHEIN, M. R.; RIBEIRO, L. F.; MORITZ, C. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proc. R. Soc. B*, v. 281, n. 1792, p. 20141461, 2014.

- CLARK, P. U.; DYKE, A. S.; SHAKUN, J. D.; CARLSON, A. E.; CLARK, J.; WOHLFARTH, B.; ... & MCCABE, A. M. The last glacial maximum. *science*, v. 325, n. 5941, p. 710-714, 2009.
- D'HORTA, F. M.; CABANNE, G. S.; MEYER, D.; MIYAKI, C. Y. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology*, v. 20, n. 9, p. 1923-1935, 2011.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R., POSADA, D. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Meth.* 9, 772. 2012.
- DE RÉ, F. C.; GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; MACHADO, L. P.; MATEUS, R. P.; LORETO, E. L.; ROBE, L. J.. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 112, n. 1, p. 55-66, 2014.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, v. 7, n. 1, p. 214, 2007.
- DRUMMOND, A.J., SUCHARD, M.A., XIE, D., RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.
- DUELLMAN, W. E. The Hylid frogs of middle America. 2. ed. Ithaca, New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1159p. 1970.
- DUELLMAN, W. E. L. TRUEB. Biology of amphibians. JHU press, 1994.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- ELITH, J.; LEATHWICK, J. R. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 40, n. 1, p. 677, 2009.
- ENDLER, J. A. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, n. 10, 1977.
- 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, n. 3, p. 564-567, 2010.

- 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.
- FIELDING, A. H.; J. F. BELL. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental conservation*, v. 24, n. 1, p. 38-49, 1997.
- FIRKOWSKI, C. R.; BORNSCHEIN, M. R.; RIBEIRO, L. F.; PIE, M. R. Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 100, p. 345-360, 2016.
- FITZPATRICK, S. W., BRASILEIRO, C. A., HADDAD, C. F., & ZAMUDIO, K. R. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 13, p. 2877-2896, 2009.
- FJELDSÅ, J.; LOVETT, J. C. Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodiversity & Conservation*, v. 6, n. 3, p. 325-346, 1997.
- FRANÇOZO, E.; ZUNTINI, A. R.; CARNAVAL, A. C.; ARIAS, M. C.. Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savannas: pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. *BMC evolutionary biology*, v. 16, n. 1, p. 267, 2016.
- GARCIA, P. C. A.; VINCIPROVA, G.; HADDAD, C. F.B. The taxonomic status of *Hyla pulchella joaquini* (Anura: Hylidae) with description of its tadpole and vocalization. *Herpetologica*, v. 59, n. 3, p. 350-363, 2003.
- GARRICK, R. C.; BONATELLI, I. A.; HYSENI, C.; MORALES, A.; PELLETIER, T. A.; PEREZ, M. F.; RICE, E.; SATLER, J. D.; SYMULA, R. E.; THOMÉ, M. T. C.; CARSTENS, B. C. The evolution of phylogeographic data sets. *Molecular ecology*, v. 24, n. 6, p. 1164-1171, 2015.
- GEHARA, M.; BARTH, A.; DE OLIVEIRA, E. F.; COSTA, M. A.; HADDAD, C. F. B.; VENCES, M.. Model-based analyses reveal insular population diversification and cryptic frog species in the *Ischnocnema parva* complex in the Atlantic forest of Brazil. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 112, p. 68-78, 2017.

- GEHARA, M.; CANEDO, C.; HADDAD, C. F.; VENCES, M. From widespread to microendemic: molecular and acoustic analyses show that *Ischnocnema guentheri* (Amphibia: Brachycephalidae) is endemic to Rio de Janeiro, Brazil. *Conservation Genetics*, v. 14, n. 5, p. 973-982, 2013.
- GENE [Internet]. BETHESDA (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 – [citado em 29/12/2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
- GOWER, J. C. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, v. 40, n. 1, p. 33-51, 1975.
- GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L.. 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.
- HADDAD, C. F.; PRADO, C. P. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, v. 55, n. 3, p. 207- 217, 2005
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, v. 165, n. 3889, p. 131-137, 1969.
- HEINICKE, M.P., DUELLMAN, W.E., HEDGES, S.B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 24, p. 10092-10097, 2007.
- HELED, J.; DRUMMOND, A. J.. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, v. 8, n. 1, p. 289, 2008.
- HEPP, F.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; CARVALHO-E-SILVA, A. M. P. T.; FOLLY, M.. A fifth species of the genus *Euparkerella* (Griffiths, 1959), the advertisement calls of *E. robusta* Izecksohn, 1988 and *E. tridactyla* Izecksohn, 1988, and a key for the *Euparkerella* species (Anura: Brachycephaloidea: Craugastoridae). *Zootaxa*, v. 3973, n. 2, p. 251-270, 2015.
- HEWITT, G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 359, n. 1442, p. 183-195, 2004.
- HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, v. 405, n. 6789, p. 907-913, 2000.



- HEYER, W.R., RAND, A.S., CRUZ, C.A.G., PEIXOTO, O.L., NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. Arquivos de Zoologia (São Paulo), v. 31, n. 4, p. 231-410, 1990.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; Crandall, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P.F.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 54, n. 1, p. 291-301, 2010.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; ... & JARAMILLO, C.. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *science*, v. 330, n. 6006, p. 927-931, 2010.
- JENKINS, C. N.; PIMM, S. L.; JOPPA, L. N. Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 28, p. E2602-E2610, 2013.
- JETZ, W.; PYRON, R. A.. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nature ecology & evolution*, v. 2, n. 5, p. 850, 2018.
- KLINGENBERG, C. P.; BARLUENGA, M.; MEYER, A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, v. 56, n. 10, p. 1909-1920, 2002.
- KLINGENBERG, C. P.; MCINTYRE, G. S. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, v. 52, n. 5, p. 1363-1375, 1998.
- KLINGENBERG, C. P.; MONTEIRO, L. R. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, v. 54, n. 4, p. 678-688, 2005.
- KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, v. 11, n. 12, p. 2623-2635, 2002.
- KUHNER, M. K. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, v. 22, n. 6, p. 768-770, 2006.
- 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.

- LANDE, R.. Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *The American Naturalist*, v. 116, n. 4, p. 463-479, 1980.
- LARA, M. C.; PATTON, J. L. Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 130, n. 4, p. 661-686, 2000.
- LEDRU, M. P.; MONTADE, V.; BLANCHARD, G.; HÉLY, C. Long-term spatial changes in the distribution of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, v. 48, n. 2, p. 159-169, 2016.
- LEITE, Y. L.; COSTA, L. P.; LOSS, A. C.; ROCHA, R. G.; BATALHA-FILHO, H.; BASTOS, A. C.; ... & PARDINI, R. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 4, p. 1008-1013, 2016.
- LIBRADO, P., ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.
- LIMA-RIBEIRO, M. S.; VARELA, S.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.; DE OLIVEIRA, G.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; TERRIBILE, L. C.. EcoClimate: a database of climate data from multiple models for past, present, and future for macroecologists and biogeographers. *Biodiversity Informatics*, v. 10, 2015.
- LINGNAU, R., GUIMARÃES, L.D.; BASTOS, R.P. Vocalizations of *Hyla weneri* (Anura, Hylidae) in southern Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, v. 3, n. 2, p. 115-120, 2004.
- MARTINS, A.C.J.S., KIEFER, M.C., SIQUEIRA, C.C., VAN SLUYS, M., MENEZES, V.A., ROCHA, C.F. D. Ecology of *Ischnocnema parva* (Anura: Brachycephalidae) at the Atlantic rainforest of Serra da Concórdia, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Zoologia*, v. 27, n. 2, 2010.
- MOREAU, R. E. The bird faunas of Africa and its islands. Academic Press, New York, 424 pp, 1966.
- MORITZ, C.; PATTON, J. L.; SCHNEIDER, C. J.; SMITH, T. B.. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual review of ecology and systematics*, v. 31, n. 1, p. 533-563, 2000.
- MUSCARELLA, R.; GALANTE, P. J.; SOLEY-GUARDIA, M.; BORJA, R. A.; KASS, J. M.; URIARTE, M.; ANDERSON, R. P. ENM eval: An R package for conducting spatially independent

- evaluations and estimating optimal model complexity for Maxent ecological niche models. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 5, n. 11, p. 1198-1205, 2014.
- NEI, M.. Molecular evolutionary genetics. In: Columbia university press. New York, p. 512, 1987.
- OSWALD, C. B. O status taxonômico de *Ischnocnema manezinho* (Garcia, 1996) (Anura: Brachycephalidae). 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2016.
- PAZ, A.; SPANOS, Z.; BROWN, J. L.; LYRA, M.; HADDAD, C.; RODRIGUES, M.; CARNAVAL, A. Phylogeography of Atlantic Forest glassfrogs (Vitreorana): when geography, climate dynamics and rivers matter. *Heredity*, p. 1, 2018.
- PERES, E. A.; SOBRAL-SOUZA, T.; PEREZ, M. F.; BONATELLI, I. A.; SILVA, D. P.; SILVA, M. J.; SOLFERINI, V. N.. Pleistocene niche stability and lineage diversification in the subtropical spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PLoS one*, v. 10, n. 4, p. e0121543, 2015.
- PETERS, W. C. H.. Über neue Amphien (Hemidactylus, Urosaura, Tropidolepisma, Geophis, Uriechis, Scaphiophis, Hoplocephalus, Rana, Entomoglossus, Cystignathus, Hylodes, Arthroleptis, Phyllobates, Cophomantis) des Königlich Zoologisch Museum. *Monatsberichte der Königlich Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin* pp. 641–652. 1870.
- PIE, M. R.; FAIRCLOTH, B. C.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R.; MCCORMACK, J. E.. Phylogenomics of montane frogs of the Brazilian Atlantic Forest is consistent with isolation in sky islands followed by climatic stability. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 125, n. 1, p. 72-82, 2018.
- PIE, M. R.; MEYER, A. L.; FIRKOWSKI, C. R.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (Brachycephalus spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecological Modelling*, v. 250, p. 165-176, 2013.
- PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E.. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling*, v. 190, n. 3-4, p. 231-259, 2006.
- R CORE TEAM (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- RAMBAUT, A. FigTree. Tree figure drawing tool. 1.4. 3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. URL < <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2016.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.*, v. 10, 2018.
- RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B.. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, v. 106, n. 1, p. 46, 2011.
- ROHLF, F. J. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2005.
- ROHLF, F. J.; LOY, A.; CORTI, M. Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematic Biology*, v. 45, n. 3, p. 344-362, 1996.
- SALAZAR, L. F.; NOBRE, C. A.; OYAMA, M. D. Climate change consequences on the biome distribution in tropical South America. *Geophysical Research Letters*, v. 34, n. 9, 2007.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L.. História ecológica da Terra. Edgard Blücher, 1994.
- SANDEL, B.; ARGE, L.; DALSGAARD, B.; DAVIES, R. G.; GASTON, K. J.; SUTHERLAND, W. J.; SVENNING, J. C. The influence of Late Quaternary climate-change velocity on species endemism. *Science*, p. 1210173, 2011.
- SILVA, J. M. C.; STRAUBE, F. C. Systematics and biogeography of scaled woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 31, n. 1, p. 3-10, 1996.
- STEPHENS, M., SMITH, N.J., DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, v. 68, n. 4, p. 978-989, 2001.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- THOMÉ, M. T. C., ZAMUDIO, K. R., GIOVANELLI, J. G., HADDAD, C. F., BALDISSERA JR, F. A.; ALEXANDRINO, J.

- Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 55, n. 3, p. 1018-1031, 2010.
- THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; HADDAD, C. F.; ALEXANDRINO, J.. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 23, n. 24, p. 6152-6164, 2014.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology*, v. 22, n. 5, p. 1193-1213, 2013.
- VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E. E.. The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 34, n. 23, p. 251-255, 1981.
- WALLACE, B.. The estimation of adaptive values of experimental populations. *Evolution*, v. 6, n. 3, p. 333-341, 1952.
- WEBB III, T.; BARTLEIN, P. J.. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual review of Ecology and Systematics*, v. 23, n. 1, p. 141-173, 1992.
- WRIGHT, S.. Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, n. 2, p. 114, 1943.
- ZAMUDIO, K. R.; BELL, R. C.; MASON, N. A. Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 29, p. 8041-8048, 2016.

## Apêndice

Tabela S1. Locais de amostragem de *Ischnocnema.henselii*, com detalhe sobre a origem do material (coleções), a qual coleção pertence (definidas no presente estudo) e finalidade: análise morfométrica (M); genética (G); bem como a procedência do dado: \*GenBank (depositados do trabalho de Gehara et al., 2017); °presente estudo.

Localização	Finalidade	Origem	População	Número de espécimes	
				M	G
Adrianópolis, PR	G	CFBH*	COAST	--	2
Angelina, SC	M	CFBH*	COAST	2	--
Anitápolis, SC	G/M	CHUFSC °	ARAUC	2	4
Apiúna, SC	G/M	CFBHT°	COAST	1	1
Araranguá, SC	M	CHUFSC	COAST	1	--
Atibaia, SP	G	CFBHT°	SMARSP	--	1
Biritiba Mirim, SP	G	CHUFSC°	SMARSP	--	2
Bocaiúva do Sul, SC	G	MCP°	COAST	--	1
Bom Retiro, SC	G/M	CHUFSC	ARAUC	3	1
Bombinhas, SC	G/M	CAUC°/MCP°	ARAUC	2	1
Caçador, SC	M	CAUC°	ARAUC	1	--
Campo Belo do Sul, SC	G/M	CFBH*	RGRS	1	3
Caraá, RS	G	MCP°	ARAUC	--	1
Chapecó, SC	G	CFBHT°	ARAUC	--	1
Concórdia, SC	G	MCP°	ARAUC	--	1
Cotia, SP	G	CHUFSC°	SMARSP	--	1
Florianópolis, SC	G/M	CFBHT°	ILHA	18	9
Garuva, SC	G	CFBHT°	COAST	--	1
Governador Celso Ramos, SC	M	MCP°	COAST	1	--
Gravataí, RS	G	CFBH*	RGRS	--	1
Guapira, SP	G	MCP°	COAST	--	1
Guaramirim, SC	G/M	MZUSP*/ZUECAM P	SMARSP	6	2
Intervales, SP	G	MTR*	SMARSP	--	1
Itanhaém, SP	G	CFBH*	SMARSP	--	7
Itapema, SC	M	MTR*	COAST	1	--

Itapoá, SC	M	CHUFSC	COAST	1	--
Jaraguá do Sul, SC	G	CFBHT <sup>o</sup>	COAST	--	2
Joinville, SC	G/M	CFBH*	COAST	4	1
Maquiné, RS	G	MCP <sup>o</sup>	RGRS	--	1
Misiones, Argentina	G	CFBH*	ARAUC	--	1
Ortigueira, PR	G	CFBH*	ARAUC	--	1
Palma Sola, SC	G	CHUFSC <sup>o</sup>	ARAUC	--	1
Paranapiacaba, SP	G	MTR*	SMARSP	--	1
Parnaíba, SP	G	MTR*	SMARSP	--	1
Peruíbe, SP	G	MCP*	SMARSP	--	3
Piraquara, PR	G	CHUFSC*	ARAUC	--	3
Rancho Queimado, SC	G	CFBHT <sup>o</sup> /CFBH*	ARAUC	--	1
Ribeirão Grande, SP	G/M	CFBH*/ZUECAMP	SMARSP	1	2
Santo Amaro da Imperatriz, SC	G/M	CHUFSC <sup>o</sup>	ARAUC	4	1
São Bento do Sul, SC	G/M	CHUFSC <sup>o</sup>	ARAUC	2	2
São Bernardo do Campo, SP	G	CHUFSC <sup>o</sup>	SMARSP	--	8
São Bonifácio, SC	G	CFBH*	COAST	--	6
São Francisco de Paula, SC	G/M	CFBHT <sup>o</sup>	RGRS	1	6
São Francisco do Sul, SC	G/M	CFBHT <sup>o</sup> /CHUFSC	COAST	2	3
São Luiz do Paraitinga, SP	M	ZUECAMP	SMARSP	8	--
São Paulo, SP	G/M	CFBHT <sup>o</sup> */ZUECA MP	SMARSP	1	6
São Pedro, Siderópolis	M	CHUFSC	COAST	8	--
Serra do Faxinal, SC	M	CHUFSC	ARAUC	1	--
Tapiraí, SP	G	CFBH*	SMARSP	--	1
Treviso, SC	G	CFBH*	COAST	--	1
Vacaria, RS	M	CHUFSC	RGRS	1	--
Vargem, SC	G/M	CHUFSC <sup>o</sup> /ZUECA MP	ARAUC	2	1

Figura S1. Distribuição potencial de *Ischnocnema henselii*. Foram mantidas células com probabilidades de ocorrência maiores que 0,5.

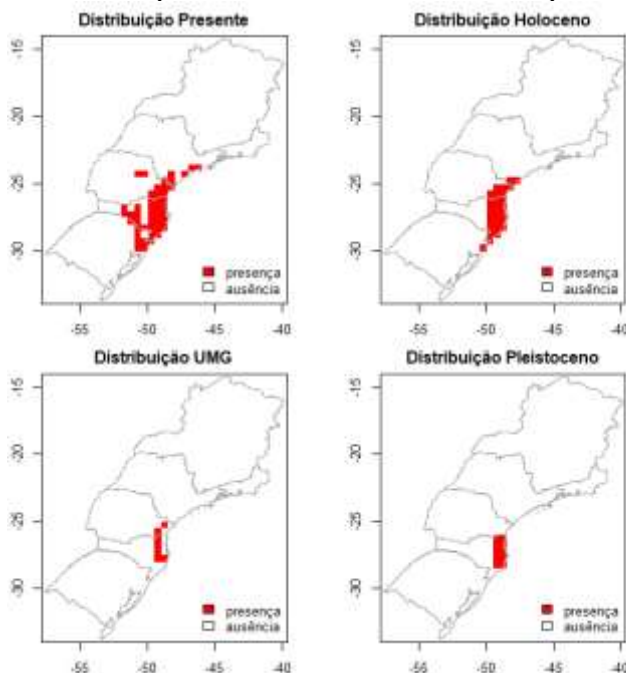


Figura S1. Distribuição potencial de *I. henselii*. Foram mantidas células com probabilidade de ocorrência maiores que 0,5.

Tabela S2. Pontos de distribuição utilizados para a modelagem de nicho potencial de *Ischnocnema henselii*, incluindo localização, coleção a qual pertencem e fonte dos dados.

Localização	Coleção/voucher	Fonte
Fazenda Rio Grande, PR	DZSJRP 8860	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Fazenda Rio Grande, PR	DZSJRP 888S	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Fazenda Rio Grande, PR	DZSJRP 8889	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP 6199	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP6 198	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	OZSJRP 6183	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP6 184	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.



São José dos Pinhas, PR	DZSJRP6 185	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP 6188	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP6Z24	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP 6215	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP 6304	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Várgem Bonita, SC	DZSJRP 13506	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
São José dos Pinhas, PR	DZSJRP 13507	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
FLONA de Irati, PR	DZSJRP 13513	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Várgem Bonita, SC	DZSJRP 13351	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
PARNA das Araucarias, SC	DZSJRP 13191	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
PARNA das Araucarias, SC	DZSJRP 13192	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Telemaco Borba, PR	-	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Tijucas do Sul, PR	-	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Fazenda Rio Grande, PR	-	Conte, Carlos Eduardo, et al., 2010.
Lebon Regis, SC	-	LINGNAU, R. 2008.
Rancho Queimado, SC	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
Aguas Mornas, SC	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
Florianópolis, SC	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
Canela, RS	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
São Francisco de Paula, RS	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
Maquine, RS	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
São Leopoldo, RS	-	KWET, A. & SOLÉ, M. 2005.
Blumenau, SC	MCP	<i>Species Link</i>
Vacaria, RS	MCP	<i>Species Link</i>
Porto Alegre, RS	-	Dietl, J.; Engels, W.; Solé, M. 2009
Tapiraí, SP	CFBH-T 10987	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Paulo, SP	CFBH-T 12525	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Paulo, SP	CFBH-T 12533	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Paulo, SP	CFBH-T 12534	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Ribeirão Grande, SP	CFBH-T 12680	Gehara, Marcelo, et al. 2013

Adrianópolis,PR	CFBH-T 13126	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Adrianópolis,PR	CFBH-T 13127	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13205	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13206	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13207	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13208	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13209	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bonifácio,SC	CFBH-T 13210*	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Pedro, Missiones,Argentina	CFBH-T 13826	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Paulo,SP	CFBH-T 1915	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Treviso,SC	CFBH-T 1924	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Anitápolis,SC	CFBH-T 2088	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Anitápolis,SC	CFBH-T 2089	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Rancho Queimado,SC	CFBH-T 2890	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Anitápolis,SC	CFBH-T 2891	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Piraquara,PR	CFBH-T 3062	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Piraquara,PR	CFBH-T 3063	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Piraquara,PR	CFBH-T 3064	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Cotia,SP	CFBH-T 3109	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3146	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3147	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3153	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3156	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3160	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3162	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Biritiba Mirim,SP	CFBH-T 3167	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bento do Sul,SC	CFBH-T 3255	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3871	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 3880	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3883	Gehara, Marcelo, et al. 2013

São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3884	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3886	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3900	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3901	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Bernardo do Campo,SP	CFBH-T 3905	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Biritiba Mirim,SP	CFBH-T 3917	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Guapira,SP	CFBH-T 4237	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Ribeirão Grande,SP	CFBH-T 5609	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itanhaém,SP	CFBH-T 6921	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Peruíbe,SP	CFBH-T 8751	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Peruíbe,SP	CFBH-T 8755	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Peruíbe,SP	CFBH-T 9713	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Campo Belo do Sul,SC	MCP 10561	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Campo Belo do Sul,SC	MCP 10565	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Francisco de Paula,RS	MCP 10700	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Francisco de Paula,RS	MCP 10702	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Francisco de Paula,RS	MCP 10703	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Francisco de Paula,RS	MCP 10704	Gehara, Marcelo, et al. 2013
São Francisco de Paula,RS	MCP 10762	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Intervales,SP	USP-T CX012ST34	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Ortigueira,PR	USP-T CX027ST18	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Paranapiacaba,SP	USP-T CX067ST43	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Parnaíba,SP	USP-T CX128ST05	Gehara, Marcelo, et al. 2013
Itapoá, SC	CHUFSC 2120	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2218	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2220	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2221	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2222	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2230	Consultado na coleção
Praia Grande, SC, Serra do Faxinal	CHUFSC 2255	Consultado na coleção
Sto. Amaro da Imperatriz, SC	CHUFSC 2368	Consultado na coleção

Itapoá, SC, São Francisco do Sul, SC, RPPN - Vega do Sul	CHUFSC 2495	Consultado na coleção
	CHUFSC 2496	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 2574	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Poção	CHUFSC 2579	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Lagoa do Peri	CHUFSC 2582	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Maciço da Costeira (Poção)	CHUFSC 2589	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Lagoa do Peri	CHUFSC 2591	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Lagoa do Peri	CHUFSC 2592	Consultado na coleção
Vargem, SC, UHE São Roque	CHUFSC 2716	Consultado na coleção
Vargem, SC, UHE São Roque	CHUFSC 2717	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Maciço da Costeira (Poção)	CHUFSC 2744	Consultado na coleção
Bombinhas, SC, ARIE Zimbros	CHUFSC 2873	Consultado na coleção
Bombinhas, SC, ARIE Zimbros	CHUFSC 2874	Consultado na coleção
Bombinhas, SC, ARIE Zimbros	CHUFSC 2901	Consultado na coleção
Joinville, SC, Campus UFSC	CHUFSC 2919	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 2940	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 2941	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Maciço da Costeira	CHUFSC 2942	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Lagoa do Peri	CHUFSC 2943	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Maciço da Costeira	CHUFSC 3015	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3063	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3064	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3065	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Parque Municipal Lagoa do Peri	CHUFSC 3067	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3068	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3092	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3093	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3094	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3095	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3096	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3097	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3098	Consultado na coleção

Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3099	Consultado na coleção
Anitópolis, SC, Gruta Nossa Senhora	CHUFSC 3199	Consultado na coleção
São Francisco do Sul, SC, Módulo 2	CHUFSC 3266	Consultado na coleção
Guaramirim, SC, H3	CHUFSC 3267	Consultado na coleção
Guaramirim, SC, H3	CHUFSC 3268	Consultado na coleção
Guaramirim, SC, H3	CHUFSC 3269	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3270	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Paque Municipal do Maciço da Costeira	CHUFSC 3271	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3272	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3273	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3274	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3275	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3276	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3277	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3278	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3279	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3280	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3281	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3282	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3283	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3284	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3285	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3286	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3287	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3288	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, UCAD	CHUFSC 3289	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3356	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3358	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3359	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3361	Consultado na coleção
São Francisco do Sul, SC	CHUFSC 3376	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3384	Consultado na coleção

Guaramirim, SC	CHUFSC 3385	Consultado na coleção
São Francisco do Sul, SC	CHUFSC 3392	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3395	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3397	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3398	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3399	Consultado na coleção
Guaramirim, SC	CHUFSC 3400	Consultado na coleção
Apiúna, SC	CHUFSC 3201	Consultado na coleção
Bom Retiro, SC, RPPN - Grande Floresta Araucárias	CHUFSC 3440	Consultado na coleção
Santo Amaro, SC, Hotel Caldas da Imperatriz	CHUFSC 3450	Consultado na coleção
Santo Amaro da Imperatriz, SC, Hotel Plaza	CHUFSC 3817	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Morro da Lagoa	CHUFSC 3819	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Morro da Lagoa	CHUFSC 3820	Consultado na coleção
Florianópolis, SC, Morro da Lagoa	CHUFSC 3821	Consultado na coleção
São Bento do Sul, SC, CEPA Rugentas	CHUFSC 3881	Consultado na coleção
São Bento do Sul, SC, CEPA Rugentas Parque Nacional da Serra Geral, Cambará do Sul, RS, Brasil	CHUFSC 3891 MCP 000012357	Consultado na coleção <i>Species link</i>
Potreiro Novo, São Francisco de Paula, RS, Brasil	MCP 000010700	<i>Species link</i>
São Francisco de Paula, RS, Brasil Parque Estadual da Serra do Mar, São Luiz do Paraitinga, São Paul Floresta Nacional de Irati, Fernandes Pinheiro, Paraná, Brasil	MCP 000006649 ZUEC-AMP 23060 DZSJRP 13513	<i>Species link</i> <i>Species link</i> <i>Species link</i>
São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	UFMG-AMP 34	<i>Species link</i>
Parque Nacional da Serra Geral, Cambará do Sul, RS, Brasil	MCP 000012364	<i>Species link</i>
São Luiz do Paraitinga, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 22846	<i>Species link</i>
Zoológico de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 19531	<i>Species link</i>
Sítio do Saulo, Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 6974	<i>Species link</i>
Instituto Botânico, São Paulo, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 19532	<i>Species link</i>
Potreiro Novo, São Francisco de Paula, RS, Brasil	MCP 000003683	<i>Species link</i>
RPPN Chácara Edith, Brusque, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 10089	<i>Species link</i>
Barra do Ouro, Maquiné, RS, Brasil	MCP 000012155	<i>Species link</i>

Parque Nacional Serra do Itajaí, Apiúna, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 18019	<i>Species link</i>
São Bento do Sul, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 16691	<i>Species link</i>
Parque Estadual da Serra do Mar, São Luiz do Paraitinga, São Paulo	ZUEC-AMP 23063	<i>Species link</i>
Parque Estadual de Caxambu, Castro, Paraná, Brasil	DZSJRP 14041	<i>Species link</i>
Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil	DZSJRP 8885	<i>Species link</i>
São Luiz do Paraitinga, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 22841	<i>Species link</i>
Celulose Irani, Vargem Bonita, Santa Catarina, Brasil	DZSJRP 13506	<i>Species link</i>
Parque Estadual Fontes do Ipiranga - São Paulo, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 19535	<i>Species link</i>
Fazenda dos Gateados, Campo Belo do Sul, SC, Brasil	MCP 000010561	<i>Species link</i>
Instituto Botânico, São Paulo, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 19533	<i>Species link</i>
Porto Estácio, Torres, RS, Brasil	MCP 000000327	<i>Species link</i>
Parque Estadual de Caxambu, Castro, Paraná, Brasil	DZSJRP 14042	<i>Species link</i>
Rio Vermelho, São Bento do Sul, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 10472	<i>Species link</i>
Parque Nacional das Araucárias, Ponte Serrada, Santa Catarina, Brasil	DZSJRP 13192	<i>Species link</i>
Gravataí, RS, Brasil	MCP 000011163	<i>Species link</i>
Cascata da Cortina, Timbé do Sul, SC, Brasil	MCP 000012355	<i>Species link</i>
Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil	DZSJRP 8860	<i>Species link</i>
Gravataí, RS, Brasil	MCP 000011153	<i>Species link</i>
Parque Ecológico Klabin, Telemaco Borba, Parana, Brasil	MZUEL 1768	<i>Species link</i>
Rio Negro, Paraná, Brasil	DZSJRP 13514	<i>Species link</i>
Parque Estadual da Serra Furada, Orleans, Santa Catarina, Brazil	FNJV 0032400	<i>Species link</i>
Vila da Glória, São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 10211	<i>Species link</i>
Jaguariaíva, Paraná, Brasil	DZSJRP 13588	<i>Species link</i>
Curitiba, SC	MCP 000010342	<i>Species link</i>
Aratinga, São Francisco de Paula, RS, Brasil	MCP 000010704	<i>Species link</i>
Florianópolis, SC, UCAD	MCP 000008281	<i>Species link</i>
Parque Nacional dos Campos Gerais, Ponta Grossa, Paraná, Brazil	FNJV 0033554	<i>Species link</i>
Parque das Nascentes, Blumenau, SC, Brasil	MCP 000008677	<i>Species link</i>
Serro e Gemido, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil	DZSJRP 13351	<i>Species link</i>
Lauro Muller, SC, Brasil	MCP 000012354	<i>Species link</i>

Piraí do Sul, Paraná, Brasil - FLONA 43 - Banhado dos perdidos	DZSJRP 14144	<i>Species link</i>
Celulose Irani, Vargem Bonita, Santa Catarina, Brasil	DZSJRP 13507	<i>Species link</i>
Flona S. F. Paula Rio Grande do Sul, Brasil	UFMG-AMP 32	<i>Species link</i>
Parque Nacional do Itajaí, Blumenau, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 30	<i>Species link</i>
Parque das Nascentes, Blumenau, SC, Brasil	MCP 000008678	<i>Species link</i>
Vidal Ramos, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 3270	<i>Species link</i>
Serra da Boa Vista, Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 7021	<i>Species link</i>
Jaguariaíva, Paraná, Brasil	DZSJRP 13589	<i>Species link</i>
Caraá, RS, Brasil	MCP 000013171	<i>Species link</i>
Parque Nacional da Serra Geral, Cambará do Sul, RS, Brasil	MCP 000012356	<i>Species link</i>
Parque Nacional Serra do Itajaí, Apiúna, Santa Catarina, Brasil	UFMG-AMP 18018	<i>Species link</i>
Tijucas do Sul, Paraná, Brasil	DZSJRP 9062	<i>Species link</i>
U.H.E. Barra Grande, Vacaria, RS, Brasil	MCP 000008399	<i>Species link</i>
Fazenda Rio Grande, Paraná, Brasil	DZSJRP 8889	<i>Species link</i>
Atibaia, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 22722	<i>Species link</i>
Ribeirão Grande, São Paulo, Brasil	ZUEC-AMP 20559	<i>Species link</i>

Tabela S3. Resultado do *F<sub>st</sub>* para a par gerado pelo *software* Arlequin 3.5.2.2.

Populações	COAST	RGRS	ARAUC	ILHA
COAST	-			
RGRS	0,61261+-0,0379	-		
ARAUC	0,01802+-0,0121*	0,16216+-0,0353	-	
ILHA	0,22523+-0,0339	0,99099+-0,0030	0,13514+-0,0311	-
SMARSP	0,00000+-0,0000*	0,00000+-0,0000*	0,00000+-0,0000*	0,00000+-0,0000*

\*representa resultados significativos com  $p < 0,05$