



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA
VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Dendropsophus sanborni EN LAGUNAS PERMANENTES DEL MUNICIPIO DE
SÃO LOURENÇO DO OESTE-SC Y PALMAS-PR**

MARIA ALEJANDRA CASTAÑEDA BARRERA

Proyecto de TCC II presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la vida y de la naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latino-americana, como requisito parcial a la obtención del título de Bacharel en Ciencias Biológicas- Ecología y biodiversidad

Orientador: Prof. Dr. Michel Varajão Garey
Coorientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Foz do Iguaçu-PR
2024

MARIA ALEJANDRA CASTAÑEDA BARRERA

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Dendropsophus sanborni EN LAGUNAS PERMANENTES DEL MUNICIPIO
DE SÃO LOURENÇO DO OESTE, SC Y MUNICIPIO DE PALMAS/PR.**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas - Ecología y Biodiversidad.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.
Michel Varajão Garey

Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Coorientador: Prof. Dr.
Profesor Vladimir Pavan Margarido

Prof. Dr. Roberto Larindondo Lui

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____

AGRADECIMIENTOS

A la UNILA, por ser un proyecto integrador que transformó mi realidad a través de la educación, permitiéndome vivenciar otras perspectivas que enriquecieron mi crecimiento personal y académico, y por el apoyo económico brindado a través del edital de apoyo al TCC, que hizo posible la culminación de este trabajo. A mi orientador, Michel Varajão Garey, por permitirme participar en este trabajo, por su compromiso y claridad al explicar. A mi coorientador, Vladimir Pavan Mardarido, por su enseñanza y hospitalidad. A los profesores Luiz Henrique Garcia Pereira y Roberto Laridondo Lui, por aceptar evaluar este trabajo, cuyas contribuciones son clave para su realización. A Julieta Cuevas por el apoyo en Qgis y a Gabriela Vasquez por su apoyo en el laboratorio. Agradezco a Evelyn Camila Lampugnani por su trabajo previo en la obtención del material y datos que sirvieron de eje central para este estudio.

A mis compañeras y compañeros de turma con los cuales llevo recuerdos invaluable de la sala de aula, campo y el bar-mercado de Big Rio. Quiero agradecer también a las personas que formaron parte de mi vida y de mi proceso académico en momentos importantes. Aunque ahora nuestras vidas sean diferentes y ya no estemos tan cerca, su apoyo y amistad fueron fundamentales para mi crecimiento. Cada charla y reto que compartimos me ayudó a ser quien soy hoy. Siempre llevaré en el corazón el impacto que tuvieron en mi camino. A mis psicólogas, Laura, quien me acompañó, y Larissa, quien me apoya en este viaje académico. Agradezco profundamente su ayuda para encontrar herramientas y apoyo en este proceso.

A mi padre, Pablo Castañeda, por ser mi mayor fan y por creer en mí, siempre alentándome a alcanzar lo posible e imposible. Y a mi tía Laura Castañeda, por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando más lo necesitaba desde la distancia.

A mis amigas de Colombia Caterine Gómez, Paula Yopasa y Maria Fernanda Hueso, porque aun en la distancia con una palabra de aliento me impulsaron y me dignificaron de diversas maneras, las admiro y quiero muchísimo por siempre. A

Oscary, por estos años juntas en la universidad, por compartir comidas, historias y crecer juntas personal y académicamente. A mi amiga perruna, Pola, por ser mi fiel compañía en cada paso desde 2018, explorando juntas las calles y casas de Foz de Iguaçu.

A Emanuely Gestal, por el apoyo tan esencial en esta etapa de mi vida, gracias por encarar este mundo conmigo y hacerlo más bonito. Por ser mi amor y espacio seguro junto a la Suri-gata e incentivarme a crecer cada día más.

Y finalmente, quiero agradecer a todas las mujeres que fueron gestoras y motor de todo mi proceso de formación hasta aquí, que han sido mis cuidadoras, mi inspiración y mis guías. A mi abuela Rosa María Rojas Guayacán, mujer campesina y luchadora, por su amor incondicional y enseñanzas sobre la vida y la naturaleza. A mi madre, Maria Isabel Barrera Rojas, por ser una fuerza e inspiración constante en mi vida y juntas crecer a través del diálogo y cariño. A mis tías Celmira Barrera, por siempre incentivarme a ser independiente y persistente, respetando incluso nuestras diferencias en la visión de la vida, y a Luz Mery Barrera, por su apoyo fundamental en mi estadía aquí en Brasil. Por apoyarme en cada paso de este camino y por el amor incondicional que siempre me han brindado, haciéndome sentir como una hija más. Este logro también es de ustedes, las amo.

CASTAÑEDA BARRERA, Maria Alejandra. **DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *DENDROPSOPHUS SANBORNI* EN LAGUNAS PERMANENTES DEL MUNICIPIO DE SÃO LOURENÇO DO OESTE-SC Y PALMAS-PR.** Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas: Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024. 32

RESUMEN

Uno de los principales factores antropogénicos que afecta la distribución de la biodiversidad son los cambios en el uso y ocupación del suelo (GRIMM et al., 2008; MCGILL et al., 2015). El aislamiento de las comunidades o la reducción del intercambio entre subpoblaciones puede generar restricciones en los cambios demográficos, disminución del flujo génico y una reducción en el tamaño poblacional (COSGROVE et al., 2017). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad y estructura genética de la rana *Dendropsophus sanborni* (Lissamphibia, Hylidae) en lagunas permanentes situadas en los municipios de Palmas, en el estado de Paraná, y São Lourenço do Oeste, en el estado de Santa Catarina, mediante el marcador molecular mitocondrial D-Loop. Las ranas fueron estudiadas en dos tipos de tratamiento del paisaje: áreas conservadas y áreas no conservadas. Se evaluó, identificó y cuantificó la diversidad genética utilizando índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, así como el número de alelos y sitios polimórficos, y la distribución de los haplotipos mediante una red haplotípica. La estructura genética de las poblaciones se analizó mediante AMOVA (Análisis de Varianza Molecular), BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure), y los índices de diferenciación genética F_{st} , G_{ST} y N_{ST} . Las áreas no conservadas presentaron índices de diversidad genética menores en comparación con las áreas conservadas. Se observó una estructuración genética significativa entre las poblaciones de las áreas conservadas y no conservadas, siendo las poblaciones de las áreas no conservadas las que presentaron una estructura de metapoblación. Sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre la distancia geográfica y la diferenciación genética entre las poblaciones. Este patrón sugiere que, aunque el aislamiento geográfico no sea el principal factor determinante de la diferenciación genética, otros factores ambientales podrían estar influyendo en la estructura observada. Además, se identificaron posibles efectos de deriva genética debido al aislamiento de las poblaciones en las áreas no conservadas. Este estudio muestra el importante impacto de la conservación del paisaje en la diversidad y estructura genética de *Dendropsophus sanborni*. Estas observaciones muestran la importancia de conservar los hábitats para mantener la conectividad y el flujo de genes entre las poblaciones, lo cual es vital para conservar la especie en el futuro.

Palabras-clave: diversidad genética; estructura genética; *Dendropsophus sanborni*; marcador molecular

CASTAÑEDA BARRERA, Maria Alejandra. **DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *DENDROPSOPHUS SANBORNI* EN LAGUNAS PERMANENTES DEL MUNICIPIO DE SÃO LOURENÇO DO OESTE-SC Y PALMAS-PR.** Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas: Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024. 32

RESUMO

Um dos principais fatores antrópicos que afetam a distribuição da biodiversidade são as mudanças no uso e ocupação do solo (GRIMM et al., 2008; MCGILL et al., 2015). O isolamento das comunidades ou a redução do intercâmbio entre subpopulações pode gerar restrições às mudanças demográficas, diminuição do fluxo gênico e redução do tamanho populacional (COSGROVE et al., 2017). Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética da rã *Dendropsophus sanborni* (Lissamphibia, Hylidae) em lagoas permanentes localizadas nos municípios de Palmas, no estado do Paraná, e São Lourenço do Oeste, no estado do Paraná, estado de Santa Catarina, utilizando o marcador molecular mitocondrial D-Loop. Os anuros foram estudados em dois tipos de tratamento paisagístico: áreas conservadas e áreas não conservadas. A diversidade genética foi avaliada, identificada e quantificada por meio de índices de diversidade haplotípica e de nucleotídeos, bem como o número de alelos e sítios polimórficos, e a distribuição de haplótipos através de uma rede haplotípica. A estrutura genética das populações foi analisada utilizando a AMOVA (Análise de Variância Molecular), BAPS (Análise Bayesiana de Estrutura Populacional) e os índices de diferenciação genética F_{st} , G_{ST} e N_{ST} . As áreas não conservadas apresentaram menores índices de diversidade genética em comparação às áreas conservadas. Foi observada uma estrutura genética significativa entre as populações das áreas conservadas e não conservadas, sendo as populações das áreas não conservadas aquelas que apresentavam estrutura metapopulacional. No entanto, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre distância geográfica e diferenciação genética entre populações. Este padrão sugere que, embora o isolamento geográfico não seja o principal fator determinante da diferenciação genética, outros fatores ambientais poderiam estar influenciando a estrutura observada. Além disso, foram identificados possíveis efeitos de deriva genética devido ao isolamento de populações em áreas não conservadas. Este estudo mostra o importante impacto da conservação da paisagem na diversidade e estrutura genética de *Dendropsophus sanborni*. Estas observações mostram a importância da conservação dos habitats para manter a conectividade e o fluxo genético entre as populações, o que é vital para a conservação das espécies no futuro.

Palavras-chave: diversidade genética; estrutura genética; *Dendropsophus sanborni*; marcador molecular

CASTAÑEDA BARRERA, Maria Alejandra. **DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *DENDROPSOPHUS SANBORNI* EN LAGUNAS PERMANENTES DEL MUNICIPIO DE SÃO LOURENÇO DO OESTE-SC Y PALMAS-PR.** Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas: Ecologia e Biodiversidade.) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024. 32

ABSTRACT

One of the main anthropogenic factors affecting the distribution of biodiversity is changes in land use and occupation (GRIMM et al., 2008; MCGILL et al., 2015). The isolation of communities or the reduction of exchange between subpopulations can generate restrictions on demographic changes, decreased gene flow and a reduction in population size (COSGROVE et al., 2017). In this context, the objective of this work was to evaluate the diversity and genetic structure of the frog *Dendropsophus sanborni* (Lissamphibia, Hylidae) in permanent lagoons located in the municipalities of Palmas, in the state of Paraná, and São Lourenço do Oeste, in the state of Santa Catarina, using the mitochondrial molecular marker D-Loop. The frogs were studied in two types of landscape treatment: conserved areas and non-conserved areas. Genetic diversity was assessed, identified and quantified using haplotype and nucleotide diversity indices, as well as the number of alleles and polymorphic sites, and the distribution of haplotypes using a haplotypic network. The genetic structure of the populations was analyzed using AMOVA (Analysis of Molecular Variance), BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure), and the genetic differentiation indices F_{st} , G_{ST} and N_{ST} . Non-conserved areas presented lower genetic diversity indices compared to conserved areas. Significant genetic structuring was observed between populations in conserved and non-conserved areas, with populations in non-conserved areas presenting a metapopulation structure. However, no significant correlation was found between geographic distance and genetic differentiation between populations. This pattern suggests that, although geographic isolation is not the main determining factor of genetic differentiation, other environmental factors could be influencing the observed structure. In addition, possible effects of genetic drift due to the isolation of populations in non-conserved areas were identified. This study shows the important impact of landscape conservation on the diversity and genetic structure of *Dendropsophus sanborni*. These observations show the importance of conserving habitats to maintain connectivity and gene flow between populations, which is vital to conserve the species in the future.

Keywords: genetic diversity; genetic structure; *Dendropsophus sanborni*; molecular marker

SUMARIO

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO.	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Descripción del área de estudio.	10
Extracción y amplificación del DNA mitocondrial (D-loop)	12
Análisis de las secuencias DNA mitocondrial (D-loop).	13
Análisis de la distancia geográfica y distancia genética.	14
RESULTADOS.	16
DISCUSIÓN.	23
REFERENCIAS.	28

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, el uso y modificación del espacio geográfico ha sido una necesidad constante, dado que en él se encuentran los recursos esenciales para nuestra supervivencia. Con el crecimiento de la población y el desarrollo de nuevas tecnologías, las formas de habitar y utilizar estos espacios han evolucionado, lo que ha llevado a impactos significativos en los sistemas biológicos y físicos fundamentales para los ciclos vitales de la Tierra. Uno de los cambios más notorios ha sido la retirada de la cobertura vegetal nativa, que se ha producido para la agricultura, la construcción de edificaciones y la extracción de materias primas (DALE et al., 2000; GRIMM et al., 2008). Además, la construcción de carreteras y centros urbanos se ha convertido en una barrera significativa para la fauna (VOS; CHARDON, 1998). El impacto de estos cambios en el uso y ocupación del suelo en los hábitats y paisajes, y por ende en la flora y fauna, varía según factores como el tamaño corporal, los hábitos de las especies, su amplitud de distribución geográfica y si son especies raras (DAVIES et al., 2000; LUGO, 2001; MURRAY & HOSE, 2005; CHICHORRO et al., 2019). De esta manera, la transformación del espacio geográfico tiene profundas repercusiones en la biodiversidad y en la salud de los ecosistemas.

En este contexto de fragmentación de los hábitats naturales por la acción humana, las poblaciones pueden quedar aisladas. El aislamiento de las comunidades o la disminución del intercambio entre subpoblaciones puede resultar en una restricción en los cambios demográficos, reducción del flujo génico y en un descenso del tamaño poblacional (COSGROVE et al., 2017). En este escenario, existen algunas posibles consecuencias, tales como: una pérdida acelerada de diversidad genética causada por la deriva genética, endogamia y un incremento del riesgo de extinción poblacional (ALLENDORF et al. 2013). Por tanto, es fundamental comprender cómo los factores ambientales pueden afectar la variación genética, ya que el potencial adaptativo y evolutivo de una población se manifiesta en su grado de diversidad genética (ALLENDORF et al. 2013).

Uno de los principales factores antrópicos que influyen en la distribución de la biodiversidad son los cambios en el uso y ocupación del suelo (GRIMM et al., 2008; MCGILL et al., 2015). Estos cambios han resultado en cambios en el hábitat local y también en la matriz, impidiendo o limitando el flujo de genes, generando dinámicas de subpoblaciones conectadas por la eventual dispersión de organismos características de las metapoblaciones (RICKLEFS, 2003; COX et al., 2016). Cabe señalar que los recursos de los ecosistemas terrestres no se distribuyen de manera homogénea. Esta variación espacial en las condiciones y de los recursos se refleja en la distribución heterogénea de las poblaciones (HARTL; CLARK, 2010). La conexión entre las subpoblaciones a través del flujo genético es vital para la supervivencia de una metapoblación, por medio de la migración entre subpoblaciones facilita la recolonización y reduce la deriva genética, especialmente en subpoblaciones pequeñas (COX et al., 2017).

Existen diversas formas de estudiar este flujo genético entre poblaciones, utilizando índices de diversidad genética, que reflejan cualquier variación genética dentro de la población, así como datos moleculares que permiten analizar la historia demográfica y la estructuración genética de las especies (SLATKIN, 1985; HARTL; CLARK, 2010). Un indicador efectivo de historias evolutivas recientes es el ADN mitocondrial, debido a su alta tasa de variación y mutación (BIRKY; FUERST; MARUYAMA, 1989; HARTL; CLARK, 2010). Esto resulta útil para detectar diferencias significativas entre las poblaciones de anfibios. Esta herramienta puede ser útil para evaluar comparativamente la diversidad y estructura genética de una metapoblación, subpoblación y de las poblaciones aisladas de anfibios en áreas con diferentes usos del suelo.

Los anfibios son sensibles a las condiciones ambientales de su entorno, principalmente la temperatura y humedad al tratarse de animales ectotérmicos (WELLS, 2007). Al poseer una alta permeabilidad cutánea, son capaces de realizar trocas gaseosas por su piel también puede haber una gran pérdida de agua a través de la misma (WELLS, 2007). Los cuerpos hídricos son indispensables para la reproducción, desova y desarrollo de las primeras etapas de vida de los anfibios, es por eso que son un modelo de indicadores ambientales (PECHMANN; WILBUR, 1994). Debido a esta gran sensibilidad a los cambios ambientales, los anfibios son el primer grupo de vertebrados más vulnerables a nivel mundial en términos de peligro

de extinción, con un 41% de las especies amenazadas (LUEDTKE et al., 2023; IUCN, 2024). En el caso de Brasil, cerca de 44 especies están en estado de peligro o peligro crítico de extinción y ya se registraron dos especies extintas *Boana cymbalum* y *Phrynomedusa fimbriata* (IUCN, 2024 IBGE, 2024)., siendo que la mayoría de las especies amenazadas están en el Bosque Atlántico.

El Bosque Atlántico es considerado un *hotspot* de biodiversidad (MYERS et al., 2000). Bosque Atlántico abarca 17 estados brasileños, con un total de 3,401 municipios y alberga aproximadamente el 70% de la población brasileña, también comprende una pequeña parte de Argentina y Paraguay (MARQUES et al., 2021). La transformación de este bioma se remonta a inicios del primer periodo colonial con la llegada de los portugueses. Por medio de sistemas de plantaciones de monocultivo, plantaciones de pastizales para uso de ganadería, antiguamente con el carbón vegetal para uso energético y el crecimiento de la urbanización e industrialización (SOLÓRZANO et al., 2021). Estas deforestaciones contribuyen cada día más para la fragmentación y pérdida de hábitat por medio del desmonte de flora nativa (DINIZ-FILHO et al., 2009). Esto trae consigo una modificación del paisaje que en la mayoría de los casos lleva a una gran pérdida de biodiversidad (MCKINNEY 2006; 2008; CHICHORRO et al., 2019) pues dificultar o imposibilitar el movimiento de los animales entre los hábitats, especialmente los anfibios (CROUZEILLES et al., 2010). Los anfibios tienen bajo potencial de migración (SMITH; GREEN, 2005), limitando su capacidad para colonizar nuevos hábitats propicios para su reproducción y facilitando el aislamiento entre poblaciones (EHRlich; RAVEN, 1969; COX et al., 2016), consecuentemente, modificando la estructura y dinámica de las poblaciones generando pérdidas de biodiversidad genética.

Con todo, los estudios que analizan la diversidad y la estructura genética de las poblaciones de anfibios en diferentes ambientes (por ejemplo, paisajes) son escasos (por ejemplo, COX et al., 2017, 2021, 2023), principalmente para las especies neotropicales como Dixo et al. (2009), quienes estudiaron poblaciones de *Rhinella ornata* en fragmentos de la selva atlántica costera de Brasil. Encontrando que los fragmentos más pequeños y degradados presentaban un menor número de haplotipos. Sugiriendo que la fragmentación del hábitat afecta negativamente la

variabilidad genética, destacando la importancia de conservar áreas más grandes y menos alteradas para mantener la diversidad genética de las especies.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que mide la diversidad y estructura genética de poblaciones de *Dendropsophus sanborni*. Creemos que los resultados serán importantes para comprender los impactos de la conversión del uso de la tierra en la diversidad y la estructura genética de las poblaciones de anfibios, proporcionando información importante para futuras estrategias de manejo y conservación de especies de anfibios nativos en Brasil.

OBJETIVO

Evaluar la variación en la diversidad y estructura genética en dos tratamientos de *Dendropsophus sanborni* (Amphibia, Anura) en ambientes bajo diferentes grados de antropización.

Objetivos específicos

- Calcular los índices de diversidad genética de los locales conservados y no conservados;
- Identificar la estructura genética de los locales conservados y no conservados;
- Identificar los aspectos que podrían estar afectando los índices de diversidad y la estructura los locales estudiados;
- Evaluar si existe una correlación entre la diversidad genética y la distancia geográfica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo biológico

Para llevar a cabo este estudio, definimos al anfibio *Dendropsophus sanborni* (Figura 1) (Schmidt, 1944) (Lissamphibia: Anura: Hylidae) como modelo biológico. *D. sanborni* es una especie nativa de América del sur, tiene una distribución espacial que comprende desde el sur y centro oeste de Brasil, el nordeste de Argentina, Uruguay hasta Paraguay (AMPHIBIAWEB, 2024). *D. sanborni* mide cerca de 20 mm, generalmente las hembras son mayores y la especie no presenta dimorfismo sexual en otros caracteres morfológicos externos (CURI et al., 2014). Los machos suelen encontrarse en áreas abiertas y vegetaciones más bajas próximas al agua (CONTE; MACHADO, 2005). Sus huevos son depositados en ambientes lénticos, los renacuajos se desarrollan directamente en el agua y no tienen cuidado parental (POTRICH et al., 2020). De acuerdo con IUCN (2024), su estado actual se encuentra en "Preocupación Menor" (Least Concern o LC).



Figura 1 – Representante de *Dendropsophus sanborni*. Autor: Renato Augusto Martins

Descripción del área de estudio

Para el presente estudio, las muestras fueron recolectadas en cuatro lagunas naturales permanentes, ubicadas en dos ciudades diferentes en el bioma Bosque Atlántico. Tres de las lagunas están ubicados en área rural con plantación

de soja (denominados como “área no conservada”) en el municipio São Lourenço do Oeste, ubicado al oeste del estado de Santa Catarina (SLO 1: 26°21'50.7"S, 52°56'43.3"W; SLO2: 26°21'46.3"S, 52°57'01.5"W; y SLO3: 26°21'37.0"S, 52°57'33.6"W) en la frontera con el estado de Paraná. Las lagunas están separadas una de las otras de la siguiente forma: SLO1 Y SLO2 están separadas por una distancia de 500 metros, las lagunas SLO2 Y SLO3 a 1.000 metros de distancia, y SLO1 Y SLO3 se encuentran a 1.500 metros entre sí. El tamaño de las lagunas de este local es variado, donde la laguna SLO1 tiene un área de 3.625 m², mientras que SLO2, con 438 km², es más pequeña, SLO3 destaca con 5.766 km². En cuanto a vegetación SLO1 está muy cerca de los cultivos de soja, la laguna SLO3, aunque está adyacente a la cría de ganado existen más arbustos y vegetación. São Lourenço do Oeste, cuenta con un clima templado, se presenta una temperatura media anual de 17,1-18 C°, con una humedad relativa del 78% y una pluviosidad media anual de 200-2100 mm (VELOSO et al. 1991; IBGE 2012). Los inviernos son bien fríos y pueden estar acompañados de heladas. En esta región, aproximadamente desde el 2005, se evidencian cultivos de soja y cosechas temporales alrededor de las lagunas. Actualmente, el municipio de São Lourenço do Oeste tiene 75% da cobertura do solo ocupada por la agropecuaria, un área con bosque del 22.24% y un restante 2,34% de área no vegetada (IBGE, 2024).

La otra laguna está ubicada en una zona conservada (Pa1: 26°32'33.4"S, 51°39'43.4"W) en la ciudad de Palmas, Paraná. Esta laguna está ubicada dentro de una área de bosque lluvioso mixto y campos naturales. La laguna está muy cerca de la Unidad de Conservación de Protección Ambiental Refugio de Vida Silvestre Dos Campos das Palmas, creada en 2006. Esta unidad cuenta con un área de 16.582 hectáreas, la vegetación está compuesta por campos naturales existentes en un mosaico con áreas de bosque lluvioso mixto (APREMAVI, 2005). La laguna de Palmas (Pa1) se encuentran separada de las lagunas de São Lourenço do Oeste en aproximadamente 130 km de distancia (Figura 2). El municipio de Palmas presenta un uso de suelo destinado principalmente para agricultura, ocupando el 57,4% de la extensión territorial del municipio, formaciones de bosques cuenta con un 36,16%, 5,21% ocupado por pastizales y los cuerpos de agua solo presentan un 0,35%. (IBGE, 2024).

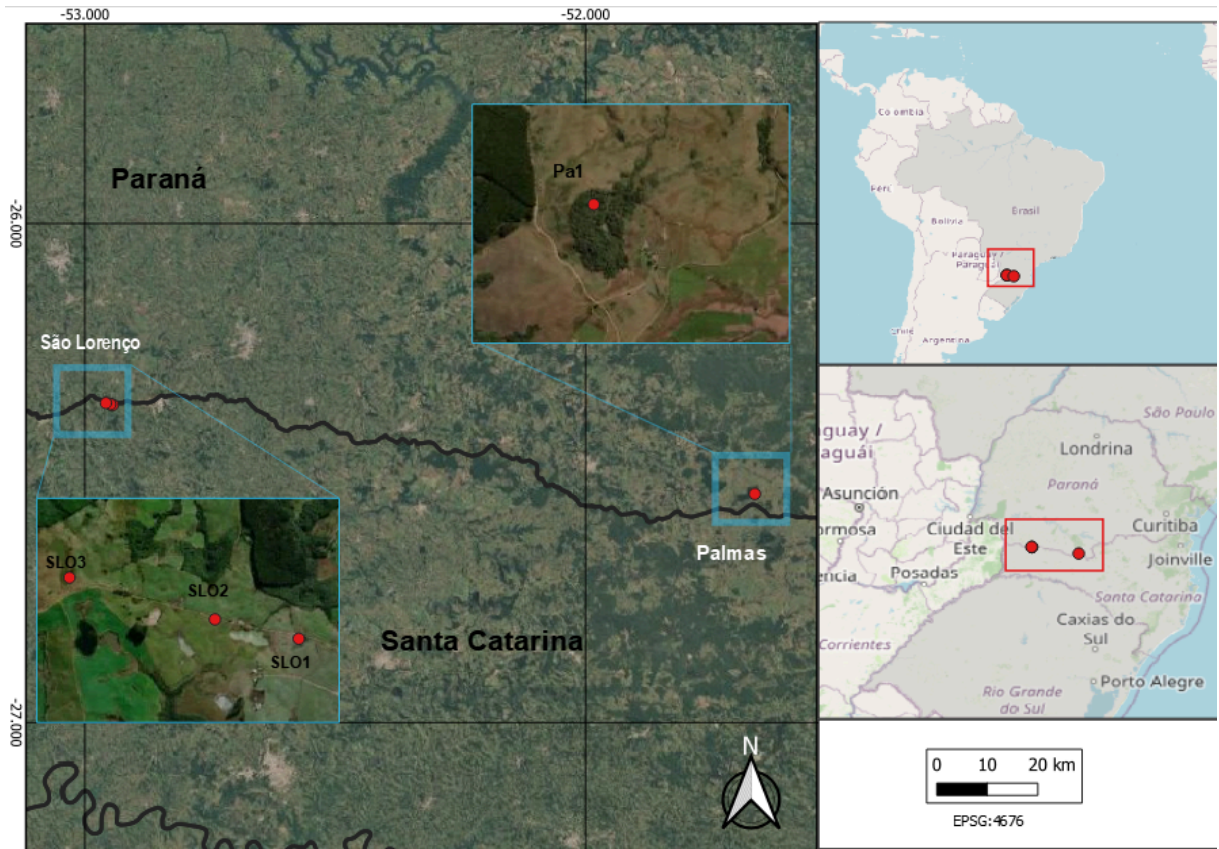


Figura 2- Locales de colecta de *Dendropsophus sanborni*, ubicados en Palmas-PR (Pa1) y São Lourenço do Oeste-SC (SLO1, SLO2 Y SLO3).

Para este trabajo fueron usados tejidos hepáticos encontrados en la colección del laboratorio de genética de la Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-PR. Los individuos están fijados y se depositados en la colección científica de la Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Comitê de Ética en la Experimentación Animal a Aulas Práticas - CEEAAP/Unioeste- Protocolo nº 66/10. La especie estudiada fue la rana arborícola *Dendropsophus sanborni* (Amphibia, Hylidae). La selección de la especie fue definida realizando un cribado previo de los tejidos disponibles en la colección, que cumplieran con la cantidad de individuos en las lagunas a ser estudiadas tanto de São Lourenço do Oeste, como de Palmas. Para cada laguna fueron estudiados tejidos de ocho individuos, dando un total de 32 secuencias para análisis.

Extracción y amplificación del DNA mitocondrial (D-loop)

La extracción del material genético fue realizada con el Kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), según las especificaciones del fabricante. Con ayuda del dispositivo Espectrofotómetro Nanok (Kasvi) fue realizada la cuantificación del DNA. En este trabajo, fue seguida la indicación de Goebel *et al.* (1999), en que el conjunto de iniciadores más indicados son IP-H Control (5'GTCCAGATTCASTTCCGTCAG'3) y Wrev-L Control (5'GACATAYTATGTATA AATCGAGCATT'3).

Para la amplificación del DNA fue utilizado el protocolo encontrado en el trabajo de Lima *et al.* (2019), en la cual para la solución del PCR contenía 1X de buffer para la reacción de PCR (Promega), con 3 mM de MgCl₂, 4,6 mM de dNTPs, 0,6mM de cada primer, 2U de Taq DNA polymerase (Promega), y 10 ng/μl de DNA molde. Para PCR, el termorregulador fue programado con los siguientes parámetros: 94 °C (1 min), 36 ciclos de 94 °C (1 min), 48 °C (40 s), 72°C (1 min y 30 s), seguidos por 72 °C (7 min). La purificación de la PCR fue realizada por medio del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Por último, las muestras purificadas fueron enviadas para el Centro de Pesquisa e Genoma Humano da USP (São Paulo, Brasil) en donde se dio su seguimiento con el primer Control IP-H. A partir de la secuenciación parcial de la región D-loop del ADN mitocondrial, se analizaron 627 pares de bases de *Dendropsophus sanborni*.

Análisis de las secuencias DNA mitocondrial (D-loop)

Para editar las secuencias genéticas fue usado el programa BioEdit V.7.2 (HALL, 1999) y Mega V.11 (TAMURA *et al.*, 2021) para alinear secuencias, identificar sitios polimórficos y examinar las relaciones y afinidades entre los haplotipos. La diversidad genética fue cuantificada a través de los índices de diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), número de sitios polimórficos (S) y número de haplotipos (h) por medio del programa DnaSP v.6 (ROZAS *et al.*, 2017). Para las medidas de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se consideran valores de Hd < 0,05 y π < 0.5% como bajos (Grant *et al.*, 1998).

La estructura genética de la población fue evaluada por medio de una red de haplotipos, generada por medio del programa PopArt Versão 1.7 (LEIGH;

BRYANT, 2015). También se generaron los índices GST (“Índice de diferenciación genética”) Y NST (“Índice de diferenciación por sustitución de nucleótidos”), por medio de DnaSP v.6 (ROZAS et al., 2017). Los anteriores índices mide la proporción de la variación genética total que se encuentra entre poblaciones en comparación con la variación dentro de ellas y cuenta la historia filogenética de las poblaciones y se basa en el número de sustituciones nucleotídicas respectivamente (PONS; PETIT, 1996; WRIGHT, 1949).

Para verificarla distribución de la variación genética, dentro, entre las muestras y entre grupos, fue usado un análisis de varianza molecular (AMOVA), por medio del programa Arlequín V (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), para este análisis se hicieron dos grupos, (i) todas lagunas de São Lourenço do Oeste (i.e., no conservada) y (ii) la laguna de Palmas (i.e., conservada) en donde se obtuvieron los índices de fijación para cada una de las comparaciones (Φ_{ST} , Φ_{CT} , Φ_{SC}). A través del análisis de diferenciación genética (FST) entre las poblaciones, se examinó el nivel total de divergencia genética entre los diferentes locales. Los valores del índice de diferenciación genética Φ_{ST} , varían entre 0 y 1, donde 0 indica la mínima diferenciación y 1 la máxima. En este contexto, se interpretan los valores de manera que aquellos entre 0 y 0,05 indican una pequeña diferenciación genética, mientras que los que oscilan entre 0,05 y 0,15 sugieren una moderada diferenciación. Los valores que se encuentran entre 0,15 y 0,25 reflejan una gran diferenciación, y aquellos de superiores a 0,25 indican una diferenciación muy grande (HARTL *et al.*, 2010;).

Por medio del programa BAPS (CORANDER *et al.*, 2008) se realizó el Analisis Bayesiano de estructura poblacional para identificar y caracterizar las poblaciones en grupos genéticos de acuerdo a los locales estudiados.

Análisis de la distancia geográfica y distancia genética

Para verificar la relación entre las distancias geográficas y genéticas entre las poblaciones de cada laguna, se usó una prueba de Mantel simple con una matriz de distancia geográfica y los valores de diferenciación genética de cada uno de los locales. Las distancias geográficas entre cada laguna fueran obtenidas en el

software Google Earth (GOOGLE, 2024) y la prueba de Mantel con el paquete “vegan” (OKSANEN et al., 2022) dentro del software R (R CORE TEAM, 2024).

RESULTADOS

Para los 32 individuos de *Dendropsophus sanborni* se identificaron un total de 16 haplotipos. El local conservado (Palmas, Pa1) mostró una mayor diversidad genética, con ocho haplotipos exclusivos que representan cincuenta por ciento de todos de los haplotipos obtenidos en este estudio. También se obtuvo un total de 25 sitios polimórficos y resaltó con la mayor diversidad genética de todas las muestras y la segunda mayor diversidad nucleotídica de los locales (Tabla 1). En contraste, los locales no conservados ubicados en São Lourenço do Oeste, tuvieron un total de ocho haplotipos distribuidos entre las lagunas. Para los sitios polimórficos de los locales de São Lourenço do Oeste (SLO1, SLO2 y SLO3), se obtuvo en media, 15 sitios polimórficos y seis haplotipos. Los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron menores que los obtenidos en el área conservada. A pesar de existir una clara diferencias en los valores de diversidad genética entre estos dos tratamientos de los locales de manera general, dentro de las lagunas de São Lourenço se presentaron resultados contrastantes. Para los sitios polimórficos (Tabla 1) la laguna SLO3 representa la mayor cantidad (50%) , seguido de la población SLO2 (38%) y la laguna SLO1 (12 %). Todos los sitios de São Lourenço do Oeste mostraron un alto índice de diversidad haplotípica, excepto el sitio SLO2 con un $H_d = 0,464$. Para la diversidad nucleotídica (π), todos los locales presentaron un bajo índice de diversidad nucleotídica (Tabla 1).

Tabla 1 - Diversidad genética de *Dendropsophus sanborni* locales conservados (PA1 en Palmas-PR) y no conservados (SLO1, SLO2 y SLO3) ubicados São Lourenço do Oeste-SC. S = número de sitios polimórficos; h = número de haplotipos; H_d = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica.

Locales	N	S	h	H_d	π
SLO1	8	5	3	0,75	0,0036
SLO2	8	17	3	0,464	0,0073
SLO3	8	23	6	0,928	0,0173
Pa1	8	25	8	1	0,0142

La red de haplotipos revela tres grupos diferenciados y una distancia genética entre los locales conservados y no conservados (Figura 3). La población del área conservada (i.e., Palmas), a pesar de ser representada por una sola laguna, presentó una alta tasa de diversidad y riqueza haplotípica y mostró que no

existe ningún haplotipo compartido con el área no conservada (Figura 5). También se puede ver que existe una gran cantidad de pasos mutacionales entre los haplotipos encontrados dentro de esta laguna, lo que trae una diferencia genética entre los mismos individuos de este mismo local. (Figura 3). Ya para São Lourenço do Oeste (i.e., no conservado) se observa un agrupamiento de haplotipos, lo que sugiere que los individuos son más similares entre sí, indicando una historia evolutiva compartida reciente y una clara diferencia de los individuos de este local respecto a los del área no conservada. Dentro de los locales de São Lourenço podemos verificar que existen haplotipos compartidos entre los locales (SLO1, SLO2, SLO3) siendo estos Hap1 y Hap2. Sin embargo, la frecuencia del haplotipo Hap1 en las lagunas SLO2 y SLO3 es significativamente baja, contrastando con esto el Hap2 en SLO2 es muy frecuente, indicando una pérdida de diversidad genética en esas áreas (Fig. 4). Por otro lado, la identificación de varios haplotipos exclusivos en la localidad SLO3 (Hap5, Hap6, Hap7 y Hap8) y la baja frecuencia de los haplotipos comunes, sugiere una mayor diversidad genética y algún grado de aislamiento en comparación con las demás lagunas de São Lourenço do Oeste.

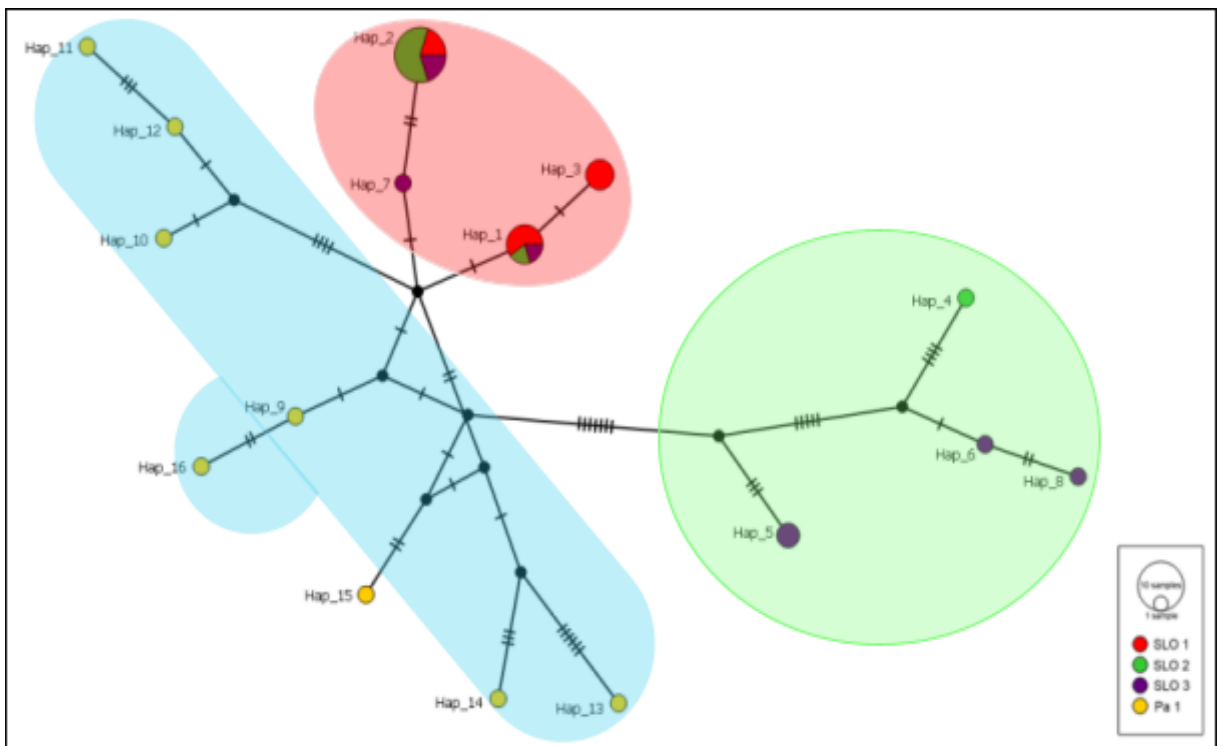


Figura 3 - Rede de haplotipos de secuencias parciales de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Dendropsophus sanborni*, obtenidos de 32 muestras obtenidas de las ciudades de Palmas-PR y São Lourenço do Oeste-SC. Los tamaños de los

círculos son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos. Las barras negras indican mutaciones entre las secuencias. Los puntos negros indican posibles haplotipos que no están dentro de la muestra. Cada punto de muestra corresponde a un color.

En el local de São Lorenço do Oeste, las frecuencias de los haplotipos mostraron que existe una pérdida de diversidad genética. Aunque SLO1 y SLO2 contribuyen con la misma cantidad de haplotipos las frecuencias varían. Existe una fijación del hap2 en el local SLO2 pues presenta una frecuencia alta, respecto a los demás haplotipos presentados en este local, por otro lado SLO1 tiene sus frecuencias de los haplotipos mejor distribuidas. SLO3 es el local con mayor haplotipos y una cantidad equitativa en la aparición de las frecuencias haplotípicas (Figura 4).



Figura 4 - Frecuencias de haplotipos en lagunas de São Lourenço do Oeste (SLO1, SLO2, SLO3) cada color representa un haplotipo, cada número representa la cantidad de haplotipos encontrados por individuo.

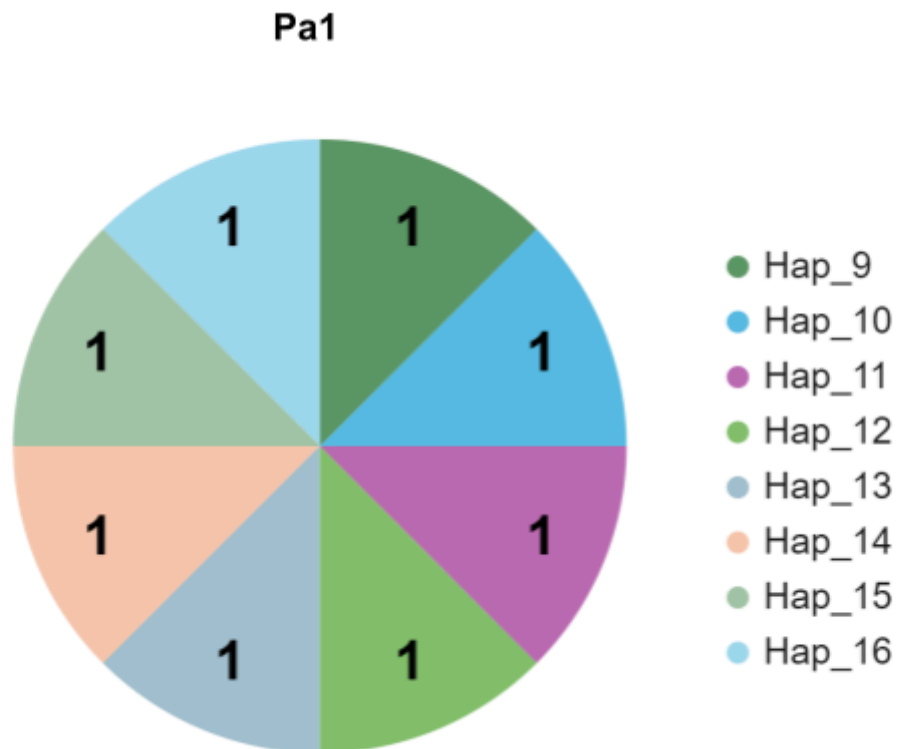


Figura 5 - Frecuencias de haplotipos en lagunas de Palmas (Pa1) cada color representa un haplotipo, cada número representa la cantidad de haplotipos encontrados por individuo.

El análisis de la estructuración poblacional reveló la existencia de tres grupos genéticos distintos, cada uno representado por un color diferente. En el caso de Palmas, se identificó un grupo genético único marcado en color azul (Figura 6). En las áreas de São Lourenço do Oeste, se encontraron dos grupos genéticos: uno representado por color rojo y otro por color verde. La ausencia de grupos genéticos compartidos entre las áreas conservadas y no conservadas indica que estas localidades son poblaciones distintas de *Dendropsophus sanborni*. Para los sitios no conservados (SLO1, SLO2, SLO3), se observó una base genética común, indicando un grupo genético en común, representado en color rojo, siendo los locales de São Lourenço una población. El grupo genético de color verde es exclusivo de los sitios SLO2 y SLO3, lo que sugiere que existe un flujo génico activo entre estas localidades. Por otro lado, el sitio SLO1 muestra evidencia de una conexión pasada con las otras lagunas, pero actualmente esa conexión parece haber sido interrumpida.

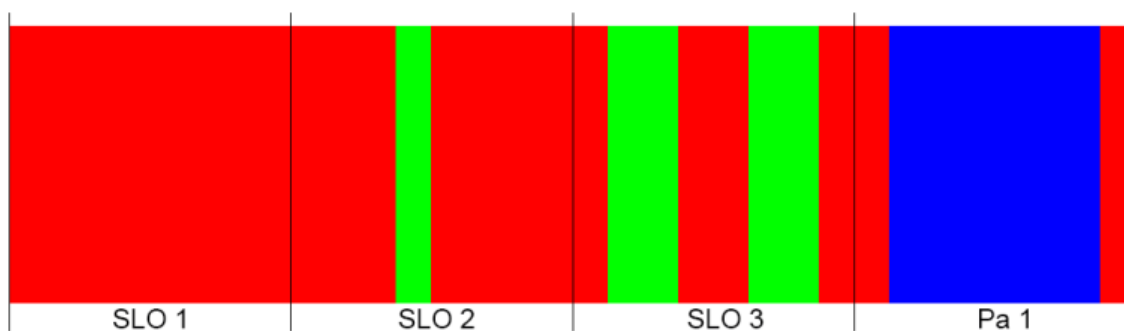


Figura 6 - Estructuración poblacional para las secuencias parciales de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Dendropsophus sanborni*, en 32 muestras obtenidas de las ciudades de Palmas-PR y São Lourenço do Oeste-SC. Cada color representa un grupo genético formado.

Para el análisis de varianza molecular (AMOVA), se definieron a priori dos grupos, uno de área conservada (Pa1) y otro de área no conservada (SLO1, SLO2, SLO3). Se comprobó mediante el análisis de AMOVA que la mayor tasa de variación molecular ocurre dentro de las poblaciones con (72,95%; $P = 0,0001$), la segunda mayor tasa de variación ocurrió entre las poblaciones de los grupos (17,92% de variación; $P = 0,005$) indicando diferencias genéticas significativas. La variación entre de los grupos (9,13%; $P = 0,25$) no fue significativa.

Tabla 2 - Análisis de Variancia molecular (AMOVA) para las poblaciones de *Dendropsophus sanborni* de lagunas en São Lourenço do Oeste-SC y Palmas-PR, mostrando el porcentaje de variación entre poblaciones, entre poblaciones y entre grupos

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación	Índice de fijación	p
Entre grupos	1	14,875	0,41667 Va	9,13	0,091 (FCT)	0,25
Entre poblaciones de grupos	2	19,75	0,81808 Vb	17,92	0,197 (FSC)	0,0032
Dentro de poblaciones	28	93,25	3,33036 Vc	72,95	0,270 (FST)	0,001
Total	31	127,875	4,5651			

Quando comparamos la diferenciación genética entre las poblaciones de cada laguna fue verificado que todos los valores del índice de diferenciación

genética (Φ_{ST}) fueron significativos, mostrando en todas las comparaciones entre lagunas una alta o muy alta diferenciación genética, es decir, valores siempre superiores a 0,15 (Tabla 3). Esto resalta la existencia de diferencias genéticas notables entre las poblaciones analizadas. Además, para los valores de NST (“Índice de diferenciación por sustitución de nucleótidos” y GST (Índice de diferenciación genética”), con unos valores de NST = 0,23620 Y GST=0,10518, indicando un grado de diferenciación entre las poblaciones.

Tabla 3 - Diferenciación genética (Φ_{ST}) obtenido par a par para poblaciones de *Dendropsophus sanborni* en lagunas de São Lourenço do Oeste-SC (SL) y Palmas-PR (PA). Los números debajo de la diagonal indican los valores de (Φ_{ST}) par a par; Los valores encima de la diagonal indican los respectivos valores de P para cada comparación

	SLO1	SLO2	SLO3	Pa1
SLO1		0,009	0,027	0,0001
SLO2	0,258		0,036	0,0001
SLO3	0,282	0,155		0,0001
Pa1	0,242	0,283	0,212	

Mediante el análisis de Mantel se verificó que el aumento de la distancia geográfica entre las poblaciones locales no resultó en una mayor diferenciación genética ($r_m = 0.08571$; $P = 0.54167$), a pesar de la tendencia a una relación positiva entre las variables observadas en los datos (Figura 7).

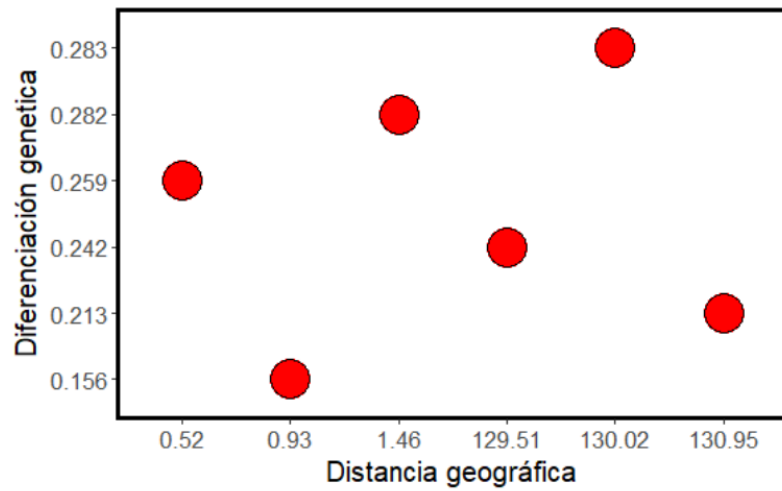


Figura 7 – Análisis Mantel de distancia geográfica y distancia genética para las secuencias parciales de la región D-loop del ADN mitocondrial de *Dendropsophus sanborni*, en 32 muestras obtenidas de los municipios de Palmas-PR y São Lourenço do Oeste-SC.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que el local de Palmas denominado como área conservada tuvo mayores índices de diversidad si comparado con las áreas no conservadas en São Lourenço do Oeste. Se corroboró que existe una estructuración genética entre las áreas conservadas y no conservadas, mostrando que existen dos poblaciones diferentes de *Dendropsophus sanborni*. Sin embargo, el análisis de la diferenciación genética versus la distancia geográfica no mostró una relación proporcional. Dentro de las lagunas de São Lourenço do Oeste se encontró una dinámica de metapoblación.

La población de la zona conservada, específicamente la laguna de Palmas, presenta una alta diversidad genética, evidenciada por un gran número de haplotipos, lo que sugiere que cada haplotipo corresponde a un individuo diferente (Figura 5). Este hallazgo indica que la población está aislada de las lagunas de São Lourenço do Oeste, ya que contiene haplotipos exclusivos de esta región. A pesar de esta laguna tener un área reducida, está ubicada en un área de conservación con una matriz vegetal más desarrollada y conservada, lo que supone mayor cantidad de haplotipos (DIXO et al. 2009). También a 200 metros se encuentra otra laguna, lo que fomenta conexiones entre individuos, facilitando la dispersión y aumentando así la diversidad genética (GALINA et al., 2022; CHRISTIE; KNOWLES, 2015; COATES et al., 2018). Para las lagunas de São Lourenço, aunque presentan una baja diversidad genética, se observa un flujo genético entre las lagunas SLO2 y SLO3 a pesar de las barreras geográficas, como carreteras y cultivos de soya, se evidenció la presencia de haplotipos comunes y frecuentes, lo que sugiere un ancestro común más reciente (NEIGEL; AVISE, 1993). La baja diversidad genética en las lagunas no conservadas puede ser resultado de la influencia de actividades antrópicas (TEMPLETON et al., 1990), limitando interacciones y dispersión entre localidades distantes. Esto puede conducir a una disminución de la variación genética a través de la deriva genética (WRIGHT, 1931; WRIGHT, 1943), efecto que es más pronunciado en poblaciones pequeñas y podría promover la depresión por endogamia (TEMPLETON et al., 1990). Para los índices de diversidad genética, dos

estudios con marcadores moleculares D-loop, muestran cifras de diversidad haplotípica y nucleotídica para fragmentos de áreas más conservadas y grandes con valores similares a los presentados aquí. En Lima *et al.* (2019) los valores de diversidad nucleotídica para *Boana boans* varía entre 0.010 y 0.041. En Dixo *et al.* 2009, los valores para *Rhinella ornata* en fragmentos conservados son aproximados de diversidad nucleotídica son próximos a 0,014 y los valores de la diversidad haplotípica variaron de 0,94 en áreas grandes y conservadas y 0,66 en áreas pequeñas y aisladas. Por lo cual los valores para áreas conservadas están dentro de lo estudiado hasta el momento, mostrando que áreas conservadas presentan valores por encima de áreas más antropizadas.

A través de algunos índices de diversidad genética es posible inferir aspectos sobre la historia de las poblaciones, como lo demuestra Grant *et al.* (1998), uno de los casos indica que índices de diversidad haplotípica y nucleotídica bajos, esto podría ser explicado por una dinámica de metapoblaciones, un evento de cuello de botella o un efecto fundador. Para un segundo escenario, valores altos de diversidad haplotípicas y diversidad nucleotídicas, se atribuye a una expansión después de un período de bajo tamaño efectivo de población. Para las lagunas de las áreas no conservadas se presentan ambos casos mencionados anteriormente, como por ejemplo la laguna SLO2 presenta valores bajos para ambos índices, mientras que SLO1, SLO3 tienen valores similares a los del segundo escenario, donde el tamaño de una población se reduce drásticamente, lo que resulta en una reducción de la variación genética por proceso evolutivo aleatorio que cambia la frecuencia genética de una población a lo largo de generaciones (NEI *et al.*, 1975; GRANT *et al.*, 1998; MASEL, 2011). En este caso creemos que este efecto se da por las acciones antropogénicas a través de cambios en el uso del suelo pero son necesarios más análisis para entender mejor las causas detrás de estos efectos. Aunque los escenarios actuales muestran que hay una dinámica compleja entre las poblaciones de las lagunas no conservadas, es probable que otros factores como tamaño de las lagunas y calidad de la vegetación circundante, están influyendo de manera combinada en la diversidad genética que se observa en estos lugares.

Se observó una diferencia significativa en la variabilidad genética entre los individuos de *Dendropsophus sanborni* en los locales conservados y no conservados, comprobada mediante los valores de F_{ST} par a par. Comparado con el estudio de

Dixo et al. (2009), donde los valores de FST variaron entre 0,0005 y 0,1602, los resultados del presente estudio mostraron una fuerte diferenciación genética entre los locales analizados. Además, el análisis bayesiano reveló una clara estructuración entre las poblaciones de áreas conservadas y no conservadas, indicando la existencia de dos poblaciones distintas de *Dendropsophus sanborni*.

A pesar de estos hallazgos, el análisis de Mantel no mostró una relación significativa entre la diferenciación genética y la distancia geográfica entre las lagunas. Se muestra una tendencia lineal entre los datos (Figura 7), lo que podría sugerir que más lagunas podrían contribuir para la tendencia del gráfico, de acuerdo con el modelo de aislamiento por distancia definido por Wright (1943), la diferenciación genética entre las poblaciones sería directamente proporcional a la distancia geográfica. En este caso el aislamiento genético puede ocurrir mediante la limitación de la dispersión (COSGROVE et al., 2017), pero también mediante el aislamiento mediante la adaptación y la monopolización (NOSIL & CRESPI, 2004; ORSINI et al., 2013). El aislamiento por adaptación ocurre cuando el flujo de genes entre hábitats se reduce debido a variaciones ambientales entre hábitats, lo que lleva a un patrón de aislamiento por parte del medio ambiente. En la monopolización, la adaptación genética local de los genotipos colonizadores iniciales da como resultado una reducción en el flujo de genes que promueve la persistencia de los efectos fundadores (DE MEESTER et al., 2002; ORSINI et al., 2013). La diferenciación genética entre estas áreas muestra el efecto de aislamiento entre poblaciones de áreas conservadas y no conservadas, sin embargo, la falta de efecto de distancia entre áreas indica que la variación observada debe estar relacionada con el aislamiento por adaptación o monopolización. Como no tenemos datos para probar el patrón de aislamiento debido a la historia de la colonización, sólo nos queda evidencia de que existe un patrón de aislamiento debido a la variación ambiental, pero no podemos descartar un efecto de monopolización.

Finalmente, verificamos que los individuos de *D. sanborni* de las lagunas muestreados en el área no conservada forman una metapoblación, que está aislada de la población del área conservada. Además, encontramos que las poblaciones del área no conservada tenían una menor diversidad genética y un menor número de haplotipos en comparación con la población del área conservada. De esta manera, tenemos evidencia de que las acciones humanas, como las actividades agrícolas,

influyeron negativamente en la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *D. sanborni*. Una limitación importante del estudio es que hay pocos trabajos previos sobre la especie, lo que dificulta hacer comparaciones precisas. Esta falta de información limita cómo podemos entender nuestros resultados en un contexto más amplio. Recomendamos que estudios futuros abarquen otros factores como el tamaño de la población, los patrones de apareamiento, calidad del agua de las lagunas, efectos de borda, y la permeabilidad del suelo (ELLEGREN; GALTIER, 2016; MONTEIRO et al., 2019). Con estas consideraciones, podremos hacer un análisis más claro y completo sobre la diversidad genética sobre *Dendropsophus sanborni*.

CONCLUSIONES

Las áreas conservadas presentan un índice de diversidad genética mayor debido a la disponibilidad de recursos que favorecen la reproducción, el abrigo y la dispersión, lo que contribuye a una mayor riqueza y diversidad genética. En el análisis de la estructura genética, se identificó que los individuos de Palmas y São Lourenço pertenecen a dos poblaciones distintas de *Dendropsophus sanborni*. Esto demuestra que, en escalas geográficas finas, pueden encontrarse poblaciones que albergan una diversidad genética notablemente diferente entre sí. La conservación de estos genes es crucial para enriquecer el acervo genético de la Mata Atlántica.

Para las lagunas de São Lourenço al tener una dinámica de metapoblación se encontraron que las lagunas SLO1 y SLO2 son más vulnerables a la pérdida de variabilidad genética y a los efectos negativos de la deriva genética. Esto se debe a que, al estar más aisladas, enfrentan un mayor riesgo de endogamia, lo que puede comprometer su salud y adaptabilidad. Por otro lado, la laguna SLO3 se destaca como un sitio crucial para la conservación, ya que tiene un mayor potencial para mantener la variabilidad genética. Esto es fundamental para la resiliencia de las poblaciones frente a cambios ambientales y enfermedades. La existencia de corredores ecológicos es esencial en este contexto, ya que facilitan el flujo genético entre poblaciones, permitiendo la migración y el intercambio de individuos. Esto no

solo ayuda a mantener la diversidad genética, sino que también refuerza la estabilidad del ecosistema en su conjunto.

REFERENCIAS

AMPHIBIAWEB. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2024. Disponível em: <https://www.amphibiaweb.org>.

ALLENDORF, Fred W.; LUIKART, Gordon H.; AITKEN, Sally N. Conservation and the Genetics of Populations. 2. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. 624 p. ISBN 978-0-470-67145-0.

APREMAVI (Santa Catarina) (comp.). Refúgio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas, 2005. Disponível em: <https://apremavi.org.br/areas-tematicas/conservacao-da-biodiversidade/refugio-de-vida-silvestre-dos-campos-de-palmas/>. Acesso em: 28 jun. 2024.

BIRKY, C W; FUERST, P; MARUYAMA, T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes.. Genetics, [S.L.], v. 121, n. 3, p. 613-627, 1 mar. 1989. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/121.3.613>.

COATES, David J. et al. Genetic Diversity and Conservation Units: dealing with the species-population continuum in the age of genomics. Frontiers In Ecology And Evolution, [S.L.], v. 6, n. , p. 1-13, 23 out. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2018.00165>.

CHICHORRO, Filipe et al. A review of the relation between species traits and extinction risk. Biological Conservation, [S.L.], v. 237, p. 220-229, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2019.07.001>.

CHRISTIE, Mark R.; KNOWLES, L. Lacey. Habitat corridors facilitate genetic resilience irrespective of species dispersal abilities or population sizes. Evolutionary Applications, v. 8, n. 5, p. 454-463, 31 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12255>.

CONTE, Carlos E.; MACHADO, Reginaldo A.. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 940-948, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81752005000400021>.

CORANDER, Jukka; TANG, Jing. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, [S.L.], v. 205, n. 1, p. 19-31, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2006.09.015>.

COSGROVE, Anita J. *et al.* Consequences of impediments to animal movements at different scales: a conceptual framework and review. **Diversity And Distributions**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 448-459, 18 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ddi.12699>.

COX, K. *et al.* **Effect of the landscape matrix on gene flow in a coastal amphibian metapopulation**. *Conservation Genetics*, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1359-1375, 9 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-0170985-z>.

COX, Karen *et al.* **Scale-dependent effects of terrestrial habitat on genetic variation in the great crested newt (*Triturus cristatus*)**. *Landscape Ecology*, v. 36, n. 10, p. 3029-3048, 5 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10980-021-01297-5>

COX, Karen *et al.* **The common ground in landscape effects on gene flow in two newt species in an agroecosystem**. *Conservation Genetics*, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 807-826, 14 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-023-01539-w>.

CROUZEILLES, Renato; LORINI, Maria Lucia; GRELLE, Carlos Eduardo Viveiros. **Deslocamento na matriz para espécies da Mata Atlântica e a dificuldade da construção de perfis ecológicos**. *Oecologia Australis*, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 875-903, dez. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2010.1404.06>.

CURI, Lucila M. et al. Reproductive aspects of *Dendropsophus sanborni* (Anura, Hylidae) in northeastern Argentina. *Iheringia. Série Zoologia*, [S.L.], v. 104, n. 4, p. 432-438, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-476620141044432438>.

DALE, V. H.; BROWN, S.; HAEUBER, R. A.; HOBBS, N. T.; HUNTLY, N.; NAIMAN, R. J.; RIEBSAME, W. E.; TURNER, M. G.; VALONE, T. J.. *Ecological Principles and Guidelines for Managing the Use of Land. Ecological Applications*, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 639, jun. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/2641032>.

DAVIES, Kendi F. et al. Which traits of species predict population declines in experimental forest fragments? *Ecology*, [S.L.], v. 81, n. 5, p. 1450-1461, maio 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1450:wtospp\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1450:wtospp]2.0.co;2).

DE MEESTER, Luc de et al. The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 121-135, jun. 2002. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1146-609x\(02\)01145-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1146-609x(02)01145-1).

DIXO, Marianna et al. **Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest.** *Biological Conservation*, v. 142, n. 8, p. 1560-1569, ago. 2009. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.11.016>.

DINIZ-FILHO, José Alexandre Felizola et al. **Climate history, human impacts and global body size of Carnivora (Mammalia: eutheria) at multiple evolutionary scales.** *Journal Of Biogeography*, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 2222-2236, 16 nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02163.x>.

ELLEGREN, Hans; GALTIER, Nicolas. **Determinants of genetic diversity.** *Nature Reviews Genetics*, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 422-433, 6 jun. 2016. DOI:
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.58>.

EHRlich, Paul R.; RAVEN, Peter H.. Differentiation of Populations. *Science*, [S.L.], v. 165, n. 3899, p. 1228-1232, 19 set. 1969. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.165.3899.1228>.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: uma nova série de programas para realizar análises de genética populacional sob Linux e Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564–567, 2010.

GETELINA, M. A. et al. **Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran.** *Hydrobiologia*, [S.L.], v. 849, n. 11, p. 2463-2475, 12 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-022-04840-w>.

GOOGLE. *Google Earth*. 2024. Disponível em: <https://www.google.com/earth/>. Acesso em: 04 mayo. 2024.

GRANT, W. et al. **Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation.** *Journal Of Heredity*, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 415-426, 1 set. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>.

GRIMM, Nancy B. et al. **Global Change and the Ecology of Cities.** *Science*, v. 319, n. 5864, p. 756-760, 8 fev. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1150195>.

HARTL, Daniel L. et al. Mutaç o e teoria neutra. In: **HARTL, Daniel L. et al.** *Princ pios de genética de populações*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 190.

HASTINGS, Alan; HARRISON, Susan. **METAPOPULATION DYNAMICS AND GENETICS. Annual Review Of Ecology And Systematics**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 167-188, nov. 1994. Annual Reviews.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.001123>.

HANSKI, Ilkka et al. **Metapopulation dynamics**. Nature, [S.L.], v. 396, n. 6706, p. 41-49, nov. 1998. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1038/23876>.

HALL, T.A. **BioEdit: um editor de alinhamento de sequência biológica e programa de análise amigável para Windows 95/98/NT**. Nucleic Acids Symposium Series, v. 41, p. 95-98, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Número de espécies da fauna e da flora brasileira avaliadas quanto ao risco de extinção**, por grupos taxonômicos, hábito ou forma de vida, tipo de ambiente, biomas e Sistema Costeiro-Marinho e categorias de risco. En Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/9625>.

UNION INTERNACIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). *Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas: 2024*. Gland: IUCN, 2024.

LEIGH, Jessica W.; BRYANT, David. Popart: full :feature software for haplotype network construction. **Methods In Ecology And Evolution**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1110-1116, jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/2041-210x.12410>.

LIMA, Jonatha Edson de Paula *et al.* Analysis of the mitochondrial D-Loop reveals that neither river boundaries nor geographic distance structure the fine-scale genetic variation of an Amazonian treefrog. **Hydrobiologia**, [S.L.], v. 847, n. 2, p. 321-330, 18 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10750-019-04069-0>.

LUGO, Ariel E. El manejo de la biodiversidad en el siglo xxi. INCI, Caracas , v. 26, n. 10, p. 484-490, oct. 2001 . Disponible en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-1844200100100011&lng=es&nrm=iso. accedido en 29 oct. 2023.

LUEDTKE, Jennifer A. *et al.* Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. **Nature**, [S.L.], v. 622, n. 7982, p. 308-314, 4 out. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>.

MASEL, Joanna. Genetic drift. **Current Biology**, [S.L.], v. 21, n. 20, p. 837-838, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.007>.

MARQUES, Marcia C. M. *et al.* The Atlantic Forest: an introduction to the megadiverse forest of south america. **The Atlantic Forest**, [S.L.], p. 3-23, 2021. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-55322-7_1.

MCKINNEY, Michael L. *et al.* Urbanization, Biodiversity, and Conservation. **Bioscience**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 883, 2002. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0883:ubac\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0883:ubac]2.0.co;2).

MYERS, Norman *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [S.L.], v. 403, n. 6772, p. 853-858, fev. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35002501>.

MCGILL, Brian J. *et al.* Fifteen forms of biodiversity trend in the Anthropocene. **Trends In Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 104-113, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.006>.

MURRAY, Brad R. *et al.* Life-history and ecological correlates of decline and extinction in the endemic Australian frog fauna. **Austral Ecology**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 564-571, 26 jul. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-9993.2005.01471.x>.

NEI, Masatoshi *et al.* The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. **Evolution**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 1, mar. 1975. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2307/2407137>.

NEIGEL, J e; AVISE, J C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. **Genetics**, [S.L.], v. 135, n. 4, p. 1209-1220, 1 dez. 1993. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/135.4.1209>.

NOSIL, P.; CRESPI, B. J. DOES GENE FLOW CONSTRAIN ADAPTIVE DIVERGENCE OR VICE VERSA? A TEST USING ECOMORPHOLOGY AND SEXUAL ISOLATION IN TIMEMA CRISTINAE WALKING-STICKS. **Evolution**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 102-112, jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01577.x>.

ORSINI, Luisa *et al.* Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 22, n. 24, p. 5983-5999, 18 nov. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12561>.

OKSANEN, Jari *et al.* *Package 'vegan'*. Versão 2.6-2, 17 abr. 2022. Disponível em: <https://github.com/vegandevs/vegan>. Acesso em: 07 out. 2024.

PECHMANN, Joseph H. K.; WILBUR, Henry M. *Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts*. *Herpetologica*, v. 50, n. 1, p. 65-84, 1994. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/3892876>. Acesso em: 07 out. 2024.

POTRICH, Ana Paula *et al.* Anurans of a remnant of Mixed Rainforest in southern Brazil. **Biota Neotropica**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 2-11, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2020-1091>.

PONS, O; PETIT, R J. Measuring and Testing Genetic Differentiation With Ordered Versus Unordered Alleles. **Genetics**, [S.L.], v. 144, n. 3, p. 1237-1245, 1 nov. 1996. Oxford University Press (OUP).

<http://dx.doi.org/10.1093/genetics/144.3.1237>.

RICKLEFS, Robert E. La economía de la naturaleza. 3. ed. Madrid: Ediciones de la Universidad de Salamanca, 2003.

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing.* Version 4.3.0, 2024. Viena: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.R-project.org>.

ROZAS, Julio *et al.* DnaSP 6: dna sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 18 set. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx248>.

SMITH, M. Alex; GREEN, David M.. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. **Ecography**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 110-128, fev. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0906-7590.2005.04042.x>.

SOLÓRZANO, Alexandro *et al.* The Atlantic Forest Ecological History: from pre-colonial times to the anthropocene. **The Atlantic Forest**, [S.L.], p. 25-44, 2021. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-55322-7_2.

SLATKIN, M. Gene Flow in Natural Populations. **Annual Review Of Ecology And Systematics**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 393-430, nov. 1985. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.002141>.

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 23 abr. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TEMPLETON, Alan R. *et al.* The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. **Annals Of The Missouri Botanical Garden**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 13, 1990. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2399621>.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.

VOS, C.C.; CHARDON, J.P.. Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. **Journal Of Applied Ecology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 44-56, fev. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2664.1998.00284.x>.

WELLS, Kentwood D. Capítulo 3: *Temperature relations*. In: WELLS, Kentwood D. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. p. 100-150.

WRIGHT, Sewall. EVOLUTION IN MENDELIAN POPULATIONS. **Genetics**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 97-159, 1 mar. 1931. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>.

WRIGHT, Sewall. ISOLATION BY DISTANCE. **Genetics**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 114-138, 29 mar. 1943. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>.

WRIGHT, Sewall. THE GENETICAL STRUCTURE OF POPULATIONS. **Annals Of Eugenics**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 323-354, jan. 1949. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>.