

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**Manoela Alberton Getelina**

**INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NO FLUXO GÊNICO E  
ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DE ANUROS DO BIOMA MATA  
ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL**

Santa Maria, RS

2022

Manoela Alberton Getelina

**INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NO FLUXO GÊNICO E  
ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DE ANUROS DO BIOMA MATA  
ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal**

Orientadora: Prof. Dr. André Passaglia Schuch

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001

Alberton Getelina, Manoela  
INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NO FLUXO GÊNICO E  
ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DE ANUROS DO BIOMA MATA  
ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL / Manoela Alberton  
Getelina.- 2022.  
127 p.; 30 cm

Orientador: André Passaglia Shuch  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências  
Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS,  
2022

1. Fragmentação de habitat florestal 2. Anfíbios especialistas de habitat 3.  
Genética de Populações 4. Danos celulares 5. Filogenia I.  
Passaglia Shuch, André  
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da  
Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta  
CRB 10/1728.

Declaro, MANOELA ALBERTON GETELINA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Manoela Alberton Getelina**

**INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NO FLUXO GÊNICO E  
ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DE ANUROS DO BIOMA MATA  
ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Biológicas – Área Biodiversidade Animal**.

**Aprovada em de 21 de setembro de 2022:**

---

**André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Lizandra Jaqueline Robe, Prof<sup>a</sup>. Dra (UFSM)**

---

**Ana Lúcia Segatto, Prof<sup>a</sup>. Dra (UFSM)**

---

**Samanta Iop, Prof<sup>a</sup>. Dra (USP)**

---

**Ibere Machado, Prof. Dr. (UFG)**

Santa Maria, RS  
2022

*Dedico esta Tese aos meus pais, Ana Alberton Getelina e Celso Getelina, que não mediram esforços para proporcionar-me educação e estudos de qualidade.*

## AGRADECIMENTOS

Um time, é um grupo de pessoas que se unem por um objetivo em comum, com isso, gostaria de agradecer a esse time de pessoas que foram fundamentais para execução deste trabalho:

Agradeço, primeiramente, à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde tive a oportunidade de cursar o Doutorado.

Agradeço imensamente ao professor **André Schuch (orientador)**, que tornou tudo isso possível, que foi determinante para as ideias saírem do papel e terem se tornado dados importantes para conservação. Ele que é um exemplo pra mim tanto como pessoa, quanto como profissional. Obrigada por compartilhar comigo um pouco de todo seu conhecimento durante esses anos de parceria, e me dar todo suporte, apoio e mostrar o caminho do crescimento dentro da pós graduação e como futura profissional Doutora. Nossas conversas sempre muito motivadoras e positivas, com palavras que nos colocam para cima e dão forças para seguir em frente. Serei sempre grata pela oportunidade e crescimento que proporcionaste! Conte sempre comigo!

Ao professor **Daniel Graichen**, por ser esse colaborador importantíssimo para execução deste trabalho e por sempre ter aberto as portas do laboratório para mim. Sempre muito acolhedor e preocupado com o nosso bem-estar. Você foi imprescindível para tornar essa ideia uma contribuição científica e uma tese. E não posso deixar de agradecer por ser o meu “pai da biologia molecular”, pois foi quem me apresentou todo esse mundo incrível e todas as suas possibilidades. Bem como a **Jéssyca**, que também foi responsável por me apresentar a genética, me ensinando as técnicas dentro do laboratório e por ter sido essa parceira de vida e de trabalho desde o mestrado e seguindo agora no doutorado, obrigada por tanto. A **Sofia**, que esteve comigo no laboratório também desde o início de tudo e me ajudou muito em todo processo, sempre acolhedora com um abraço pra dar, uma boa conversa e com sua presença leve e descontraída dentro do lab, saiba que a oportunidade de dividir o dia a dia com você foi muito importante para mim. Além deles, aos também colegas do laboratório de Genética Evolutiva, **Adriano, Andriele, Mariana, Pedro e Lynara, Kauane**, por darem seu apoio e ajuda, entre um café e outro, no dia a dia e rotina do laboratório, companheiros de diagnóstico da Covid-19 e dos dias intensos de experimentos. Agradecer também a equipe **Detecta**, pela oportunidade de participar do diagnóstico da Covid-19, por todo auxílio e aprendizagem.

Aos meus colegas do laboratório de Fotobiologia, **Bruna, Cassiano e Sophia**, aos quais sempre tive uma conexão e uma troca muito grande, que me receberam de braços abertos no

laboratório e me ensinaram muito. Também aos membros do laboratório, **James, Luana, Rayana, Bruno, Marcelo, Maurício e Karen**, por todas as conversas, receptividade, apoio e auxílio.

Gostaria de deixar registrado também meu agradecimento aos coordenadores do PPGBA, **prof. Dr. André Schuch e prof. Dr. Cristian Dambros**, e ao secretário, **Sidnei Cruz**, pelo auxílio e disponibilidade de sempre. Também agradecer aos docentes do PPGBA, por todos ensinamentos durante as disciplinas e discussões científicas ao longo desses anos, vocês foram fundamentais no meu desenvolvimento. Em especial, a alguns docentes que foram fundamentais para o crescimento deste trabalho dando suas contribuições na banca de qualificação e em seminários, como a **prof. Dra. Lizandra Robe, prof. Dra. Ana Lúcia Segatto e Dra. Geruza Melo**.

Aos meus parceiros incansáveis de campo (Gilci, Vane, Geverton, Marcelo, Aline). Não sei quais olhos que brilhavam mais nos riachos, se eram o dos insetos ou os nossos ao ver os “sapinhos”.

Agradeço a toda minha família e amigos, que sempre me incentivou a estudar, me proporcionou esta oportunidade e sempre me deu suporte para tudo, **pai, mãe e irmã** e ao **Guilherme**. Agradeço muito ao **Geverton**, por toda ajuda nos campos, no trabalho, e por todo o apoio de sempre. As minhas amigas **Luma, Débora, Juliana, Julie, Daniela e Gilci** e a minha colega e amiga de PPG **Sheila**.

Por fim, agradeço

*Ao **IBAMA** pela licença de coleta*

*Agradeço também à **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de doutorado concedida.*

*À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, de coração, muito obrigada!*

*“A única verdade que persiste é a mudança”*

*Octavia Butler*



## **EPÍGRAFE- Apresentação geral**

Como estão as espécies de anfíbios de riacho e dependentes de ambientes florestais na paisagem fragmentada? Como está o fluxo gênico e diversidade genética dessas espécies, que possuem baixa capacidade de locomoção e que não conseguem migrar facilmente para outros fragmentos?

Com base nestes questionamentos centrais, observamos a importância de avaliar espécies com baixa vagilidade, como no caso dos anfíbios especialistas de habitat de riacho e de ambientes florestais. O projeto inicial era trabalhar com três espécies que se distribuem ao longo da paisagem do bioma Mata Atlântica no sul do Brasil, sendo elas *Crossodactylus schimidt*, *Vitreorana uranoscopa* e *Boana curupi*. Para isso, desenvolvemos uma metodologia que poderia ser replicada a essas três espécies (uma por manuscrito), em diferentes fragmentos (Figura 1a). De início, já percebemos a primeira lacuna na literatura, a falta de registros dos locais de ocorrência das espécies. No primeiro capítulo, com a espécie *Crossodactylus schimidt*, desenvolvemos a metodologia com os principais fatores que poderiam ser avaliados nos fragmentos amostrados, sendo eles avaliar fragmentos e Unidades de Conservação de diferentes tamanhos, verificar a perda de habitat que essas áreas possam ter sofrido ao longo dos últimos anos, bem como o atual tamanho desses fragmentos, analisar a diversidade genética das populações encontradas e a quantidade de danos genotóxicos que poderiam estar sofrendo. Após o desenvolvimento do primeiro manuscrito, iniciamos a aplicação da metodologia a espécie *Vitreorana uranoscopa*, até o momento avaliamos as áreas de ocorrência e os danos genotóxicos.

Concomitantemente, iniciamos a aplicação da metodologia com a espécie *Boana curupi*. No entanto, ao analisar as amostras de DNA, verificamos que não se tratava apenas da espécie em questão e sim de mais espécies do mesmo gênero. Os indivíduos que acreditávamos ser *Boana curupi*, na verdade eram quatro espécies morfológicamente semelhantes e sem registro de ocorrência para região. Com isso, mudamos nossa abordagem, concluindo que o passo mais importante inicialmente seria registrar corretamente as espécies nos locais de ocorrência. Concomitantemente,

Durante o desenvolvimento dessa pesquisa, tive a oportunidade aprender muitas técnicas, bem como aplicá-las em prol da conservação. Pude desenvolver escrita, leitura, participar de congressos com apresentação de trabalho, aprender com as disciplinas e discussões científicas proporcionadas pelo PPG e seus docentes. Além disso, tive a oportunidade de

participar do LabFotobio, coordenado pelo prof. André Schuch e do laboratório Genevo, coordenado pelo prof. Daniel Graichen, aprendendo diversas técnicas e abordagens e tendo acesso a estrutura necessária para desenvolvimento da metodologia desta pesquisa. No metade do meu doutorado, logo após a qualificação, iniciou a pandemia, mesmo sendo tempos difíceis, tive a oportunidade de participar do diagnóstico da Covid-19, no laboratório GenEvo, ao qual já fazia parte, podendo aplicar o que já havia aprendido dentro da pesquisa até o momento, bem como aprender técnicas novas. Essa oportunidade foi muito importante para meu desenvolvimento pessoal e profissional dentro da pesquisa, afinal, naquele momento, devido aos conhecimentos obtidos dentro dos laboratórios, pude estar na linha de frente da detecção do vírus, realizando um papel importante para a comunidade.

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NO FLUXO GÊNICO E ESTRUTURA CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DE ANUROS DO BIOMA MATA ATLÂNTICA NO SUL DO BRASIL

AUTORA: Manoela Alberton Getelina

ORIENTADORA: André Passaglia Schuch

A Mata Atlântica, é um vasto e heterogêneo bioma florestal, compreendendo cerca de 17% do território brasileiro, com apenas 12% de área original remanescente, resultante de uma paisagem extremamente fragmentada. A fragmentação pode ocasionar declínios e isolamentos populacionais e, com isso, causar danos cromossômicos e afetar a estrutura e a variabilidade genética das espécies e populações. Dentre os vertebrados, os anfíbios são o grupo taxonômico mais ameaçado, devido suas características fisiológicas e biológicas como permeabilidade da pele, baixa vagilidade, pequeno tamanho corpóreo, fase larval aquática, entre outros. Neste sentido, este trabalho tem o objetivo de avaliar o impacto da fragmentação de habitat na diversidade genética e instabilidade genômica em populações de anuros de riachos na Mata Atlântica. As coletas foram realizadas em cinco fragmentos de diferentes tamanhos, em três espécies (*Crossodactylus schmidtii*, *Vitreorana uranoscopa* e *Boana curupi*) restritas a ambientes de riachos do bioma Mata Atlântica. A hipótese inicial era que as populações encontradas em fragmentos com menor tamanho possuem uma maior instabilidade genômica, acumulando mais danos no DNA dos indivíduos, e menor variabilidade, comparadas as populações dos fragmentos florestais maiores. Os nossos resultados demonstraram que mesmo fragmentos menores, de até 4,6 hectares, podem manter populações de anfíbios específicas de habitat, se possuem os recursos necessários, como meio hídrico disponível. Além disso, populações em fragmentos menores, mesmo apresentando mais danos genômicos, em alguns casos, possuem diversidade genética considerável e podem se manter saudáveis com a preservação da área. Quanto aos fragmentos maiores, como Unidades de Conservação, além de manterem um maior número de indivíduos, devido a maior disponibilidade de recursos, também realizam um papel importante nas matrizes que estão inseridas, onde servem como os principais dispersores da variabilidade genética para as demais áreas vizinhas.

**Palavras-chave:** Anfíbios de riacho; Diversidade genética; Instabilidade genômica, Unidades de Conservação, Pequenos Fragmentos.

## ABSTRACT

The Atlantic Forest is a vast and heterogeneous forest biome, covering about 17% of Brazilian territory with only 12% of the original area remaining, resulting from an extremely fragmented landscape. Fragmentation can lead to population declines and isolation and thus cause chromosomal damage and affect genetic structure and variability. Among vertebrates, amphibians are the most threatened taxonomic group due to their physiological and biological characteristics such as skin permeability, low vagility, small body size, aquatic larval phase, among others. In this sense, this work aims to evaluate the impact of habitat fragmentation on genetic diversity and genomic instability in anurans populations in Atlantic Forest streams. The samplings were made in five fragments of different sizes, in three species (*Crossodactylus schmidtii*, *Boana curupi*, and *Vitreorana uranoscopa*) restricted to stream environments in the Atlantic Forest biome. The initial hypothesis was that populations found in smaller forest fragments present larger genomic instability, accumulating more damage in the DNA of individuals, and a lower genetic variability, compared to populations in larger forest fragments. Our results show that even smaller fragments of up to 4.6 hectares can maintain specific amphibian habitat populations if present the necessary resources such as available water. Furthermore, populations in smaller fragments, even if they present more genomic damage, in some cases possess considerable genetic diversity and can remain healthy with the preservation of the area. As for the larger fragments, such as Protected Units, in addition to maintaining a higher number of individuals due to the larger availability of resources, they also play an important role in the matrices where they are located, where they serve as the main spreaders of genetic variability to the other neighbor areas.

**Keywords:** Stream amphibians; Genetic diversity; Genomic instability, Protected Units, Small fragments.

## LISTA DE FIGURAS

### TEXTO INTEGRADOR

FIGURA 1 – <i>Crossodactylus schimidti</i> .....	23
FIGURA 2 – <i>Vitreorana uranoscopa</i> .....	24
FIGURA 3 – <i>Boana curupi</i> .....	26

### ARTIGO I – Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran

FIGURE 1 – Sampling areas with their tributaries. The distances in kilometers of each area in relation to area 1 (A1) are shown below each fragment at the top of the figure.....	46
FIGURE 2 - Analysis of satellite images indicating the maintained area, gained area and lost in hectares (ha) from 1985 to 2018 of four forest fragments (1, 2, 3 and 4) where <i>C. schmidti</i> individuals were sampled.....	47
FIGURE 3 - Haplotype network (by <i>median-joining</i> ) of <i>16S</i> , <i>COI</i> and <i>TYR</i> sequences.....	47
FIGURE 4 - Haplotype network of concatenated <i>COI</i> and <i>16S</i> genes .....	48
FIGURE 5 - Frequency of chromosomal instability (micronuclei and binucleated cells) and dead cells (apoptosis and necrosis) observed in sampled individuals of <i>C. schmidti</i> in five different streams of forest fragments (A1-a, A1-b, A1, A2, A3 and A4); a – statistically non-significant; b – statistically significant ( $p < 0.05$ ) .....	49

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

FIGURE 1s - Haplotype network (by <i>median-joining</i> ) of <i>COI</i> gene for the two populations in the 1 area (A1-a and A1-b) .....	57
FIGURE 2s- Total number of chromosomal instability.....	58

### ARTIGO II - Influência da fragmentação de habitats na diversidade genética e estrutura cromossômica de *Vitreorana uranoscopa* Muller, 1924 (Anura: Centrolenidae) no bioma Mata Atlântica sul do Brasil

FIGURA 1 - Áreas de coleta das amostras. As distâncias em quilômetros das áreas 2, 3, 4 e 5 em relação à área 1 (maior área) são mostradas abaixo de cada fragmento na parte superior da imagem.....	68
--	----

FIGURA 2 - Análise de imagens de satélite das cinco áreas de amostragem previstas neste estudo, indicando as alterações ambientais sofridas entre os anos de 1985 e 2019, os quadros vermelhos indicam as quatro áreas com a presença da espécie <i>Vitreorana uranoscopa</i> .....	69
FIGURA 3 - Frequência de micronúcleos e alterações nucleares em adultos de quatro populações de <i>Vitreorana uranoscopa</i> amostradas em quatro áreas.....	70

### **ARTIGO III - Espécies simpátricas de *Boana*: estrutura populacional e novos registros de distribuição no sul da Mata Atlântica**

FIGURA 1 - Mapa da América Latina com os pontos de coleta das amostras das espécies <i>Boana curupi</i> , <i>Boana stellae</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	90
FIGURA 2 - Rede de haplótipos (Network por median-joining) do gene mitocondrial 16s de quatro espécies do gênero <i>Boana</i> , <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	91
FIGURA 3 - Rede de haplótipos (Network por median-joining) do gene mitocondrial COI de quatro espécies do gênero <i>Boana</i> , <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	92
FIGURA 4 - Filogenia molecular resumida de Análise Bayesiana para os dados do gene 16s utilizando sequências de <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	93
FIGURA 5 - Filogenia molecular resumida de Análise Bayesiana para os dados do gene COI utilizando sequências de <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	94

#### **MATERIAL SUPLEMENTAR**

FIGURA 1S - Filogenia molecular detalhada de Análise Bayesiana para os dados do gene 16s utilizando sequências de <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	102
FIGURA 2S - Filogenia molecular detalhada de Análise Bayesiana para os dados do gene COI utilizando sequências de <i>Boana stellae</i> , <i>Boana curupi</i> , <i>Boana joaquina</i> e <i>Boana sp</i> .....	106

## LISTA DE TABELAS

### TEXTO INTEGRADOR

TABELA 1- .....	26
-----------------	----

### **ARTIGO I – Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran**

TABLE 1 - Primer sequences and amplicon sizes of mitochondrial ( <i>COI</i> and <i>16S</i> ) and nuclear ( <i>TYR</i> ) target genes.....	42
TABLE 2- Genetic diversity indices based on the <i>COI</i> , <i>16S</i> and <i>TYR</i> sequences of five populations of <i>Crossodactylus schmidtii</i> .....	43
TABLE 3 - Pairwise fixation index values ( $F_{ST}$ ) of genetic differentiation of five populations of <i>C. schmidtii</i> based on <i>COI</i> , <i>16S</i> and <i>TYR</i> sequences.....	44

### **ARTIGO II - Influência da fragmentação de habitats na diversidade genética e estrutura cromossômica de *Vitreorana uranoscopa* Muller, 1924 (Anura: Centrolenidae) no bioma Mata Atlântica sul do Brasil**

TABELA 1 - Número total de instabilidade cromossômica.....	71
--	----

### **ARTIGO III - Espécies simpátricas de *Boana*: estrutura populacional e novos registros de distribuição no sul da Mata Atlântica**

TABELA 1S - Sítios de amostragem genética do gênero <i>Boana</i> no sul do Brasil e nordeste da Argentina.....	99
TABELA 2S - Distância genética (distância p) par a par, calculada entre os grupos de espécies, <i>B. curupi</i> , <i>B. joaquini</i> , <i>B. stellae</i> e <i>Boana sp.</i> .....	101

## SUMÁRIO

TEXTO INTEGRADOR.....	18
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1.1. <i>Crossodactylus schimidti</i> .....	23
1.1.2 <i>Vitreorana uracoscopa</i> .....	24
1.1.3 <i>Boana curupi</i> .....	25
<b>2. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 ARTIGO I .....	29
2.1.2 ARTIGO II.....	59
2.1.3 ARTIGO III.....	80
TEXTO INTEGRADOR.....	110
<b>3. DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>117</b>
REFERÊNCIAS .....	118
ANEXO 1.....	125

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está estruturada de acordo com as normas do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e atende exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal (PPGBA). A tese integra



os requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Biodiversidade Animal, sendo composta por um breve texto integrador, artigos científicos (que compõem 3 capítulos), discussão final, considerações finais, principais resultados e perspectivas futuras. A metodologia empregada na tese está descrita em cada um dos trabalhos científicos.

O texto integrador inclui uma contextualização dos temas dos três capítulos, a atual situação das paisagens fragmentadas do bioma Mata Atlântica e como isto influencia espécies de anfíbios especialistas de habitat de riacho e ambientes florestais, além de abordar os atuais dados das espécies de anfíbios estudadas nesta tese. Subsequente a contextualização introdutória, segue a apresentação dos objetivos da tese.

**Artigo I: (publicado) Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran**

Neste capítulo avalio os impactos causados por pressões antrópicas em populações de da espécie *Crossodactylus schimdt*, anfíbio ameaçado e dependente de ambientes florestais com recurso hídrico disponível para sobrevivência no bioma Mata Atlântica, no sul do Brasil.

**Artigo II: Influência da pressão antrópica na diversidade genética e estrutura cromossômica de *Vitreorana uranoscopa* Muller, 1924 (Anura: Centrolenidae) no bioma Mata Atlântica, sul do Brasil**

Neste capítulo avalio os impactos causados pela fragmentação de habitat em populações de uma espécie de anfíbio de riacho de ambientes florestais, ameaçado de extinção.

**Artigo III: Espécies simpátricas de *Boana*: estrutura populacional e novos registros de distribuição no sul da Mata Atlântica**

Neste capítulo apresento a distribuição do gênero *Boana* na paisagem da região sul do bioma Mata Atlântica, sul do Brasil. Também apresento novas distribuições e novos registros de espécies do gênero, auxiliando na elucidação dos locais de ocorrências de quatro espécies do gênero.

## **TEXTO INTEGRADOR**

### **1. INTRODUÇÃO**

A lei brasileira através da resolução 001 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 1986 define impacto ambiental como “qualquer alteração das propriedades

físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente afetam a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais”.

A fragmentação, é definida como a subdivisão do habitat em manchas menores e mais isoladas, geralmente ocorre no mundo real em conjunto com a perda de habitat (WATSON et al., 2014; WILSON, 2014). A fragmentação dos biomas resulta em uma diminuição da riqueza das espécies e das densidades populacionais, exceto de algumas poucas espécies com melhor adaptação nesse novo cenário fragmentado, o que acaba afetando a biodiversidade e aumentando a homogeneização dos ambientes. Um fator determinante para as alterações que vem ocorrendo e para a extinção é a quantidade de habitats desses biomas, que está sendo reduzida a fragmentos (MULTINI et al., 2020). Além disso, há também os fatores mais específicos de cada fragmento, que afetam a distribuição e a abundância de espécies no habitat, incluindo a luz solar incidente (principalmente raios UV), cobertura vegetal, temperatura, umidade relativa e o aumento do uso de pesticidas (HARPER et al., 2005; HAYES et al., 2010).

Dentre os biomas florestais, o bioma Mata Atlântica tem sofrido intensamente com processos de fragmentação e desmatamento, causados principalmente pela pressão antrópica e alterações feitas pelo ser humano. Originalmente, o bioma Mata Atlântica se distribuía do nordeste da Argentina e Paraguai ao nordeste do Brasil. Mesmo sendo considerado um dos principais hotspots mundiais de biodiversidade com paisagens heterogêneas que favorecem a manutenção dos índices elevados de diversidade e endemismo, atualmente há apenas cerca de 12 % de sua cobertura original (MITTERMEIER et al., 2005; ROCHA et al., 2005; RIBERIRO et al., 2009; NASCIMENTO; CAMPOS, 2011).

A perda de habitat consiste na destruição de sistemas naturais por ações humanas e é um fator principal indiscutível da perda de biodiversidade e serviços ecossistêmicos (DOBSON et al., 2006). A fragmentação e perda de habitat estão entre os principais fatores que causam declínio e alterações em todos os grupos de plantas e animais que ali habitam. No grupo dos anfíbios, considerando o seu pequeno tamanho corpóreo e a baixa capacidade de locomoção, o isolamento populacional pode se tornar um fator determinante para sobrevivência. Fatores como o isolamento pode levar à endogamia, devido ao baixo fluxo gênico, além de potencialização do efeito de borda e a questão da ocorrência da espécie, que pode estar diretamente associada às particularidades e qualidade do habitat (ANDRÉN, 1994; BECKER et al., 2007; GIOVANELLI et al., 2010).

Os anfíbios são importantes indicadores biológicos, uma vez que são vulneráveis às mudanças no seu habitat devido, principalmente, por ocorrerem em ambientes aquáticos e terrestres. Além disso, anfíbios de interior de ambientes florestais tendem a ser mais vulneráveis (LIPS, 1998; DECENA et al., 2020). Espécies como, *Crossodactylus schmidti* (Hylodidae), *Boana curupi* (Hylidae) e *Vitreorana uranoscopa* (Centrolenidae) são especialistas de habitat e encontradas apenas em riachos localizados em fragmentos de Mata Atlântica no sul do Brasil e em países vizinhos (CARAMASHI; SAZIMA, 1985; CARVALHO-SILVA, 2001). *C. schmidti* tem distribuição no sul do Paraguai, norte da Argentina e sul do Brasil (CALDART et al., 2010). Segundo a IUCN 2017, a espécie tem status de quase ameaçada (NT) e na lista vermelha do RS (FZB, 2014) é listada na categoria em perigo (EM). *B. curupi* é endêmica da Mata Atlântica e tem ocorrência no norte Argentino e sul do Brasil (FROST, 2017). Segundo a IUCN 2017, a espécie está em status de pouco preocupante (LC). Na lista vermelha das espécies ameaçadas do estado do Rio Grande do Sul (FZB, 2014), a mesma está na categoria em perigo (EM) (IUCN, 2017). Já *V. uranoscopa* tem status de pouco preocupante (LC) (IUCN, 2017) e na lista vermelha do Rio Grande do Sul (FZB, 2014) está na categoria quase ameaçada (NT).

A necessidade de conservação, manejo e recuperação das espécies e dos ambientes necessita de uma abordagem mais ampla, que além de estudos ambientais inclua esforços voltados para a genética de populações (Souza et al., 1998). Estudos que elucidam características genéticas são de grande importância para manutenção das populações na paisagem, e podem identificar barreiras que afetam ou fatores que facilitam o fluxo gênico. Desta forma, é importante avaliar o tamanho mínimo de fragmentos florestais preservados, a existência de áreas de contato entre os fragmentos e elaborar medidas de preservação de ambientes terrestres e aquáticos para manter a conectividade entre as populações, auxiliando assim, na manutenção da diversidade genética e perpetuação das espécies (SEGELBACHER et al., 2010; EMEL; STORFER, 2012; COX, 2017). Além disso, nestes estudos, torna-se importante sempre utilizar indivíduos de fragmentos diferentes, para verificar quais fatores externos podem estar interferindo na estrutura populacional (UDROIU; SGURA, 2017).

Neste contexto, marcadores genéticos têm sido utilizados em estudos de estrutura populacional (BEEBEE, 2005). Marcadores baseados nas sequências de DNA são capazes de inferir processos microevolutivos, ampliando o conhecimento sobre dinâmica populacional e possibilitando investigar a variabilidade genética entre indivíduos, populações e espécies. (ZHANG; HEWITT, 2003). De acordo com Lyra et al., (2016), o gene Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COI) se mostrou muito eficiente como marcador genético padrão para análises de populações de uma mesma espécie, em nível individual. É amplamente recomendado o uso

de DNA barcode para anfíbios associado também a outros genes nucleares e mitocondriais (VENCES et al., 2005; ZANGL et al., 2020). Muitos estudos tem utilizado COI e o método barcondig para identificação molecular de espécies de anfíbios e para análises de diversidade genética (WILSON et al., 1974; HEBERT et al., 2003; DEICHMANN et al., 2017; AMARAL et al., 2019).

Além da utilização de marcadores moleculares em estudos de genética populacional, também há outras técnicas bastante utilizadas, como por exemplo, as técnicas de citogenética que podem ser usadas no intuito de avaliar a estrutura cromossômica de uma população, bem como a presença de danos genômicos. Nos estudos de genética populacional, é importante sempre utilizar dois ou mais grupos de indivíduos em ambientes/fragmentos diferentes e que irão diferir nos fatores externos (UDROIU; SGURA, 2017). Para análises citogenéticas, pode-se utilizar regiões cromossômicas contendo genes de rRNA, em que a atividade de síntese se origina no nucléolo, nas chamadas Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) (MACGREGOR, et al., 1972). A NOR é composta basicamente por sequências que correspondem a transcrição primária de rRNA (SHAWARZACHER; MASGOLLER, 2000). Além do heteromorfismo que pode ser detectado, variações inter e intrapopulacionais no número e localização da NOR já foram relatadas para alguns anuros da família Hylidae (SILVA et al., 1999).

Alterações cromossômicas podem ocorrer por exposição a determinados fatores externos (BOSH et al., 2011; LAJMANOVICH et al., 2014). Ao analisarmos o grupo dos anfíbios, onde as espécies de riacho tem fase aquática e terrestre (BECKER et al., 2010), os indivíduos podem entrar em contato com diversos fatores, como agrotóxicos, o que os torna um grupo bastante importante para mensurar a genotoxicidade em seus habitats (VALENCIA et al., 2011; LAJMANOVICH et al., 2014). Há estudos que identificaram a presença de micronúcleos nas células, o que evidencia um dano causado por algum estresse que o indivíduo foi submetido no ambiente (LAJMANOVICH, 2005; MOUCHET et al., 2011). Os micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos ou inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a divisão celular (ROCHA, 2011). A formação do micronúcleo pode ocorrer de forma espontânea, mas principalmente por variações ambientais ou ainda pela presença de agentes contaminantes no ambiente. Os micronúcleos também podem aparecer nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais (FENECH, 2003; LAJMANOVICH et al., 2014).

Danos genômicos podem ser causados por diversos fatores externos, que, com o aumento da fragmentação, pode aumentar a exposição dos indivíduos a estes fatores

(CUSHMAN, 2006). Além disso, a fragmentação também pode acarretar em isolamento populacional, diminuição no fluxo gênico (DIXO, 2009), alterações genômicas (Lin & Wang, 1987) e perda de biodiversidade (CUSHMAN, 2006). Porém, não existe um padrão consistente nas reações das espécies ou padrões que determinem a qualidade e quantidade de fragmento necessário para manter essas espécies de anfíbios. Considerando a taxa alarmante de perda de habitat nos trópicos e o fato de que grandes áreas de proteção contínua de floresta são limitadas, torna-se cada vez mais importante determinar o valor da biodiversidade nos fragmentos, a fim de investigar efeitos de fragmentação em anfíbios de floresta tropical (RIEMANN et al., 2015).

A conservação de espécies geralmente tem foco principal na preservação de populações em fragmentos de habitats remanescentes, normalmente sem evidências de que essa abordagem seja suficiente para interromper o declínio (STOKES et al., 2021). Então, quando tratamos sobre espécies ameaçadas e especialistas de habitat, muitos fatores se tornam importantes para serem avaliados, e podem ser associados, dentre eles, fragmentação de habitat, danos genômicos, diversidade genética dessas populações e fluxo gênico. Além disso, também se torna importante identificar a espécie corretamente na paisagem e registrar aonde ocorrem. Assim, novas distribuições e registros de espécies são os primeiros passos para inserir estratégias de conservação.

### 1.1 Gênero *Crossodactylus*

O gênero *Crossodactylus* pertencente à família Hylodidae (DUMÉRIL; BIBRON, 1841), conhecidos popularmente como “rãzinhas-do-riacho”. Este gênero atualmente compreende 11 espécies diurnas que habitam riachos montanhosos na Mata Atlântica ou savana montanhosa e campos rupestres. A área de distribuição conhecida do gênero vai do nordeste do Brasil até o norte da Argentina, através do sul do Paraguai, desde o estado de Alagoas no nordeste do Brasil até a Província de Misiones no nordeste da Argentina (NASCIMENTO et al., 2005). Haddad et al., (2003) reconheceram este gênero como o menos resolvido taxonomicamente dentro de Hylodidae. Tanto a literatura, quanto as coleções de museus estão repletas de espécimes não identificados e identificados incorretamente devido à escassez de dados sobre variação e distribuição geográfica das espécies de *Crossodactylus* (PIMENTA et al., 2008). *Crossodactylus* é atualmente dividido entre três grupos de espécies: os grupos *C. gaudichaudii*, *C. trachystomus* e *C. schmidti*, o primeiro dos quais contém a maioria das espécies reconhecidas (AMPHIBIA WEB, 2022).

### 1.1.1 *Crossodactylus schimdti*

*Crossodactylus schimdti* (Figura 1) conhecida popularmente como rãzinha-de-riacho, possui seu habitat natural em áreas florestadas com sítio reprodutivo em rio ou riacho. Tem hábitos noturnos e é endêmica da Mata Atlântica (TOLEDO et al., 2021). *Crossodactylus schimdti* tem distribuição na região sul do Brasil, no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Em Santa Catarina, essa espécie está classificada como criticamente em perigo de extinção (CR). Nas listas nacionais é classificada como quase ameaçada (NT) (ICMBio, 2021). Possui grande vulnerabilidade à extinção devido principalmente à diminuição das áreas ripárias, podendo afetar essa espécie por suas características, já que todas as fases dessa espécie estão relacionadas a esse habitat com características dependentes da mata ciliar e riacho (ALMEIDA-GOMES et al., 2013).

Figura 1: Espécie *Crossodactylus schimdti*.



### 1.1.2 *Vitreorana uranoscopa*

O gênero *Vitreorana* contém nove espécies, distribuídas na Argentina, Colômbia, Guiana, Equador, Paraguai, Venezuela e Brasil (FROST, 2014). A espécie *Vitreorana*

*uranoscopa* (Figura 2) está distribuída ao longo da Mata Atlântica (Semidecídua, Floresta Ombrófila Mista e na Floresta Ombrófila Densa) nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e na província de Misiones na Argentina, e é dependente de ambientes aquáticos e florestados (HEYER, 1985; CARVALHO-SILVA et al., 2008). No Rio Grande do Sul, está na categoria quase ameaçada (NT) (FZB, 2014) e pela IUCN tem status de pouco preocupante (LC) (IUCN, 2017).

Figura 2: Espécie *Vitreorana uranoscopa*.



### 1.1.3 Gênero *Boana*

A família Hylidae é a mais diversa dentre os anuros. Trata-se de um grupo monofilético, amplamente distribuído, mas com concentração de sua diversidade observada na região Neotropical. Dentro desta família, o gênero *Boana* compreende 100 espécies distribuídas da América Central até as regiões subtropicais da América do Sul, do centro da Argentina à Nicarágua e Hispaniola. Nas Índias Ocidentais, tem representantes em diferentes biomas desde florestas úmidas até áreas secas e abertas, incluindo diversas elevações. Recentemente, o gênero foi redefinido em sete grupos de espécies: *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pellucens*, *B. pulchella*, *B. punctata*, e *B. semilineata*. O grupo *Boana pulchella* possui grande parte da diversidade filogenética e morfológica do gênero. Conhecidas como pererecas gladiadoras,



devido ao comportamento territorialista e os machos possuem espinhos nos membros superiores que são usados nas brigas por territórios. Possuem algumas características morfológicas marcantes que se distribuem nas espécies do grupo, como uma listra verde irregular que se estende desde o olho até a narina, e uma mancha verde entre os olhos e o tímpano. Este grupo teve origem na Mata Atlântica e após radiaram para outras regiões. Pertencentes a este grupo, dentro de um mesmo clado, estão *B. semigunttata*, *B. caipora*, *B. curupi*, *B. joaquini*, *B. stellae* (DUELLMAN et al. 1997; FAIVOVICH et al., 2005; KÖHLER et al. 2010; AMPHIBIA WEB, 2021; FAIVOVICH et al., 2021). É notável o crescimento da diversidade dentro deste grupo, pois até o ano de 2003, haviam apenas 15 espécies descritas. Este crescimento ocorreu devido ao aumento de estudos filogenéticos de hílideos, a descrição de novas espécies e novos registros de outras, porém este conhecimento ainda está longe ser estável (FAIVOVICH et al., 2004; FAIVOVICH et al., 2021)

#### 1.1.4 *Boana curupi*

É endêmica da região de Misiones, Argentina (Figura 3). Seu habitat vegetativo ideal é a floresta estacional e a floresta de araucárias no Domínio da Mata Atlântica. É encontrada as margens de córregos nos ambientes florestais. Registrada também no Paraguai e seu padrão de dispersão parece estar correlacionado com as bacias dos rios Paraná e Uruguai. No Brasil, até o momento, há registros de presença no estado do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Considerada como EM (Em perigo) na lista regional do estado do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2014) e como VU (Vulnerável) no Brasil (GARCIA et al., 2007; IOP et al., 2009; LUCAS; GARCIA, 2011; FONTANA et al., 2017; ICMBIO, 2018; FROST., 2021; AMPHIBIAWEB., 2022).

Figura 3: Espécie *Boana curupi*.



Tabela 1. Áreas amostradas neste estudo, com registro da presença ou ausência das espécies *Crossodactylus schmidti*, *Vitreorana uranoscopa*, *Boana curupi*, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, Brasil.

ÁREA	<i>Crossodactylus schmidti</i>	<i>Vitreorana uranoscopa</i>	<i>Boana curupi</i>
Parque Estadual do Turvo-Derrubadas/RS	X	X	X
Reserva Biológica Moreno Fortes- Dois Irmãos das Missões/RS	X	X	
Fragmento em propriedade particular em área urbana- Frederico Westphalen/RS	X	X	

Fragmento em propriedade particular, Tenente Portela/ RS	X		
Parque Estadual do Papagaio Charão/RS		X	X
Parque Municipal de Sertão/RS		X	X
Chapecó/SC			X
Palma Sola/SC			X
Caxambu do Sul/SC			X
Parque Estadual das Araucárias-São Domingos/SC			X
São Miguel do Oeste/SC			X
Parque Estadual Fritz Plaumann Concórdia/SC			X
Dois Vizinhos/PR			X

**ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## 2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

**3.1 ARTIGO I-** O Artigo 1, intitulado: “Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an endangered forest-specialist anuran”, foi publicado no periódico *Hydrobiologia*, ISSN:0018-8158. 2022 v.849 no.11 pp. 2463-2475.



**INFLUENCE OF ANTHROPOGENIC PRESSURE ON THE GENETIC DIVERSITY  
AND CHROMOSOMAL INSTABILITY OF AN ENDANGERED FOREST-  
SPECIALIST ANURAN**

Getelina, M.A.<sup>1</sup>; Schwantes, J.B.<sup>1</sup>; Graichen, D.A.S<sup>1</sup>; Schuch, A.P.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Animal Biodiversity, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900, Brazil.

\* Corresponding author: Av. Roraima, 1000, P.O. Box 5021, room 3010, Camobi, Santa Maria, RS, 97110-970, Brazil. Fone: 55.55.3220-8136.

E-mail: [schuchap@gmail.com](mailto:schuchap@gmail.com)

Manoela Alberton Getelina - Orcid: 0000-0001-8367-8682

Jéssyca Bressan Schwantes - Orcid: 0000-0002-5813-1789

Daniel Ângelo Sganzerla Graichen - Orcid: 0000-0002-7516-0864

André Passaglia Schuch - Orcid: 0000-0001-7398-7553

### **Declarations**

#### **Founding**

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq – 407103/2018-0; 307063/2018-6] and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [CAPES/PROEX – 23038.005848/2018].

#### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Availability of data**

All data of this research is presented in the results of the manuscript and supplementary material.

#### **Ethics approval**

This work was performed by following the authorizations provided by the Information System on Biodiversity of the Brazilian Ministry of the Environmental (authorization number 64137-1) and the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria, Brazil (protocol number 9073031218).

**Acknowledgments**

We thank the Information System on Biodiversity of the Brazilian Ministry of the Environmental and the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Santa Maria for access field sites, collect sample and conduct the experiments. We are also thankful to the farmers for the access to the field sites located in their particular areas. This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq – 407103/2018-0; 307063/2018-6] and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [CAPES/PROEX – 23038.005848/2018].

## Abstract

Deforestation leads to changes in the landscape, which can isolate and decrease the size of populations affecting their structure and genetic variability. Additionally, it can increase the frequency of chromosomal damage due to exposure to genotoxic agents present in the environment. Among vertebrates, amphibians are the most threatened taxonomic group, especially forest-specialist species. Our work aimed to assess the impact of deforestation on landscape, as well as in the genetic diversity and genomic instability of populations of the amphibian specie *Crossodactylus schmidtii*, which is restricted to well-preserved stream environments in the Atlantic rainforest in southern Brazil. Sampling of oral mucosa cells was carried out in four different forest fragments. We analyzed a total of 200 sequences of two mitochondrial and one nuclear gene, as well as 1000 oral mucosa cells per individual through cytogenetic analyses. Our results clearly indicate that all forest fragments analyzed in this work are important for the genetic diversity and maintenance of these populations in the landscape, regardless of size. However, the largest fragment has the major role as disperser of genetic diversity, highlighting the importance of conservation units and large forest fragments for the persistence of endangered forest-specialist amphibian species.

**Keywords:** Amphibian decline; habitat loss; DNA damage; genetic variability.



## Introduction

Changes caused by human development, especially urbanization and activities related to land use, have seriously modified ecosystem patterns around the world (Gibbs et al., 2010; Osti et al., 2011; Johnson et al., 2018). These changes are mostly related to the fragmentation of the original habitats. Fragmentation and habitat loss are some of the main causes of species decline today, as these can lead to population isolation, potentiation of edge effect and inbreeding due to the low gene flow between the areas (Becker et al. 2007). In addition, there are also more specific factors that affect species richness, distribution and abundance in fragmented landscapes, such as vegetation cover, temperature, relative humidity, incidence of solar (mainly ultraviolet (UV)) radiation, and increased exposure to pesticides (Harper et al., 2005; Hayes et al., 2010; Londero et al., 2019; Da Rocha et al., 2020).

Fragmentation and habitat loss have altered many biomes worldwide, including the Atlantic Forest, which presents a high degree of endemism and harbors most of the endangered species in Brazil (Silvano & Segalla, 2005; Bonfim et al., 2019). Amphibians are among the most threatened groups worldwide and became the focus of many studies due to the widespread decrease in their population (Amaral et al. 2019). In fact, amphibians can suffer strong impacts when exposed to environmental changes due to skin permeability and high dependency on humid environments (Carnaval et al., 2014; Gomes et al., 2016). Because of these features, amphibians are important biological indicators and, since they have low displacement capacity, their occurrence can be directly associated with habitat quality (Lips, 1998; Giovanelli et al., 2010; Joly, 2019).

Most amphibian species have a complex life cycle since tadpoles and adults occupy distinct habitats, aquatic and terrestrial, respectively, during their development (Becker et al. 2007; Becker et al. 2010). The species *Crossodactylus schmidtii* belongs to the family Hylodidae. It is a habitat specialist species that depends on well-preserved stream environments in the Atlantic Forest in southern Brazil and neighboring countries, viz. southern Paraguay and northern Argentina (Caramaschi & Sazima, 1985; Caldart et al., 2010). This region of the Atlantic Forest is one of the most threatened due to the intense deforestation and replacement of the forest landscape by monocultures (Bastiani et al., 2012; Caldart et al., 2013; Dos Santos et al., 2019). Thus, although this species is considered near threatened (NT) by the IUCN Red List, the red list of the state of Rio Grande Sul, Brazil (FZB 2014), classifies it as endangered (EN).

The main impacts of urbanization are the fragmentation and loss of natural habitats, which can reduce genetic diversity and genetic viability of populations in the landscape (Keely

et al., 2015). Studies that evaluate genetic characteristics provide important subsidies to monitor the maintenance of populations and may help identify factors that affect or facilitate gene flow. Thus, it is important to assess preserved forest fragments with different sizes and the contact areas between them in order to develop measures to preserve terrestrial and aquatic environments, maintaining the connectivity between populations (Segelbacher et al., 2010; Emel & Storfer, 2012; Cox et al., 2017). In addition, forest-specialist amphibians that inhabit environments under high human impact can be exposed to several genotoxic factors, such as pesticides that are present in the soil and in the stream water, and solar UV radiation, whose incidence can dramatically increase due to deforestation (Valencia et al., 2011; Lajmanovich et al., 2014; Da Rocha et al., 2020). Furthermore, fragmentation can also lead to population isolation, gene flow decrease (Dixo et al., 2009) and diversity loss (Cushman, 2006).

Considering the alarming rate of landscape change that occurs in tropical and subtropical regions, it is necessary to evaluate the direct and indirect effects of deforestation on amphibian species that are restricted to forest environments to understand their responses to anthropogenic pressure, as well as the quality and size of forest fragments that are necessary to maintain their populations.

In this study, we evaluated the importance of the size and preservation level of forest fragments on the genetic diversity and genomic instability of *C. schmidtii* populations. We performed analyses regarding size, distance and vegetation cover of four different forest fragments through satellite images. Moreover, we evaluated indices of genetic diversity and genetic structure within and among populations using three different genes. Finally, we performed a cytogenetic analysis to evaluate the level of cellular damage and correlate it with the level of deforestation of each studied area.

## Methods

### *Study area*

Samples were collected in 4 different forest fragments in the southern Atlantic Forest (Figure 1). Since Area 1 (A1) is the largest fragment, we decided to collect samples in two different sites inside this area (A1-a and A1-b). A1 is the state conservation unit called Turvo State Park (27°14'38.00"S, 53°55' 7.73" W) and it is the largest remnant of Seasonal Deciduous Forest in the state of Rio Grande do Sul (IBGE 2012). However, its surroundings are strongly impacted by the presence of crops and pastures (Iop et al., 2011). Area 2 (A2; 27°20'24.67" S, 53°39'29.66"W) is 31 km distant from A1, and it is a fragment of Seasonal Deciduous Forest located in a private property in the surroundings of a large conservation unit. Area 3 (A3; 27°21'

39,98"S, 53°24'40.83" W) is located in an urban area (Caldart et al. 2011) and it is 45 km distant from A1. The last fragment is area 4 (A4; 27° 36'47.94" S, 53°29'49.56" W) that is located 54 km from A1 and presents two forest types, Araucaria Forest and Seasonal Deciduous Forest (IBGE 2012; Dois Irmãos das Missões 2009).

For the characterization of the preservation level of each fragment, we evaluated the forest area that was maintained, lost or gained between 1985 and 2018. We performed pixel-by-pixel classification of Landsat satellite images through Google Earth Engine (MapBiomas 2020). The images were defined using the AutoCAD software, 2016.

#### *Collection of oral mucosa samples*

Oral mucosa samples were collected between November 2018 and January 2019, every 20 meters, covering 100 m of each stream downstream to upstream. Samples were collected from 15 adult individuals of each studied area using sterile swabs (Animal Ethics Committee nº 9073031218). It is important to emphasize that this is a representative number since the populations of this species usually have a small number of individuals in these streams. Swabs containing salivary material were deposited in 1 mL of digestion buffer (10 mM tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% SDS) and stored at -20 °C until the moment of DNA extraction.

#### *DNA manipulation and sequence analysis*

The total DNA was extracted from each collected oral mucosa sample using a phenol-chloroform extraction protocol, following Green & Sambrook (2012). Fragment amplification was performed using two mitochondrial genes, cytochrome oxidase subunit I (*COI*) and rRNA *16S* (Lyra et al., 2016), and the nuclear gene tyrosinase (*TYR*), following Langone et al. (2016) (Table 1). For amplicon purification, we used the precipitation protocol with Polyethylene Glycol (PEG) (Dunn & Blattner, 1987). After purification, the fragments were automatically sequenced in the SeqStudio Genetic Analyzer sequencer using BigDye terminator v3.1 (Thermo Fischer, USA). The assemblies and editions of the electropherograms were performed using the Gap4 software in the Staden package (Staden, 1996) and the polymorphic sites were confirmed by visual inspection. The consensus sequences had their identity confirmed using the BLASTn (NCBI) algorithm (Altschul et al. 1990) and were later aligned with each other using the ClustalW algorithm implemented in the MEGA7 software (Kumar et al., 2015).

To characterize the genetic structure of populations, we calculated the haplotype diversity indices, nucleotide diversity and number of haplotypes of the populations of each fragment. For the tyrosinase gene, heterozygous sites were resolved by applying the PHASE

algorithm (Stephens & Donnelly 2003) implemented in DnaSP v6 (Rozas et al., 2017), using 10000 iterations with 100 burn-in generation and a thinning interval of 1.

We estimated relationships between haplotypes by median-joining using the program Network 10.0 (Bandelt et al. 1999). In this analysis, we used different approaches: i) for each mitochondrial gene independently; ii) for both mitochondrial genes concatenated; iii) the *COI* gene exclusively for area A1, to explain the genetic differentiation between the two collection points. For the nuclear tyrosinase gene, the recombinant sites were calculated and excluded from the analysis in DNA SP 6.0 (Rozas et al., 2017).

We calculated the fixation index ( $F_{ST}$ ) of the populations comparing them pairwise between the fragments (A1, A2, A3 and A4).  $F_{ST}$  values close to 1 indicate a high structure and values close to 0 indicate a total genetic mixture of populations. All analyses were performed using the Arlequin 3.5.2 software (Excoffier & Lischer, 2010).

The Mantel test was performed to evaluate a significant positive correlation between the genetic and geographic distances of the populations. For this test, the linear geographical distance between populations was used and calculated in the Diva-Gis 7.5 software (Hijmans et al., 2012) based on the geographic coordinates of the collection areas. We performed the Spearman's correlation between fragment size and molecular data in the software STATISTICA v. 8.0 (Weiß, 2007) using haplotype diversity indices (as representative of genetic differentiation) and the size of the fragments, with nonparametric data ( $p < 0.05$ ).

#### *Cytogenetic analysis for the assessment of genomic instability*

Cell samples used for cytogenetic analysis were also obtained collecting the oral mucosa of adult anurans, but, in this case, with the aid of a cytological brush with nylon bristles. Samples were fixed with acetic acid and methyl alcohol solution (3:1) and kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After field collection, cells were separated from samples and the preparation of slides was done in the laboratory according to Fenech et al. (2003), with adaptations. Histological slides are prepared under the surface of a water bath at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For cell visualization, the slides were stained with 10% Giemsa dye for 6 min and analyzed individually by a single researcher with a light microscope at 1000x magnification. To observe the interphasic nucleus and processes related to genomic instability and cell death, such as micronuclei, apoptosis, necrosis and binucleated cells following the Fenech et al. (2003) protocol and through photos of the cells (Thomas et al., 2009), 1000 cells from each individual were observed, totaling 15000 analyzed cells per population. Differences between the number of nuclear abnormalities and dead cells in the population of each area were compared using analysis of variance (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) with

Tukey's post hoc test for pairwise comparisons. All analyses were performed using the programs STATISTICA (version 8.0) and GraphPad Prism (version 7.0).

## Results

### *Forest cover of fragments*

Three of the four studied forest fragments showed changes in their forest cover between 1985 and 2018 (Figure 2). Area A1 is the largest sampled fragment, with a total of 17,098.5 ha of forest. Of this total, 92.8% was maintained since 1985 (15,861 ha) and 7.2% (1,237.5 ha) were gained until 2018. In Area A1, two *C. schmidti* populations were sampled in two different streams, and these were called as population A1-a and A1-b (see Figure 1). A2 is the closest fragment to A1 (31 km), and its size corresponds to 0.0002% of the latter, with 4.6 ha. All its vegetation remained intact over the analyzed years. Area A3 is 45 km away from A1 and it has 0.12% of its size. However, it lost 7.07 ha (34.4%) until 2018. This indicates that only 65.6% of its total forested area has been preserved. Area A4 is 54 km distant from A1 and it has 8.6% of its size. It is the second larger area with a total of 503 ha of forest. 92.4% (465 ha) of this area was maintained over the years and 7.5 % (38 ha) were gained until 2018.

### *Genetic diversity*

We analyzed the sequences of the mitochondrial genes *COI* (590 bp) and *16S* (371 bp), as well as a region of the nuclear *Tyrosinase* gene (*TYR*; 473 bp) (Table 1) of all samples collected from 75 adult individuals in all studied forest areas.

For the *COI* gene, we found a total of 17 distinct haplotypes that varied in frequency among all the populations in the four areas (Figure 3). The population with the largest number of haplotypes was A1-b ( $n = 7$ ); three of them are exclusive and four are shared. Also, in the area A1, the population A1-a presented only three haplotypes, being one exclusive. Taking all together, area A1 had a total of 9 haplotypes and shares five of these with the other areas. The most frequent haplotype and probably the most ancestral haplotype is C\_1, which is present in 22 individuals of the areas A1-a, A1-b, A2 and A4. Area A2 has five haplotypes in total, being two exclusives and three shared with all populations, mostly with A1 and A3. The population of area A3 has the lowest capacity to share haplotypes with the other areas. It has four haplotypes in total, but three are exclusive. Area A4 has a total of six haplotypes, being three exclusives and three shared with A1. In general, haplotype diversity ( $H_d$ ) in all populations varied from 0.242 (A1-a) to 0.857 (A1-b), while the nucleotide diversity ( $\pi$ ) by location varied from 0.001 (A1-a and A3) to 0.015 (A4) (Table 2).

The sequences of the *I6S* gene indicate the presence of six haplotypes among all populations (Figure 3). The population with the largest number of haplotypes was A4, which contains five of the six haplotypes found. In addition, this population has three exclusive haplotypes, and one of these haplotypes (16S\_6) is separated by 15 replacements from the most frequent haplotype (16S\_1). 16S\_1 is present in 42 individuals from areas A1-a, A1-b, A2 and A4. The second most frequent is 16S\_2, which is present in 21 individuals of the areas A2, A3 and A4. Haplotype diversity among all populations ranged from 0 (A1-a, A1-b and A3) to 0.714 (A4) and nucleotide diversity varied from 0 (A1-a, A1-b and A3) to 0.010 (A4) (Table 2).

A total of 11 alleles were observed for the nuclear gene *TYR*. The most diverse population was A3, with 6 alleles, and the least diverse were A1-a and A1-b (Figure 3). Alleles diversity among all populations varied from 0.681 (A1-a) to 0.984 (A2) and nucleotide diversity from 0.005 (A1-a) to 0.051 (A4) (Table 2). The network of the A4 population shows two exclusive alleles, being the T\_2 separated by 14 replacements from the most frequent alleles (T\_1), which is present in 45 individuals from all areas.

The concatenated haplotype network of mitochondrial genes has a star-like pattern, where haplotype 1 is the most frequent, being present in all populations except A3. In general, A1 is likely a center for haplotype sharing with the other areas. A1-b has one exclusive haplotype, but it shares haplotypes with A1-a, A2, and A4. A1-a has three haplotypes, being two exclusives, although it shares with A1-b, A2, and A-4. A2 has seven haplotypes and despite it shares one haplotype with A1-a, A1-b, A2 and A4, one with A1-b, and another one with A3, the other four haplotypes are exclusives. A3 has three haplotypes, being two exclusives and one shared with A2. A4 is the most diverse area since it has a total of 9 nine haplotypes, being six exclusives and three shared with A1-a, A1-b and A2. (Figure 4).

The results of the pairwise analysis of population structure showed a high  $F_{ST}$  index value between the populations A1 and A3 for both mitochondrial genes (Table 3). The highest homogeneity was observed in A1 and A3, whose values are  $F_{ST} = 0.127$  for *COI* between A1-b and A1-a,  $F_{ST} = 0$  for *I6S* between A1-b and A1-a, and  $F_{ST} = 0.178$  for *TYR* between A1-a and A3 (Table 3). Although the result in the Mantel test for correlation of genetic divergence and geographic distance of the nuclear gene *TYR* ( $r = 0.113$ ,  $p = 0.355$ ) was not significant, both mitochondrial genes, *COI* ( $r = 0.560$ ,  $p = 0.016$ ) and *I6S* ( $r = 0.693$ ,  $p = 0.039$ ), showed significant values, indicating the existence of an isolation-by-distance pattern of genetic divergence. On the other hand, no correlation was found when we evaluated the influence of the fragments' size on the indices of genetic diversity ( $p = 0.740$  for *COI*;  $p = 0.437$  for *I6S*; and  $p = 0.894$  for *TYR*).

### *Chromosomal instability and cell death*

In general, population from A1-a, A1-b, A2 and A4 presented non-significant results regarding the amount of nuclear abnormality and dead cells here evaluated. However, A3 population showed higher and significant values of chromosomal instabilities and dead cells in relation to the other areas ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

### **Discussion**

Considering that amphibians of stream environments have low mobility and small body size, as is the case with *Crossodactylus schmidti*, any short distance or non-habitat matrix becomes an important barrier (Joly, 2019; Ramos et al., 2018). In this study, we demonstrate the importance of the remnants of the southern Atlantic Forest for this endangered amphibian species that is restricted to well-preserved streams in forest environments.

Area A1 is the largest analyzed fragment (17,098.5 ha) and it is a state conservation unit inserted in a human-disturbed landscape mainly characterized by soybean plantations. The other areas (A2, A3 and A4) are smaller, varying from 4.6 to 503 ha. This scenario is very representative of the current situation, where the majority of forest remnants are smaller than 50 ha, and only a small portion is protected by conservation units (Ribeiro et al., 2009). Regarding genetic diversity, A1 has the highest capacity for genetic exchange with the other studied areas (Figures 3 and 4). However, since A1-a is located near a geographical barrier (natural crevice) of the A1 fragment, it may have caused greater isolation and lower diversity. On the other hand, A1-b is near a human-disturbed edge, next to a crop, and geographically closer to the other forest fragments, which may explain the increased diversity (see Online Resource 1). Therefore, these results suggest that A1 may be acting as a disperser of genetic variability in the landscape, playing a fundamental role for the maintenance of this species at this region.

In the area A2, the two analyzed mitochondrial genes also showed a large number of shared haplotypes (Figure 3), which can be explained by its location near A1, since both areas show high similarity (Table 3). In addition, A2 has an adjacent location to another conservation unit with 23,000 ha (called Reserva Indígena do Guarita). Thus, the connection to these large protected areas could also explain the observed diversity. As already reported by Dixo et al. (2009), connectivity between fragments is very important to increase the genetic diversity of populations. Furthermore, A2 has a high haplotype sharing with A1 and A3, and this may be associated with the tributary that connects these areas (Figure 1). This haplotype sharing between populations corroborates previous studies that suggest that water connectivity and/or

riparian areas may be influencing gene flow of stream amphibian populations in different fragments (Paz et al., 2018).

Species that are dependent on forest habitats and inhabit isolated fragments can have their diversity altered because of the simplification of animal communities or partial isolation of the fauna (Dos Santos et al., 2019). Philopatry is common in many amphibian species and populations tend to show higher genetic structure than other vertebrates, with high-resolution signals of the historic events that led a species to its current distribution (Zeisset et al., 2008; Nascimento et al., 2018).

Area A4 is the second largest area and also has a high genetic diversity. However, its diversity is associated with the large number of exclusive haplotypes, which may indicate greater isolation, considering that this area is the most geographically distant from A1. Furthermore, the correlation test between genetic diversity and geographic distance presented statistically significant results for both mitochondrial genes, indicating that distance can affect the genetic divergence of populations.

The forest fragments with the largest genetic differentiation between them are A1 and A3 (Table 3). A3 is one of the smallest sampled fragments, with only 13.48 ha of forest cover currently (Figure 2). According to Wang et al. (2018), even small fragments (islands) up to 39 ha must be protected for effective conservation of amphibians. Furthermore, according to a previously published study of island biogeography (Mageski et al., 2015), small areas such as A2 and A3 do not support many haplotypes. However, they are also important for the population's conservation, as well as for assisting in the maintenance of genetic diversity since small migration rates between populations can positively affect global levels of diversity (Cox et al., 2017; Amaral et al., 2019).

In general, the number of haplotypes and alleles diversity and nucleotide diversity (Table 2) did not vary a lot between fragments, although there is a positive trend towards higher diversity in larger fragments. The observed haplotype groups seem to be related to the geographic location where population is inserted in the landscape, as previously related in the literature (Cox et al. 2017). In the present study, we observed that populations located in areas with intermediate or small size can maintain relatively high diversity if it is connected to larger fragments with higher genetic variability, as shown in the haplotype networks of areas A2, A3 and A4 (Figure 3). The analyzed fragments share the most abundant haplotypes and have some rare haplotypes that are exclusive to each area, which suggests that these fragments must be managed and conserved as a large mosaic where each small fragment is important for the conservation of this species.



Dixo et al. (2009) tested the influence of connectivity and size of different fragments on the genetic diversity of a generalist amphibian species with aquatic larval phase and observed a significant positive correlation between genetic diversity and fragment size. According to this study, habitat split has a large effect on amphibian species with aquatic larval development and can significantly increase the effects of fragmentation. In our study, we found no relationship between fragment size and genetic diversity, probably because our focus was an endangered forest-specialist instead of a generalist species.

In general, studies that evaluate genetic and chromosomal data in the context of the landscape are scarce. Therefore, here we aimed to link genetic indices to the size, distance and preservation level of fragments in relation to A1, as well as the induction of chromosomal abnormalities and cell death (Bosch et al., 2011; Valencia et al., 2011; Lajmanovich et al., 2014). The existing studies to date that evaluate genomic damage in amphibians used blood samples to count individual cells (Schuch et al., 2015; Fanali et al., 2018; Curi et al., 2019; Freitas et al., 2019; Londero et al., 2017). In the present study, a considerable number of cell changes could be observed in the oral mucosa of adult individuals sampled *in situ* (Figure 5). This result suggests that the oral mucosa may be a good sample to evaluate biomarkers of the genotoxic impact caused by environmental factors. Furthermore, with the increase of deforestation and fragmentation, the exposure of individuals to stressors may also increase (Lin et al., 1987; Cushman, 2006).

Cell changes can lead to metabolic consequences, changes in diet and vulnerability to pathogens (Fijan, 2002; Pollo et al., 2015). The analysis of chromosomal instability and cell death in the individuals sampled in this study indicate a significant difference between A3 and the other areas (Figure 5). A3 is the only fragment inserted in an urban matrix and it has been constantly degraded over the years, which suggest that the analyzed population is probably more exposed to different types of stressors than in the other areas. In addition, this is area presents the lower genetic diversity indices, indicating that this population may be at high risk of decline.

Despite the fundamental role of large areas as centers of genetic diversity and gene flow in the landscape, our data also highlight the importance of smaller forest fragments that contain the species, regardless of their effective forest size. Therefore, all forest fragments, independently of its size, are essential for maintaining genetic variability, distribution of individuals and species persistence in the landscape. Regarding the restricted distribution of the species in southern Brazil (Frost, 2020), the sampled fragments in this study are important to demonstrate the situation of a forest-specialist amphibian that is distributed in a human-

disturbed and fragmented forest landscape. Finally, this study demonstrates the importance of preserving all the remaining current forest areas with water availability, regardless of their size, for the conservation of amphibian species that are restricted to well preserved forest streams and endemic to the region.

## Conclusion

In this study, the results demonstrate the importance of preserving all remaining southern Atlantic forest fragments present in the landscape, independently of their size, since they have an important role in the maintenance of genetic diversity and health of populations of forest-specialist stream amphibians, such as *Crossodactylus schmidti*. We highlight the high need of conservation of area A3, which presented a considerable loss of habitat, less genetic diversity and higher chromosomal damage and cell death in sampled individuals. In addition, we highlight the importance of the maintenance of Conservation Units due to its fundamental role to preserve larger forest fragments that improve the dispersion of genetic diversity to other small fragments of the surrounding landscape and successfully preserve other existing populations.

## Tables

**Table 1.** Primer sequences and amplicon sizes of mitochondrial (*COI* and *16S*) and nuclear (*TYR*) target genes.

Primers	Sequence	Size	Genes
<i>AnF1</i> <i>AnR1</i>	(5'-ACHAAYCAYAAAGAYATYGG-3') (5'-CCRAARAATCARAADARRTGTTG-3')	600 bp	<i>COI</i>
<i>An16SF</i> <i>An16SR</i>	(5'-ACCGTGCGAAGGTAGCGTAATC-3') (5'-CCTGATCCAACATCGAGGTCG-3')	440 bp	<i>16S</i>
<i>TyrcC</i> <i>TyrcG</i>	(5'-GGCAGAGGAWCRTGCCAAGATGT- 3') (5'-TGCTGGCRTCTCTCCARTCCCA-3').	319 bp	<i>TYR</i>

**Table 2.** Genetic diversity indices based on the *COI*, *16S* and *TYR* sequences of five populations of *Crossodactylus schmidti*. *N* = number of individuals; *h* = haplotype number; *Hd* = haplotype diversity;  $\pi$  = nucleotide diversity. Area 1 (A1-a and A1-b), Area 2 (A2), Area 3 (A3) and Area 4 (A4).

		<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i>	$\pi$
<b><i>COI</i></b>	A1-a	15	3	0.242	0.001
	A1-b	15	7	0.857	0.004
	A2	15	5	0.844	0.005
	A3	15	4	0.371	0.001
	A4	15	6	0.813	0.015
	Total	70	17	0.835	0.008
	<b><i>16S</i></b>	A1-a	15	1	-
A1-b		15	1	-	-
A2		15	3	0.590	0.003
A3		15	1	-	-
A4		15	5	0.714	0.010
Total		70	6	0.575	0.004
<b><i>TYR</i></b>		A1-a	7	6	0.681
	A1-b	15	17	0.938	0.007
	A2	15	17	0.984	0.010
	A3	12	19	0.947	0.007
	A4	10	4	0.685	0.051
	Total	59	57	0.960	0.023

**Table 3.** Pairwise fixation index values ( $F_{ST}$ ) of genetic differentiation of five populations of *C. schmidtii* based on *COI*, *16S* and *TYR* sequences (diagonally paired below). Area 1 (A1-a and A1-b), Area 2 (A2), Area 3 (A3) and Area 4 (A4).

<i>COI</i>		<b>A1-a</b>	<b>A1-b</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
	<b>A1-a</b>	-				
	<b>A1-b</b>	0.127	-			
	<b>A2</b>	0.191	0.276	-		
	<b>A3</b>	0.673	0.795	0.450	-	
	<b>A4</b>	0.369	0.423	0.354	0.531	-
<i>16S</i>		<b>A1-a</b>	<b>A1-b</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
	<b>A1-a</b>	-				
	<b>A1-b</b>	0	-			
	<b>A2</b>	0.224	0.224	-		
	<b>A3</b>	1*	1*	0.341	-	
	<b>A4</b>	0.432	0.432	0.318	0.397	-
<i>Tyrosinase</i>		<b>A1-a</b>	<b>A1-b</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
	<b>A1-a</b>	-				
	<b>A1-b</b>	0.224	-			
	<b>A2</b>	0.192	0.410	-		
	<b>A3</b>	0.178	0.429	0.190	-	
	<b>A4</b>	0.379	0.552	0.334	0.399	-
		<b>A1-a</b>	<b>A1-b</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>

\* = higher rates of differentiation between populations.

### Figure Captions

**Fig. 1** Sampling areas with their tributaries. The distances in kilometers of each area in relation to area 1 (A1) are shown below each fragment at the top of the figure. **A.** Map of Latin America highlighting the state of Rio Grande do Sul (Brazil) in gray. **B.** Location of the 4 sampling areas in the map of the state of Rio Grande do Sul. **C.** Location of the 4 sampling areas in the landscape with their tributaries.

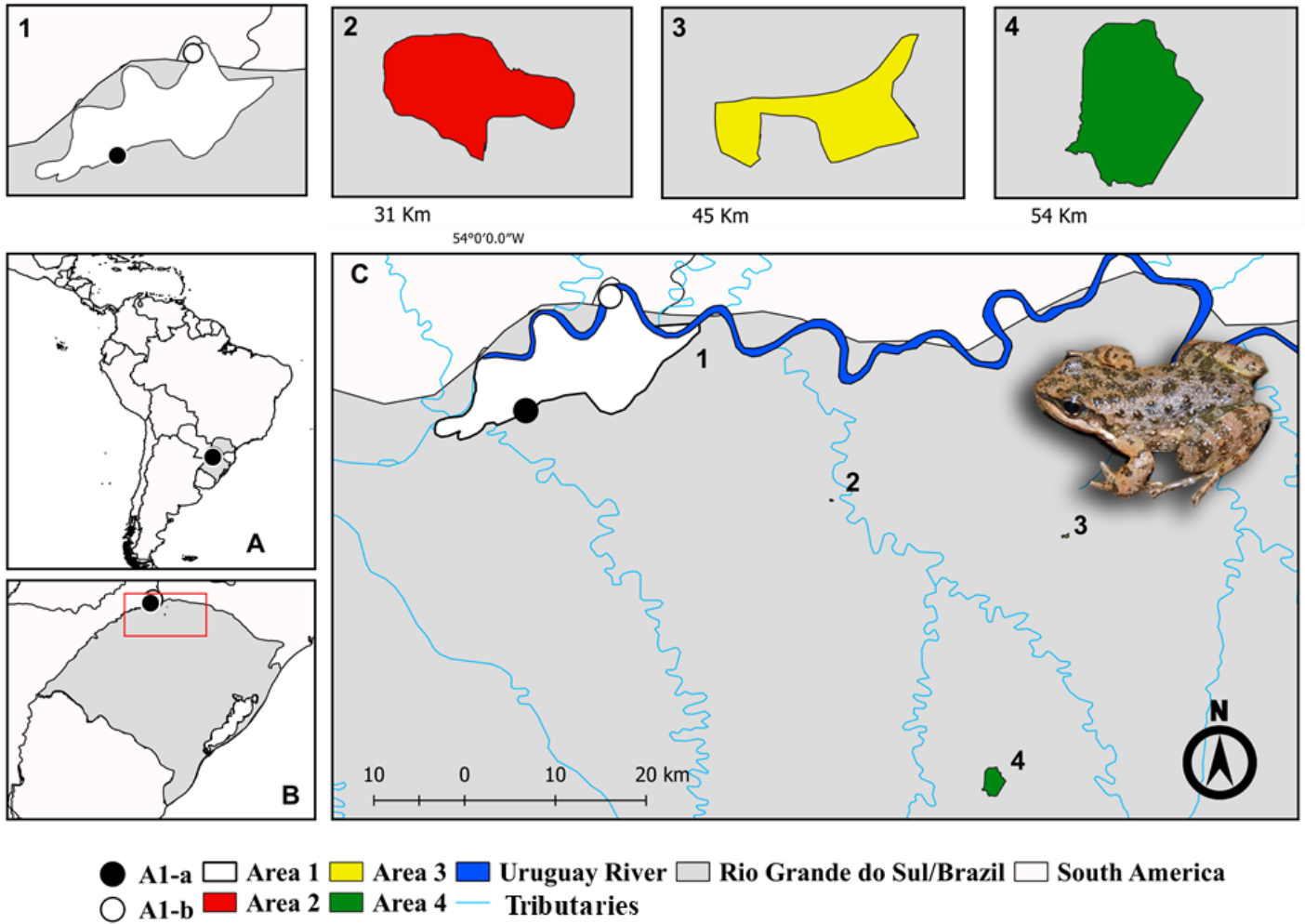
**Fig. 2** Analysis of satellite images indicating the maintained area, gained area and lost in hectares (ha) from 1985 to 2018 of four forest fragments (1, 2, 3 and 4) where *C. schmidtii* individuals were sampled.

**Fig. 3** Haplotype network (by *median-joining*) of *16S*, *COI* and *TYR* sequences. Lines correspond to the mutational steps that differentiate the haplotypes, represented by circles, in which sizes are proportional to their frequency and colors refer to geographical origin.

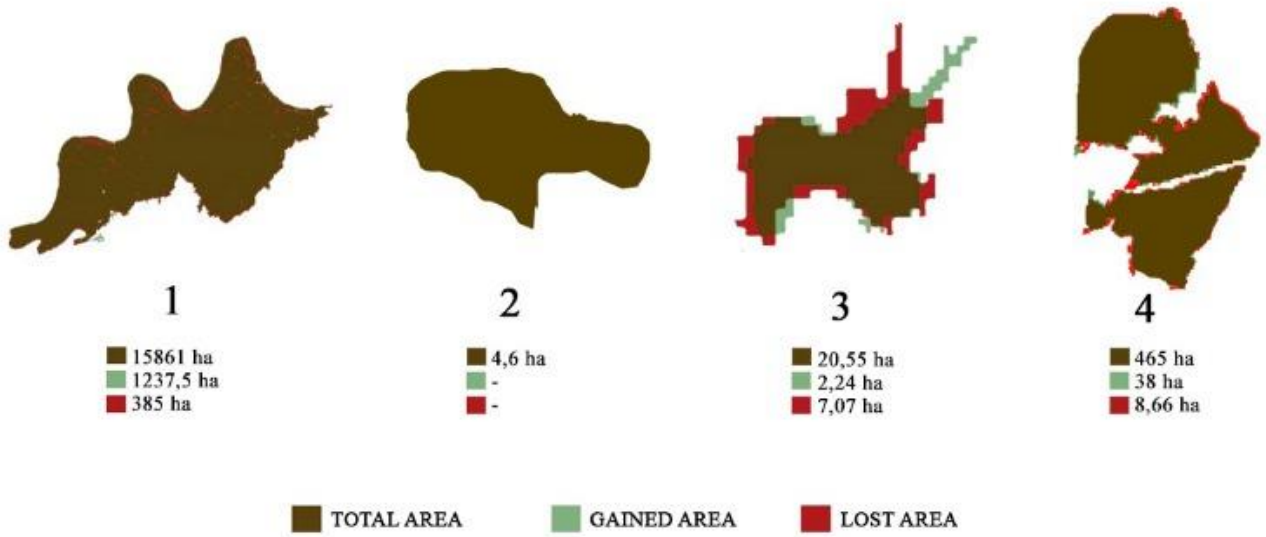
**Fig. 4** Network of concatenated *COI* and *16S* genes. The lines correspond to the mutational steps that differentiate the haplotypes, represented by circles, in which sizes are proportional to their frequency and colors refer to geographical origin.

**Fig. 5** Frequency of chromosomal instability (micronuclei and binucleated cells) and dead cells (apoptosis and necrosis) observed in sampled individuals of *C. schmidtii* in five different streams of forest fragments (A1-a, A1-b, A1, A2, A3 and A4); a – statistically non-significant; b – statistically significant ( $p < 0.05$ ).

Fig 1.



**Fig 2.**



**Fig 3.**

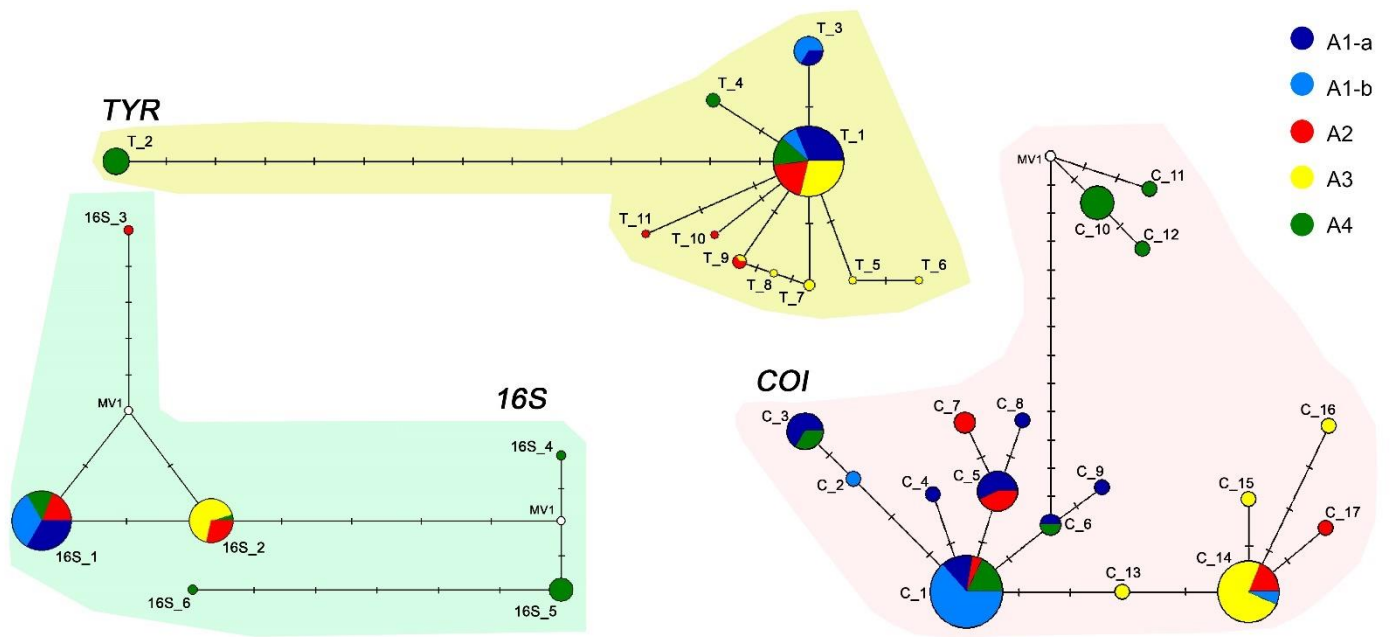


Fig 4.

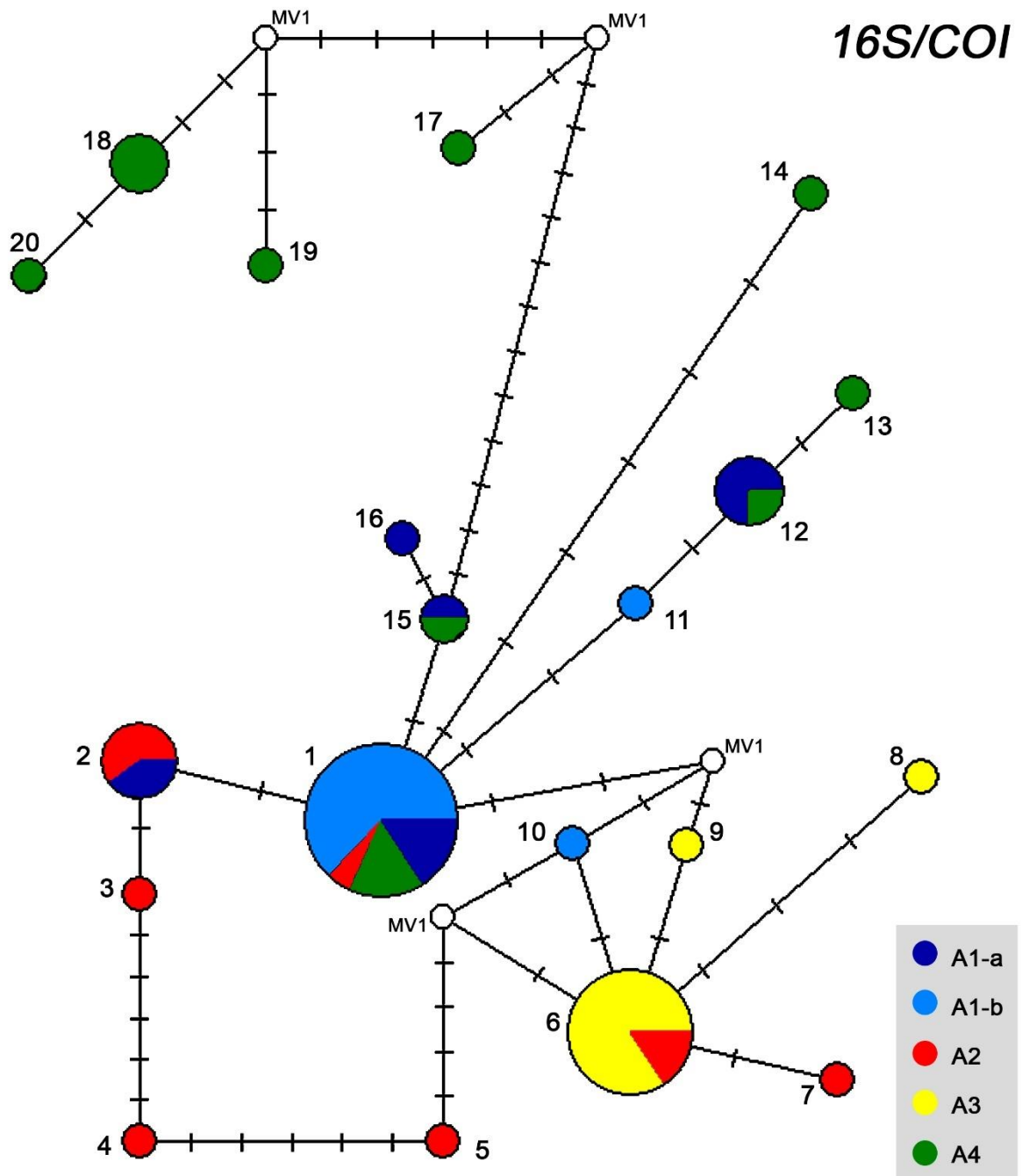
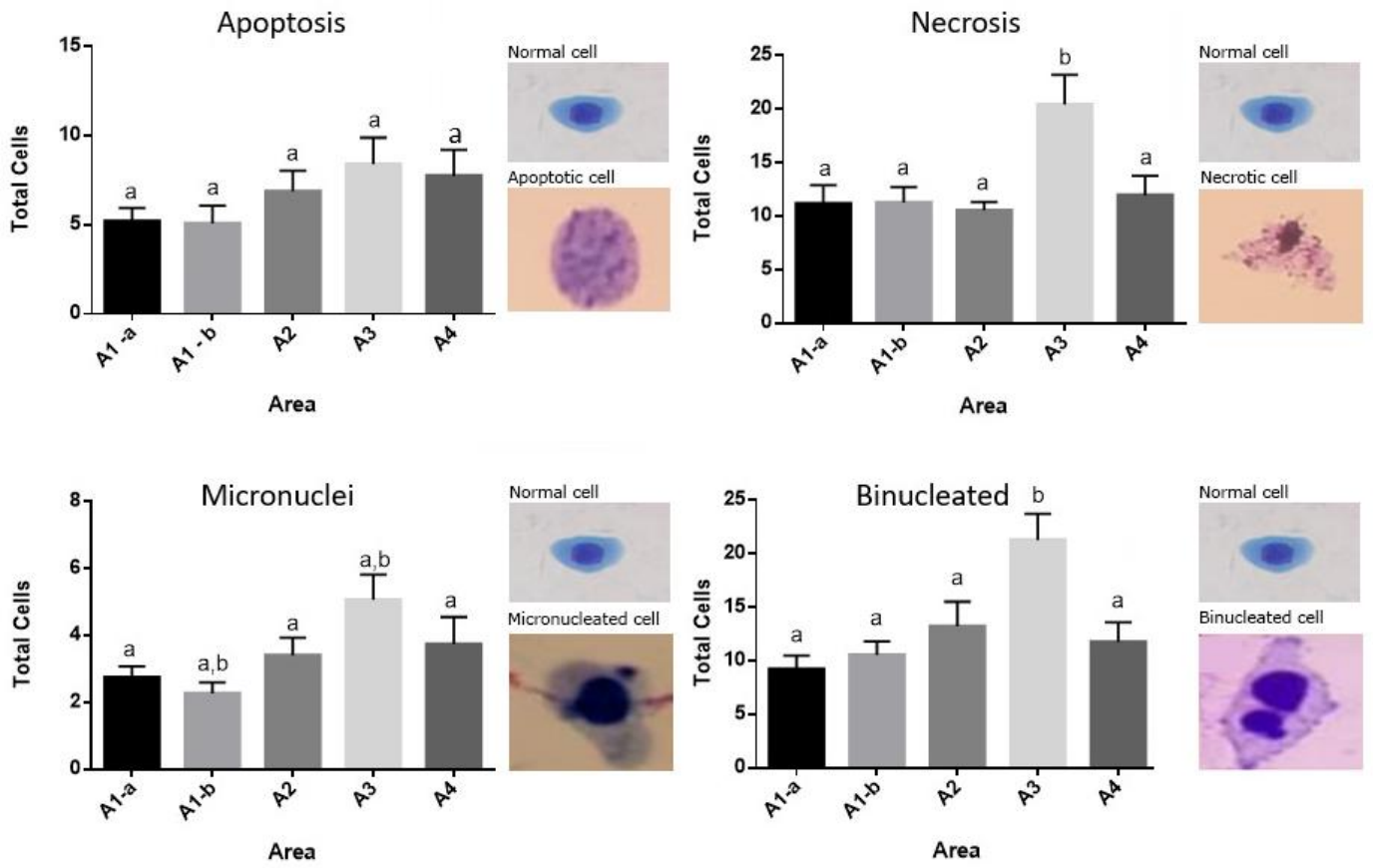




Fig 5.



## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amaral, C.R.L., Chaves, A.C.S., Borges Júnior, V.N.T, Pereira, F., Silva, B.M., Silva, D.A., Amorin, A., Carvalho, E.F. & Rocha, C.F.D. 2019 Amphibians on the hotspot: Molecular biology and conservation in the South American Atlantic Rainforest. *PLoS One* 14:e0224320. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224320>
- Bandelt, H., Forster, P. & Rohl, A. 1999 Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bastiani, V.I.M., Garcia, P.C. De A. & Lucas, E.M. 2012 *Crossodactylus schmidti* Gallardo, 1961 (Anura: Hylodidae) in Santa Catarina state, southern Brazil: A new record and comments on its conservation status. *Check List* 8:262-263. DOI: <https://doi.org/10.15560/8.2.262>
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B., Batista, R.F. & Prado, P.I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 318:1775–1777. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1149374>
- Becker, C.G., Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B. & Prado, P.I. 2010. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. *Conservation Biology* 24:287-294. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01324.x>
- Bonfim, F.C.G, Cordeiro, P.H.C., Peres, C.A., Canale, G.R. & Bernardo, C.S.S. 2019. Combining modeling tools to identify conservation priority areas: A case study of the last large-bodied avian frugivore in the Atlantic Forest. *Global Ecology and Conservation* 17: e00426. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00426>
- Bosch, B., Manas, F., Gorla, N. & Delia, A. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 3:155–163. DOI: <https://doi.org/10.5897/jtehs>
- Caldart, V.M., Iop, S., De Sá, F.P., Da Rocha, M.C., De Arruda, J.L.S., Dos Santos, T.G. & Cechin, S.Z. 2013. New records of *Crossodactylus schmidti* Gallardo, 1961 (Anura: Hylodidae) for the state of Rio Grande do Sul, Brazil, with data on morphometry and an updated geographic distribution map. *Check List* 9:1552–1555. DOI: <https://doi.org/10.15560/9.6.1552>
- Caldart, V.M., Iop, S., Santos, T.G. & Cechin, S.Z. 2010. Extension of the geographical distribution of two anuran species for Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on

- natural history. *Biota Neotropica* 10:143-147. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300015>
- Caldart, V.M., Iop, S., Rocha, M.C. & Cechin, S.Z. 2011. Diurnal and nocturnal predators of *Crossodactylus schmidti* Gallardo, 1961 (Anura, Hylodidae) in southern Brazil. *North-Western Journal of Zoology* 7:342-345.
- Caramaschi, U. & Sazima, I. 1985. Uma nova espécie de *Crossodactylus* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Lepodactylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 3:43-49. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81751985000100005>
- Carnaval, A.C., Waltari, E., Rodrigues, M.T., Rosauer, D., Veerwal, J., Damasceno, R., Prates, I., Strangas, M., Spanos, Z., Rivera, D., Pie, M.R., Firkowski, C.R., Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F. & Moritz, C. 2014 Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281:20141461. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1461>
- Cox, K., Maes, J., Calster, H.V. & Mergeay, J. 2017. Effect of the landscape matrix on gene flow in a coastal amphibian metapopulation. *Conservation Genetics* 18:1359-1375. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0985-z>
- Curi, L.M., Peltzer, P.M., Seoval, M.T. & Lajmanovich, R.C. 2019 Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution* 230:22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>
- Cushman, S. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: review and prospectus. *Biological Conservation* 128:231–240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>
- Dixo, M., Mezger, J.P., Morgante, J.S. & Zamudio, K.R. 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation* 142:1560-1569. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.11.016>
- Dos Santos, J.F.C., Gleriani, J.M., Velloso, S.G.S., de Souza, G.S.A, do Amaral, C.H., Torres, F.T.P., Medeiros, N.G. & Dos Reis, M. 2019. Wildfires as a major challenge for natural regeneration in Atlantic Forest. *Science of the Total Environment*. DOI: 650:809-821. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.016>
- Dois Irmãos Das Missões (2009). Plano de Manejo da Reserva Biológica Municipal Moreno Fortes. Departamento de Meio Ambiente, Rio Grande do Sul, Brazil.

- Dunn, I.S. & Blattner, F.R. 1987. CHARONS 36–40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers e polystuffers. *Nucleic Acids Research* 15:2677–2698. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/15.6.2677>.
- Emel, S.L. & Storfer, A. 2012. A decade of amphibian population genetic studies: synthesis and recommendations. *Conservation Genetics* 13:1685-1689. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0407-1>
- Excoffier, L. & Lischer, H.E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C.R. & Oliveira, C. 2018. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution* 237:93-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>
- Fenech. M., Cheng, W.P., Kirsch-Volders, M., Holle, N. & Bonassi S, & Zeiger, E. 2003. HUMN Project: Detailed description of scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534:65-75. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)
- Fijan, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology* 60:999-1014. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02424.x>
- Freitas, J.S., Giroto, L., Goulart, B.V., Alho, L.O.G., Gebara, R.C., Montagner, C.C., Schiesari, L. & Espíndola, E.L.G. 2019. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182:109446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>.
- Frost, D.R. 2020. Amphibian Species of the World: An online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Accessed February 03<sup>rd</sup>, 2020.
- FZB: FUNDAÇÃO ZOOBOTANICA DO RS. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Accessible at [https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id\\_modulo=1andid\\_uf=23andano=2012](https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=1andid_uf=23andano=2012). Accessed: December 17<sup>th</sup>, 2019.
- Gibbs, H.K., Ruesch, A.S., Achard, F., Clayton, M.K., Holmgren, P., Ramankutty, N. & J. Foley, A. 2010 Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:16732–16737. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0910275107>

- Giovanelli, J.G.R., Siqueira, M.F., Haddad, C.F.B. & Alexerino, J. 2010. Modeling a spatially restricted distribution in the Neotropics: How the size of calibration area affects the performance of Five presence-only methods. *Ecological Modelling* 221: 215-224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.10.009>
- Gomes, M.A., Vieira, M.V., Rocha, C.F.D., Metzger, J.P. & Coster, G.D. 2016 Patch size matters for amphibians in tropical fragmented landscapes. *Biological Conservation* 195:89-96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.025>
- Green, M.R. & Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 4rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Harper, K.A., Macdonald, S.E., Burton, P.J., Chen, J., Brososke, K.D., Saunders, S.C., Euskirchen, E.S., Roberts, D. & Jaiteh, M.S. 2005. Edge influence on Forest structure and composition in fragmented landscapes. *Conservation Biology* 19:768–782. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00045.x>
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S. & Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213:921-933. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
- Hijmans, R.J., Guarino, L. & Mathur, P. 2012. *Diva-GIS version 7. 5. Manual*. Accessible at [http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS\\_manual\\_7.pdf](http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf).
- IBGE (2012) *Manual técnico da vegetação brasileira*. Ministério do Planejamento, Orçamento and Gestão. Rio de Janeiro, Brazil.
- Iop, S., Caldart, V.M., Santos, T.G. & Cechin, S.Z. 2011. Anurans of Turvo State Park: testing the validity of seasonal forest as a new bione in Brazil. *Journal of Natural History* 45:2443-2461. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.596951>
- IUCN (2017) *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version accessible at <http://www.iucnredlist.org>. Accessed in: October 12<sup>th</sup> 2019.
- Joly, P. 2019. Behavior in a changing landscape: using movement ecology to inform the conservation of pond-breeding amphibians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:155. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00155>.
- Johnson, M.T.J., Prashad, C.M., Lavoignat, M. & Saini, S. 2018. Contrasting the effects of natural selection, genetic drift and gene flow on urban evolution in white clover (*Trifolium repens*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285: 20181019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.1019>
- Keely, C.C., Hale, J.M., Heard, G.W., Parris, K.M., Sumner, J., Hamer, A.J. & Melville, J. 2015 Genetic structure and diversity of the endangered growling grass frog in a rapidly urbanizing

- region. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2: 140255. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.140255>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Lajmanovich, R., Cabagna, M., Peltzer, P., Stringhini, G. & Attademo, A. 2014. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide Endosulfan. *Mutation Research* 587:67-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.001>
- Langone, J.A., Camargo, A. & De Sá, R.O. 2016 High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 95:137–151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.11.012>
- Lin, M.F., Wu, C.L., Wang, T.C. 1987. Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 188:241–250. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90095-4)
- Lips, K.R. 1998. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12:106-112.
- Londero, J.E.L., Dos Santos, C.P., Segatto, A.L.A. & Schuch, A.P. 2017. Impacts of UVB radiation on food consumption of forest specialist tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143:12–18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.002>
- Londero, J.E.L., Dos Santos, M.B., Schuch, A.P. 2019. Impact of solar UV radiation on amphibians: focus on genotoxic stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 842:14-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.003>
- Lyra, M.L., Haddad, C.F.B. & De Azeredo-Espin, A.M.L. 2016. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources* 17:966-980. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12648>
- Mageski, M., Ferreira, R.B., Jesus, P.R., Costa, L.C., Roper, J.R. & Ferreira, P.D. 2015. The island rule in the Brazilian frog *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae): incipient gigantism? *Zoologia (Curitiba)* 32:329-333. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1984-46702015000500001>
- Da Rocha, M. C., Dos Santos, M. B., Zanella, R., Prestes, O. D., Gonçalves, A. S., & Schuch, A. P. 2020. Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. *Biological Conservation*, 249, 108746. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108746>.

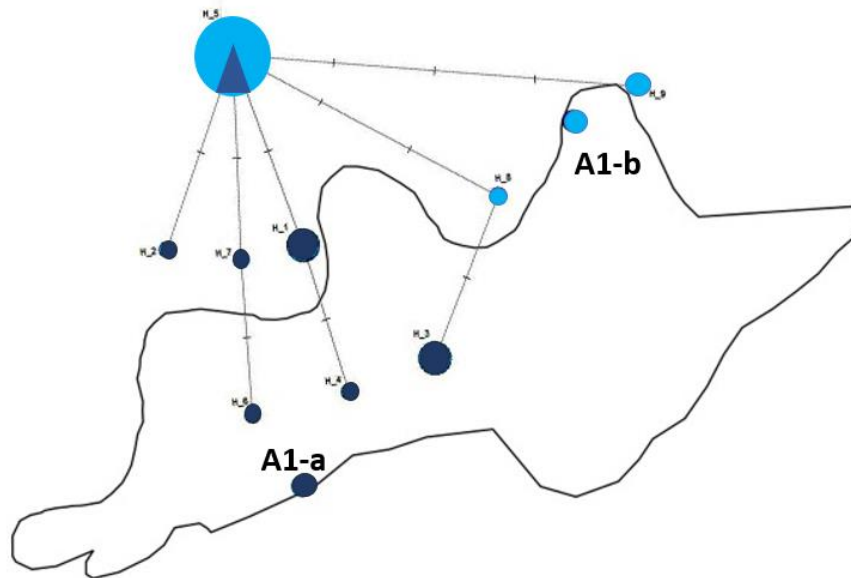
- Nascimento, A.C., Chaves, A.V., Leite, F.S.F., Eterovick, P.C. & Dos Santos, F.R. 2018. Past vicariance promoting deep genetic divergence in an endemic frog species of the Espinhaço Range in Brazil: The historical biogeography of *Bokermannohyla saxicola* (Hylidae). *PloS One* 13: e0206732. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206732>
- Osti, M., Coad, L., Fisher, J., Bomhard, B., Hutton, J. 2011. Oil and gas development in the World Heritage and wider protected area network in sub-Saharan Africa. *Biodiversity and Conservation* 20:1863-1877. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0056-6>
- Paz, A., Spanos, Z., Brown, J.L., Lyra, M., Haddad, C., Rodrigues, M. & Carnaval, A. 2018. Phylogeography of Atlantic Forest glassfrogs (*Vitreorana*): when geography, climate dynamics and rivers matter. *Heredity* 122:545–557. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0155-1>
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E. & Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment* 187:581. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>
- Mapbiomas Project. 2020. Coleção v. 4.1 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil. <http://plataforma.mapbiomas.org/map#coverage>. Accessed 10 October 2019.
- Ramos, E.K.S., De Magalhães, R.F., Sari, E.H.R., Rosa, A.H.B., Garcia, P.C.A. & Santos, F.R. 2018. Population genetics and distribution data reveal conservation concerns to the sky island endemic *Pithecopus megacephalus* (Anura, Phyllomedusidae). *Conservation Genetics* 19:99-110. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1013-z>
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J. & Hirota, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142:1141-1153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Schuch, A.P., Dos Santos, M.B., Lipinski, V.M., Peres, L.V., Dos Santos, C.P., Cechin, S.Z., Schuch, N.J., Pinheiro, D.K. & Loreto, E.L.S. 2015. Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 118:190–198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.029>
- Segelbacher, G.L., Cushman, S.A., Epperson, B.K., Fortin, M.J., Francois, O., Hardy, O.J., Holderegger, R., Taberlet, P., Waits, L.P. & Manel, S. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation Genetics* 11:375–385. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0044-5>

- Silvano, D.L. & Segalla, M. 2005. Conservation of Brazilian Amphibians. *Conservation Biology* 19:653-658. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00681.x>
- Staden, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnol* 5:233-241.
- Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics* 73:1162–1169. DOI: <https://doi.org/10.1086/379378>
- Thomas, P., Holle, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. & Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 4:6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
- Valencia, L.C., Garcia, A., Ramírez-Pinilla, M.P. & Fuentes, J.L. 2011. Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). *Genetics and Molecular Biology* 34:681-688. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000048>
- Wang, Y., Wang, X., Wu, Q., Chen, C., Xu, A. & Ding, P. 2018. The small-isle effect in amphibian assemblages on subtropical le-bridge isles of an inundated lake. *Current Zoology* 64:303-309. DOI: <https://doi.org/10.1093/cz/zox038>
- Weiβ, C.H. 2007. StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. *AStA Advances in Statistical Analysis* 91:339–341. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10182-007-0038-x>
- Zeisset, I., Beebee, T.J.C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101:109–119. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.30>



### Supplementary material

**Fig. 1s:** Haplotype network (by *median-joining*) of *COI* gene for the two populations in the 1 area (A1-a and A1-b). The lines correspond to the mutational steps that differentiate the haplotypes, represented by circles, in which sizes are proportional to their frequency and colors refer to geographical origin.



**Fig. 2s:** Total number of chromosomal instability (micronuclei and binucleated cells), dead cells (apoptosis and necrosis), and alive cells observed in sampled individuals of *C. schmidtii* in five different streams of forest fragments (A1-a, A1-b, A1, A2, A3 and A4).

Areas	N° cells Alive/Apoptosis	N° cells Alive/Necrosis	N° cells Alive/Micronuclei	N° cells Alive/Binucleated
A1-a	994.6/5.4	989.9/10.1	996.1/3.9	989.1/10.9
A1-b	994.5/5.5	989.6/10.3	998.8/1.2	989/11
A2	994.3/5.7	990.2/9.8	997.7/2.3	973.5/13.5
A3	992.2/7.8	980/20	995.5/4.5	979.1/20.9
A4	993.3/6.7	988.9/11.1	996.7/3.3	988.7/11.3

**3.1.2 ARTIGO II-** O Artigo 3, intitulado: “Influência da fragmentação de habitats na diversidade genética e estrutura cromossômica de *Vitreorana uranoscopa* Muller, 1924 (Anura: Centrolenidae) no bioma Mata Atlântica sul do Brasil”.



**INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS NA DIVERSIDADE GENÉTICA E NA ESTRUTURA CELULAR DE *VITREORANA URANOSCOPA* MULLER, 1924 (ANURA: CENTROLENIDAE) NO BIOMA MATA ATLÂNTICA SUL DO BRASIL**

**Resumo**

A diversidade de anfíbios do Brasil, contrapõe a falta de estudos em relação a algumas espécies pouco frequentes e específicas de habitat, e também da velocidade em que aumentam os índices de perda e desmatamento de habitats. O desmatamento do bioma Mata Atlântica se intensificou nos últimos anos em 10 dos 17 estados que compreendem o bioma. Dentre os primeiros em índice de desmatamento está o estado do Rio Grande do Sul, aonde amostramos neste estudo a espécie *Vitreorana uranoscopa*. Esta espécie é pouco frequente e pouco abundante, possui extensão de ocorrência em uma paisagem fragmentada, classificada como vulnerável nas listas locais de fauna ameaçada. Poucos estudos tem buscado entender a dinâmica populacional, analisando aspectos genéticos e a relação entre alteração ambiental e modificações populacionais em anfíbios. Com isso, esse estudo tem o objetivo principal de avaliar o impacto da fragmentação de habitat na diversidade genética e instabilidade genômica em populações de *V. uranoscopa*, espécie de anfíbio restrita a ambientes de riachos no bioma Mata Atlântica no sul do Brasil. Foram coletadas amostras de adultos em quatro fragmentos de diferentes tamanhos, totalizando 60 amostras. Todos os fragmentos analisados apresentaram alterações no tamanho de área entre os anos 1985 e 2019. A área A1 é a que possui maior área florestada, com 15.800 hectares de área mantida (86%), teve o maior índice de perda de área florestal. Em relação aos dados de anomalias celulares nas populações da área A1, em geral, houve menos danos celulares em comparação com as outras áreas. A população da área A2 e A4 foram as que apresentaram maior número de células em necrose, apoptose e binucleadas.

Palavras-chave: Fragmentação, Mata Atlântica, Micronúcleo, Alterações celulares.

## INTRODUÇÃO

Regiões que sofrem com alto impacto da fragmentação e transformação da paisagem podem servir como indicadores de padrões de conversão de áreas florestais. No Brasil, o isolamento de manchas florestais devido a processos de fragmentação já afeta 36,4% das paisagens (Ramos et al., 2018). Dentre essas áreas afetadas, está o bioma Mata Atlântica, que tem sido amplamente ameaçado e detém o maior número de espécies em risco de extinção no Brasil (Silvano & Segalla, 2005). A fragmentação e a perda de habitat estão entre os principais fatores que causam declínio em espécies, pois podem levar ao isolamento populacional, potencialização do efeito de borda e à endogamia, devido ao baixo fluxo gênico entre as áreas (ANDRÉN, 1994; BECKER et al., 2007; REMON et al., 2022).

Muitos grupos podem sofrer com o as causas do isolamento populacional por fragmentação de habitat, mas alguns em específico, possuem características que os tornam ainda mais sensíveis a estas alterações. Espécies ectotérmicas, como os anfíbios podem sofrer fortes impactos quando expostos a mudanças ambientais, devido a permeabilidade da pele e por serem altamente dependentes de umidade (CARNAVAL et al., 2014; GOMES et al., 2016; BECKER et al., 2010; DELUEN et al., 2022). Além disso, tem pequeno tamanho corpóreo e possuem baixa capacidade de locomoção. Assim, considerando que os fragmentos estão distribuídos na paisagem entre matrizes de não habitat, qualquer pequena distância entre os ambientes florestais acaba se tornando uma grande barreira para dispersão. Além disso, os anfíbios são importantes indicadores biológicos, considerando que a sua ocorrência pode ser diretamente associada às particularidades e qualidade do habitat (LIPS, 1998; GIOVANELLI et al., 2010).

Espécies generalistas de habitat podem manter maiores populações em paisagens fragmentadas do que espécies especialistas, que geralmente apresentam densidades mais baixas e dependem dos recursos nos remanescentes de habitat para a sua manutenção (ANDRÉN, 1994). O gênero *Vitreorana* contém nove espécies, distribuídas na Argentina, Colômbia, Guiana, Equador, Paraguai, Venezuela e Brasil (FROST, 2014). A espécie *Vitreorana uranoscopa* (Figura 1) é especialista de habitat de riachos do bioma Mata Atlântica, fitofisionomias de Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional e Floresta Ombrófila Densa (CARVALHO et al., 2008; IUCN, 2017), e geralmente apresenta baixa densidade populacional, distribuída em uma paisagem severamente fragmentada. É uma espécie pouco frequente e

pouco abundante, sendo classificada como “vulnerável” nas listas de fauna ameaçada de Santa Catarina (CONSEMA, 2011; HADDAD et al., 2013). No Rio Grande do Sul, está na categoria quase ameaçada (NT) (FZB, 2014) e pela IUCN tem status de pouco preocupante (LC) (IUCN, 2017). Espécies com fase larval aquática, como a *V. uranoscopa* podem estar expostas a estresse celular desde a fase larval, e são ainda mais vulneráveis a fragmentação e desmatamento, pois já sofrem grande mudança de nicho ontogenético, onde girinos e adultos ocupam dois habitats, afetando, portanto, a abundância e aumentando o declínio dessa espécie (BECKER et al., 2007; BECKER et al., 2010).

A necessidade de conservação dessas espécies e dos seus habitats necessita de uma abordagem ampla, que responda além de questões ecológicas, aspectos relacionados à genética de populações (Souza et al., 1998). Para isso, alguns marcadores genéticos têm sido importantes para estudos de estrutura populacional (BEEBEE, 2005). De acordo com Lyra et al., (2016), os genes *Citocromo Oxidase Subunidade 1* (COI) e 16S se mostraram muito eficientes como marcadores genéticos para análises de fluxo gênico e diversidade genética das populações de uma mesma espécie de anfíbio e em nível individual (LANGONE et al., 2016).

Além de estudos de genética populacional, também há outras técnicas, como por exemplo, as técnicas de citogenética, que podem ser usadas para analisar os efeitos da fragmentação sobre a estabilidade genômica. Considerada uma técnica confiável, rápida, menos exigente e com baixo custo, o teste do micronúcleo (MN) consegue avaliar a taxa de formação de micronúcleo e outras alterações celulares que podem ser usadas para avaliar a indução de danos cromossômicos, bem como a indução de morte celular (ARSLAN et al., 2015). As estruturas caracterizadas como micronúcleos ocorrem durante a anáfase, onde as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos se atrasam e não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos no processo de divisão celular, não sendo incluídas no núcleo das células filhas (OBIAKOR et al., 2012). A formação do micronúcleo pode ocorrer de forma espontânea, mas principalmente pela exposição a agentes contaminantes no ambiente. Os micronúcleos também podem aparecer nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais (FENECH, 2003; LAJMANOVICH et al., 2014). Além do micronúcleo, estudos descreveram a presença de outras alterações nucleares (NA's) (GONÇALVES et al. 2014). Sendo assim, esse teste pode ser considerado uma ferramenta apropriada para detectar efeitos de estresse celular e para alertar a ocorrência de danos no DNA das células de organismos expostos a agentes genotóxicos, incluindo os anfíbios (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015; SCHUCH et al., 2015).

É de grande importância avaliar a espécie no seu cenário atual, verificando a capacidade desses indivíduos de continuarem se mantendo nos ambientes e demonstrando a importância dos fragmentos remanescentes, principalmente os com a presença de espécies ameaçadas. Desta forma, é necessário avaliar a saúde dessas populações com análises de diversidade genética, danos genotóxicos, registros atuais de ocorrência, bem como verificar se a densidade vegetal dos fragmentos está se mantendo.

Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da fragmentação de habitat na diversidade genética e instabilidade genômica em populações de *Vitreorana uranoscopa*, espécie de anfíbio restrita a ambientes de riachos no bioma Mata Atlântica no sul do Brasil. Os objetivos específicos desse estudo são: I) verificar as alterações sofridas nos quatro fragmentos amostrados ao longo dos últimos anos, quantidade de área que foi mantida, perdida ou adquirida; II) caracterizar a diversidade genética das populações de *Vitreorana uranoscopa*; III) testar a influência da distância geográfica e do tamanho e preservação do fragmento na estrutura genética e fluxo gênico das populações; IV) analisar a instabilidade genômica das populações em cada fragmento florestal por meio de análises citogenéticas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Área de Estudo*

As amostras foram coletadas de 15 indivíduos por fragmento, totalizando 60 indivíduos amostrados em quatro fragmentos de tamanhos diferentes, sendo o maior deles o Parque Estadual do Turvo, em Derrubadas/RS (Área 1), que é o maior remanescente de Floresta Estacional Decidual do estado do RS (IBGE, 2012), mas em seu entorno há uma forte antropização por lavouras (IOP, 2011). A Reserva Biológica Moreno Fortes, em Dois Irmãos das Missões/RS (Área 2), é uma área onde ocorre dois tipos florestais, a de Araucárias e Floresta Estacional Decidual (IBGE, 2012; DOIS IRMÃOS DAS MISSÕES, 2009). O Parque Estadual do Papagaio Charão, em Sarandi/RS (Área 3), protege um significativo fragmento do ecossistema de contato entre o campo (savanas) e a floresta com araucária (SEMA, 2009). E, por fim, há o Parque Municipal de Sertão, em Sertão/RS (Área 4) (Figura 1).

Para verificar dados atualizados de tamanho de áreas florestais que foram mantidas, perdidas ou adquiridas em cada fragmento, foram utilizadas imagens de satélite obtidas entre o período de 1985 e 2017, que estão disponíveis no software MapBiomas, onde todos os mapas anuais de cobertura e de uso do solo são produzidos a partir da classificação pixel a pixel de

imagens do satélite Landsat, através da plataforma *Google Earth Engine* (MAPBIOMAS, 2022). As imagens foram definidas utilizando software AutoCAD, 2019.

### *Coleta das amostras*

Para as análises citogenéticas, foram coletadas amostras de mucosa bucal de 15 indivíduos adultos de cada população da espécie *Vitreorana uranoscopa*, com auxílio de *swabs* estéreis. Os *swabs* com o material salivar foram depositados em 1 mL de tampão de digestão (10 mM tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% SDS) e estocados em freezer a -20 °C até o momento da extração de DNA.

### *Técnicas de citogenética para a avaliação da instabilidade genômica*

A obtenção das amostras de células para as análises citogenéticas também foi realizada através da coleta da mucosa de anuros adultos, mas neste caso, com auxílio de uma escova citológica com cerdas de nylon. Em seguida, as amostras foram fixadas com fixador Carnoy 3:1 (ácido acético e álcool metílico) e mantidas refrigeradas. Após a coleta em campo, foi realizada a separação das células das amostras e preparação das lâminas no laboratório de acordo com o protocolo de Fenech, (2003). Para visualização das células foi utilizado o método de coloração convencional por Giemsa, com o objetivo de se observar o núcleo interfásico e processos relacionados à instabilidade genômica e morte celular, como micronúcleos, apoptoses e necroses (FENECH, 2003; THOMAS et al., 2011). Para cada indivíduo foi analisado mil células em lâmina, com auxílio de microscópio óptico, totalizando 15.000 células analisadas por ponto de amostragem. Para comparar os resultados obtidos para os indivíduos da Área 1 (maior fragmento). Para correlação entre tamanho de área e dados de alterações celulares, foram utilizados índices de número de células alteradas como representativos da diferenciação e o tamanho dos fragmentos para correlação de Spearman com dados não paramétricos ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (versão 8.0) e o GraphPad Prism (versão 7.0).



## RESULTADOS

Neste estudo foram coletadas amostras de 15 adultos em quatro fragmentos de diferentes tamanhos, totalizando 60 amostras. Todos os fragmentos analisados apresentaram alterações no tamanho de área entre os anos 1985 e 2019. A área A1, foi a maior área amostrada, com 15.800 ha, seguida da área A3 com 1.250 ha, área A4 com 614.5 ha, e depois a área A2, com 507.7 hectares. Todas as populações das quatro áreas avaliadas (A1, A2, A3 e A4), apresentaram danos celulares, quando testado a correlação entre tamanho de área e número de alterações celulares, houve correlação significativa para alguns danos celulares como. Para A1, células binucleadas  $p = 0.321$  e apoptoses  $p = 0.4100$ . Na área A2, houve relação significativa para células com apoptoses  $p = 0.200$ , e binucleadas  $p = 0.344$ . Para A3, apoptoses  $p = 0.004$  e binucleadas  $p = 0.456$ . Para A4, células com apoptose  $p = 0.365$ , e binucleadas  $p = 0.376$ .

## DISCUSSÃO

Mesmo em ambientes pouco perturbados, as espécies podem sofrer com a perda e a fragmentação de habitats, assim como com contato com agentes externos, como agroquímicos. Todos os fragmentos analisados apresentaram alterações no tamanho de área entre os anos 1985 e 2019. Ao analisarmos as quatro áreas de 1985 até 2019 observamos que a área 1 (A1- Parque Estadual do Turvo/RS) é a que possui maior área florestada, com 15.800 hectares de área mantida (86%), teve o maior índice de perda de área florestal. A área 2 (A2- Parque Municipal Moreno Fortes/RS), é o fragmento mais próximo da A1, estando a 45 km de distância e possui 474,8 hectares de área florestada de acordo com o Plano de Manejo e atualmente possui 91% de área florestada mantida, 8% de ganho de habitat e 1% de perda. A área 3 (A3- Parque Estadual do Papagaio Charão/RS), possui originalmente 1.000, desse total 71% da área está mantida, 27% de ganho de habitat e 2 % de perda. A área 4 (A4- Parque Municipal de Sertão/RS), possui originalmente 590,88 ha, 91% dessa área foi mantida, 7% de ganho de área e 3% de perda (Figura 2). Como já demonstrado em estudos de biogeografia de ilhas (MAGESKI et al., 2015), mesmo áreas pequenas são importantes para conservação efetiva das populações de anfíbios Wang et al., (2018), e mesmo no fragmento menor de 474,8 ha, há a presença da espécie *V. uranoscopa*, o que demonstra que independentemente do tamanho da área, pode haver recursos suficientes para manter populações de anfíbios ameaçados.

Os anfíbios têm sido considerados bioindicadores, pois vivem no ambiente aquático em sua fase larval, podendo ser expostos ao contato com agentes genotóxicos presentes na água, e

na fase adulta possuem pele a permeável, possibilitando alta troca com o meio em que vive, por isso podem ser importantes na detecção de poluentes (SCHIESARI et al., 2007; PAVAN et al., 2021). Para a detecção nos organismos, uma das técnicas amplamente utilizadas para a detecção de danos genômicos é o teste de Micronúcleo (FENECH et al., 2003). Todas as populações das quatro áreas avaliadas (A1, A2, A3 e A4), apresentaram danos celulares acima do esperado. No entanto, os estudos existentes em geral se utilizam dos efeitos de produtos químicos de algum agente estressor, como um agrotóxico a ser avaliado (YIN et al., 2009; PAVAN et al., 2021; HEREK et al., 2021; SILVA et al., 2020). Ao contrário, neste presente estudo avaliamos as células do indivíduo coletadas diretamente no ambiente em que vive, e os anfíbios são amplamente utilizados como animais de teste na avaliação dos efeitos de produtos químicos em ecossistemas aquáticos e agrícolas. De maneira geral, mesmo em estudos onde os indivíduos são expostos a agroquímicos em testes em laboratório, são demonstrados índices semelhantes (YIN et al., 2009; BARKA et al., 2016; ROCHA et al., 2011) aos deste presente estudo, que analisou indivíduos no seu habitat natural. De acordo com Ray et al., (2005), o aumento da frequência de alterações celulares pode ser indicativo de um mecanismo de defesa/reação da célula para eliminar células com danos genéticos.

Vale ressaltar, que esses danos podem acarretar consequências metabólicas, mudanças na dieta, vulnerabilidade a patógenos entre outros (FIJAN, 2002; POLLO et al., 2015). Ao analisarmos o total de alterações celulares e MN, percebemos uma diferença entre as áreas. Nas populações da área A1, em geral, houve menos danos celulares em comparação com as outras áreas. A população da área A2 foi a que apresentou maior número de células em necrose, apoptose e binucleadas (Figura 3, Tabela 1). Bem como, a A4 que também apresentou níveis mais altos que o esperado, principalmente nos índices de necroses e apoptoses celular (Tabela 1). Salientamos que as áreas A2 e A4 também são os fragmentos com menor área florestada. Danos genômicos podem ser causados por diversos fatores presentes no ambiente e, com o aumento da fragmentação, pode-se aumentar a exposição dos indivíduos a estes fatores (CUSHMAN, 2006). Além disso, a fragmentação também pode acarretar em isolamento populacional, diminuição no fluxo gênico (DIXO et al., 2009), alterações genômicas (LIN; WANG, 1987) e perda de diversidade (CUSHMAN, 2006).

As áreas protegidas demonstram ser uma ferramenta importante para frear a fragmentação e perda de biodiversidade, pois em comparação com áreas desprotegidas, abrigam mais espécies e indivíduos, baixos índices de perda de habitat (JOPPA; PFAFF, 2011; GELDMANN et al., 2013; GRAY et al., 2016) e mais serviços ecossistêmicos (Watson et al. 2014). O papel das áreas protegidas depende de muitos fatores complexos, como localização e

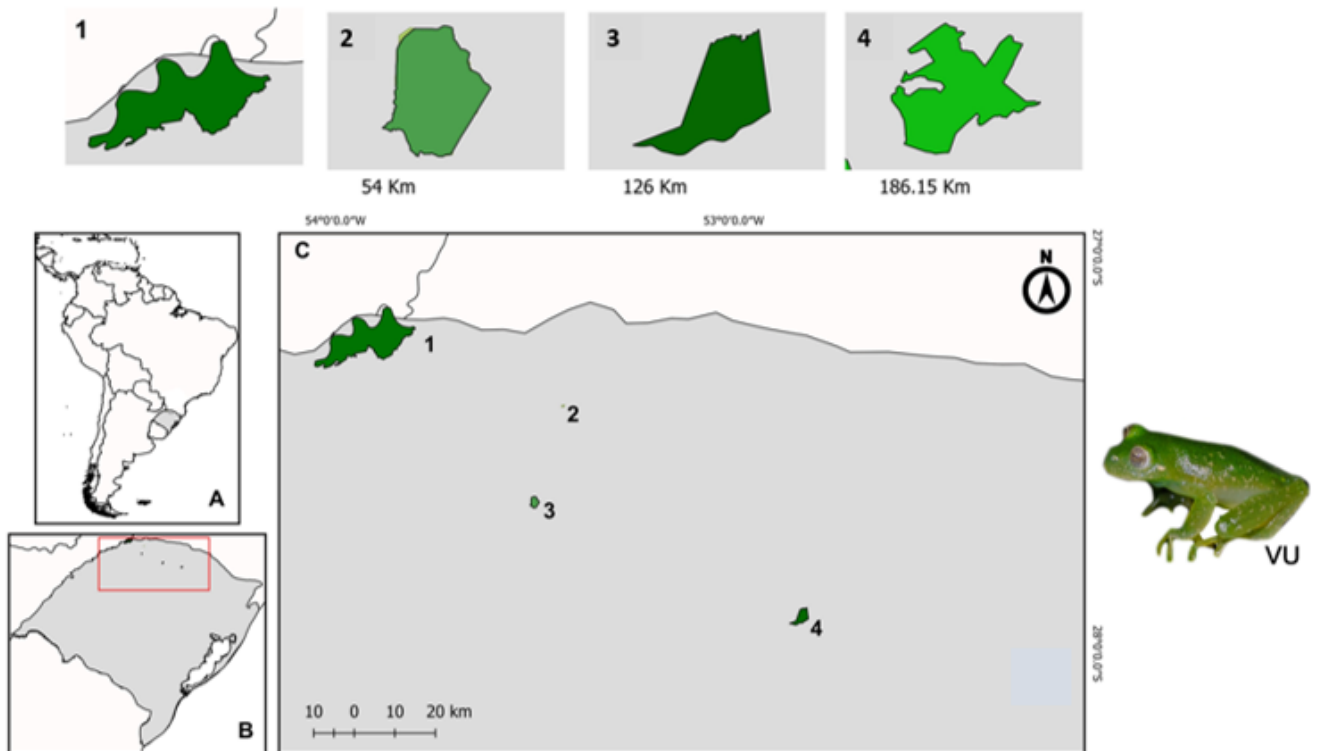
conectividade com outros locais, bem como outras áreas menores e não protegidas, também dependem da conectividade com áreas maiores para manter a diversidade existente (RODRIGUES; CAZALIS, 2020). No entanto, devem ser realizadas avaliações constantes nessas áreas (protegidas e desprotegidas) para verificação da permanência ou declínio das espécies.

## CONCLUSÃO

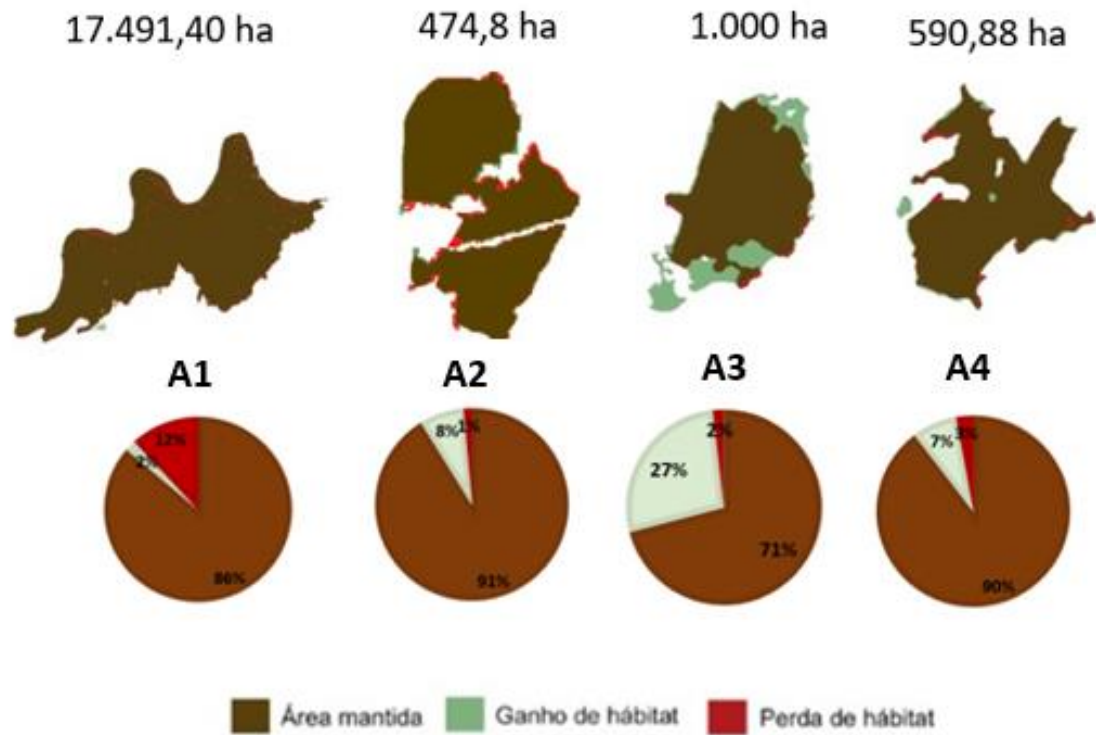
De maneira geral, a área A1 é a que possui maior área florestada, e também teve o maior índice de perda de área floresta, com 15.800 hectares de área mantida (86%). Em relação aos dados de anomalias celular nas populações da área A1, houve menos danos celulares em comparação com as outras áreas menores. A população da área A2, com 7% de área mantida e um total de 507.7 hectares, e A4 com 4% de área mantida e um total de 624.5 ha, foram as que apresentaram maior número de células em necrose, apoptose e binucleadas, e são também as menores áreas amostradas. Já a A3, com 1.250 ha, e com um aumento da sua área florestal em 25% nos anos analisados, demonstrou menor índice de danos celulares em comparação com A2 e A4. Com estes dados, conseguimos observar como as áreas de maior tamanho podem manter populações mais saudáveis, pois, para *V. uranoscopa*, que é uma espécie dependente de habitat florestal, essas áreas podem se tornar refúgios para perpetuação da espécie, e importantes barreiras contra as ações antrópicas do meio externo, para essas populações de vivem interior das áreas.

## Figuras.

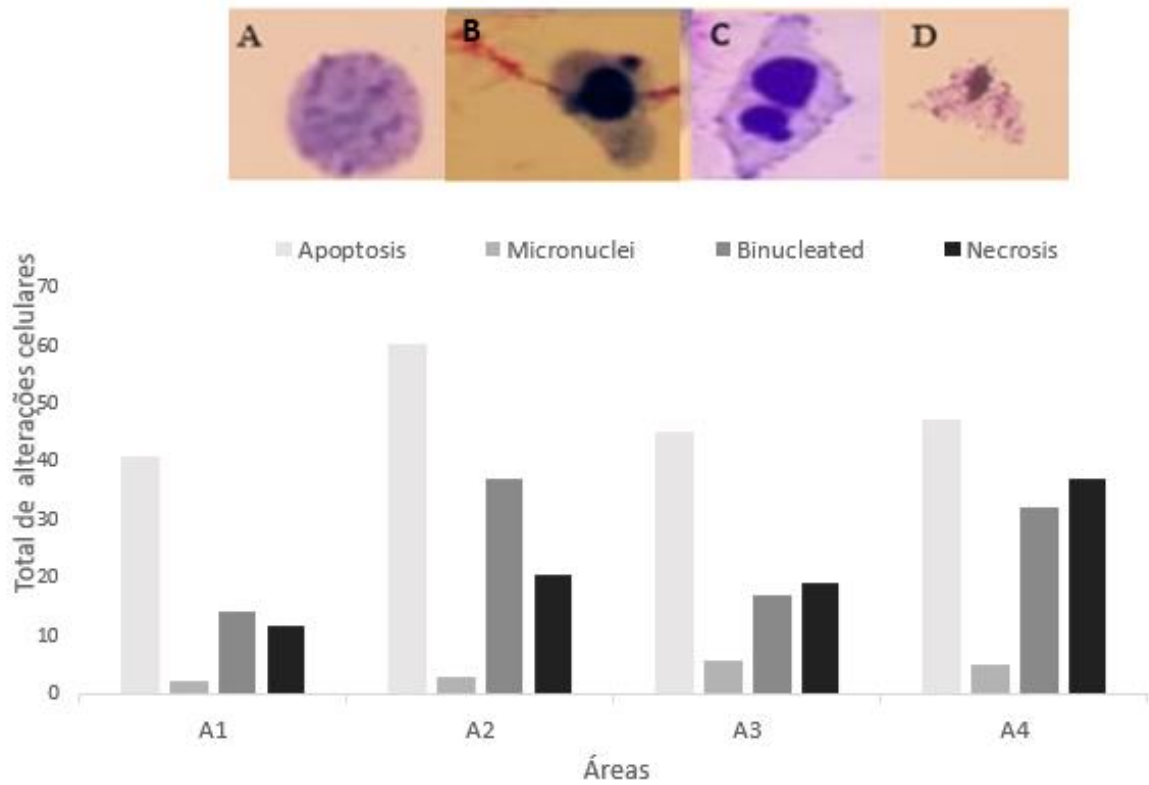
**Figura 1.** Áreas de coleta das amostras. As distâncias em quilômetros das áreas 2, 3, 4 e 5 em relação à área 1 (maior área) são mostradas abaixo de cada fragmento na parte superior da imagem. **A.** Mapa da América Latina representando em cinza o estado do Rio Grande do Sul (Brasil). **B.** Localização das áreas de coleta dentro do Rio Grande do Sul. **C.** Localidades onde foram realizadas as coletas de VU = *Vitreorana uranoscopa*, destacadas pelos quadros vermelhos.



**Figura 2.** Análise de imagens de satélite das cinco áreas de amostragem previstas neste estudo, indicando as alterações ambientais sofridas entre os anos de 1985 e 2019, os quadros vermelhos indicam as quatro áreas com a presença da espécie *Vitreorana uranoscopa*.



**Figura 3.** Frequência de micronúcleos e alterações nucleares em adultos de quatro populações de *Vitreorana uranoscopa* amostradas em quatro áreas: populações da área A1, área A3, área A4 e área A5. (A) Célula com Apoptose; (B) Célula com Micronúcleo; (C) Célula Binucleada (D) Célula necrosada; (E) Célula com Bolha nuclear.



## Tabelas

**Tabela 1:** Número total de instabilidade cromossômica (células micronucleadas e binucleadas), células mortas (apoptose e necrose) e células vivas observadas em indivíduos amostrados de *V. uranoscopa* em quatro riachos diferentes de fragmentos florestais (A1, A2, A3 e A4).

Areas	Nº cells Alive/Apoptosis	Nº cells Alive/Necrosis	Nº cells Alive/Micronuclei	Nº cells Alive/Binucleated
A1	959.1/40.9	988,4/11.6	997.8/2.2	985.5/14.5
A2	939.8/60.2	979.6/20.4	997/3	962.6/37.4
A3	954.8/45.2	980.9/19.1	994.1/5.9	982.9/17.1
A4	952.8/47.2	963/37	995/5	967.8/32.2

## Perspectivas Futuras

### Manipulação do DNA e análises das sequências

O DNA total será extraído de cada amostra de mucosa bucal coletada utilizando protocolo de extração com uso de fenol-clorofórmio, de acordo com Green and Sambrook (2012). A amplificação dos alvos genéticos será realizada utilizando dois genes mitocondriais (Lyra et al., 2016) e um nuclear de acordo com Langone et al., 2016. Para purificação dos amplicons será utilizado o protocolo de Precipitação com Polietilenoglicol (PEG). Após a purificação, os fragmentos serão sequenciados automaticamente utilizando o sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer, usando BigDye terminator v3.1.

As montagens e edições dos eletroferogramas serão realizadas no programa Gap4 do pacote Staden (STADEN, 1996) e os sítios polimórficos serão confirmados por inspeção visual. As sequências consenso terão sua identidade confirmada pelo uso do algoritmo BLASTn (NCBI) e posteriormente alinhadas entre si utilizando o algoritmo ClustalW, implementado no programa MEGA7 (KUMAR et al., 2015).

Para caracterizar a estruturação genética das populações serão feitos os cálculos dos índices de diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e número de haplótipos das populações de cada fragmento. Para tal, será utilizado o programa DNA SP 6.0 (Librado & Rozas, 2009). A caracterização geográfica será realizada pela construção de redes de haplótipos (network), inferidas com o uso do programa Network 5.0 por median joining (BANDELT et al., 1999) para cada gene separadamente para todas as áreas.

Os níveis de diferenciação entre as populações serão medidos por meio de análise de variância molecular (AMOVA). Serão feitas três análises diferentes com os genes COI e 16S, para verificar a estrutura populacional entre as populações dos fragmentos (A1, A3, A4 e A5). Esta análise avalia o índice de fixação ( $F_{ST}$ ), em que valores próximos a 1 indicam uma alta estruturação entre as populações, e valores próximos a 0 indicam uma mistura entre as populações. Todas as análises serão realizadas utilizando o programa Arlequin 3.5.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O Teste de Mantel será realizado para avaliar se há correlação positiva significativa entre as distâncias genéticas e as geográficas das populações. Para esse teste, será utilizada a distância geográfica entre as populações calculada no programa Diva-Gis 7.5 (HIJMANS et al., 2012). Será realizado um teste de correlação, teste Tuckey, no software STATISTICA 8.0, entre os dados genéticos e tamanho de área.



## Referências

- ARSLAN, O. C. et al. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, p. 48-54, 2015.
- JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagen**, v. 23, p. 207-22, 2008.
- ANDRÉN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportion of suitable habitat: a review. **Oikos**, v. 3, p. 355-366, 1994.
- BANDLET H.; FORSTER P.; ROHL A. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol**, v.161, p. 37-48, 1999.
- BARKA, S. et al. Monitoring genotoxicity in freshwater microcrustaceans: A new application of the micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 803, p. 27-33, 2016.
- BECKER, C. G. et al. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775-1777, 2007.
- BECKER, C. G. et al. Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. **Conservation Biology**, v. 24, p. 287-294, 2010.
- BEEBEE T. J. Conservation genetics of amphibians. **Heredity**, v. 6, p. 423-428, 2005.
- BOSCH, B. et al. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. **J. Toxicol. Environ. Health Sci**, v. 3, p. 155–163, 2011.
- CALDART, V. et al. Extension of the geographical distribution of two anuran species for Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on natural history. **Biota Neotropica**, v. 3, p. 143-147, 2010.
- CALDART, V. M. et al. Diurnal and nocturnal predators of *Crossodactylus schmidtii* Gallardo, 1961 (Anura, Hylodidae) in southern Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 7, p. 342-345, 2011.
- CARNAVAL, A. C. et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 281, p. 1792, 2014.
- CARAMASCHI, U.; SAZIMA, I. Uma nova espécie de *Crossodactylus* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Lepodactylidae). **Rev. Bras. Zoo**, v.1, p. 43-49, 1985.

- Carnaval, A. C. et al. Landscape Transformations and loss of Atlantic Forests: challenges for conservation. **Journal for Nature Conservation**, v. 66, p. 126152, 2022.
- CARVALHO E SILVA A. M. T.; SILVA G. R.; CARVALHO E SILVA S. P. Anurans at Rio das Pedras Reserve, Mangaratiba, RJ, Brazil. **Biota Neotrop**, v. 8, p. 199-209, 2008.
- COX, K.; MAES, J.; CALSTER, H. V.; MERGEA, Y. J. Effect of the landscape matrix on gene flow in a coastal amphibian metapopulation. **Conserv Genet**, v. 18, p. 1359-1375, 2017.
- CUSHMAN S. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: review and prospectus. **Biol Conserv**, v. 128, p. 231–240, 2006.
- DELUEN, M. et al. Impacts of temperature on O<sub>2</sub> consumption of the Pyrenean brook newt (*Calotriton asper*) from populations along an elevational gradient. **Journal of Thermal Biology**, v. 103, p. 103166, 2022.
- DIXO, M. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biol Conserv**, v. 142, p. 1560-1569, 2009.
- DOIS IRMÃOS DAS MISSÕES. Plano de Manejo da Reserva Biológica Municipal Moreno Fortes. Dois Irmãos das Missões. **Departamento de Meio Ambiente**, 2009.
- DA ROCHA, M. C. et al. Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. **Biological Conservation**, 249, 108746, 2020.
- EMEL, S. L.; STORFER, A. A decade of amphibian population genetic studies: synthesis and recommendations. **Conservation Genetics**, 2012.
- EXCOFFIER L.; LISCHER H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Res**, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FENECH, M. et al. Detailed description of scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Reserach/ Genetic Toxicology an Environmental Mutagenesis**, v. 1, p. 65-75, 2003.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.
- FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 999-1014, 2002.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA, 2017. Eletronic Data bases acessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>

- FZB: FUNDAÇÃO ZOOBOTANICA DO RS. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em <[https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id\\_modulo=1&id\\_uf=23&ano=2012](https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=1&id_uf=23&ano=2012)>. Acesso em 17 out. 2021, 2014.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK. J. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 4rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2012.
- GELDMANN, J. et al. Effectiveness of terrestrial protected areas in reducing habitat loss and population declines. **Biological Conservation**, v. 161, p. 230-238, 2013.
- GOMES M. A. Et al. Patch size matters for amphibians in tropical fragmented landscapes. **Biol Conserv**, v. 195, p. 89–96, 2016.
- GONÇALVES M. W. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, 2014.
- GIOVANELLI, J. G. R. et al. Modeling a spatially restricted distribution in the Neotropics: How the size of calibration area affects the performance of Five presence-only methods. **Ecological Modelling**, v. 2, p. 215-224, 2010.
- HADDAD, C. F. B. et al. *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia*. São Paulo: Anolis Books, p. 544, 2013.
- HARPER, K. A. et al. Edge influence on Forest structure and composition in fragmented landscapes. **Conservation Biology**, v. 19, p. 768–782, 2005.
- SCHIESARI, L.; GRILLITSCH B., GRILLITSCH, H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution, **Conserv. Biol.**, v. 21, p. 465-471, 2007.
- SZCZEPANOWSKA K.; TRIFUNOVIC A. Different faces of mitochondrial DNA mutators. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1847, p. 1362-1372, 2015.
- HAYES, T. B., et al. The cause of global amphibian 467 declines: a developmental endocrinologist's perspective. **J. Exp. Biol**, v. 213, p. 921–33, 2010.
- HIJMANS, R. J.; GUARINO, L.; MATHUR, P. *Diva-GIS version 7. 5. Manual*. [http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS\\_manual\\_7.pdf](http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf). 2012.
- HEREK, J. S. et al. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA- IBGE. *Manual técnico da vegetação brasileira*. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro, 2012.
- IOP S., et al. Anurans of Turvo State Park: testing the validity of seasonal forest as a new biome in Brazil. **Journal of natural history**, v. 45, p. 2443-2461, 2011.

- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version (2017-2). <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 October 2019, 2017.
- JOPPA, L. N.; PFAFF, A. Global protected area impacts. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278(1712), p. 1633-1638, 2011.
- KUMAN S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 3, p. 1870-1874, 2016.
- LAJMANOVICH R., et al. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hylapulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research**, v. 587, p. 67-72, 2005.
- LIBRADO P.; ROZAS J. DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2496-2597, 2009.
- LIN M. F.; WU C. L.; WANG T. C. Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 188, p. 241–250, 1987.
- LIPS K. R. Decline of a tropical montane amphibian fauna. **Conservation Biology**, v. 12, p. 106-112, 1998.
- LANGONE J. A.; CAMARGO A.; DE SÁ R. O. High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 95, p. 137–151, 2016.
- LYRA M. L.; HADDAD C. F. B.; DE AZEREDO-ESPIN A. M. L. Meeting the challenge of DNA barcoding neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**, 2016.
- OBIAKOR, M. O., et al. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2(1), p. 123-133, 2012.
- PAVAN, F. A., et al. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 103637, 2021.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M., et al. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Argentina, v. 119, p. 15 -24, 2015.
- PROJETO MAPBIOMAS – Coleção v. 4.0 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil, acessado em 10 de outubro de 2019, através do link: <http://plataforma.mapbiomas.org/map#coverage> ", 2017.

- MAGESKI M., et al. The island rule in the Brazilian frog *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae): incipient gigantism?. **Zoology**, v. 32, p. 5, 2015.
- MITTERMEIER R. A., et al. *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. **University of Chicago Press**, 2005.
- MOUCHET F., et al. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water, **Environ. Toxicol**, v. 26, p.136–145, 2011.
- PAZ A., et al. Phylogeography of Atlantic Forest glassfrogs (*Vitreorana*): when geography, climate dynamics and rivers matter. **Springer Nature- The genetics Society**, 2018.
- POLLO, F. E., et al. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, p. 581, 2015.
- RAMOS, E. K. S., et al. Population genetics and distribution data reveal conservation concerns to the sky island endemic *Pithecopus megacephalus* (Anura, Phyllomedusidae). *Conservation Genetics* 19:99-110. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1013-z>, 2018.
- RAY, M. R., et al. Micronucleus frequencis and Nucleus anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. **Int. J. Hum. Genet**, v. 5, p. 45 – 48, 2005.
- REBOLLAR E. A. et al. The Skin Microbiome of the Neotropical Frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring Potential Bacterial-Host-Pathogen Interactions from Metagenomic Data. **Front. Microbiol**, 2018.
- REBOLLAR E. A.; HARRIS R. N. Ecology of Amphibian-Microbial Symbiose. **Frontiers Research Topics**, 2019.
- REMON, J. et al. Patterns of gene flow across multiple anthropogenic infrastructures: Insights from a multi-species approach. **Landscape and Urban Planning**, v. 226, p. 104507, 2022.
- RIBEIRO, L.F., MORITZ, C. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proc. R. Soc**, v. 281, p. 161, 2014.
- RIEMANN J. C. et al. The value of Forest fragments for maintaining amphibian diversity in Madagascar. **Biological Conservation**, v. 191, p. 707–715, 2015.
- RODRIGUES, A. S.; CAZALIS, V. The multifaceted challenge of evaluating protected area effectiveness. **Nature Communications**, v.1, p. 1-4, 2020.
- ROCHA, C. A. M. The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tools for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulfate. **Middle East J. Sci. Res**, v. 8, p. 23–29, 2011.

- SCHUCH, A. P. et al. Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.118, p. 190–198, 2015.
- SEGELBACHER G. L. et al. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. **Conserv Genet**, v. 11, p. 375–385, 2010.
- SEMA (Secretaria Estadual do Meio Ambiente). Plano de Manejo do Parque Estadual do Turvo. Porto Alegre (Brazil): Estado do Rio Grande do Sul. 348 p, 2005.
- SEMA (Secretaria Estadual do Meio Ambiente). Parque Estadual do Papagaio Charão, 2009. <https://www.sema.rs.gov.br/parque-estadual-do-papagaio-charao>
- SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology**, v. 3, p. 653-658, 2005.
- SILVA, M. B. D. et al. Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 7, p. 1-11, 2020.
- SOUZA L. M. I.; KAGEYAMA P. Y.; GANDARA F. B. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Camará Centro de Apoio às Sociedades Sustentáveis**. ESALQ/USP, v. 32, p. 65-70, 1998.
- STADEN R. The Staden Sequence Analysis Package. **Mol Biotechnol**, v. 5, p. 233-241, 1996.
- SUMNER, A. T. Funcional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem**, v. 38, p. 91-109, 1994.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 4, p. 6, 2009.
- VALENCIA, L. C. et al. Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 681-688, 2011.
- UDROIU I.; SGURA A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, 2017.
- YIN, X. et al. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 680, p. 2-6, 2009.
- YIN X. H. et al. Zhuang. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 280-286, 2008.
- ZHANG D. X.; HEWITT G. G. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Mol Ecol**, v. 12, p. 593-584, 2003.

WATSON, J. E., et al. The performance and potential of protected areas. **Nature**, v. 515, p. 67-73, 2014.

WANG Y. et al. The small-island effect in amphibian assemblages on subtropical land-bridge islands of an inundated lake. **Current Zoology**, v. 64, p. 303-309, 2018.

**3.1.3 ARTIGO III-** O Artigo 2, intitulado “Espécies Simpátricas de *Boana*: Estrutura Populacional e Novos Registros de Distribuição no Sul da Mata Atlântica”, está em fase de redação.





## ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE *BOANA*: ESTRUTURA POPULACIONAL E NOVOS REGISTROS DE DISTRIBUIÇÃO NO SUL DA MATA ATLÂNTICA

### Resumo

Neste estudo relatamos novas distribuições e novos registros de espécies do gênero *Boana*, grupo *Boana pulchella* (*Boana curupi*, *Boana stellae* e *Boana joaquina*), além de uma possível nova espécie ainda não identificada, abordada nesse estudo como *Boana sp.* Esses registros contribuem para distribuição das espécies, ampliando ou reduzindo a sua distribuição geográfica, além de serem um passo importante para implementação de programas de conservação e para se obter o real status de conservação dessas espécies para o conhecimento da anurofauna local no bioma Mata Atlântica. Várias espécies que são estreitamente relacionadas têm sido descritas e, atualmente, estamos diante de resultados complexos principalmente dentro de alguns grupos de espécies de anfíbios, como no grupo *B. pulchella*, com espécies relativamente bem caracterizadas em termos fenotípicos e em suas respectivas localidades tipo: *B. curupi*, *B. caipora*, *B. joaquina*, *B. semiguttatus* e *B. stellae*. Porém, essas espécies são pouco compreendidas quanto a variação geográfica e com sobreposições de nicho. Com isso, este trabalho tem como objetivo principal auxiliar na compreensão da distribuição de espécies do gênero *Boana*, dentro do grupo *Boana pulchella*, avaliando as diferenças genéticas e a coocorrência, bem como demonstrar uma nova distribuição para as espécies. A partir das coletas e análises de DNA, as espécies até o momento reconhecidas como *Boana curupi* formam, na verdade, quatro espécies: *B. stellae*, *B. curupi*, *B. joaquina* e uma espécie ainda não identificada (chamada *Boana sp.*).

Palavras chave: *Boana curupi*, *Boana stellae*, *Boana joaquina*, Análise de DNA, Filogenia, Novos registros geográficos.

## INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica é considerado um hotspot de biodiversidade e essa característica pode estar associada a mudanças históricas nas paisagens e flutuações climáticas (Mittermeier et al., 2004, Carnaval et al., 2009; Wilson et al., 2021). Além da alta biodiversidade é possível verificar a presença de espécies crípticas. Essas são morfologicamente muito semelhantes e muitas vezes identificadas de forma equivocada como uma única espécie (Bickford et al., 2007). Nesse caso, as análises moleculares tem sido uma boa alternativa para a identificação de forma correta (Satler et al., 2013; Hedin, 2015).

Há diversos grupos com problemas na identificação de espécies crípticas, incluindo o grupo dos anfíbios. Estes são importantes indicadores biológicos, uma vez que são vulneráveis às mudanças no seu habitat devido, principalmente, por terem fases de vida em ambientes aquáticos e terrestres (LIPS, 1998). O gênero *Boana* (Anura, Hylidae) é representado por 97 espécies distribuídas em sete grupos. Dentre os grupos, o *Boana pulchella* é o mais representativo, apresentando até o momento 38 espécies (Faivovich et al., 2020). *Boana curupi* e *Boana stellae* pertencem ao grupo de espécies *Boana pulchella* (Faivovich et al. 2005; Frost, 2021), são especialistas de habitat e encontradas apenas em riachos (Caramashi & Sazima, 1985; Carvalho-silva, 2001). A distribuição geográfica conhecida até o momento para *B. curupi* inclui o sul do Brasil (estados de Santa Catarina e Rio Grande do sul), nordeste da Argentina e sudeste do Paraguai (Frost, 2021). No Brasil, os registros de ocorrência estão situados em paisagens altamente fragmentadas do bioma Mata Atlântica e muitos destes registros foram feitos fora de unidades de conservação (Bastiani et al., 2016). Para *B. stellae*, a distribuição se encontra restrita ao estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, e Misiones, na Argentina (Ferro et al., 2018; Widholzer; Castroviejo-Fisher, 2018).

Segundo a IUCN (2017), ambas as espécies estão em status de pouco preocupante (LC). Na lista vermelha regional das espécies ameaçadas (FZB, 2014), *B. curupi* está na categoria em perigo (EM) e *B. stellae* está sem status, o que demonstra os poucos dados existentes até o momento sobre a espécie, além da importância da identificação correta das espécies para a obtenção do status de conservação adequado (Hemami et al., 2021).

A diversidade da fauna de anfíbios do Brasil (SBH 2022) contrapõe com a atual perda e degradação de habitats e o escasso conhecimento sobre a taxonomia, biologia e distribuição geográfica de muitas espécies. A falta de informações sobre a distribuição geográfica de espécies traz prejuízos à interpretação quanto à macroecologia e padrões evolutivos (Garcia et

al., 2007; Lucas e Garcia, 2011), que são os primeiros passos para o processo de tomada de decisão sobre conservação da biodiversidade. Com isso, este trabalho tem como objetivo, auxiliar na compreensão da distribuição de espécies do gênero *Boana*, dentro do grupo *Boana pulchella*, avaliando as diferenças genéticas e a coocorrência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

A área de estudo inclui as regiões sul do Brasil e nordeste da Argentina, representando grande parte da área de distribuição conhecida de *Boana curupi*. Amostramos nove fragmentos florestais no sul do Brasil, três no estado do Rio Grande do Sul e seis no estado de Santa Catarina (Figura 1; Tabela 1s). Além das amostras coletadas, analisamos também amostras no estado do Paraná, Rio Grande do Sul, e três fragmentos localizados na província de Misiones, Argentina. Os pontos de amostragem estão inseridos no domínio da Mata Atlântica, em fitofisionomias de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Decidual (IBGE, 2004).

### Coleta de dados

Realizamos amostragens noturnas no período de setembro de 2017 a janeiro de 2018 e setembro de 2018 a fevereiro de 2019. Iniciamos as amostragens ao anoitecer e finalizamos próximo às 00h, quando a espécie normalmente diminuía ou cessava a atividade de vocalização (Bastiani et al., 2016). Localizamos os indivíduos de *Boana* sp. com o auxílio de lanternas, por meio de busca visual, auditiva e encontros ocasionais (Heyer et al., 2001).

Coletamos amostras de mucosa bucal de 5 a 15 indivíduos por riacho de amostragem, com auxílio de *swab* estéril. Acondicionamos os *swabs* em tubos individuais com solução tampão TE (10mM tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl e 2% SDS), para posterior extração de DNA. Para evitar pseudorréplicas, após a coleta das amostras, cada indivíduo foi marcado com etiqueta alfanumérica (*Visible Implant Alpha Tags* de 1.2 mm × 2.7 mm, BUCKMEIER; IRWIN, 2000) na porção subcutânea da coxa (Osbourn et al., 2011) e posteriormente liberado no mesmo local de captura. Além das amostras de mucosa bucal coletadas, utilizamos 42 amostras de tecidos (fígado e artelho) depositados em coleções científicas, totalizando 164 indivíduos amostrados.

## Extração de DNA e amplificação de fragmentos

Para a extração do material genético de cada indivíduo, seguimos o protocolo de Bruschi et al. (2012). Utilizamos precipitação salina em solução de etanol e avaliamos a integridade das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Os dois fragmentos de DNA mitocondrial foram amplificados utilizando os primers AnF1 (5'-ACHAAYCAYAAAGAYATYGG-3') e AnR1 (5'-CCRAARAATCARAADARRTGTTG-3') para o gene *Citocromo Oxidase Subunidade I (COI)* (LYRA et al., 2016), e An16SF (5'-ACCGTGCGAAGGTAGCGTAATC-3') e An16SR (5'-CCTGATCCAACATCGAGGTTCG-3') para o gene 16S. Esses genes mitocondriais conservados vem sendo utilizados para inferir diversidade e diferenciação entre espécies (Lyra, et al., 2017). Para o gene nuclear utilizamos os primers RAG1 R1-GFF (5'-GAGAAGTCTACAAAAVGGCAAAG-3') e R1-GFR (5'-GAAGCGCCTGAACAGTTTATTAC-3').

As amplificações do DNA em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador, em um volume final de 25 µL, contendo: 2 µL do DNA extraído, 15,7 µL de água milli-Q, 2,5 µL de 10x *buffer* PCR, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1 µL de dNTP Mix (10 Mm), 0,75 µL de cada primer (20pm/µL) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase. As condições de amplificação PCR foram conduzidas de acordo com Lyra et al. (2016). Realizamos a purificação das amostras com o protocolo de precipitação por PEG (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Posterior à purificação, as amostras foram analisadas em sequenciador automático AB3500 *Genetic Analyzer* após marcação com o Kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific).

## Análise de dados

Para as análises das sequências de DNA, as montagens e edições dos eletroferogramas foram realizadas no programa Gap4 do pacote Staden (Staden, 1996) e os sítios polimórficos foram confirmados por inspeção manual. As sequências consenso tiveram sua identidade confirmada pelo uso do BLASTn (NCBI site), sendo então alinhadas entre si utilizando o algoritmo ClustalW, implementado no programa MEGA7 (Kumar et al., 2016).

A caracterização geográfica de cada espécie, foi realizada pela construção de duas redes de haplótipos (network), com o uso do programa Network 10.2.0.0, por median joining (Bandelt et al., 1999), sendo uma para o gene mitocondrial 16S e outra para o gene mitocondrial COI,

contemplando todas as espécies em cada rede e utilizando algumas sequências disponíveis no GenBank (Tabela 1S).

As três árvores filogenéticas foram desenvolvidas utilizando o método da Máxima Verossimilhança os modelos foram calculados no Jmodeltest conforme valor de AIC, baseado no modelo Tamura-Nei para árvore do gene 16S, Hasegawa-Kishino-Yano + G para árvore do gene COI, e Hasegawa-Kishino-Yano + G para a árvore do gene 16s, no programa MEGA7, onde foram utilizadas nesta análise todas as sequências mitocondriais de cada gene. Para o grupo externo foram utilizadas as espécies com genoma completo disponíveis no GeneBank *Espadarana prosoblepon* (JX564857) e *Hyla sanchiangensis* (MK388868).

## RESULTADOS

Foram sequenciados 164 indivíduos para os genes mitocondriais COI (609 pb), 16S (450 pb) e nuclear *RAG1* (450 pb). A partir da análise dessas sequências foram identificadas quatro espécies do gênero *Boana*: *B. curupi*, *B. stellae*, *B. joaquini* e *Boana sp.* (espécie em potencial). Com isso, apresentamos novos registros de ocorrência para espécies (Figura 1), ampliação da área de ocorrência de *B. stellae*, *B. joaquini*, e redução dos registros de *B. curupi*.

Quanto a rede de haplótipos do gene 16s (Figura 2), demonstrou um total de 53 haplótipos, divididos entre as quatro espécies, sendo 18 haplótipos para *B. curupi*, com padrão starlike. O haplótipo H1 é o mais frequente, presente em 60 indivíduos, distribuídos em diversas localidades (Parque Estadual do Turvo/RS, Arroyo Coral/MI, Reserva Biosfera/MI, Palma Sola/SC e São Miguel/SC), e o segundo mais frequente foi o H4, representado em cinco indivíduos (Misiones/AR e Chapecó/SC). *Boana stellae* apresentou um total de 23 haplótipos, com o mais frequente sendo o H29, presente em 14 indivíduos (Misiones/AR, Sertão/RS, Parque Estadual do Papagaio Charão/RS, Concórdia/SC), seguido pelo H34, que esteve presente em 11 indivíduos (Sertão/RS e Concórdia/SC) e o H49 representado em 6 indivíduos (Palma Sola/SC, Parque Estadual das Araucárias/SC e Parque Estadual do Turvo/RS). Quanto a *Boana joaquini*, esta apresentou um total de 6 haplótipos. O mais frequente foi o H24, presente em 3 indivíduos da mesma localidade (Chapecó/SC), seguido do H23, presente em 2 indivíduos (Cambará do Sul/SC). *Boana sp* apresentou o total de quatro haplótipos, onde o mais frequente foi o H25 (Dois Vizinhos/PR e Misiones/AR).

A rede de haplótipos para o gene COI (Figura 3) apresentou um total de 53 haplótipos divididos entre quatro espécies, sendo 29 haplótipos para a espécie *Boana curupi*. O haplótipo C8 foi o mais frequente, estando presente em 26 indivíduos distribuídos em todos os pontos amostrados com a presença da espécie. Em seguida, temos o haplótipo C1, presente em 17 indivíduos, e o C18, presente em 16 indivíduos, todos pertencentes à mesma localidade (Parque Estadual do Turvo/RS). Para *B. stellae* foram identificados um total de 16 haplótipos, sendo o mais frequente o C41, representado em 4 indivíduos, e o C44, presente em 3 indivíduos. *B. joaquina* tem um total de 4 haplótipos, sendo o mais frequente o C35, presente em 3 indivíduos, ambos da mesma localidade (Chapecó/SC). E, *Boana sp.* com um único haplótipo C32, presente em 3 indivíduos, ambos da mesma localidade, (Dois Vizinhos/PR).

A árvore filogenética do gene 16s apresenta uma monofilia recíproca em *B. curupi*, *B. stellae* (Figura 4), com quatro clados bem suportados divididos entre indivíduos das três espécies e os indivíduos identificados como *Boana sp.* Em relação a árvore filogenética do gene COI (Figura 5), está também demonstrou a conformação de quatro clados bem definidos das quatro espécies. Algumas amostras do gene nuclear já analisadas em comparação com os genes mitocondriais demonstraram um desequilíbrio citonuclear, ou seja, quando marcadores citoplasmáticos e nucleares demonstram espécies diferentes.

Quanto à distância genética (distância p) entre os grupos de espécies (Tabela 2s), ao compararmos *B. joaquina* com *B. stellae*, observamos 0,09 de diferenciação. Para o gene 16s a diferenciação genética interespecífica variou de 0 a 0,8 e a distância genética intraespecífica da espécie *B. curupi* variou de 0 a 0,07, de *B. stellae* variou de 0 a 0,07, para *B. joaquina* a variação foi de 0 a 0,84 e para *Boana sp.* variou de 0 a 0,77. Para o gene COI, a distância genética interespecífica variou de 0 a 0,10, a intraespecífica das populações de *B. curupi* variou de 0 a 0,10, a de *B. stellae* variou de 0 a 0,10, de *B. joaquina* variou de 0,08 a 0,10, e *Boana sp.* variou de 0,08 a 0,09.

## DISCUSSÃO

A partir dos indivíduos analisados neste estudo foi possível confirmar a existência de quatro espécies, além de *Boana curupi*, espécie já registrada para região de amostragem, também identificamos as espécies *Boana stellae*, *Boana joaquina* e uma espécie em potencial chamada de *Boana sp.* A espécie *Boana stellae* pertencente ao grupo *Boana pulchella*, a *B. stellae* está intimamente relacionada com *B. joaquina*, *B. caipora*, *B. curupi* e *B. semiguttata*,

devido principalmente à semelhança morfológica entre os espécimes adultos. Tem registros no Rio Grande do Sul, sudeste do Brasil, e uma única localidade em Misiones, Argentina (LUTZ, 1925; ANTUNES et al., 2008; KWET, 2008; FERRO et al., 2018; WIDHOLZER; CASTROVIEJO-FISHER, 2018). Seu status de conservação está como pouco preocupante (LC) pela IUCN (IUCN, 2022). A espécie *Boana joaquini* localizada em formações abertas e florestas de araucárias no planalto da Serra Geral no sul de Santa Catarina, Brasil. Possui status de pouco preocupante (LC) pela lista vermelha de espécies ameaçadas (IUCN), mas nas listas nacionais e regionais não há dados. *B. joaquini* tem distribuição registrada em alguns poucos pontos de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil (AMPHIBIA WEB, 2022). Esta espécie possui poucos dados disponíveis.

Nas análises dos dados, foram verificados clados bem suportados nas árvores filogenéticas, onde observamos três espécies reconhecidas e uma espécie potencial na área de ocorrência até então atribuída apenas a espécie *Boana curupi*. As localidades situadas mais a oeste foram representadas por *B. curupi*. Já no centro da distribuição, na zona intermediária houve ocorrências mais misturadas das espécies, e as localidades à leste apresentam predomínio de *B. stellae*. Essa configuração aponta para alguns cenários possíveis: a) o conhecimento dessa distribuição está mudando a ampliação da distribuição de *B. stellae* e *B. joaquini*, a partir do leste sobre as áreas de *B. curupi*; b) reconfiguração da distribuição de *B. curupi*, expandindo em algumas regiões e reduzindo em outras. Então, de acordo com a área amostrada (Figura 1), as localidades situadas mais a oeste foram representadas por *B. curupi*, uma região intermediária com ocorrência de *B. curupi*, *B. stellae*, *B. joaquini* e *Boana* sp., e as localidades à leste apresentam predomínio de *B. stellae*. Os dados da árvore filogenética corroboraram com o estudo de filogenia do grupo *B. pulchella* de Faivovich et al., (2020), aonde *B. curupi*, *B. stellae* e *B. joaquini* são grupo irmão.

Todas as espécies registradas pertencem ao grupo *Boana pulchella*, mais especificamente ao clado *Boana semiguttata* (FAIVOVICH et al., 2021). O clado de *B. semiguttata* é caracterizado por apresentar espécies com taxonomia bastante complexa, tendo problemas com a delimitação das espécies (FAIVOVICH et al., 2021). Esse cenário é comum quando se trata de um grupo que apresenta espécies crípticas. A principal característica das espécies crípticas é a ausência de diferenças morfológicas, sendo assim a sua identificação de forma visual pode muitas vezes ser equivocada (BICKFORD et al., 2006), necessitando de análises moleculares para a definição (STUART et al., 2006). As espécies analisadas neste estudo podem ser caracterizadas como sendo espécies crípticas, devido a sua grande semelhança morfológica e até na vocalização, fato que já foi observado em outros estudos

(Garcia et al., 2007; Kwet, 2008). A definição das espécies a partir de estudos moleculares é de extrema importância, especialmente quando se trata de espécies crípticas, pois isso pode ampliar ou reduzir a área de ocorrência até então conhecida para cada espécie. Além disso, a identificação correta interfere diretamente nas estratégias de conservação das mesmas (Bickford et al., 2006; Stuart et al., 2006).

A maior diversidade de haplótipos foi registrada para *B. curupi*, seguida de *B. stellae*, o que pode ser explicado por uma maior dominância e distribuição dessas espécies na paisagem amostrada. Esse cenário também pode acontecer para as outras espécies registradas (*Boana sp.* e *B. joaquina*). No entanto, essas espécies se encontram sub representadas em nossas amostragens, com dados que não demonstram esgotamento da biodiversidade, necessitando assim, investigações futuras. A rede de haplótipos do gene 16S mostrou um padrão de expansão populacional mais evidente do que o gene COI. O haplótipo 1 (H1) de *B. curupi* é o mais frequente da rede de haplótipos (Figura 2). Este haplótipo está presente no maior número de indivíduos, o que pode sugerir que, além de mais frequente, também seja o haplótipo mais ancestral (Fukutani, et al., 2022).

A distância genética (distância p) (Tabela 2s) entre os indivíduos de clados diferentes é alta e as distâncias intraespecíficas são relativamente baixas, mostrando coesão interna dentro dos clados analisados. Os quatro clados bem suportados podem ser observados tanto nos dados da árvore filogenética quanto na rede de haplótipos. Os clados são bem separados, embora analisamos apenas genes mitocondriais, em que eventos de hibridação ou introgressão são difíceis de serem detectados.

A elevada diversidade haplotípica é comum em anuros, sendo muitas vezes correlacionada com a distância geográfica (Vallan, 2002; Haddad and Prado, 2005; Dixo, et al. 2009) e com espécies amplamente distribuídas. Além disso, a baixa capacidade de locomoção dos anuros também influencia na sua dispersão e fluxo gênico (Becker et al., 2007; Becker et al., 2010; Sharifi, 2016; Wielstra et al., 2015).

## CONCLUSÃO

Foi identificada a existência de quatro espécies, além de *Boana curupi*, espécie já registrada para região de amostragem, também identificamos as espécies *Boana stellae*, *Boana joaquina* e uma espécie em potencial chamada de *Boana sp.* Todas as espécies registradas pertencem ao grupo *Boana pulchella*, mais especificamente ao clado *Boana semiguttata*, que é



caracterizado por apresentar espécies com taxonomia bastante complexas. A maior diversidade genética foi registrada para *B. curupi*, seguida de *B. stellae*, o que pode ser explicado por uma maior dominância e distribuição das mesmas. A definição de espécies a partir de estudos moleculares é de extrema importância, especialmente quando se trata de espécies crípticas, pois isso pode ampliar ou reduzir a área de ocorrência até então conhecida para cada espécie. Além disso, a identificação correta interfere diretamente nas estratégias e no status de conservação das mesmas.

## Figuras

**Figura 1:** Mapa da América Latina com os pontos de coleta das amostras das espécies *Boana curupi*, *Boana stellae*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*, nas regiões sul do Brasil e nordeste da Argentina.

**Figura 2:** Rede de haplótipos (Network por median-joining) do gene mitocondrial 16s de quatro espécies do gênero *Boana*, *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*. Os traços correspondem aos passos mutacionais que diferenciam os haplótipos, representados pelos círculos, no qual os tamanhos são proporcionais a sua frequência e as cores se referem à origem geográfica.

**Figura 3:** Rede de haplótipos (Network por median-joining) do gene mitocondrial COI de quatro espécies do gênero *Boana*, *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*. Os traços correspondem aos passos mutacionais que diferenciam os haplótipos, representados pelos círculos, no qual os tamanhos são proporcionais a sua frequência e as cores se referem à origem geográfica.

**Figura 4:** Filogenia molecular resumida de Análise Bayesiana para os dados do gene 16s utilizando sequências de *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*, coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, Brasil e Misiones, Argentina, extremo Sul da Mata Atlântica. O tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. Os haplótipos representam a procedência de cada indivíduo.

**Figura 5:** Filogenia molecular resumida de Análise Bayesiana para os dados do gene COI utilizando sequências de *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*, coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, Brasil e Misiones, Argentina, extremo Sul da Mata Atlântica. O tamanho dos ramos é proporcional ao número de substituições por sítio. Os haplótipos representam a procedência de cada indivíduo.

Figura 1.

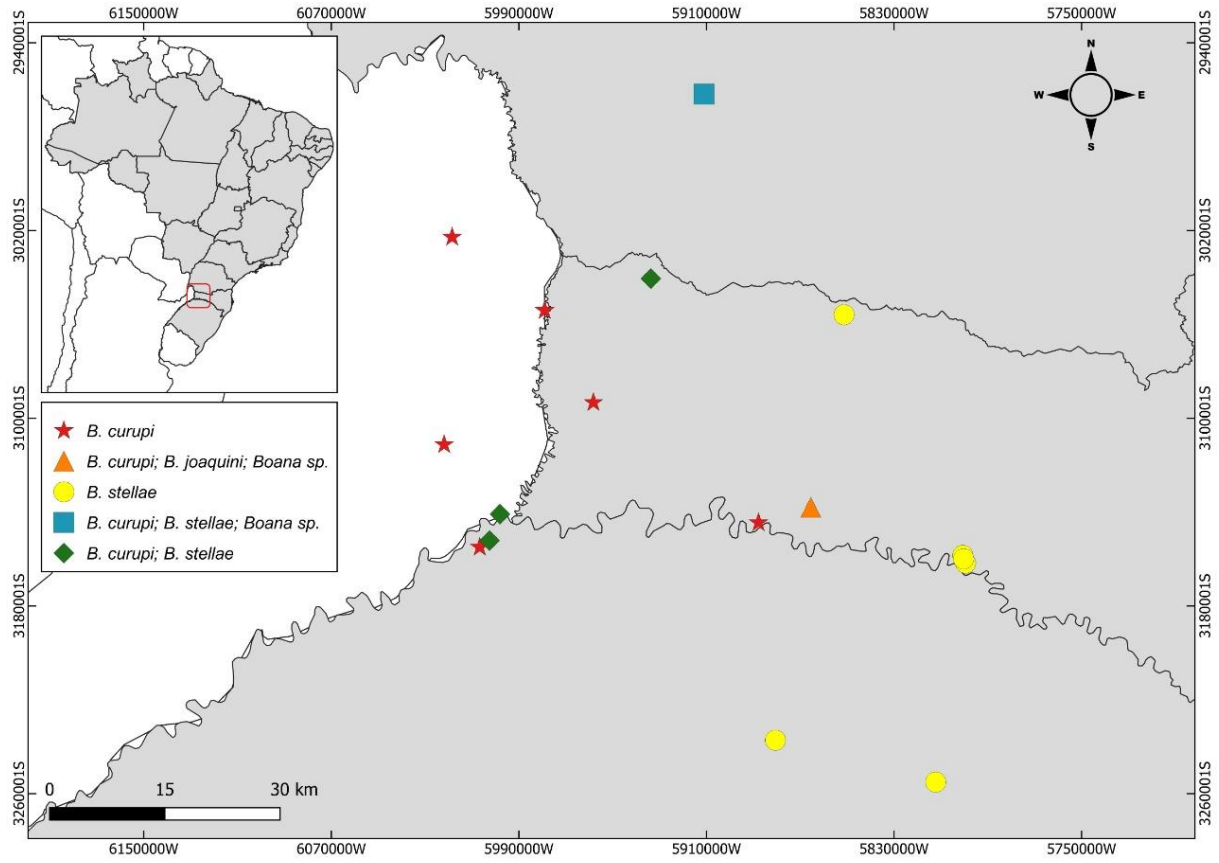


Figura 2.

16S

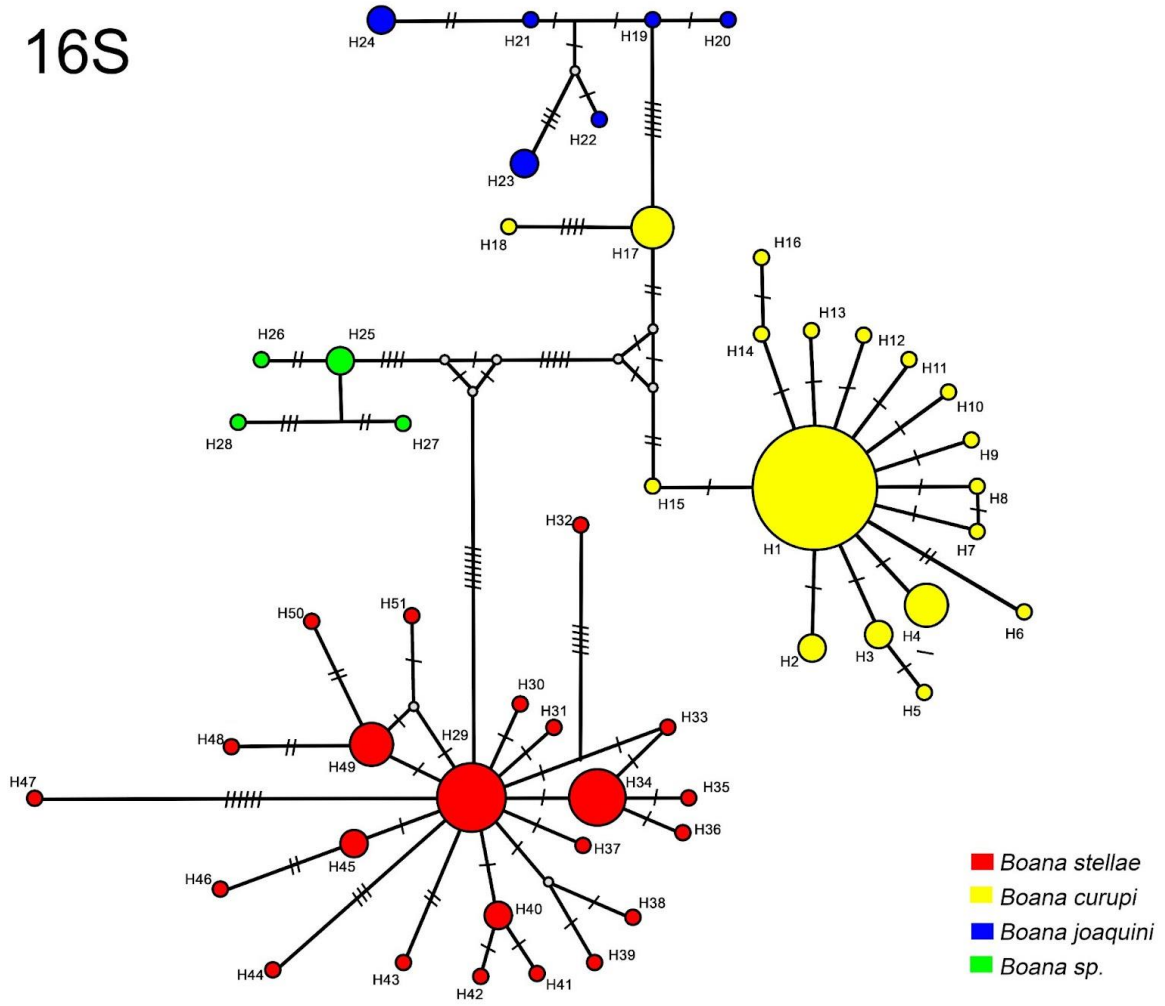


Figura 3.

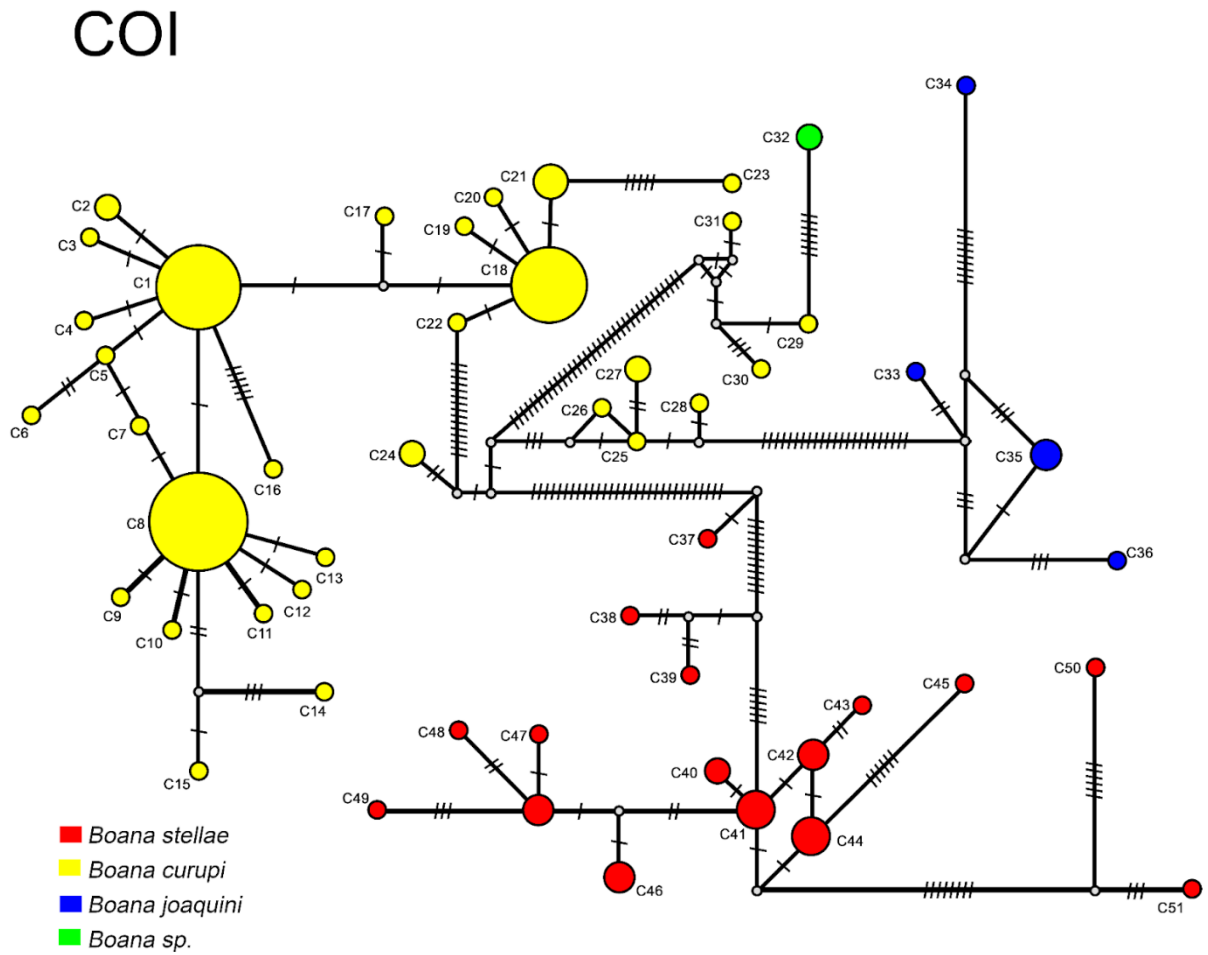
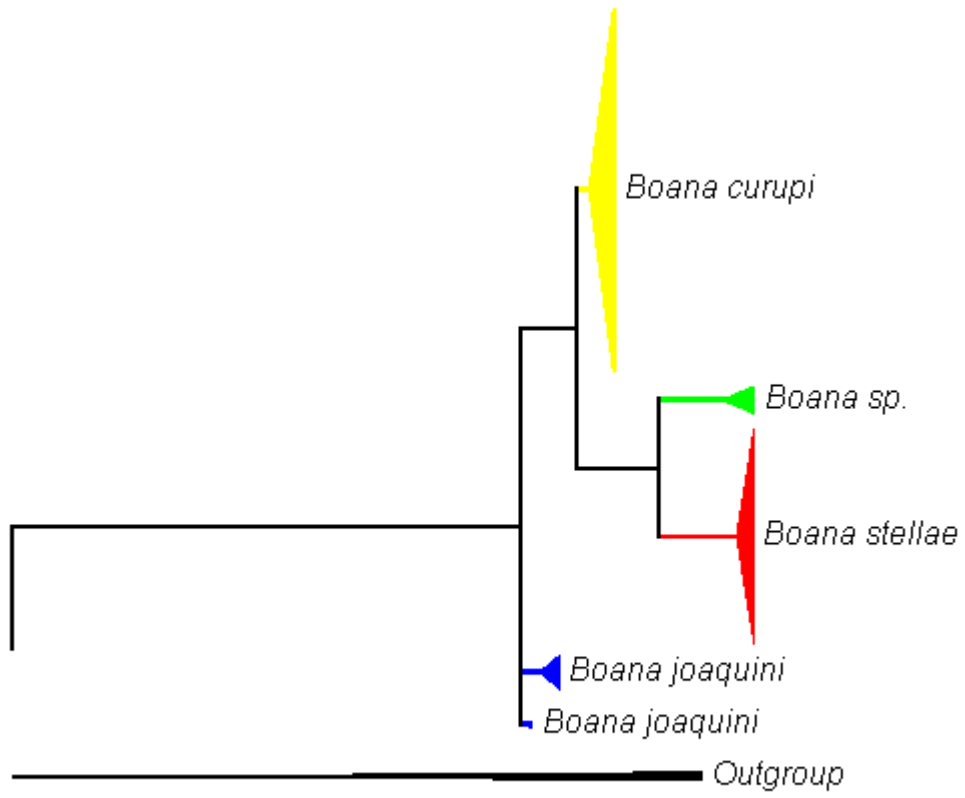
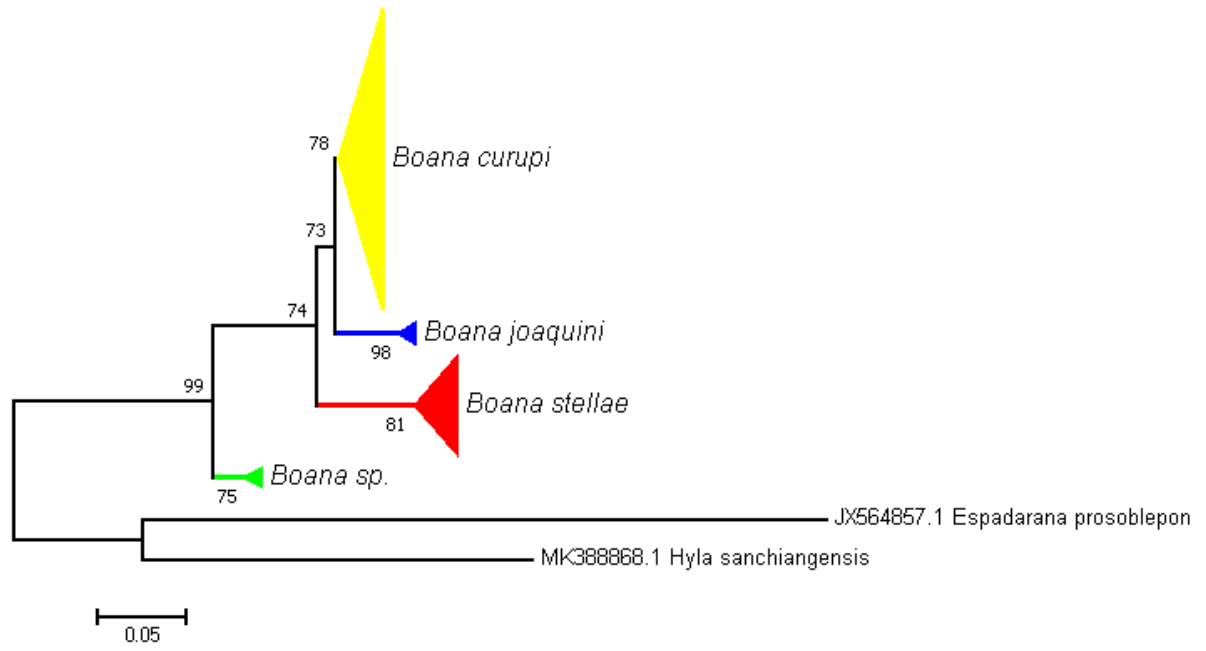


Figura 4.



**Figura 5.**



## Referências

- Bastiani, V. I.M.; Cavasotto, I. E.; Ferreira, F.; Lucas, E. M. Ecology and natural history of *Hypsiboas curupi* (Anura, Hylidae): An endemic amphibian to the southern Atlantic Forest. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 11, n. 3, p. 122-131, 2016.
- Bandelt H.; Forster P.; Rohl A. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 161:37-48, 1999.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2006.
- Becker, C. G.; Fonseca C. R.; Haddad C. F. B.; Batista R. F. B.; Prado P. I. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, 318:1775-1777, 2007.
- Becker, C. G.; Fonseca C. R.; Haddad C. F. B. Prado P. I. Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. **Conservation Biology**. 24: 287-294, 2010.
- Bruschi, D. P.; Busin, C. S.; Siqueira, S.; Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* Group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, v. 149, n. 1, p. 34-40, 2012.
- Buckmeier, D. L.; Irwin, E. R. An evaluation of soft visual implant tag retention compared with anchor tag retention in channel catfish. *Journal of Fisheries Management*, v. 20, p. 296–298, 2000.
- Caramaschi, U. & Sazima, I. Uma nova espécie de *Crossodactylus* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Lepodactylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 3:43-49, 1985
- 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*, 323(5915), 785-789, 2009.
- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Math Biosci* 205:19-31
- Corander J, Cheng L, Marttinen P, Serén J, Tang J (2013). BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. pp.1–28. Disponível em: <http://www.helsinki.fi/bsg/software/BAPS/macSnow/BAPS6manual.pdf>.

- Carvalho E Silva A. M. T.; Silva G. R.; Carvalho E Silva S. P. Anurans at Rio das Pedras Reserve, Mangaratiba, RJ, Brazil. **Biota Neotrop**, v. 8, p. 199-209, 2008.
- Dixo, M. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biol Conserv**, v. 142, p. 1560-1569, 2009
- Faivovich, J.; Baldo, D. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). **PLoS One**, v. 13, n. 2, 2018.
- Excoffier L., Lischer H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Res** 10:564-567, 2010.
- Faivovich, J.; Haddad, C. F. B.; Garcia, P. C. A.; Frost, D. R.; Campbell, J. A.; Wheeler, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 1–240, 2005.
- Faivovich, J.; Pinheiro, P.D.P.; Lyra, M.L.; Pereyra, M.O.; Baldo, D.; Munoz, A.; Reichle, S.; Brandão, R.A.; Giaretta, A.A.; Thom. M.T.C.; Chaparro, J.C.; Baêta, D.; Widholzer, R.L.; Baldo, J.; Lehr, E.; Wheeler, W.C.; Garcia, P.C.A.; Haddad, C, F, B. Phylogenetic relationships of the Boana pulchella Group (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 155, p. 1-18, 2021.
- Ferro, J. M. et al. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). **PLoS ONE**, v.13, p. 2, 2018.
- Frost, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, U.S.A. 20121. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia> Acesso em: 22 jul. 2021.
- Fukutani, K., Matsui, M., Van Tran, D., & Nishikawa, K. Genetic diversity and demography of *Bufo japonicus* and *B. torrenticola* (Amphibia: Anura: Bufonidae) influenced by the Quaternary climate. *PeerJ*, 10, e13452, 2022.
- FZB: FUNDAÇÃO ZOOBOTANICA DO RS. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em <[https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id\\_modulo=1&id\\_uf=23&ano=2012](https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=1&id_uf=23&ano=2012)>. Acesso em 3 set. 2021, 2014.
- Garcia, P. C. A.; Faivovich J.; C. F. B. Haddad. Redescription of *Hypsiboas semiguttatus*, with the Description of a New Species of the *Hypsiboas pulchellus* Group. *Copeia* 4: 933-951, 2007.
- Haddad C. F. B., Prado C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience** 55:207-217, 2005.



- Hemami, G. F., Malekian M., Fakheran S., Martínez-Freiría. Species versus within-species niches: a multi-modelling approach to assess range size of a spring-dwelling amphibian. *Sci Rep* 11, 597 (2021).
- Hedin, M., Carlson, D., & Coyle, F. Sky island diversification meets the multispecies coalescent–divergence in the spruce-fir moss spider (Microhexura montivaga, Araneae, Mygalomorphae) on the highest peaks of southern Appalachia. *Molecular Ecology*, 24(13), 3467-3484, 2015.
- Heyer, R.W.; Donnelly, M.A.; Hayek, L.C.; Foster, M.S. *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica: métodos estandarizados para anfibios*. Editorial Universitaria de la Patagonia. 2001.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version (2017-2). <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 October 2017, 2017.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, p.1870-1874, 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.
- Lips K. R. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conserv Biol* 12:106-112, 1998.
- Lyra, M. L.; Haddad, C. F. B.; Azeredo-Espin, A. M. L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, v. 17, p. 966–980, 2016.
- Lyra, M. L., Haddad, C. F., & De Azeredo-Espin, A. M. L. (2017). Meeting the challenge of DNA barcoding neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 966-980.
- Osbourn, M. S.; Hocking, D. J.; Conner, C. A.; Peterman, W. E.; Semlitsch, R.D. Use of Fluorescent Visible Implant Alphanumeric Tags to Individually Mark Juvenile Ambystomatid Salamanders. *Herpetological Review*, v. 42, n. 1, 2011.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Satler, J. D., Carstens, B. C., & Hedin, M. Multilocus species delimitation in a complex of morphologically conserved trapdoor spiders (Mygalomorphae, Antrodiaetidae, Aliatypus). *Systematic biology*, 62(6), 805-823, 2013.
- Stuart, B. L.; Inger, R. F.; Voris, H. K. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biol. Lett.* 2, 470– 474, 2006.

Vallan, D. Effects of anthropogenic environmental changes on amphibian diversity in the rainforest of eastern Madagascar. *J Tropical Ecol.* 18:725-742, 2002.

Widholzer, R.L.; Castroviejo-Fisher, S. The tadpole of *Boana stellae* (Anura: Hylidae). *Zootaxa*, 4508, 582–586, 2018.

Wielstra, B., Bozkurt, E.; Olgun, K. The distribution and taxonomy of *Lissotriton* newts in Turkey (Amphibia, Salamandridae). *ZooKeys*, p. 484, v.11, 2015.

Wilson, o. J., Mayle f. E., Walters r. J., Lingner d. V., Vibrans a. C., Floristic change in Brazil's southern Atlantic Forest biodiversity hotspot: From the Last Glacial Maximum to the late 21st Century, *Quaternary Science Reviews*, v. 264, p. 107005, 2021.

## Material Suplementar

**Tabela 1S:** Sítios de amostragem genética de *Boana curupi* no sul do Brasil e nordeste da Argentina. Coordenadas geográficas e número de indivíduos por local. PR=Paraná; SC=Santa Catarina; RS=Rio Grande do Sul; MI=Misiones.

População	Local	Espécie	Coordenadas geográficas
1	Chapecó/SC	<i>B. curupi</i> <i>B. joaquini</i> <i>Boana sp.</i>	27° 6'59.36"S/ 52°41'25.35"O
2	Palma Sola/SC	<i>B. curupi</i> <i>B. stellae</i>	26°20'3.67"S/ 53°18'10.56"O
3	Caxambu do Sul/SC	<i>B. curupi</i>	27°10'7.14"S/52°53'26.98"O
4	Parque Estadual do Turvo Derrubadas/RS	<i>B. curupi</i> <i>B. stellae</i>	27°13'47.59"S/53°55'18.40"O
5	Parque Estadual das Araucárias São Domingos/SC	<i>B. stellae</i>	26°27'29.12"S/52°33'46.76"O
6	São Miguel do Oeste/SC	<i>B. curupi</i>	26°45'30.69"S/53°31'24.75"O
7	Parque Estadual Fritz Plaumann Concórdia/SC	<i>B. stellae</i>	27°17'30.90"S/ 52° 6'17.57"O
8	Parque Estadual Fritz Plaumann Concórdia/SC	<i>B. stellae</i>	27°16'49.17"S/ 52° 6'28.45"O

9	Parque Natural Municipal de Sertão Sertão/RS	<i>B. stellae</i>	28°02'56.2"S/52°12'42.2"O
10	Parque Estadual do Turvo Derrubadas/RS	<i>B. curupi</i>	27°15'7.96"S/53°57'32.91"O
11	Parque Estadual do Turvo Derrubadas/RS	<i>B. curupi</i> <i>B. stellae</i>	27°8'22.85"S/53°52'53.06"O
12	Reserva de Biosfera Yabotí San Pedro/MI	<i>B. stellae</i>	26°54'09"S/54°05'44"O
13	General Manuel Belgrano/MI Estancia	<i>B. curupi</i>	26°26'36"S/53°42'37.3"O
14	General Manuel Belgrano/MI Arroyo Coral	<i>B. curupi</i>	26°11'32.1"S/54°03'53.3"O
15	Concórdia/SC	<i>B. stellae</i>	27°18'22.18"S/ 52° 5'50.06"O
16	Dois Vizinhos/PR	<i>Boana sp.</i> <i>B. stellae</i> <i>B. curupi</i>	25°41'57" S/ 53°05'59" O
17	Parque Estadual do Papagaio Charao/RS	<i>B. stellae</i>	27°54'26.14"S 52°49'33.27"O
*	Sinimbu/RS MT804919	<i>B. stellae</i>	
*	Dois lajeados/RS MT804920	<i>B. stellae</i>	

\* Caiguas, Aristobulo *B. stellae*  
 del Valle, Balnearia  
 Rio Cuna Piru/  
 Misiones- Argentina  
 MT804921  
 MT804923  
 MT804924  
 MT804925  
 MT804926  
 MT804922

---

\* Campos Novos/ SC *B. joaquini*  
 MT804917  
 MT804916

---

\* Urubici/SC *B. joaquini*  
 MT804918

---

\* Cambara do Sul/ RS *B. joaquini*  
 MT823790  
 MT823794

---

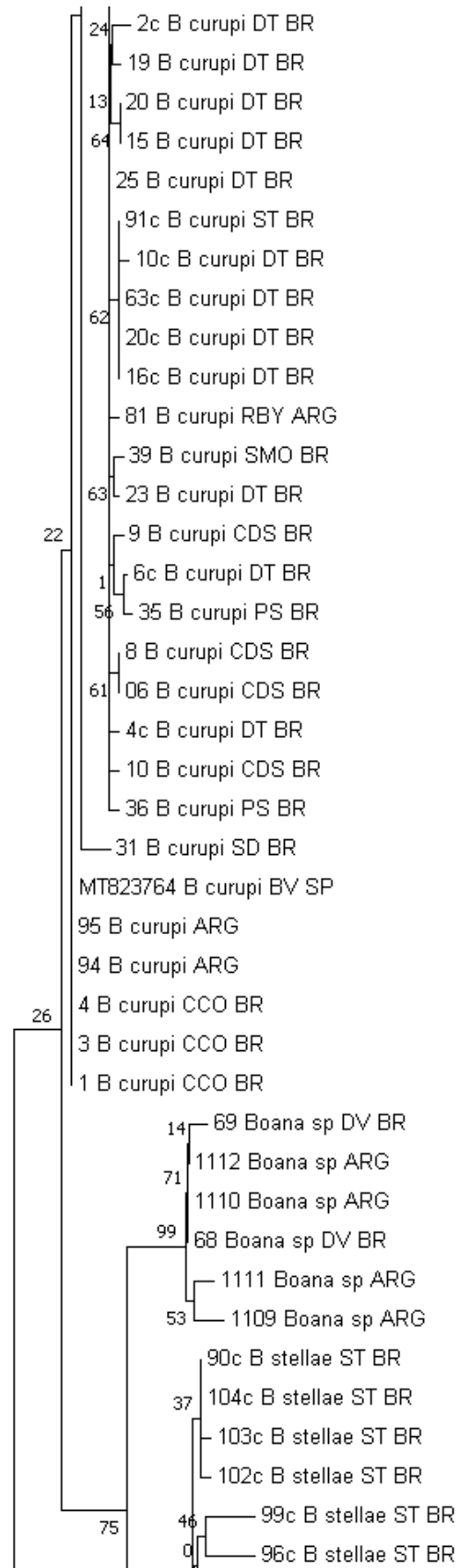
(\*) significa que a amostra não é nossa, foram retiradas de um artigo- sinalizar no mapa

**Tabela 2S.** Distância genética (distância p) par a par, calculada entre os grupos de espécies, *B. curupi*, *B. joaquini*, *B. stellae* e *Boana sp.*

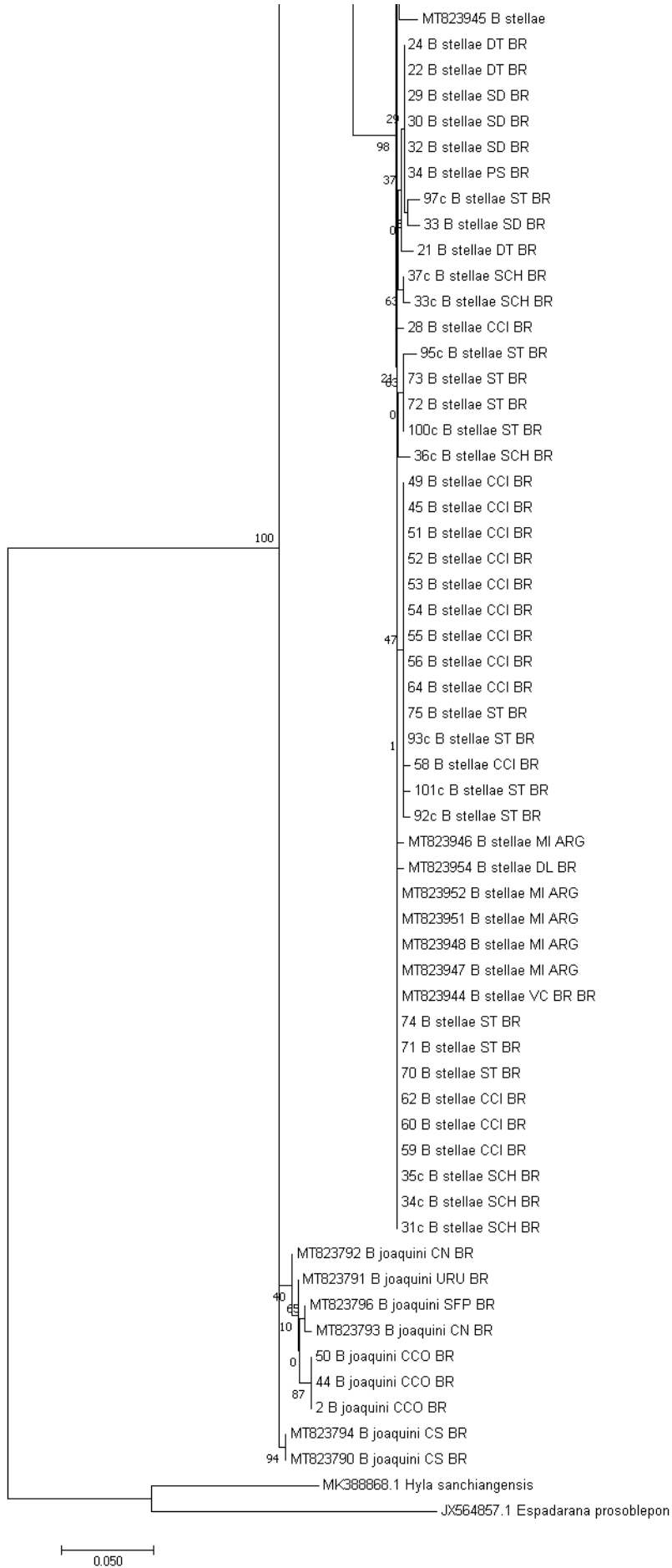
	<i>B.curupi</i>	<i>B. joaquini</i>	<i>B. stellae</i>	<i>Boana sp.</i>
<i>B_curupi</i>				
<i>B_joaquini</i>	0,056			
<i>B_stellae</i>	0,097	0,093		
<i>B_sp</i>	0,087	0,085	0,094	

**Figura 1S:** Filogenia molecular detalhada de Análise Bayesiana para os dados do gene 16s utilizando sequências de *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquina* e *Boana sp.*, coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, Brasil e Misiones, Argentina, extremo Sul da Mata Atlântica. CS\_BR = Cambará do sul/SC, CN\_BR = Campos novos/SC, URU\_BR = Urubici/SC, DL\_BR = Dois Lajeados/RS, SFP = São Francisco de Paula/SC, BV\_SP = Bela Vista/SP, DT\_BR = Parque Estadual do Turvo/RS, ST\_BR = Sertão/RS, ET\_BR = General Belgrano/MI -Estancia, AC\_ARG = General Belgrano/ MI- Arroyo Coral, CDS\_BR = Caxambu do Sul/SC, RBY\_BR = San Pedro/MI- Reserva de Biosfera Yabotí, DV\_BR = Dois Vizinhos/PR, CCI\_BR = Concórdia/SC, PS\_BR = Palma Sola/SC, CCO\_BR – Chapecó/SC, SCH\_BR = Sarandi/RS Parque Estadual do Papagaio Charão, SD\_BR = São Domingos/SC, SIB\_BR = Sinimbu/RS.

12 B curupi DT BR  
 11 B curupi DT BR  
 12c B curupi DT BR  
 13 B curupi DT BR  
 14 B curupi DT BR  
 14c B curupi DT BR  
 15c B curupi DT BR  
 16 B curupi DT BR  
 17 B curupi DT BR  
 17c B curupi DT BR  
 18 B curupi DT BR  
 19c B curupi DT BR  
 1c B curupi DT BR  
 26 B curupi DT BR  
 27 B curupi DT BR  
 37 B curupi SMO BR  
 38 B curupi SMO BR  
 3c B curupi DT BR  
 40 B curupi SMO BR  
 41 B curupi SMO BR  
 42 B curupi SMO BR  
 43 B curupi SMO BR  
 46 B curupi PS BR  
 47 B curupi PS BR  
 48 B curupi PS BR  
 5 B curupi PS BR  
 50c B curupi DT BR  
 51c B curupi DT BR  
 52c B curupi DT BR  
 53c B curupi DT BR  
 54c B curupi DT BR  
 55c B curupi DT BR  
 57c B curupi DT BR  
 58c B curupi DT BR  
 59c B curupi DT BR  
 60c B curupi DT BR  
 62c B curupi DT BR  
 64c B curupi DT BR  
 66c B curupi DT BR  
 68c B curupi DT BR  
 69c B curupi DT BR  
 77 76 B curupi RBY ARG  
 77 B curupi RBY ARG  
 78 B curupi RBY ARG  
 79 Boana curupi RBY ARG  
 80 B curupi RBY ARG  
 82 B curupi RBY ARG  
 83 B curupi AC ARG  
 84 B curupi AC ARG  
 85 B curupi AC ARG  
 86 B curupi AC ARG  
 87 B curupi AC ARG  
 88 B curupi AC ARG  
 89 B curupi ET BR  
 8c B curupi DT BR  
 90 B curupi ET BR  
 92 B curupi ET BR  
 93 B curupi ET BR  
 9c B curupi DT BR  
 AY549359 B curupi MI ARG  
 MT823765 B curupi MI ARG  
 MT823766 B curupi BV SP  
 MT823767 B curupi MI ARG



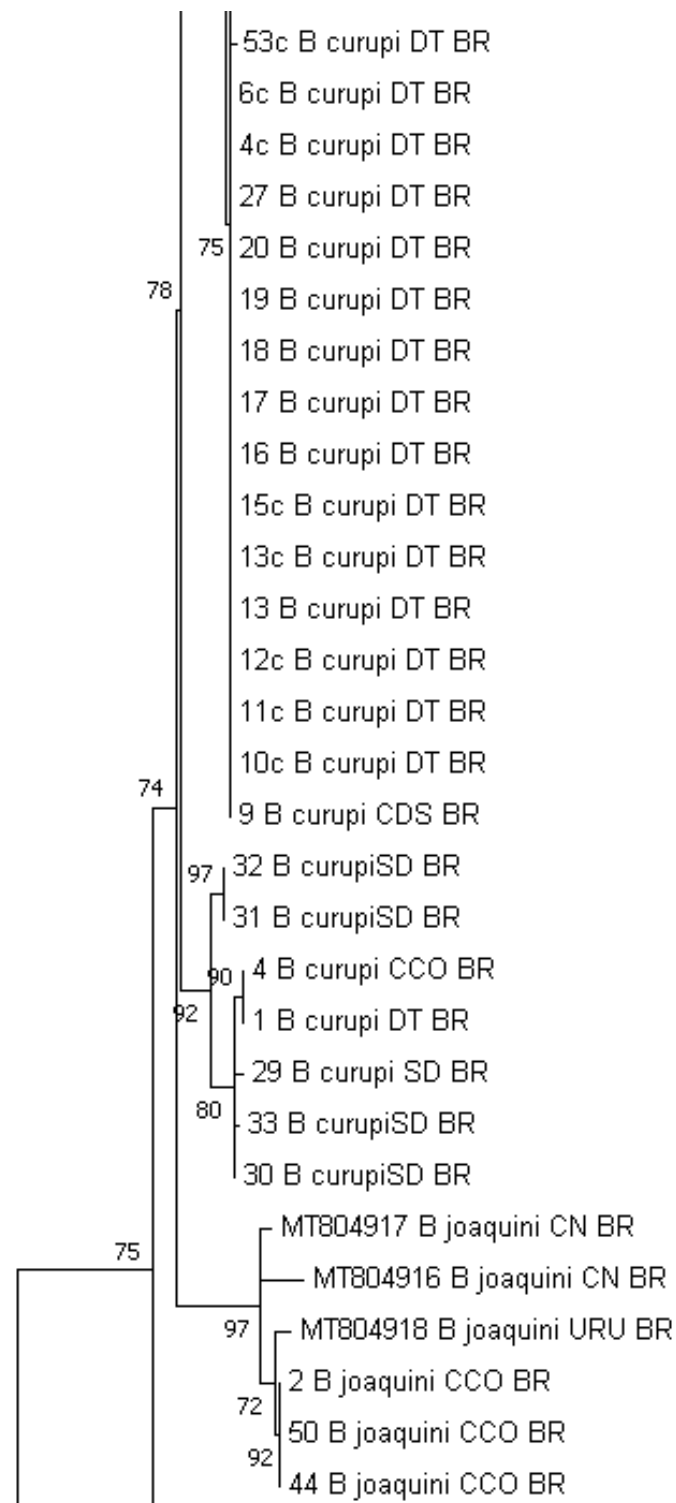


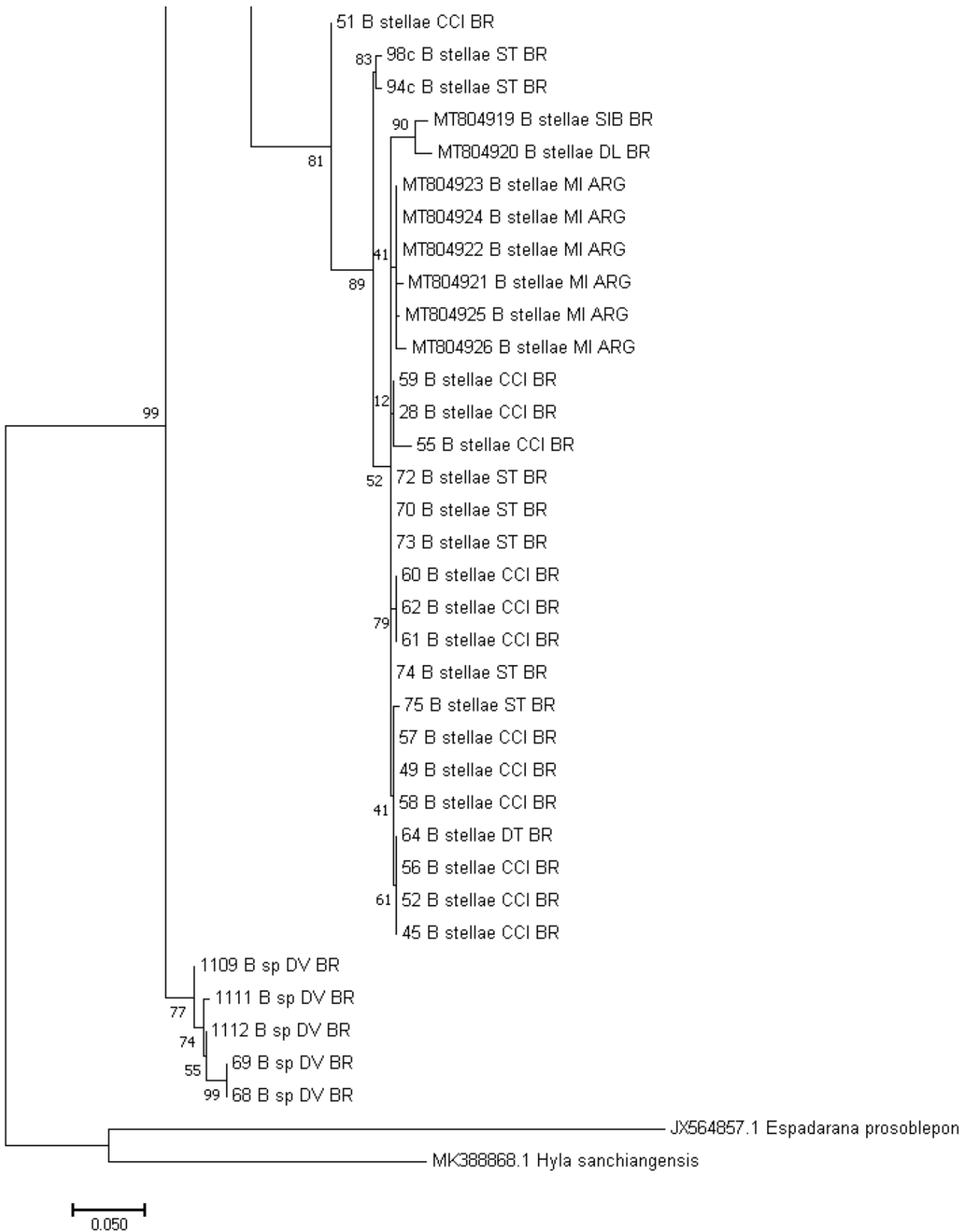


**Figura 2S:** Filogenia molecular detalhada de Análise Bayesiana para os dados do gene COI utilizando sequências de *Boana stellae*, *Boana curupi*, *Boana joaquini* e *Boana sp.*, coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, Brasil e Misiones, Argentina, extremo Sul da Mata Atlântica. CS\_BR = Cambará do sul/SC, CN\_BR = Campos novos/SC, URU\_BR = Urubici/SC, DL\_BR = Dois Lajeados/RS, SFP = São Francisco de Paula/SC, BV\_SP = Bela Vista/SP, DT\_BR = Parque Estadual do Turvo/RS, ST\_BR = Sertão/RS, ET\_BR = General Belgrano/MI -Estancia, AC\_ARG = General Belgrano/ MI- Arroyo Coral, CDS\_BR = Caxambu do Sul/SC, RBY\_BR = San Pedro/MI- Reserva de Biosfera Yabotí, DV\_BR = Dois Vizinhos/PR, CCI\_BR = Concórdia/SC, PS\_BR = Palma Sola/SC, CCO\_BR – Chapecó/SC, SCH\_BR = Sarandi/RS Parque Estadual do Papagaio Charão, SD\_BR = São Domingos/SC, SIB\_BR = Sinimbu/RS, São Miguel do Oeste/SC = SMO\_BR.

14c B curupi DT BR  
 11 B curupi DT BR  
 16c B curupi DT BR  
 17c B curupi DT BR  
 18c B curupi DT BR  
 19c B curupi DT BR  
 1c B curupi DT BR  
 20c B curupi DT BR  
 21 B curupi DT BR  
 21c B curupi DT BR  
 22c B curupi DT BR  
 24 B curupi DT BR  
 25 B curupi DT BR  
 2c B curupi CCO BR  
 38 B curupi SMO BR  
 50c B curupi DT BR  
 10 6 B curupi CDS BR  
 76 B curupi CDS BR  
 77 B curupi CDS BR  
 79 B curupi CDS BR  
 41 B curupi SMO BR  
 MT804915 B curupi MI ARG  
 82 B curupi RBY BR  
 81 B curupi RBY BR  
 80 B curupi RBY BR  
 8 B curupi CDS BR  
 7c B curupi CDS BR  
 10 B curupi CDS BR

	67c B curupi DT BR
	22 B curupi DT BR
	53 B curupi CCI BR
56	3 B curupi CCO BR
	78 B curupi CDS BR
	23 B curupi DT BR
	87 B curupi AC ARG
65	85 B curupi AC ARG
49	88 B curupi AC ARG
28	86 B curupi AC ARG
	MT804914 B curupi MI ARG
	43 B curupi SMO BR
	89 B curupi EM ARG
	MT804913 B curupi MI ARG
	93 B curupi ST BR
	92 B curupi ST BR
	90 B curupi ST BR
	48 B curupi PS BR
	47 B curupi PS BR
35	46 B curupi PS BR
	42 B curupi SMO BR
	40 B curupi SMO BR
	39 B curupi SMO BR
	37 B curupi SMO BR
	36 B curupiPS BR
	35 B curupiPS BR
	34 B curupiPS BR
	15 B curupi DT BR
	12 B curupi DT BR
	5 B curupi PS BR
	55c B curupi DT BR
98	26 B curupi DT BR
	57c B curupi DT BR
	14 B curupi DT BR
65	62c B curupi DT BR
	63c B curupi DT BR
	66c B curupi DT BR
	8c B curupi DT BR
	9c B curupi DT BR
	53c B curupi DT BR
	6c B curupi DT BR
	4c B curupi DT BR
	27 B curupi DT BR
75	20 B curupi DT BR
78	19 B curupi DT BR
	18 B curupi DT BR
	17 B curupi DT BR
	16 B curupi DT BR
	15c B curupi DT BR
	13c B curupi DT BR
	13 B curupi DT BR
	12c B curupi DT BR
	11c B curupi DT BR
	10c B curupi DT BR
74	9 B curupi CDS BR





**TEXTO INTEGRADOR**

### 3. DISCUSSÃO

As florestas tropicais em todo o mundo estão sendo devastadas pela fragmentação e desmatamento e a área florestal remanescente, que anteriormente era contínua, atualmente está distribuída em forma de fragmentos de diferentes tamanhos na paisagem. No entanto, alguns fragmentos menores, preservam no seu interior espécies importantes para diversidade e para o cenário crítico atual (ARROYO-RODRÍGUEZ et al., 2022). Por isso, se torna importante avaliar esses fragmentos, verificando a diversidade e a situação atual das espécies que ali habitam para serem incluídos em planos de conservação.

Neste sentido, observamos com o primeiro capítulo deste trabalho, que todos os fragmentos florestais remanescentes são importantes, independente do seu tamanho. Três das quatro áreas avaliadas, apresentaram alterações na sua cobertura florestal entre os anos analisados. Um estudo recente que avaliou o efeito do tamanho da mancha na densidade de espécies de plantas, escaravelhos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos em uma floresta tropical fragmentada, tanto em espécies generalistas quanto especialistas de habitat, e avaliaram a hipótese de se a densidade de espécies é menor em manchas de floresta do que em áreas de floresta contínua. Descobriram então que o tamanho do fragmento não é um fator determinante na densidade de espécies e que na maioria dos grupos do estudo a densidade das espécies não diferiu entre a floresta contínua e os fragmentos de floresta. Isto aumenta a evidencia de que pequenos fragmentos são ilhas de biodiversidade importantes para manutenção e conservação das espécies florestais especialistas de habitat e generalistas, sugerindo a importância de incluir as pequenas manchas de florestas tropicais nos planos de manejo e de conservação das áreas, bem como em Unidades de Conservação, a fim de auxiliar a manter a diversidade em todas as áreas que restam (ARRROYO-RODRÍGUEZ et al., 2022).

Alguns estudos tem demonstrado que o efeito de borda que estes fragmentos/manchas menores são submetidos pode diminuir a diversidade de espécies florestais específicas de habitat, podendo ser ocupados principalmente por algumas espécies adaptadas e que resistem as alterações do ambiente (COX et al., 2017; AMARAL et al., 2019). No entanto, observamos que mesmo os fragmentos de tamanhos florestais menores (Área 2, 3 e 4) demonstraram diversidade genética considerável. Estudos apontam que mesmo fragmentos menores, como ilhas, fornecem serviços ecossistêmicos, contribuindo para diversidade e auxiliando positivamente na manutenção de diversidade genética, mesmo com pequenas taxas de migração, como no caso do grupo dos anfíbios (WANG et al., 2018; COX et al., 2017;

AMARAL et al., 2019). Portanto, todos os fragmentos se tornam importantes para manutenção tanto da diversidade de espécies, quanto da diversidade genética, fluxo gênico e consequentemente para sobrevivência dessas espécies nesses fragmentos.

Além disso, observamos indícios que o fluxo gênico em algumas áreas possa estar ocorrendo pelo meio hídrico, pois ao verificar o mapa hídrico, foi possível observar que alguns fragmentos estão conectados pelos afluentes existentes nas áreas, demonstrando a importância da conservação de nascentes e córregos para essas espécies. Considerando que os anfíbios em geral possuem baixa capacidade de locomoção, o meio hídrico se torna um importante conector entre os fragmentos restantes (BECKER 2007; BECKER et al., 2010; TOLEDO et al., 2021). Mas, ainda há poucos estudos que abordam a importância da conectividade de zonas ripárias para anfíbios. Também observamos que áreas que sofrem com isolamento geográfico, ou mais distantes do fragmento maior e dispersor de variabilidade, podem possuir maior número de haplótipos exclusivos, podendo indicar isolamento populacional, o que em geral, é um fator negativo para os indivíduos e que pode significar um futuro desaparecimento dessas populações devido ao isolamento e baixas taxas de troca genética (MAGESKI et al., 2015; COX et al., 2017; AMARAL et al., 2019).

As áreas protegidas (APs) são a ferramenta de conservação mais importante neste atual cenário de desmatamento constante, mas avaliar o papel e a eficácia destas áreas é desafiador, porém de suma importância para que essas áreas protegidas sejam cada vez mais valorizadas e mantidas (Rodrigues et al., 2020). As APs continuam a ser a política internacional central de conservação, inclusive no âmbito do Plano Estratégico da CDB 2011–2020 para a Biodiversidade e da Estrutura Global de Biodiversidade; ou seja, as UC's (Unidades de Conservação) continuam sendo o plano principal para conservação. Portanto, trabalhos que avaliem o potencial dessas áreas são essenciais para conservação (IUCN, 2010; SCBD, 2004). Encontradas em todos os países, as áreas protegidas ocupam em torno de 15% da superfície terrestre global (UNEP-WCMC, 2020; RODRIGUES et al., 2020). No presente estudo, a maior área amostrada, em termos de tamanho florestal, foi a área 1 (A1), que é uma importante Unidade de Conservação inserida na região noroeste do Rio Grande do Sul/Brasil (Figura 1). Observamos que ela está agindo como um centro de dispersão da variabilidade genética para as demais manchas menores no seu entorno, realizando um papel importante como dispersor da variabilidade genética e compartilhamento entre as demais áreas.

Estudos que abordem dados genéticos, com características da área e genotoxicidade, são escassos (VALENCIA et al., 2011; LAJMANOVICH et al., 2014). Por este motivo, neste primeiro capítulo, unimos dados genéticos com tamanho de área florestal de fragmentos inseridos em uma mesma matriz da paisagem, porém áreas em diferentes contextos, com



diferentes impactos no seu entorno. Por isso, além das análises moleculares, se tornou importante avaliar a genotoxicidade que as populações poderiam estar sendo expostas nestes fragmentos. O grupo dos anfíbios além de estarem sofrendo com as consequências da fragmentação, também tem sido afetado pelos danos genômicos registrados em estudos (GOMES et al., 2016). Em geral, os estudos que avaliam danos genotóxicos utilizam amostras de sangue e/ou algum fator estressor (SHUCH et al., 2015; LONDERO et al., 2017; HEREK et al., 2021). Já no nosso estudo, utilizamos amostras da mucosa bucal coletadas com swab, que é um método menos invasivo e mantém o animal em plenas condições de sobrevivência. Métodos não invasivos, como swabs urinários, cutâneos e bucais, e métodos de monitoramento de hormônios transmitidos pela água (adequados para espécies terrestres e aquáticas) são válidos e trazem benefícios tanto para pesquisadores como para os organismos estudados (NARAYAN et al., 2019). Mesmo avaliando o animal no seu habitat natural, observamos uma quantidade considerável de alterações celulares, principalmente em áreas menores e com maior pressão antrópica no seu entorno, como é o caso do fragmento que está inserido em ambiente urbano e que os indivíduos apresentaram maior número de danos celulares.

Destacamos a importância das grandes áreas florestais como centro de dispersão da variabilidade genética para as demais áreas e também salientamos a importância dos fragmentos florestais, independente do seu tamanho efetivo, principalmente os que apresentam registro de espécies ameaçadas e disponibilidade hídrica, que é um fator importante para reprodução e sobrevivência dos anfíbios, assim como para os demais grupos (BECKER et al., 2010).

Muitos anfíbios dependem do meio aquático para reprodução, como o gênero *Boana*, reconhecidas como pererecas arborícolas, que depositam seus ovos na água, e seus girinos habitam desde córregos com maior quantidade de água até pequenos acúmulos de águas em plantas e banhados. Este gênero distribui-se da América Central até as regiões subtropicais da América do Sul e tem representantes em diferentes biomas (FROST, 2016; FROST, 2020). No capítulo II desta tese, reavaliamos a distribuição de espécies do gênero *Boana*, como *B. stellae*, *B. joaquina*, *B. curupi* e uma espécie em potencial ainda não identificada (*Boana sp.*).

Espécies estreitamente próximas têm sido descritas nos últimos anos e, atualmente, nos deparamos com um cenário complexo para elucidar cinco espécies relativamente bem caracterizadas em termos de morfologia externa em suas respectivas localidades (*B. curupi*, *B. caipora*, *B. joaquina*, *B. semiguttatus* e *B. stellae*), porém para os quais a variação geográfica é mal compreendida e com sobreposições. A grande diversidade genética aliada aos problemas na delimitação das espécies demonstra que ainda estamos longe de compreender a diversidade e riqueza dessas espécies (FAIVOVICH et al., 2021). Há estudos que já demonstram as

semelhanças nessas espécies a um nível cromossômico, quando ao analisar a morfologia cromossômica dentro do grupo *B. pulchella*, observou-se que *B. curupi*, *B. joaquinii*, *B. semiguttata* e *B. stellae* compartilham uma Região Organizadora Nucleolar (NOR) no telômero de par de cromossomos 1 (FERRO et al., 2018; FAIVOVICH et al., 2021).

Faivovich et al., (2004) e Faivovich et al., (2005) apresentaram o primeiro estudo filogenético com o grupo *B. pulchella*. De acordo com Faivovich et al., (2021), que realizaram uma importante revisão das relações filogenéticas atualizada do grupo *Boana pulchella*, as espécies *B. curupi*, *B. stellae* e *B. joaquinii* estão no mesmo clado, corroborando com os dados apresentados nas análises filogenéticas do capítulo II. Além disso, apresentaram *B. curupi*, *B. joaquinii* e *B. stellae* no mesmo clado e destacaram a sua similaridade morfológica também, adicionando pela primeira vez a *B. stellae* ao clado de *B. curupi* devido as suas similaridades já relatadas em estudos anteriores (KWET, 2008), e duas espécies ainda não identificadas do Estado de Santa Catarina. Portanto, *B. stellae* é o táxon irmão de *B. joaquinii* + *B. curupi*.

Faivovich et al., (2021) também encontraram algumas espécies que a identificação ainda não foi possível de ser feita (*Boana sp. 1*, *Boana sp. 2*, *Boana sp. 3* e *Boana sp. 4*), como nas análises deste estudo (*Boana sp.*), demonstrando a lacuna que existe de identificação dessas espécies e a necessidade de mais estudos com este grupo. Ainda de acordo com Faivovich et al., (2021), a filogenia molecular e as análises genéticas apresentaram altos valores de suporte nos cladogramas, assim como em vários estudos de filogenéticos realizados anteriormente (DUELLMAN et al., 2016; JETZ; PYRON, 2018; PINHEIRO et al., 2019; FAIVOVICH et al., 2021), corroborando com os dados das árvores filogenéticas deste estudo.

Lyra et al., (2020) também observou que várias espécies do grupo *B. pulchella* estavam sem dados disponíveis para estudos filogenéticos e destacou a necessidade de testes adicionais da monofilia do grupo, assim como discutiu sobre algumas sinapomorfias fenotípicas, como muitos exemplares do grupo *B. pulchella*, estão com poucos representantes disponíveis. Portanto, na região Sul do Brasil e Misiones na Argentina, a presente pesquisa é o primeiro estudo realizado especificamente com as espécies *B. curupi*, *B. joaquinii* e *B. stellae*.

É de suma importância para conservação das espécies que elas sejam corretamente registradas nos seus pontos de distribuição e que seja feita a identificação correta dos indivíduos desta população, o que amplia o conhecimento quanto à diversidade de espécies de anfíbios, podendo contribuir ou não para existência de uma nova espécie. A descrição de uma espécie também pode ocorrer a partir de evidências e início de uma nova hipótese. Com isso, para melhor avaliar a espécie aqui ainda não identificada, seriam importantes estudos de taxonomia

integrativa, utilizando dados morfológicos, filogenéticos, análise de DNA, questões reprodutivas e comportamentais para então delimitar a espécie (PADIAL; RIVA, 2010).

Garcia et al., (2007) expressaram dúvidas sobre o status taxonômico de populações de *B. joaquina*, que apresenta variação fenotípica significativa e uma quantidade considerável de diversidade genética. Estes dados indicam que a ampla distribuição e complexidade deste grupo de espécies ainda está longe de ser elucidado (FAIVOVICH et al., 2021). Portanto, se torna necessário, para complementar os resultados, maior amplitude amostral com uma maior abrangência de áreas, aliando a estudos genéticos, possivelmente biogeográficos.

De maneira geral, ao avaliarmos os resultados das populações de *C. schimidt* e *V. uranoscopa*, que possuem as mesmas exigências de habitat e as quais aplicamos a mesma metodologia, observamos que ambas apresentaram índices de danos genômicos acima do esperado. No entanto, não é possível afirmar se o tamanho dos fragmentos que interfere na quantidade de danos, ou se o contexto da paisagem no qual o fragmento e/ou a população estão inseridos que pode estar interferindo nos números de danos celulares observados. No entanto, observamos alguns dados importantes, como nas populações de *C. schimidt* da menor área e que está inserida em ambiente urbano, e demonstrou altos números de danos, bem como em *V. uranoscopa*, que nos fragmentos de menor tamanho apresentaram maior número de danos e no fragmento maior apresentaram menos danos (A1).

Todos os fragmentos, independentemente do tamanho, mas com as condições adequadas de habitat, podem ser importantes para suportar as populações de anfíbios, mesmo as específicas de habitat. O tamanho não é um fator determinante para a presença das espécies, mas sim os recursos os quais estes fragmentos apresentam. Observamos a presença das espécies *V. uranoscopa* (474,8 ha) e *C. schimidt* (4,6 ha). Por isso, destacamos a importância da conservação de todos os fragmentos possíveis, já que todas as áreas apresentaram alterações no tamanho entre os anos 1985 e 2019, em ambas as espécies de anfíbios de riacho específicos de ambientes florestais.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos a importância de fragmentos remanescentes da Mata Atlântica, independentemente do tamanho de área, e principalmente com a presença de cursos hídricos, para perpetuação das populações de anfíbios e, conseqüentemente, para a manutenção da diversidade genética, fluxo gênico e saúde das populações de anfíbios de riacho e especialistas de habitats florestais.

Destacamos, como prioridade de conservação e atenção, as áreas com menor extensão, que não são protegidas legalmente e que conseqüentemente, possuem maior risco de ampliação da perda de habitat.

Além disso, enfatizamos a importância das Unidades de Conservação, pois mantêm fragmentos de tamanhos maiores e realizam papel fundamental na dispersão da diversidade genética para os demais fragmentos da paisagem do seu entorno, auxiliando na preservação com sucesso as demais populações existentes.

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta pesquisa demonstrou a importância da conservação de fragmentos de Mata Atlântica, independente do seu tamanho de área total, para a manutenção de espécies de anfíbios de riacho ameaçadas, como *Crossodactylus schimidti*, *Boana curupi*, *Boana stellae*, *Boana joaquina*, *Vitreorana uranoscopa*, e inclusive espécies em potencial que ainda não foram devidamente registradas, como a *Boana sp.* A conservação desses fragmentos na paisagem, é importante principalmente para manutenção da diversidade genética dessas populações de anuros, fluxo gênico e para biodiversidade dessas áreas. Pretendemos divulgar em redes sociais os dados após publicação, em linguagem acessível, demonstrando os principais resultados. Seguiremos trabalhando nos dados ainda não analisados, com a finalização do artigo II, realizando amplificação do DNA e sequenciamento dos genes de interesse, para então realização das análises dos dados moleculares e de diversidade genética, bem como finalizar as análises estatísticas em relação as alterações celulares observadas, e então finalização do artigo da *Vitreorana uranoscopa*. Em relação ao artigo III, pretendemos finalizá-lo também, aprimorando a escrita, e se possível acrescentar uma análise de modelagem de nicho para as espécies registradas, pois acreditamos que este artigo terá importante impacto na avaliação do status de conservação das espécies *Boana curupi*, *Boana stellae* e *Boana joaquina*. Pretendemos também, finalizar o artigo III, realizando os sequenciamentos dos genes de interesse e análises de diversidade genética,

## REFERÊNCIAS

AMARAL, C. R. L. et al. Amphibians on the hotspot: Molecular biology and conservation in the South American Atlantic Rainforest. **PLoS ONE**, v.14, p.10, 2019.

ANDRÉN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportion of suitable habitat: a review. **Oikos**, v. 3, p. 355-366, 1994.

ANTUNES, A. P.; FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. A new species of *Hypsiboas* from the Atlantic forest of Southeastern Brazil (Amphibia: Anura: Hylidae). **Copeia**, v.1, p.179–190, 2008.

ARROYO-RODRÍGUEZ, V. et al. The Importance of Small Rainforest Patches for Biodiversity Conservation: A Multi-taxonomic Assessment. **Biodiversity Islands: Strategies for Conservation in Human-Dominated Environments**, v. p. 41-60, 2022.

ALMEIDA-GOMES, M. et al. Underestimation of extinction threat to stream-dwelling amphibians due to lack of consideration of narrow area of occupancy. **Conservation Biology**, v. 28, p. 616-619, 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA Nº 001**, de 23 de janeiro de 1986. "Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental".

BECKER, C. G. et al. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775-1777, 2007.

BECKER, C. G. et al. Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. **Conservation Biology**, v. 24, p. 287-294, 2010.

BEEBEE, T. J.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biological conservation*, v. 125(3), p. 271-285, 2005.

BRASSALOTI, R. A., ROSSA-FERES, D. D. C.; BERTOLUCI, J. Anurofauna da floresta estacional semidecidual da Estação Ecológica dos Caetetus, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 275-291, 2010.

CARAMASCHI, U.; SAZIMA, I. Uma nova espécie de *Crossodactylus* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 3, p. 43-49, 1985.

CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *The American Journal of Human Genetics*, v. 68(1), p. 281-286, 2001.

CALDART, V. M. et al. Extension of the geographical distribution of two anuran species for Rio Grande do Sul State, Brazil, with comments on natural history. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 143-147, 2010.

CASTROVIEJO-FISHER, S., M. J. R., et al. Phylogenetic systematics of egg-brooding frogs (Anura: Hemiphractidae) and the evolution of direct development. *Zootaxa*, v. 4004(1), p. 1-75, 2015.

COX, K. et al. Effect of the landscape matrix on gene flow in a coastal amphibian metapopulation. **Conservation Genetics**, v.18, p. 1359-1375, 2017.

CUSHMAN, S. A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological conservation*, 128(2), 231-240, 2006.

DEICHMANN, J. L. et al. How many species and under what names? Using DNA barcoding and GenBank data for west Central African amphibian conservation. **PLoS ONE**, v. 12, p. 2913-1846, 2017.

DECENA, S. C. P. et al. Impact of habitat alteration on amphibian diversity and species composition in a lowland tropical rainforest in Northeastern Leyte, Philippines. *Scientific reports*, v. 10(1), p. 1-15, 2020.

DINIZ, M. F. et al. Balancing multi-species connectivity and socio-economic factors to connect protected areas in the Paraguayan Atlantic Forest. **Landscape and Urban Planning**, v. 222, p. 0169-2046, 2022.

DIXO, M. et al. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, v. 142(8), p. 1560-1569, 2009.

DOBSON, D. et al. Habitat loss, trophic collapse, and the decline of ecosystem services. *Ecology*, v. 87, p. 1915–1924, 2006.

DUELLMAN, W. E.; DE LA RIVA I.; WILD E. R. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses 896 of phylogenetic relationships of Andean groups of Hyla. **Scientific Papers**, v. 3, p. 1-41, 1997.

DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, v. 4104, p. 1–109, 2016.

DUMÉRIL, A. M. C.; BIBRON, G. *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles. Comprenant l’Histoire Générale des Batraciens, et la description des cinquante-deux genres et des cent soixante-trois espèces des deux premiers sous-ordres: Les péromèles qui n’ont pas de membres, et les anoures qui sont privés de la queue.* Paris, Librairie Encyclo-pédique de Roret. v. 8, 792p, 1841.

EMEL, S. L.; STORFER, A. A decade of amphibian population genetic studies: synthesis and recommendations. *Conservation Genetics*, v. 13(6), p. 1685-1689, 2012.

FAIVOVICH, J. et al. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Molecular Phylogenetics Evolution**, v.32, p. 938–950, 2004.

FAIVOVICH, J et al. Systematic review of the frog Family Hylidae, with special reference 918 to Hylineae: phylogenetic and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum** 919 of Natural History, v. 01, p. 240, 2005.

FAIVOVICH, J. et al. Phylogenetic relationships of the Boana pulchella group (Anura: Hylidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 155, p. 106981, 2021.

FAIVOVICH, J. et al. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin American Museum of National History**, v. 294, p. 1–240, 2005.

Ferro, J. M. et al. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylineae). **PLoS ONE**, v.13, p. 2, 2018.

FROST, D. R. American Museum of Natural History, New York, USA. 929 **Amphibian Species of the World**: an Online Reference. Version 6.0. Electronic 930 Database. Available v: 931, 2015.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (20 July, 2022). American Museum of Natural History, New York, USA, 2021.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.1. Accessible at. American Museum of Natural History, New York, USA. Gallardo, J. M., 1958. Observaciones sobre el comportamiento de algunos anfibios argentinos. *Cienc. Invest.* 14, p. 291–302, 2020.

FZB, Fundação Zoobotânica, 2014. *Avaliação do Estado de Conservação de Espécies Fauna*. Available from URL: [https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id\\_modulo=1andid\\_uf=23andano=2012](https://secweb.procergs.com.br/livlof/?id_modulo=1andid_uf=23andano=2012). Accessed 06 January 2018.

GARCIA, P. C. A. et al.; Redescription of *Hypsiboas semiguttatus*, with the description of a new species of the *Hypsiboas pulchellus* group. **Copeia**, v. 4, p. 933-951, 2007.

GIOVANELLI, J. G. et al. Modeling a spatially restricted distribution in the Neotropics: How the size of calibration area affects the performance of five presence-only methods. *Ecological Modelling*, v. 221(2), p. 215-224, 2010.

GOMES, M. A., M. V., et al. Patch size matters for amphibians in tropical fragmented landscapes. *Biological Conservation*, v. 195, p. 89–96, 2016.

HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; POMBAL JR., J. P. Redescricao de *Hylodes perplicatus* (Miranda-Ribeiro, 1926) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, v. 61, p. 245-254, 2003.



HARPER, M. J., MCCARTHY, M. A.; VAN DER REE, R. The use of nest boxes in urban natural vegetation remnants by vertebrate fauna. *Wildlife Research*, v. 32(6), p. 509-516, 2005.

HAYES, F., MILLS, G., JONES, L., & ASHMORE, M. Does a simulated upland grassland community respond to increasing background, peak or accumulated exposure of ozone?. *Atmospheric Environment*, 44(34), 4155-4164, 2010.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences**, v. 270, p. 313–321, 2003.

HEREK, J. S. et al. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021.

HEYER, W. R. Taxonomic and natural history notes on frogs of the genus *Centrolenella* (Amphibia: Centrolenidae) from Southeastern Brazil and adjacent Argentina. *Pape'is Avulsos de Zoologia*, v. 36, p. 1–21, 1985.

ICMBIO. Estado de conservação. Anfíbios. *Crossodactylus-schmidti*. **Fauna Brasileira**. Acesso: 18/03/2022. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/8124-anfibioscrossodactylus-schmidti>

IOP, L. et al. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials*, v. 30(25), p. 4104-4116, 2009.

IUCN. 50 Years of Working for Protected Areas: A brief history of IUCN World Commission on Protected Areas. **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources**, 2010.

JETZ, W.; PYRON, R. A. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. **Natural Ecology Evolution**. v. 2, p. 850–858, 2018.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. D. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série técnica IPEF* 12:65-70, 1998.

KWET, A. New species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae) in the *pulchellus* group from southern Brazil. **Salamandra**, v. 44, p. 1–14, 2008.

KÖHLER, J. Amphibian diversity in Bolivia: a study with special reference to 988 montane forest regions. **Bonner Zoologische Monographien**, v. 48, p. 1–243, 2000.

LUTZ, A. Batraciens du Brésil. *Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales*, v. 93, p. 211–214, 1925.

LAJMANOVICH, R. et al. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide Endosulfan. **Mutation Research**, v. 587, p. 67-72, 2014.

LIPS, K. R. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology*, 12(1), 106-117, 1998.

LUCAS E. M.; GARCIA P. C. A. Amphibia, Anura, Hylidae Rafinesque, 1815 and Hylodidae Günther, 1858: Distribution extension and new records for Santa Catarina, southern Brazil. **Check List- Journal of species lists and distribution**, v. 7, p.1, 2011.

LONDERO, J. E. L.; DOS SANTOS, M. B.; SCHUCH, A. P. Impact of solar UV radiation on amphibians: focus on genotoxic stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 14-21, 2019.

LYRA, M. L. Et al. High-throughput DNA sequencing of museum specimens sheds light on the long-missing species of the Bokermannohyla claresignata group (Anura: Hylidae: Cophomantini). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 4, p. 1235-1255, 2020.

LYRA, M. L.; HADDAD, C. F.; DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources** Volume, v. 17, p. 966-980, 2016.

MACGREGOR, H. C. The nucleolus and its genes in amphibian oogenesis. *Biological Reviews*, v. 47(2), p. 177-210, 1972.

MAGESKI, M. et al. The island rule in the Brazilian frog *Phyllodytes luteolus* (Anura: Hylidae): Incipient gigantism?. **Zoology**, v.32, p. 5, 2015.

MITTERMEIER R. A. et al. *Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. **University of Chicago Press**, 2005.

MOUCHET, F. et al. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. *Environmental toxicology*, v. 26(2), p. 136-145, 2011.

MULTINI L. C. et al. The influence of anthropogenic habitat fragmentation on the genetic structure and diversity of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Nature research**. v. 10, p. 18018, 2020.

NARAYAN, E. J. et al. Non-invasive methods for measuring and monitoring stress physiology in imperiled amphibians. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, p. 966-980, 2019.

NASCIMENTO J. L.; CAMPOS I. B. Atlas da fauna brasileira ameaçada de extinção em unidades de conservação federais. Brasília. **ICMBIO**, 2011.

NASCIMENTO, L. B.; FEIO, R. N.; CRUZ, C. A. G. A new species of diurnal frog in the genus *Crossodactylus* Duméril & Bibron, 1841 (Anura, Leptodactylidae) from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p. 497-505, 2005.

Padial, J. M.; De La Riva, I. A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 101, p.747-756, 2010.

PIMENTA, B. V. S.; WACHLEVSKY, M.; CRUZ, C. A. G. Mor-phological and acoustical variation, geographic distribution, and conservation status of the spinythumb frog *Crossodactylus bokermanni* Caramaschi & Sazima, 1985 (Anura, Hylodidae). **Journal of Herpetology**, v.42, p. 481-492, 2008.

PINHEIRO, P. D. P.; CARRIZO, G. R.; FAIVOVICH, J. The identity of the poorly known treefrog *Hyla varelae* Carrizo, 1992 (Anura: Hylidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 283, p. 186–191, 2019.

Riemann, J. C., et al. The value of forest fragments for maintaining amphibian diversity in Madagascar. *Biological Conservation*, v. 191, p. 707-715, 2015.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implication for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1144–1156, 2009.

ROCHA, C. F. D. et al. Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the central of Mata Atlântica in eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, p. 159–168, 2005.

RODRIGUES, A. S.; CAZALIS, V. The multifaceted challenge of evaluating protected area effectiveness. **Nature Communications**, v.1, p. 1-4, 2020.

SCBD. The CBD Programme of Work on Protected Areas. <http://www.cbd.int/protected/> (2004).

SCHUCH, A. P. et al. Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.118, p. 190–198. 2015.

SEGELBACHER, G. et al. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation genetics*, v. 11(2), p. 375-385, 2010.

STOKES, D. L. et al. Saving all the pieces: An inadequate conservation strategy for an endangered amphibian in an urbanizing área. **Biological Conservation**, v. 262, p.109-320, 2021.

TOLEDO, L. F. et al. Anfíbios da Mata Atlântica. Aplicativo de celular. **Econature, Consultoria, Pesquisa e Educação Ambiental**, versão 1.0.0, 2021.

UDROIU, I.; SGURA, A. Cytogenetic tests for animal production: state of the art and perspectives. *Animal genetics*, v. 48(5), p. 505-515, 2017.

UNEP-WCMC, IUCN & NGS. Protected Planet Live Report 2020. Disponível em: <https://livereport.protectedplanet.net/> (2020).

VALENCIA L, C. et al. Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). **Genetics e Molecular Biology**, v. 34, p. 681-688, 2011.

VENCES, M. et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers Zoology**, v.2, p. 5, 2005.

WATSON, J. E. et al. The performance and potential of protected areas. *Nature*, v. **515**, p. 67, 2014.

WILSON, A. C., MAXSON, L. R., SARICH, V. M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 2843–2847, 1974.

WILSON, E. O. Half-earth: our planet's fight for life. WW Norton & Company, New York, 2016.

WIDHOLZER, R. L.; CASTROVIEJO-FISHER, S. The tadpole of *Boana stellae* (Anura: Hylidae). **Zootaxa**, v.4, p. 582-586, 2018.

WANG, Y. et al. The small-isle effect in amphibian assemblages on subtropical le-bridge isles of an inundated lake. **Current Zoology**, v. 64, p. 303-309, 2018.

ZANGL, L. et al. A reference DNA barcode library for Austrian amphibians and reptiles. 2020. **PLoS ONE**, v. 15, p.3, 2020.

ANEXO I- Produção desenvolvida durante o doutorado.

## Predation event and uncommon climbing behaviour of *Pseudoboa haasi* (Boettger, 1905) of South Brazil's Atlantic Rainforest

Aline Candaten<sup>1,\*</sup>, Manoela Alberton Getelina<sup>2</sup>, Gevertton Andre Nazario Marion<sup>1</sup>, and Marcelo Carvalho da Rocha<sup>2</sup>

*Pseudoboa haasi* (Boettger, 1905), also known as Paraná False Boa is a dipsadid snake that belongs to the Pseudoboini tribe whose distribution range comprises the southern states of Brazil and the northeast of Argentina (Giraudó, 1999; Morato, 2005; Costa and Bémils, 2018; Pavan et al., 2018). It can be found both in Araucaria and Atlantic forests (Morato, 1995; Marques et al., 2001; Di-Bernardo et al., 2003; Pavan et al., 2018) and according to Decree 51.797 (2014) and the IUCN Red List (Martins et al. 2010) the species is classified as Least Concern. The morphological characteristics that permitted the correct identification of the species were the presence of seven scales at the upper lip region, one scale divided at the cloacal region (Giraudó, 1992), the brownish colour pattern at the dorsum and the reddish stripes at the sides of the body (Zaher et al., 2008). The sex of the snake was determined by cloaca and tail analysis (Fitch, 1960). Individuals of this species are usually found foraging upon the ground at daytime (Morato et al., 2003; Gaiarsa et al., 2013) feeding on small mammals, but can also be found eating other snakes and lizards (Alencar, 2013).

*Atractus paraguayensis* Werner, 1924 is a fossorial snake that also belongs to the dipsadid family (Passos and Fernandes, 2008; Zanella and D'Agostini, 2018) and is distributed across the southern Brazilian states, northern Argentina and Paraguay (Passos et al., 2010).

For the correct identification of this specimen, we checked for the presence of dorsal flat scales, two post-ocular scales, seven upper and lower lip scales and the brownish colour with black spots at dorsal view (Passos et al., 2010). The sex of the individual was determined by dissection of the caudal portion. (Fitch, 1960).

Our observation took place on the night of January the 25<sup>th</sup> of 2019 at 21:00 h in Turvo State Park (27.1418.540 S and 53.5552.380 W; datum WGS 1984), in the Derrubadas municipality of Brazil. We first spotted a female of *Pseudoboa haasi* (body length 630 mm; tail length 160 mm), positioned on vegetation at 182cm from the ground at the bank of a small creek (Figure 1A). Hiding after feeding is a common behaviour in most snakes and climbing is useful to avoid ground predators (Martins, 1993; Martins and Oliveira, 1999; Bernarde and Abe, 2006), but is an atypical behaviour for a species which dwells in the ground (Morato, 1995) and has not previously been reported for *P. haasi*.

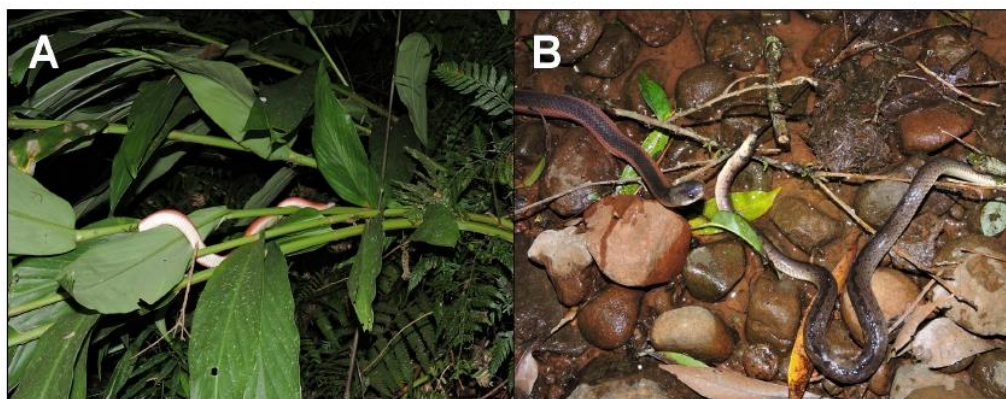
When we saw the unusual arboreal behaviour, we collected the snake for photographic inventory and to check the diagnostic characteristics. We took some pictures and measurements (with a measuring tape) and after ca. seven minutes of manipulating the individual, we released it at the collection site. At this point, it regurgitated a female of *Atractus paraguayensis* (body length 456 mm; tail length 48 mm and 34.8 g in total weight). The individual of *A. paraguayensis* was entirely swallowed but not yet digested which facilitated the identification (Figure 1B). The specimen of *A. paraguayensis* is deposited at the herpetological collection of the Federal University of Santa Maria (ZUFMS 4310) and the specimen of *P. haasi* was released back at the point of encounter.

<sup>1</sup> Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. Campus de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul State, CEP: 98400-000, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima n°1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, CEP: 97105-900, Brazil.

\* Corresponding author: E-mail: alinecandaten1@gmail.com

**Acknowledgments.** The authors wish to thank the System on Biodiversity of the Brazilian Ministry of Environmental (authorization number 55078-1/2016). Division of Conservation Units of Secretary for the Environment of the State of Rio Grande



**Figure 1.** (A) Female of *Pseudoboa haasi* found on vegetation at 182cm above the ground. (B) Regurgitated *Atractus paraguayensis* female next to the same individual of *P. haasi*. (Photo: Aline Candaten).

do Sul, Brazil (authorization number 546/2016), and also grateful the rangers of Turvo State Park for providing the license that made this observation possible.

## References

- Alencar, L.R.V., Gaiarsa, M.P., Martins, M. (2013): The Evolution of Diet and Microhabitat Use in Pseudoboine Snakes. *South American Journal of Herpetology* **8**(1): 60–66.
- Bernarde, P.S., Abe, A.S. (2006): A snake community at Espigão do Oeste, Rondônia, Southwestern Amazon, Brazil. *South American Journal of Herpetology* **1**(2): 102–113.
- Costa, H.C., Bérnils, R.S. (2018): Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira* **7**(1): 11–57.
- Decree 51.797. (2014): List of Threatened Species of State Rio Grande do Sul. Published in the official newspaper of the state of Rio Grande do Sul in 09 September 2014. Available at: <http://www.al.rs.gov.br/>. Accessed on 28 January 2019.
- Di-Bernardo, M., Borges-Martins, M., Oliveira, R.B. (2003): Répteis. In: Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul, p.165–188. Porto Alegre, Brasil, EDIPUCRS.
- Fitch, H.S. (1960): Criteria for determining sex and breeding maturity in snakes. *Herpetologica* **16**: 49–51.
- Gaiarsa, M.P., Alencar, L.R.V., Martins, M. (2013): Natural history of Pseudoboine snakes. *Papéis Avulsos de Zoologia* **53**(19): 261–283.
- Giraud, A.R. (1992): Registro de *Pseudoboa haasi* (Boettger, 1905) en la República Argentina (Serpientes: Colubridae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina* **8**(2): 3–4.
- Giraud, A.R. (1999): New Records of snakes from Argentina. *Herpetological Review* **30**: 179–181.
- Marques, O., Eterovic, A., Sazima, I. (2001): Serpentes da Mata Atlântica - Guia Ilustrado Para Serra Do Mar. Editora Holos. Primeira Edição. São Paulo, Brazil.
- Martins, M. (1993): Why do snakes sleep on the vegetation in Central Amazonia? *Herpetological Review* **24**(3): 83–84.
- Martins, M., Alencar, L.R.V., Gaiarsa, M.P. (2010): *Pseudoboa haasi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Available at: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T177570A7459096.en>. Accessed on 18 February 2019.
- Martins, M., Oliveira, M.E. (1999): Natural history of snakes in forests in the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History* **6**(2): 78–150.
- Morato, S.A.A. (1995): Padrões de Distribuição da Fauna de Serpentes da Floresta de Araucária e Ecossistemas Associados na Região Sul do Brasil. Unpublished Monograph, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.
- Morato, S.A.A., Segalla, M.V., Seger, C. (2003): *Pseudoboa haasi* (NCN). Predation. *Herpetological Review* **34**(2): 154–155.
- Morato, S.A.A. (2005): Serpentes da região atlântica do estado do Paraná, Brasil: Diversidade, distribuição e ecologia. Unpublished Ph.D thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.
- Passos, P., Fernandes, R. (2008): A new species of the colubrid snake genus *Atractus* (Reptilia: Serpentes) from the central Amazon of Brazil. *Zootaxa* **1849**: 59–66.
- Passos, P., Fernandes, R., Bérnils, R.S., Moura-Leite, J.C. (2010): Taxonomic revision of the Brazilian Atlantic Forest *Atractus* (Reptilia: Serpentes: Dipsadidae). *Zootaxa* **2364**: 1–63.
- Pavan, F.A., Mainardi, A.A., Rocha, M.C., Cechin, S.Z., Lipinski, V.M. (2018): New locality record and distribution extension for *Pseudoboa haasi* Boettger, 1905 (Serpentes: Dipsadidae). *Herpetology Notes* **11**: 1027–1028.
- Zaher, H., Oliveira, M.O., Franco, F.L. (2008): A new, brightly colored species of *Pseudoboa* Schneider, 1801 from the Amazon Basin (Serpentes, Xenodontinae). *Zootaxa* **1674**: 27–37.
- Zanella, N., D'Agostini, F. (2018): Ecology of the snake *Atractus paraguayensis* (Dipsadidae) in southern Brazil. *Zoologia* **35**: 1–6.

*Accepted by Christoph Liedtke*