

## **Títol del treball:**

Nivells de diversitat genètica en espècies d'amfibis

---

Estudiant: Rabell Ortínez, Miquel

Grau en Biologia

Correu electrònic: rabmiq23@gmail.com

Tutor: Dr. Garcia Marin, Jose Luis

Cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Dr. Garcia Marin, Jose Luis

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): joseluis.garcia@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

## Índex:

<b>1. Resum / Resumen / Abstract</b> .....	2
1.1 <i>Resum</i> .....	2
1.2 <i>Resumen</i> .....	3
1.3 <i>Abstract</i> .....	4
<b>2. Introducció</b> .....	5
2.1 <i>Amenaces a la Biodiversitat</i> .....	5
2.2 <i>Amenaces a amfibis</i> .....	6
2.3 <i>Com les amenaces poden portar a la extinció</i> .....	6
2.4 <i>Diversitat genètica</i> .....	7
<b>3. Objectives</b> .....	8
<b>4. Mètodes</b> .....	8
4.1 <i>Selecció de treballs, marcadors genètics i índexs de diversitat</i> .....	8
4.2 <i>Anàlisis estadístiques</i> .....	9
<b>5. Resultats</b> .....	9
5.1 <i>Cerca bibliogràfica i selecció de treballs</i> .....	9
5.2 <i>Nivells de diversitat en espècies amenaçades i no amenaçades</i> .....	13
5.3 <i>Diversitat segons el marcador mitocondrial</i> .....	15
5.4 <i>Comparació per països</i> .....	20
<b>6. Discussió</b> .....	23
6.1 <i>Reflexió ètica</i> .....	24
<b>7. Conclusions</b> .....	24
<b>8. Bibliografia</b> .....	25

## 1. Resum / Resumen / Abstract

### 1.1 Resum

Els amfibis són el grup d'animals cordats amb major percentatge d'espècies amenaçades, el 40% segons la IUCN. Les alteracions en els seus hàbitats per l'augment de l'explotació agrícola, se sumen a les amenaces del canvi climàtic, el deteriorament de la capa d'ozó, la introducció d'espècies invasores i els patògens, causant grans mortalitats en poblacions d'amfibis. En una població reduïda i aïllada augmenta la consanguinitat i es perd diversitat gènica, aspectes que la fan més vulnerable i redueixen la seva capacitat d'adaptació i supervivència.

En aquest treball s'han revisat els articles disponibles a la Web of Science (WOS) que presentaven dades sobre la diversitat genètica en poblacions d'amfibis per comparar si els nivells de diversitat genètica eren diferents entre les espècies d'amfibis amenaçades i no amenaçades segons la llista vermella de la IUCN. S'han fet servir índexs de diversitat en el DNA mitocondrial (mtDNA) per que els treballs disponibles a la WOS amb aquest marcador presentaven un major impacte en la comunitat científica que aquells que utilitzaven els loci microsatèl·lits (H-índex de 44 a mtDNA i 35 a microsatèl·lis). S'han revisat 324 articles científics, des del primer publicat al 1991, fins els publicats al 2018. D'aquest treballs, només 62 presentaven informació sobre diversitat poblacional, mesurada com a nombre d'haplotips, diversitat haplotípica i diversitat nucleotídica, sobre espècies d'amfibis indexats a la IUCN.

Els resultats mostren un baix nombre d'espècies amenaçades estudiades (21) en comparació a les no amenaçades (61). El nombre d'haplotips estava correlacionat amb la grandària mostral i no s'ha pogut utilitzar com a coeficient de diversitat genètica en les comparacions. Els nivells de diversitat haplotípica eren semblants entre les espècies amenaçades i no amenaçades ( $0.696 \pm 0.196$  en amenaçades,  $0.723 \pm 0.144$  en no amenaçades), però la diversitat nucleotídica era significativament inferior en el grup d'espècies amenaçades ( $0.0030 \pm 0.0027$  en amenaçades,  $0.0422 \pm 0.0830$  en no amenaçades). Aquests resultats semblen independents del marcador mitocondrial utilitzat i del territori estudiat. La diversitat nucleotídica sembla, per tant, més sensible que la haplotípica al declivi poblacional de les espècies amenaçades i podria ser un indicador de l'estat d'amenaça. En aquest sentit, algunes espècies no amenaçades presenten valors propers als d'espècies amenaçades i caldria, potser, el seu seguiment.

## 1.2 Resumen

Los anfibios son el grupo de animales cordados con mayor porcentaje de especies amenazadas, el 40% según la lista roja de la IUCN. Las alteraciones en sus hábitats por el aumento de la explotación agrícola, se suman a las amenazas del cambio climático, el deterioro de la capa de ozono, la introducción de especies invasoras y patógenos causando grandes mortalidades en poblaciones de anfibios. En una población reducida y aislada aumenta la consanguinidad y se pierde diversidad genética, lo que la hace más vulnerable y reduce su capacidad de adaptación y supervivencia.

En este trabajo se han revisado los artículos disponibles en la Web of Science (WOS) que presentaban datos sobre la diversidad genética en poblaciones de anfibios amenazadas y no amenazadas según la IUCN. Se han utilizado los índices de diversidad en el DNA mitocondrial (mtDNA), ya que los trabajos disponibles en la WOS con ese marcador presentaban mayor índice de impacto en la comunidad científica que aquellos que utilizaban los loci de microsátélites (H-índice de 44 en mtDNA y 35 en microsátélites). Se han revisado 324 artículos científicos, desde el primero publicado en 1991, hasta los publicados el 2018. De estos solo 62 presentaban información sobre diversidad poblacional, medida como número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica, sobre especies de anfibios indexadas en al IUCN.

Los resultados muestran un bajo número de especies amenazadas estudiadas (21) en comparación a las no amenazadas (61). El número de haplotipos estaba correlacionado con el tamaño muestral y no se ha podido usar como coeficiente de diversidad genética en las comparaciones. Los niveles de diversidad haplotípica eran similares entre las especies amenazadas y no amenazadas ( $0.696 \pm 0.196$  en amenazadas,  $0.723 \pm 0.144$  en no amenazadas), pero la diversidad nucleotídica era significativamente menor en el grupo de especies amenazadas ( $0.0030 \pm 0.0027$  en amenazadas,  $0.0422 \pm 0.0830$  en no amenazadas). Estos resultados parecen independientes al marcador mitocondrial utilizado y del territorio estudiado. La diversidad nucleotídica parece, por lo tanto, más sensible que la haplotípica al declive poblacional de las especies amenazadas y podría ser indicador de amenaza. En este sentido, algunas especies no amenazadas presentan valores cercanos a los de las especies amenazadas y, quizá, sería necesario su seguimiento.

### 1.3 Abstract

Amphibians are the *cordata* animal group with the highest threatened species percentage, the 40% according to the IUCN red list. The alterations in their habitats caused by the increase of the agricultural activity, add up to the threats of the climatic change, ozone layer degradation, introduction of investor species and pathogens cause great mortalities in amphibia populations. In a reduced and isolated population there is an increase of consanguinity and a loss in genetic diversity, which makes the population more vulnerable and reduces its adaptability and survival capability.

In this work the available papers in the Web of Science (WOS) that presented data of genetic diversity in amphibia populations where reviewed in order to compare the levels of genetic diversity between threatened and non-threatened species according to the IUCN. Diversity index in mitochondrial DNA (mtDNA) where used because the available papers in WOS presented a higher impact in the scientific community that those that used microsatellite loci (H-index 44 in mtDNA and 35 in microsatellite). 324 scientific papers where reviewed, starting from the first published in 1991 to the ones published in 2018. From this works only 62 presented information on population diversity, in forms of haplotype number, haplotype diversity and nucleotide diversity, on amphibian species indexed in the IUCN.

Results show a low number of threatened species studied (21) in comparison with non-threatened (61). The haplotype number was correlated with the sample size and couldn't be used as a genetic diversity index in the comparisons. The levels of haplotype diversity where similar between threatened and non-threatened species ( $0.696 \pm 0.196$  in threatened,  $0.723 \pm 0.144$  in non-threatened), but nucleotide diversity was significantly lower in the threatened species group ( $0.0030 \pm 0.0027$  in threatened,  $0.0422 \pm 0.0830$  in non-threatened). These results seem independent of the mitochondrial marker used or the territory studied. As a result, nucleotide diversity seems more sensible than haplotype diversity to population declines of threatened species and could be indicator of the threatened state. In this regard, some non-threatened species show similar values to those of threatened species and tracking could be required.

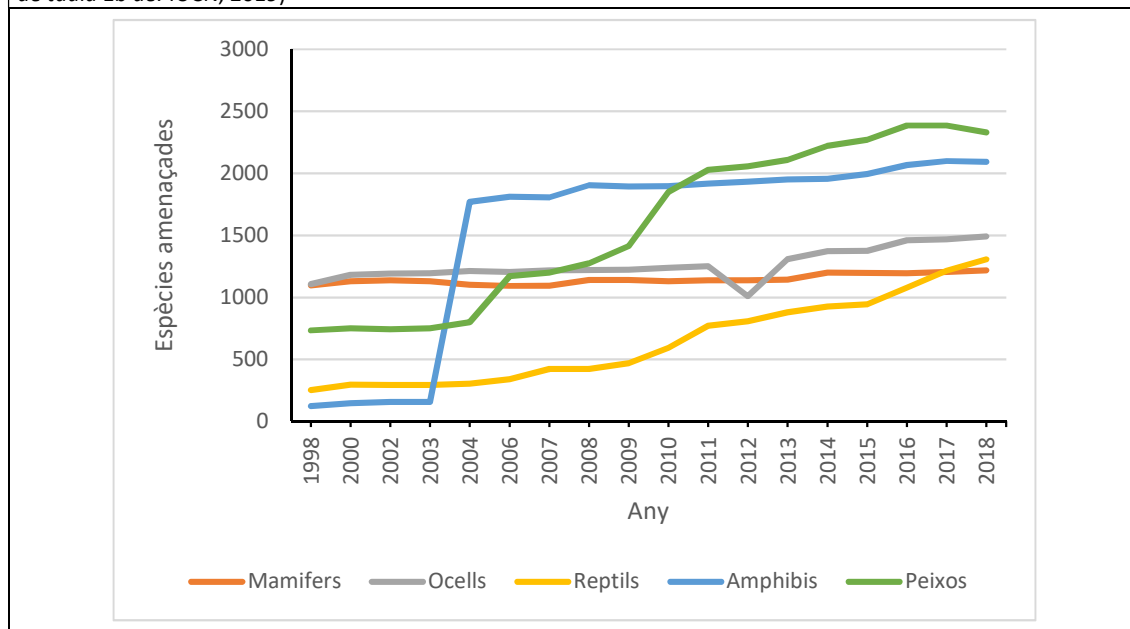
## 2. Introducció

### 2.1 Amenaces a la Biodiversitat

El gran creixement de la població humana està provocant canvis en el medi que afecten a la Biodiversitat i al seu propi sosteniment a llarg termini. Aquests canvis han modificat els habitats per a moltes espècies arreu del món. Segons les estadístiques de la unió internacional per la conservació de la natura (IUCN) més del 27% de les espècies estudiades estan amenaçades (IUCN, 2019). Es calcula que la pèrdua i degradació d'hàbitats es la causa més freqüent d'amenaça per als cordats només superada per l'explotació en el grup dels peixos (WWF, 2018). Segons el Living Planet Index del 2016 les principals amenaces sobre la Biodiversitat són, de major a menor, la pèrdua o degradació dels habitats, la sobreexplotació, les espècies invasores i les malalties, el canvi climàtic i la contaminació, essent la degradació dels habitats i la introducció d'invasors i malalties les principals amenaces pels amfibis (WWF, 2016).

Fins l'any 2003 molt poques espècies d'amfibis apareixen a la llista vermella de la IUCN (Figura 1), però a la revisió del 2004 els amfibis van passar a ser el grup més amenaçat, un 32% de les espècies estudiades (Baillie et al., 2004). El salt va ser conseqüència de una profunda revisió de la IUCN–The World Conservation Union Global Amphibian Assessment (GAA) sobre l'estat d'amenaça de les 5743 espècies d'amfibis segons els criteris de la IUCN (Stuart et al., 2004). Tot i que a partir del 2011 els peixos són el grup amb major nombre absolut d'espècies amenaçades, aquestes només representen el 13,6% de les espècies del grup. A dia d'avui, segons la IUCN, els amfibis constitueixen el grup animal amb la major proporció d'espècies amenaçades (40 % de les espècies estudiades, Taula 1) i es calcula que almenys 168 s'han extingit només en les darreres dècades (IUCN, 2019).

**Figura 1:** Nombre d'espècies dels principals grups de vertebrats amenaçades en funció de l'any. (Dades obtingudes de taula 1b de: IUCN, 2019)



**Taula 1:** Nombre d'espècies en cada una de les categories estudiades, classificades per els principals grups d'amfibis i el total del grup amfibis, a més del total de peixos que inclou els grups *Cephalaspidomorphi*, *Myxini*, *Chondrichthyes*, *Sarcopterigii*, *Holothuroidea*. (Dades obtingudes de taules 3a i 4a de: IUCN, 2019)

	Total espècies	CR	EN	VU	NT	LC	Percentatge d'amenaçades
Amphibia	5279	567	924	632	370	2786	40,22%
Anura	4694	487	805	533	309	2560	38,88%
Caudata	512	79	111	95	60	167	55,66%
Gymnophiona	73	1	8	4	1	59	17,81%
Peixos	17228	489	678	1174	575	10717	13,59%

## 2.2 Amenaces a amfibis

La disminució de la biodiversitat en amfibis i l'extinció d'algunes espècies són el resultat de diversos factors com la destrucció d'habitats, l'augment de la radiació UV-B, malalties, introducció d'espècies invasores o el canvi climàtic. Cadascun d'ells de forma individual potser no donen resultats conclouents de ser l'única causa del declivi, però combinats entre ells si que poden resultar en la extinció de les poblacions d'aquest grup d'animals. L'increment de l'explotació agrícola ha provocat la destrucció de molts hàbitats de l'hemisferi nord en les darreres dècades, reduint el nombre de basses i aïllant-les. Les carreteres tenen un impacte en les poblacions d'amfibis, sobretot en migracions a les zones de posta. Se suma a l'efecte de la destrucció d'habitats l'efecte deleteri de fertilitzants i pesticides. El resultat són poblacions que han quedat fragmentades degut a la baixa mobilitat dels amfibis (Beebee, 2005). L'esgotament de l'ozó atmosfèric causat per la indústria humana ha provocat augments en els registres dels rajos UV-B, el que redueix la supervivència dels embrions i les larves i provoca, per tant, la disminució de les poblacions d'amfibis en les zones més afectades, com per exemple les basses descobertes de vegetació, ja que la cobertura vegetal evita l'exposició d'ous i larves als rajos UV-B. Tant mateix, malalties com ranavirus (*Iridoviridae*) provoquen mortalitats massives en poblacions d'amfibis (e.g. *Abystoma tigrinum*, Jancovich et al., 1997). Infeccions per fongs que infecten la pell d'adults impedeixen la respiració i la regulació osmòtica, o provocant també mortalitats massives en els ous, amplificant els efectes dels rajos UV-B. La introducció d'espècies pot amenaçar de diverses maneres a les poblacions d'amfibis mitjançant interaccions tipus depredació i competició, introducció de patògens o la hibridació. El canvi climàtic pot produir modificacions en la fenologia de cries d'algunes espècies, en casos concrets suposa un desavantatge, canviant l'època de cria afavorint la depredació. El canvi climàtic pot traduir-se també en canvis en la humitat ambiental fent les postes menys factibles, ja que els amfibis depenen de l'aigua per a la seva reproducció (Beebee & Griffiths, 2005). A més, l'augment de temperatures afavoreix el creixement dels fongs paràsits i altera la resposta immunitària dels amfibis (e.g. *Batrachochytrium dendrobatidis*, Walker et al., 2010).

## 2.3 Com les amenaces poden portar a la extinció

Les amenaces a la biodiversitat funcionen combinades entre elles o amb altres factors que es maximitzen mútuament i poden portar a un creixement negatiu de la població o espècie conduint-la a l'extinció. La pèrdua d'habitat, la contaminació i la sobreexplotació afavoreixen la formació de poblacions petites, fragmentades i aïllades. En aquestes poblacions augmenta la consanguinitat i es perd diversitat genètica per deriva. Una menor diversitat genètica condueix sovint a una reducció de la capacitat d'adaptació, de supervivència i de reproducció. Aquests

factors disminueixen encara més la mida de la població, que també es pot veure reduïda per variacions estocàstiques de la demografia, pertorbacions ambientals o possibles catàstrofes. Així, una població reduïda és més fàcil que es mantingui petita, fragmentada i aïllada, es forma l'anomenat vòrtex d'extinció, ja que difícilment les espècies poden escapar a aquesta dinàmica (Frankham et al., 2002).

#### *2.4 Diversitat genètica*

La diversitat genètica es defineix com a: "l'extensió de variació heretable dins una població, o espècie o grup d'espècies" (Frankham et al., 2002). La variació dins d'una població és necessària per a evolucionar i adaptar-se a canvis ambientals. La manca de diversitat genètica esdevé en pèrdua de potencial evolutiu, és a dir, una capacitat reduïda d'adaptació als canvis de l'ambient (Frankham, 2005).

Degut a l'aïllament de les poblacions d'amfibis són molt probable augments de la consanguinitat per encreuament entre individus emparentats. Aquest augment de consanguinitat condueix a la depressió per consanguinitat amb l'aparició de fenotips deleteris que disminueix la supervivència i el potencial reproductiu dels individus, augmentant el risc d'extinció de les poblacions. Alhora, es redueix el nombre d'efectius i s'intensifiquen els processos de deriva.

La diversitat genètica a les poblacions es pot analitzar amb diferents marcadors (nuclears i citoplasmàtics com el DNA mitocondrial), però cal tenir en compte que les diferents regions del genoma tenen taxes de mutació diferents que poden produir diferències en les estimacions de diversitat poblacional. Entre els marcadors nuclears sovint s'utilitzen els microsatèl·lits. Aquest marcadors són zones repetitives de 1 a 6 nucleòtids en tàndem molt polimòrfics i variables en funció de les repeticions. D'altra banda, el DNA mitocondrial (mtDNA) té una major taxa de mutació en comparació al nuclear a l'estar en contacte amb radicals lliures i no tenir, el mitocondri, mecanismes de reparació (Brown, 2008). El fet que el mtDNA sigui de transmissió materna redueix la grandària efectiva de la població a un quart en comparació a la dels marcadors en el genoma nuclear. Tot i que aquest fet hauria de resultar en menor diversitat observable en el mtDNA respecte als gens nuclears, sembla que es compensa amb la seva alta taxa de mutació mantenint una diversitat similar (Nei, 1987). El mtDNA presenta un avantatge per aïllar-lo i amplificar-lo en relació al DNA nuclear, ja que cada cèl·lula presenta moltes còpies d'ADN mitocondrial, però, si és diploide, només dues còpies dels gens nuclears (una per cromosoma homòleg).

La diversitat genètica d'una població pot ser mesurada amb diversos coeficients basats en al·lels o haplotips i basats en seqüències d'ADN. Parlarem d'al·lels com a les diferents variants d'una zona marcadora nuclear, mentre que anomenarem haplotips a les diferents variants d'una mateixa zona del genoma mitocondrial haploide. Els coeficients basats en al·lels i haplotips es calculen a partir de les freqüències d'aquests a la població. Els mètodes basats en seqüències d'ADN poden incorporar les diferències entre les seqüències a nivell de nucleòtids. La diversitat genètica d'una població pot ser descrita pel nombre d'haplotips o al·lels diferents observats en la població (Griffiths, 2008), però aquests valors són dependents de la grandària mostral i, per comparar entre poblacions, caldria primer verificar la seva no correlació amb la grandària de les mostres a les diferents poblacions. En el cas que no trobem correlació, poden ésser utilitzats com a descriptors de diversitat genètica, ja que són més sensibles a les disminucions de mida poblacional que altres índexs com, per exemple, la diversitat genètica o la heterozigosi (Leberg, 1992).



La diversitat genètica es descriu com la probabilitat d'agafar dos al·lells o haplotips a l'atzar d'una població i que no siguin iguals. Si  $x$  és la freqüència de l'al·lel o haplotip  $i$  dels  $k$  haplotips o al·lells observats, la diversitat es calcula com:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Quan s'utilitza per al·lells de gens nuclears en espècies diploides descriu l'heterozigosi esperada en l'equilibri de Hardy-Weinberg. L'heterozigosi observada descriu la variació genètica respecte un locus particular a partir de la freqüència observada d'heterozigots en aquest locus. L'heterozigosi observada es compara amb l'esperada suposant l'equilibri de Hardy-Weinberg i discrepàncies entre aquests dos índexs poden indicar episodis passats d'una població, com consanguinitat o hibridació de poblacions.

La diversitat nucleotídica és el nombre mig de diferències de nucleòtids per posició entre dos seqüències en una població. Si  $x_i$  és la freqüència a la població de la seqüència  $i$ ,  $\pi_{ij}$  és la proporció de nucleòtids diferents entre les seqüències  $i$  i  $j$ , la diversitat nucleotídica es calcula com:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

En essència, és un indicador de l'heterozigosi al nivell de nucleòtids en una població amb emparellaments aleatoris (Nei, 1987). Tots els anteriors coeficients es poden analitzar per un conjunt de marcadors i l'estimador poblacional seria la seva mitjana pels marcadors analitzats.

### 3. Objectives

Using already published genetic diversity in amphibian species, the main objective of this final degree project is to compare levels of genetic diversity between threatened and non-threatened species of amphibia.

### 4. Mètodes

#### 4.1 Selecció de treballs, marcadors genètics i índexs de diversitat

Per tal d'obtenir les dades necessàries per a comparar la diversitat genètica d'espècies amenaçades i no amenaçades d'amfibis s'han consultat els articles indexats a "The web of science" (WOS). D'aquesta manera, les dades provenen d'articles científics publicats en revistes especialitzades.

Per raons de comparabilitat entre espècies d'amfibis, cal concretar la tècnica utilitzada per a l'anàlisi de la diversitat genètica, o bé a partir de genoma nuclear amb loci de microsatèl·lits, o bé amb DNA mitocondrial. Les dues opcions són vàlides i hi poden haver nombrosos treballs publicats. La cerca a la WOS pels loci microsatèl·lits s'ha fet marcant els temes "genetic diversity" + amphibia + microsatellite. Pel DNA Mitocondrial es van agrupar les següents cerques: "genetic diversity" + amphibia + "mitochondrial DNA", "genetic diversity" + amphibia + mtDNA i "genetic diversity" + amphibia + "DNA barcoding". El DNA barcoding és un mètode que fa servir les seqüències d'un gen, generalment mitocondrial, com a marcador de DNA per identificar espècies. S'ha seleccionat la tècnica a revisar en aquest estudi (microsatèl·lits o mtDNA) en

funció del nombre de coincidències de la cerca de cada tècnica al WOS i per l'índex H de les publicacions associades. Aquest índex H és una mesura de l'impacte de les publicacions (citacions per altres treballs) en la comunitat científica.

S'han revisat els articles publicats començant des de l'any 2018, l'últim completament disponible a la WOS, i retrocedint anys fins a obtenir un mínim de 30 espècies per grup. Els articles seleccionats han sigut aquells que s'ajustaven més als criteris de selecció: cal que confirmin l'ús de la tècnica seleccionada a l'apartat de mètodes i que presentessin els coeficients de diversitat poblacional. Per a cada espècie, en cada article seleccionat s'ha registrat el nom científic de l'espècie, la grandària de la mostra, els índexs de diversitat, l'estat d'amenaça segons la UICN, la referència a l'article d'origen de les dades, l'any de publicació de les dades i l'origen geogràfic de les mostres. Si en un treball hi havia més d'una població estudiada, els nivells de diversitat a cada un dels índex de diversitat s'han obtingut fent la mitjana de les diferents poblacions de les que se'n tenia informació. Per a cada espècie s'ha consultat el seu estat d'amenaça segons els criteris de la IUCN a la web de la "UICN Red List" (<https://www.iucnredlist.org/>) i agrupant en No amenaçades els grups "Least concern" i "Near threatened" i en Amenaçades els grups "Vulnerable", "Endangered" i "Critically Endangered". Les espècies no indexades en l'IUCN no s'han tingut en compte, però abans de descartar-les s'ha revisat la seva taxonomia per possibles canvis de nom i classificació i s'ha buscat a l'IUCN amb el nom nou. Tampoc es van tenir en comptes les espècies classificades per la IUCN com a "Data deficient", "Extinct" i "Extinct in the wild".

#### 4.2 Anàlisis estadístiques

En relació a les anàlisis estadístiques, s'ha comparat la diversitat genètica entre diverses agrupacions, mitjançant el test de la T-test o ANOVA si la variable es distribuïa de manera Normal, o el tests de Mann-Whitney-Wilcoxon o Kruskal-Wallis per a les que no presentaven distribució normal. Per comprovar si la variable es distribuïa de manera Normal s'ha aplicat el test de Shapiro-Wilk i el test F i Bartlett per verificar l'homogeneïtat de les variàncies dels grups comparats (Homoscedasticitat). A més, d'entre espècies amenaçades i no amenaçades, s'han comparat la diversitat genètica dels amfibis segons el país (o territori) d'origen i del marcador genètic treballat. Tanmateix, pels grups grans en les categories de marcador genètic o de país d'origen s'han comparat el nivell de diversitat entres les espècies amenaçades i no amenaçades. També s'ha testat la correlació del nombre d'al·lels o d'haplotips (H) amb la mida mostral (N) amb el coeficient de Pearson i una regressió lineal.

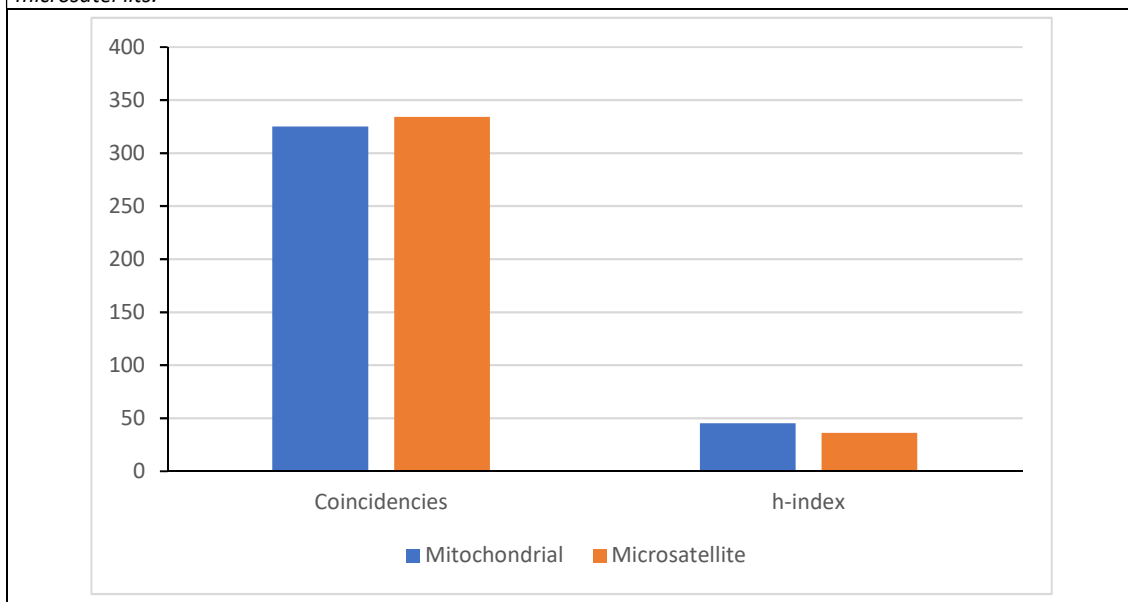
Tots els anàlisis estadístics s'han realitzar en el programa R (R Core Team, 2019) amb el paquet R cmdr (Fox, 2005; Fox & Bouchet-Valat, 2019).

## 5. Resultats

### 5.1 Cerca bibliogràfica i selecció de treballs

La cerca d'articles on la tècnica empleada eren els loci microsatèl·lits va donar 329 coincidències amb un H-índex de 35, mentre que els que semblaven tenir dades de DNA mitocondrial van donar una suma de 324 coincidències amb un h-índex de 44. Donat el semblant nombre d'articles que utilitzen ambdues tècniques, s'ha seleccionat els que treballen amb mtDNA pel seu major índex d'impacte (Figura 2).

**Figura 2:** Resultats de la cerca comparativa per les tècniques que utilitzen ADN mitocondrial i les que utilitzen microsatèl·lits.



S’han revisat els 324 articles que treballaven amb mtDNA, del darrer publicat el 2018 fins el més antic de l’any 1991. D’aquests 324 articles, només 62 contenien dades de diversitat: nombre d’haplotips (H), diversitat haplotípica (h) i diversitat nucleotídica ( $\pi$ ) a partir de seqüències de ADN mitocondrial d’espècies indexades a la IUCN (Taula 2). D’aquests 62 articles es van extreure dades per 81 espècies diferents, 60 del les categories del grup no amenaçades i 21 de les amenaçades (Figura 3).

**Taula 2:** Conjunt d’espècies revisades. N és la mida mostral, H és el nombre d’haplotips, h és la diversitat haplotípica i  $\pi$  la diversitat nucleotídica.

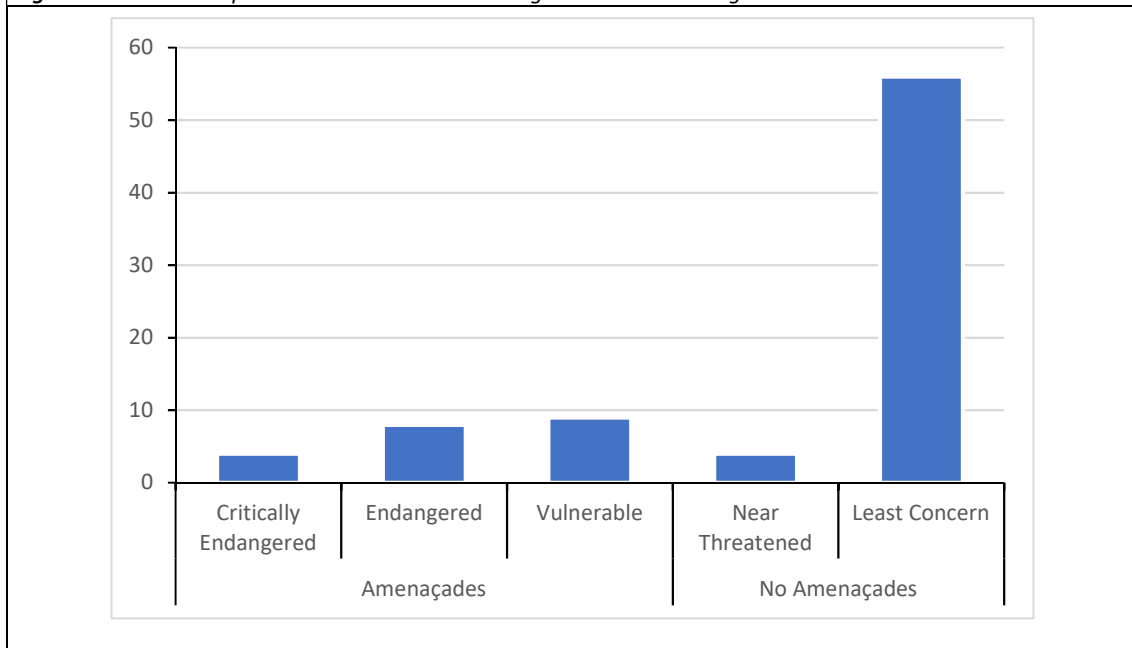
Espècie	N	Marcador genètic	H	h	$\pi$	Estat	Any	País o Regió	Cita
<i>Lepidobatrachus asper</i>	23	CO1	2	0,42	0,0014	Near Threatened	2018	Brasil	1
<i>Lepidobatrachus laevis</i>	77	CO1	23	0,90	0,0038	Least Concern	2018	Brasil	1
<i>Lepidobatrachus llanensis</i>	85	CO1	10,33	0,63	0,0033	Least Concern	2018	Brasil	1
<i>Bokermannohyla saxicola</i>	186	CO1 i Cyt B	ND	0,75	0,0030	Least Concern	2018	Brasil	2
<i>Dermatonotus mulleri</i>	72	ND2	13	0,53	0,0042	Least Concern	2018	Brasil	3
<i>Rana pseudodalmatina</i>	27	CO1 i Cyt B	ND	0,88	0,0041	Least Concern	2018	Altres	4
<i>Osteocephalus taurinus</i>	187	16S rRNA	39	0,90	0,0078	Least Concern	2018	Brasil	5
<i>Osteocephalus oophagus</i>	5	16S rRNA	2	0,40	0,0008	Least Concern	2018	Brasil	5
<i>Discoglossus pictus</i>	58	Cyt B	36	0,97	0,0090	Least Concern	2018	Mediterrani	6
<i>Hyla meridionalis</i>	50	CO1	34	0,96	0,0310	Least Concern	2018	Mediterrani	6
<i>Pelophylax saharicus</i>	63	CO1	33	0,93	0,0660	Least Concern	2018	Mediterrani	6
<i>Bufo viridis</i>	10,17	CR	ND	0,38	0,0050	Least Concern	2018	Mediterrani	7
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	150	Cyt B	4,6	0,47	0,0076	Near Threatened	2017	Xina	8
<i>Ichthyosaura alpestris</i>	149	Cyt B i ND2	13	0,80	0,0077	Least Concern	2017	Mediterrani	9
<i>Batrachuperus tibetanus</i>	14	Cyt B	3	0,42	0,0042	Vulnerable	2017	Xina	10
<i>Hynobius amjiensis</i>	45	Cyt B	5	0,52	0,0053	Critically Endangered	2016	Xina	11
<i>Gyrinophilus porphyriticus</i>	122	Cyt B	50	0,96	0,0310	Least Concern	2016	Estats Units	12
<i>Plethodon kentucki</i>	89	Cyt B	16	0,72	0,0470	Least Concern	2016	Estats Units	12

<i>Scinax eurydice</i>	128	ND2	27	0,85	0,0067	Least Concern	2016	Brasil	13
<i>Batrachyla leptopus</i>	54	Cyt B	25	0,01	0,0110	Least Concern	2016	Altres	14
<i>Laliostoma labrosum</i>	67	12s rRNA	26	ND	0,0138	Least Concern	2015	Madagascar	15
<i>Babina holsti</i>	11	ND5	6,6	0,76	0,0029	Endangered	2015	Altres	16
<i>Nanorana parkeri</i>	267	Cyt B	38	0,53	0,0031	Least Concern	2015	Xina	17
<i>Rhacophorus omeimontis</i>	196	Cyt B i ND2	39	0,95	0,0191	Least Concern	2015	Xina	18
<i>Lithobates sylvaticus</i>	76	ND2	28	0,86	0,0050	Least Concern	2015	Altres	19
<i>Odorrana schmackeri</i>	511	ND2	81	0,95	0,1009	Least Concern	2015	Xina	20
<i>Ichthyophis bannanicus</i>	158	Cyt B i ND2	23	0,70	0,0077	Least Concern	2015	Xina	21
<i>Xenopus laevis</i>	94	Cyt B	6	0,55	0,3735	Least Concern	2014	Altres	22
<i>Rana dalmatina</i>	61	CO1	ND	0,69	0,0013	Least Concern	2014	Mediterrani	23
<i>Salamandrina perspicillata</i>	551	Cyt B	17	0,26	0,0420	Least Concern	2014	Mediterrani	24
<i>Salamandrina terdigitata</i>	100	Cyt B	5	0,04	0,2080	Least Concern	2014	Mediterrani	24
<i>Neurergus crocatus</i>	9	CR i 16s rRNA	2	0,75	0,0005	Vulnerable	2014	Altres	25
<i>Neurergus kaiseri</i>	4	CR i 16s rRNA	2	0,67	0,0009	Vulnerable	2014	Altres	25
<i>Neurergus microspilotus</i>	11	CR i 16s rRNA	1	ND	0,0000	Critically Endangered	2014	Altres	25
<i>Pachyhynobius shangchengensis</i>	44	CR	7	0,56	0,0020	Vulnerable	2014	Xina	26
<i>Scutigera ningshanensis</i>	17	Cyt B	ND	0,91	0,0058	Endangered	2014	Xina	27
<i>Discoglossus montalentii</i>	72	Cyt B	16	0,87	0,0073	Near Threatened	2013	Mediterrani	28
<i>Rana kukunoris</i>	360	Cyt B	60	0,84	0,0041	Least Concern	2013	Xina	29
<i>Tylotriton shanjing</i>	146	Cyt B, CR i 12S rRNA	58	0,96	0,0097	Near Threatened	2013	Xina	30
<i>Euproctus montanus</i>	193	Cyt B i CO1	97	0,98	0,0275	Least Concern	2013	Mediterrani	31
<i>Anaxyrus punctatus</i>	46	ND	ND	0,72	0,0040	Least Concern	2013	Estats Units	32
<i>Tylotriton kweichowensis</i>	71	CR	28	0,94	0,0022	Vulnerable	2013	Xina	33
<i>Boana albopunctata</i>	121	CR, Cyt B, ND1, ND2 i 16s rRNA	91	0,99	0,0400	Least Concern	2012	Brasil	34
<i>Allobates femoralis</i>	107	16 rRNA	23	0,85	0,0060	Least Concern	2012	Brasil	35
<i>Babina subaspera</i>	23	CO1	7	ND	0,0014	Endangered	2012	Altres	36
<i>Gephyromantis enki</i>	28	16s rRNA	4	ND	0,0010	Vulnerable	2012	Madagascar	37
<i>Boophis boehmei</i>	14	16S rRNA	2	ND	0,0005	Endangered	2012	Madagascar	37
<i>Plethodon cinereus</i>	55	CO1, Cyt B	6	0,65	0,0082	Least Concern	2012	Estats Units	38
<i>Plethodon hubrichti</i>	6	CO1, Cyt B	4	0,90	0,0089	Vulnerable	2012	Estats Units	38
<i>Ranodon sibiricus</i>	21	CR	2	0,32	0,0005	Endangered	2012	Xina	39
<i>Pseudoeurycea leprosa</i>	ND	CR, CytB i 12S rRNA	16	0,85	0,0040	Least concern	2012	Altres	40
<i>Lissotriton italicus</i>	25,1	ND2	ND	0,67	0,0010	Least concern	2012	Mediterrani	41
<i>Eleutherodactylus portoricensis</i>	45	Cyt B	ND	0,92	0,0088	Endangered	2011	Altres	42
<i>Sclerophrys panterina</i>	77	ND2 i ND4	6	0,61	0,0010	Endangered	2011	Altres	43
<i>Desmognathus quadramaculatus</i>	ND	ND2 i ND4	ND	0,95	0,2300	Least concern	2011	Estats Units	44
<i>Desmognathus marmoratus</i>	ND	ND2 i ND4	ND	0,98	0,3330	Least concern	2011	Estats Units	44
<i>Hyla sarda</i>	ND	ND2 i ND4	ND	0,67	0,0022	Least concern	2011	Mediterrani	45
<i>Rana sphenoccephala</i>	ND	12s rRNA	25	ND	0,1372	Least concern	2011	Estats Units	46
<i>Salamandra salamandra</i>	168	CytB i ND1	17	0,89	0,0195	Least concern	2011	Altres	47
<i>Rhinella spinulosa</i>	203	CytB i ND1	25	0,85	0,0059	Least concern	2011	Altres	48
<i>Hyla japonica</i>	339	CytB i ND1	95	0,88	0,0088	Least concern	2011	Altres	49
<i>Bombina bombina</i>	86,4	Cyt B	ND	0,68	0,1750	Least concern	2011	Mediterrani	50
<i>Bombina variegata</i>	94	Cyt B	ND	0,68	0,2383	Least concern	2011	Mediterrani	50

<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	23	Cyt B	11	0,92	0,0050	Least Concern	2010	Brasil	51
<i>Phyllomedusa iheringii</i>	6	Cyt B	4	0,80	0,0070	Least Concern	2010	Brasil	51
<i>Engystomops pustulosus</i>	37	Cyt B	21	0,91	0,0452	Least Concern	2010	Altres	52
<i>Thoropa miliaris</i>	26	Cyt B	20	0,98	0,0156	Least Concern	2009	Brasil	53
<i>Gastrophryne carolinensis</i>	100	16s rRNA	27	0,18	0,0190	Least Concern	2009	Estats Units	54
<i>Batrachoseps attenuatus</i>	23	Cyt B	5	0,56	0,0038	Least Concern	2009	Estats Units	55
<i>Pelophylax lessonae</i>	149	Cyt B	26	0,54	0,0032	Least Concern	2008	Mediterrani	56
<i>Eleutherodactylus ockendeni</i>	51	Cyt B	5	0,47	0,0012	Least Concern	2007	Altres	57
<i>Rana ridibunda</i>	207	Cyt B	15	0,74	0,0022	Least Concern	2006	Mediterrani	58
<i>Mantella milotympanum</i>	9	Cyt B	6	0,83	0,0042	Critically Endangered	2004	Madagascar	59
<i>Mantella aurantiaca</i>	7	Cyt B	3	0,55	0,0114	Critically Endangered	2004	Madagascar	59
<i>Mantella madagascariensis</i>	7	Cyt B i CR	4	0,81	0,0032	Vulnerable	2004	Madagascar	59
<i>Craugastor bransfordii</i>	7,00	ND2	3	ND	0,0034	Least concern	2003	Altres	60
<i>Craugastor polyptychus</i>	6	ND2	2	ND	0,0016	Least concern	2003	Altres	60
<i>Craugastor stejnegerianus</i>	7	ND2	2,75	ND	0,004	Least concern	2003	Altres	60
<i>Salamandra lanzai</i>	44	Cyt B	0	0	0	Vulnerable	2002	Mediterrani	61
<i>Xenopus laevis</i>	119	Cyt B i CR	5	0,23	0,0039	Least Concern	1997	Altres	62
<i>Xenopus gilli</i>	206	Cyt B i CR	9	0,37	0,0047	Endangered	1997	Altres	62

Les cites corresponen a les següents: 1 (Brusquetti et al., 2018), 2 (Nascimento et al., 2018), 3 (Oliveira et al., 2018), 4 (Freake, O'Neill, Unger, Spear, & Routman, 2018), 5 (Ortiz, Lima, & Werneck, 2018), 6 (Beddek et al., 2018), 7 (Dufresnes et al., 2018), 8 (Wang et al., 2017), 9 (Chiocchio et al., 2017), 10 (Huang et al., 2017), 11 (Yang et al., 2016), 12 (Kuchta et al., 2016), 13 (Menezes et al., 2016), 14 (Vidal et al., 2016), 15 (Pabijan et al., 2015), 16 (Kakehashi et al., 2015), 17 (Liu et al., 2015), 18 (Li et al., 2015), 19 (D'Aoust-Messier & Lesbarrères, 2015), 20 (Li et al., 2015), 21 (Wang et al., 2015), 22 (Lobos et al., 2014), 23 (Canestrelli et al., 2014), 24 (Hauswaldt et al., 2014), 25 (Hendrix et al., 2014), 26 (Pan et al., 2014), 27 (Meng et al., 2014), 28 (Bisconti et al., 2013), 29 (Zhou et al., 2013), 30 (Yu et al., 2013), 31 (Bisconti et al., 2013), 32 (Wood et al., 2013), 33 (Zhang et al., 2013), 34 (Prado et al., 2012), 35 (Simões, Lima, & Farias, 2012), 36 (Iwai & Shoda-Kagaya, 2012), 37 (Pabijan et al., 2012), 38 (Bayer et al., 2012), 39 (Chen et al., 2012), 40 (Parra-Olea et al., 2012), 41 (Canestrelli et al., 2012), 42 (Barker et al., 2011), 43 (Measey & Tolley, 2011), 44 (Wooten & Rissler, 2011), 45 (Bisconti et al., 2011), 46 (Newman & Rissler, 2011), 47 (Reis et al., 2011), 48 (Gallardo et al., 2011), 49 (Jang et al., 2011), 50 (Fijarczyk et al., 2011), 51 (Brunes et al., 2010), 52 (Pröhl et al., 2010), 53 (Fitzpatrick et al., 2009), 54 (Makowsky et al., 2009), 55 (Martínez-Solano & Lawson, 2009), 56 (Canestrelli & Nascetti, 2008), 57 (Elmer et al., 2007), 58 (Matson et al., 2006), 59 (Vences et al., 2004), 60 (Crawford, 2003), 61 (Riberon et al., 2002) i 62 (Evans et al., 1997).

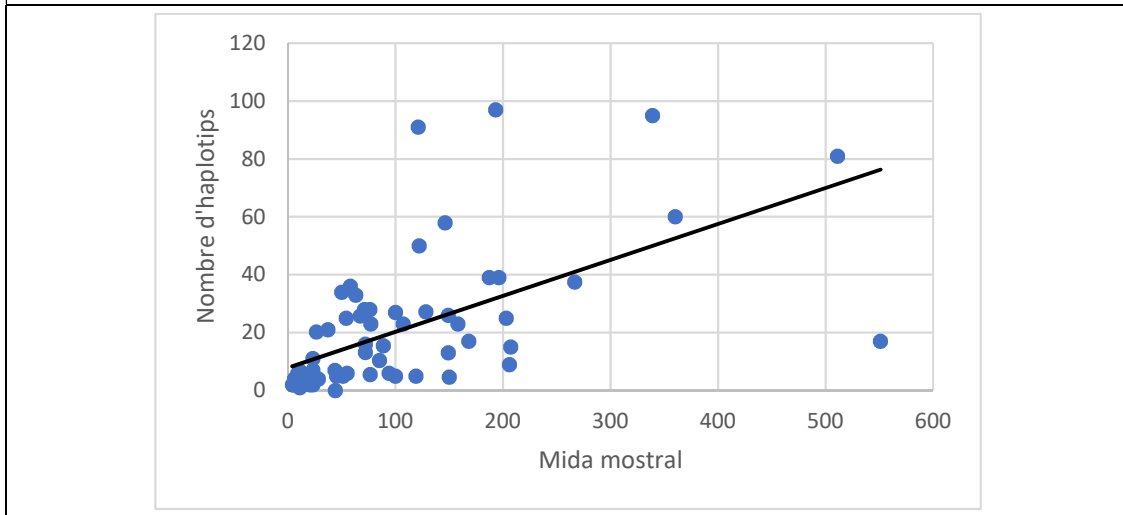
**Figura 3:** Nombre d'espècies treballades dins les categories establertes segons els criteris de la IUCN.



### 5.2 Nivells de diversitat en espècies amenaçades i no amenaçades

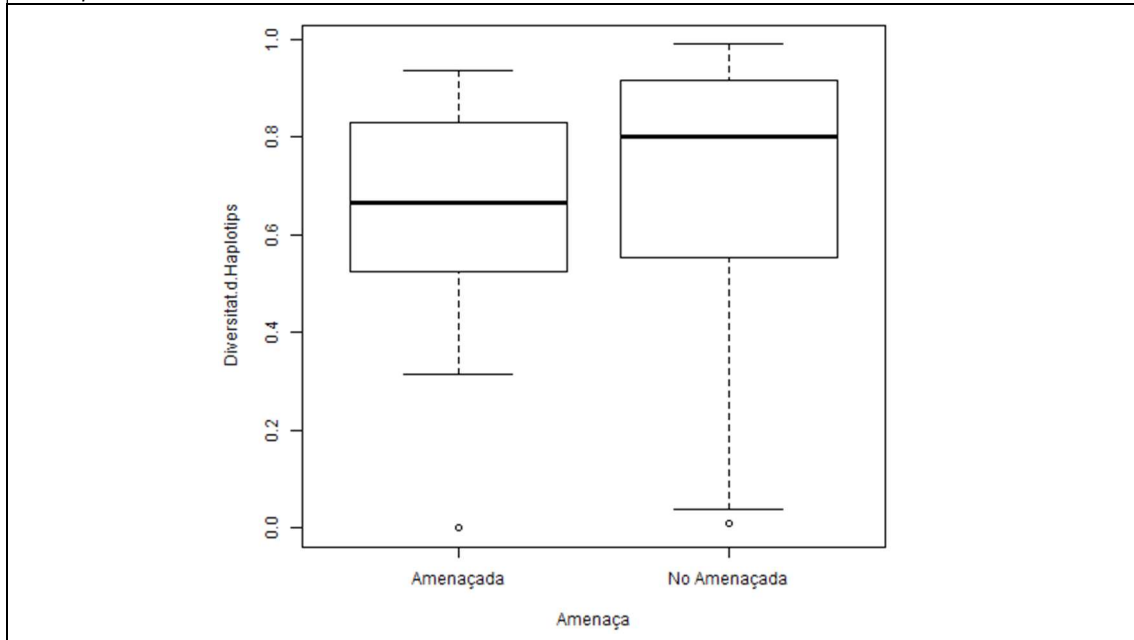
Segons el test de Pearson, hi ha una correlació positiva i significativa entre les variables grandària mostral (N) i el nombre d'haplotips (H) ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). A més, la relació de N amb H com a variable resposta s'ajusta a un model lineal (Figura 4) ( $r^2 = 0.3569$ ,  $p$ -value  $< 0.0001$ ). Donada aquesta relació entre ambdues variables, el nombre d'haplotips (H) no s'ha considerat per fer les comparacions de diversitat entre grups.

**Figura 4:** Correlació de mida mostral (N) i nombre d'Haplotips (H) on la regressió lineal es representada en negre.



La mitjana de diversitat haplotípica va ser de 0.696 (sd: 0.196) per les espècies amenaçades i 0.723 (sd: 0.244) en el grup d'espècies no amenaçades. El test Shapiro-Wilk de normalitat determinà que aquest índex presenta una distribució normal pel conjunt de poblacions d'espècies amenaçades ( $W = 0.9349$ ,  $p$ -valor = 0.3226), però no per les no amenaçades ( $W = 0.9349$ ,  $p$ -valor  $< 0.0001$ ). Per això, es van compara els valors amb el test no paramètric de Mann-Whitney-Wilcoxon, que no va detectar diferències significatives entre els dos grups ( $W = 345.5$ ,  $p$ -value = 0.391). Tot i no ser significativament diferents la mitjana de diversitat haplotípica del grup d'espècies no amenaçades, era major a la del grup d'amenaçades i presentava una distribució dels valors més ampla (Figura 5).

**Figura 5:** Distribució de diversitat haplotípica per als grups d'espècies d'amfibis Amenaçats i no Amenaçats amb els respectius errors estàndards.



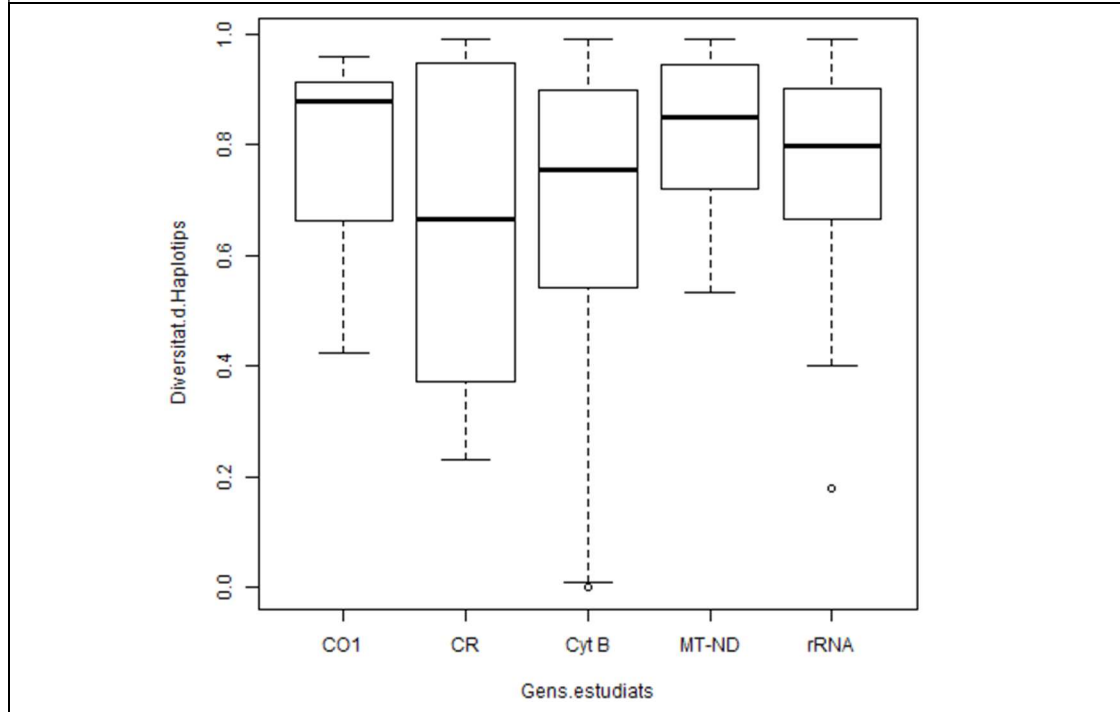
La mitjana de diversitat nucleotídica va ser de 0.0030 (sd: 0.0027) per el grup d'espècies amenaçades i 0.0422 (sd: 0.0830) per a les no amenaçades. El test de Shapiro-Wilk va determinar que cap dels dos grups presenta una distribució normal (Amenaçades:  $W = 0.88$ ,  $p\text{-value} = 0.022$ ; No Amenaçades:  $W = 0.5366$ ,  $p\text{-value} < 0.001$ ). Novament, es va aplicar el test no paramètric de Mann-Whitney-Wilcoxon que en aquest cas va indicar que els dos grups sí eren significativament diferents per aquest índex de diversitat ( $W = 194$ ,  $p\text{-value} = 0.0004$ ). El grup d'espècies no amenaçades té una diversitat nucleotídica mitjana significativament superior, a més d'una distribució molt més ampla dels valors que resulta en algunes dades atípiques (Figura 6). De les dades atípiques s'han exclòs dels anàlisis les pertanyents a *Xenopus laevis* i *Desmognathus quadramaculatus* degut a que superaven en més de tres vegades la desviació estàndard.





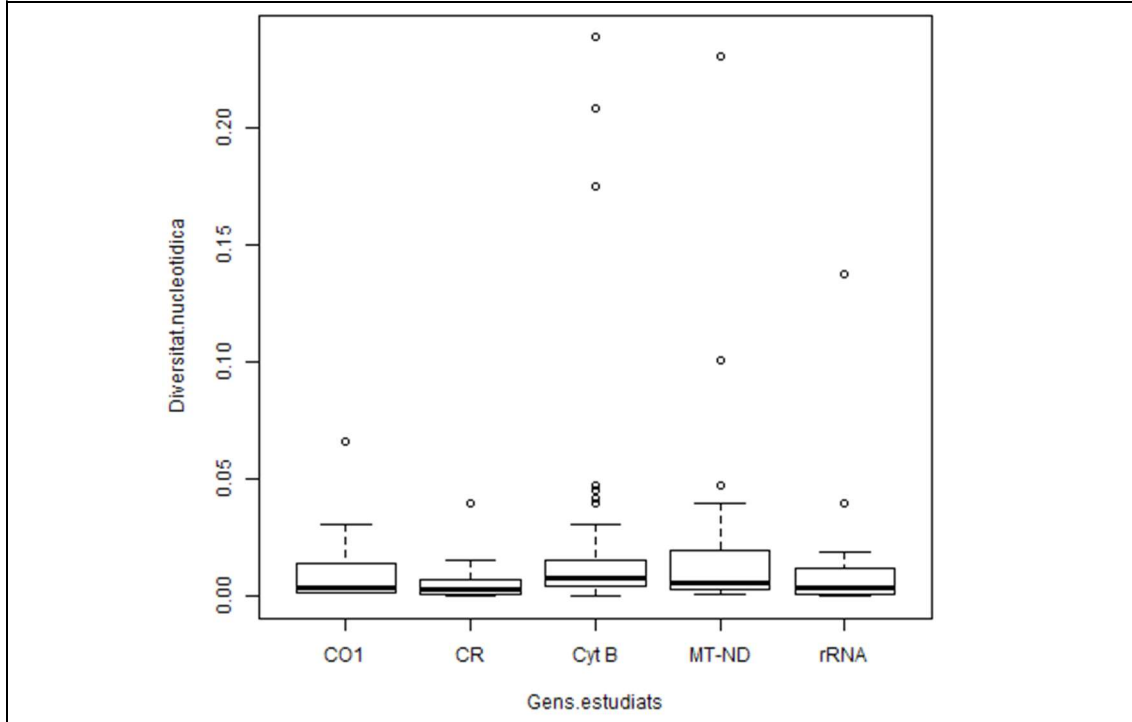
squared = 2.4819, df = 3, p-value = 0.4786) indicava que no hi havia cap marcador amb nivells de diversitat haplotípica significativament diferent als altres, tot i que CO1 presentava la major mitjana o Cyt B la distribució de valors més ampla (Figura 8).

**Figura 8:** Distribucions dels valors de diversitat haplotípica en funció de la zona del genoma mitocondrial analitzada.



Respecte la diversitat nucleotídica, el test de Kruskal-Wallis en aquest cas tampoc va detectar diferències significatives entre els marcadors mitocondrials (Kruskal-Wallis  $\chi^2$ -squared=4.7316, df=3, p-value=0.1925). En aquesta anàlisi es van eliminar alguns dels treballs revisats que fan servir Cyt B o MT-ND perquè presentaven valors atípics, superiors en més de tres vegades la desviació estàndard (Figura 9).

**Figura 9:** Distribucions dels valors de diversitat nucleotídica en funció de la zona del genoma mitocondrial analitzada. No s'hi veuen representats els valors atípics corresponents a *Xenopus laevis* (0.3735), a *Desmognathus marmoratus* (0.3330).



La regió amb el major nombre d'espècies revisades era la corresponent al citocrom B amb més del doble d'espècies que la resta (Figura 7) i es va utilitzar com a representant dels marcadors mitocondrials codificant per proteïnes per comparar la diversitat entre espècies amenaçades i no amenaçades en aquest tipus de gens. Com els gens ribosomals i la regió de control tenen altres funcions diferents a la de codificar per proteïnes, també es va fer l'anterior comparació dels nivells de diversitat entre espècies amenaçades i no amenaçades, per determinar si el tipus de funció del gen pot afectar a les conclusions d'aquest treball.

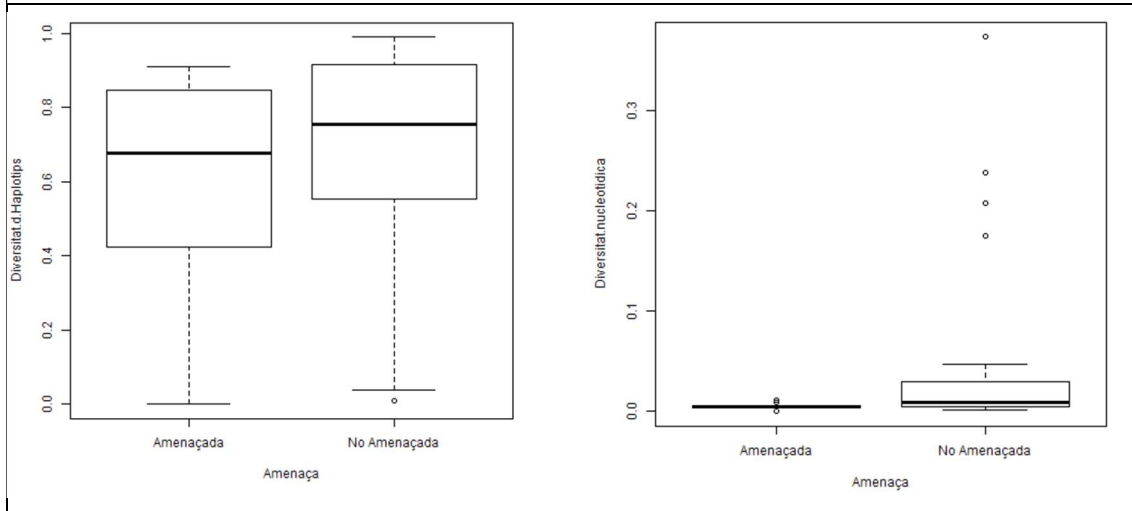
### 5.3.1 Citocrom B

Entre les espècies estudiades amb la seqüència Citocrom B, hi ha 10 espècies amenaçades i 36 llistades a la llista vermella de la IUCN com no amenaçades. Com que la mida mostral i el nombre d'haplotips estan correlacionats ( $t = 3.102$ ,  $df = 37$ ,  $p\text{-value} = 0.003669$ ) en els treballs que fan servir aquest marcador, tampoc aquí s'ha pogut usar el nombre d'haplotips com a índex de diversitat.

La diversitat d'haplotips en el grup d'espècies amenaçades no presenta una distribució normal ( $p\text{-value}=0.0018$ ), però el de no amenaçades sí ( $p\text{-value}=0.126$ ). Segons el test de Wilcoxon, les mitjanes de diversitat d'haplotips dels dos no eren significativament diferents ( $W=133$ ,  $p\text{-value}=0.2618$ )(Figura 10).

Per la diversitat nucleotídica, les espècies no amenaçades no presenta una distribució normal ( $p\text{-value}<0.001$ ) mentre que el grup d'amenaçades sí ( $p\text{-value}=0.360$ ) segons el test Shapiro-Wilk. El test Wilcoxon va determinar que el grup d'espècies no amenaçades té valors de diversitat nucleotídica significativament superiors al grup d'espècies amenaçades ( $p\text{-value}=0.039$ )(Figura 10).

**Figura 10:** Distribucions dels índex de diversitat diversitat haplotípica (esquerra) i diversitat nucleotídica (dreta) de les dades de Cyt B en funció del seu grup d'amenaça.

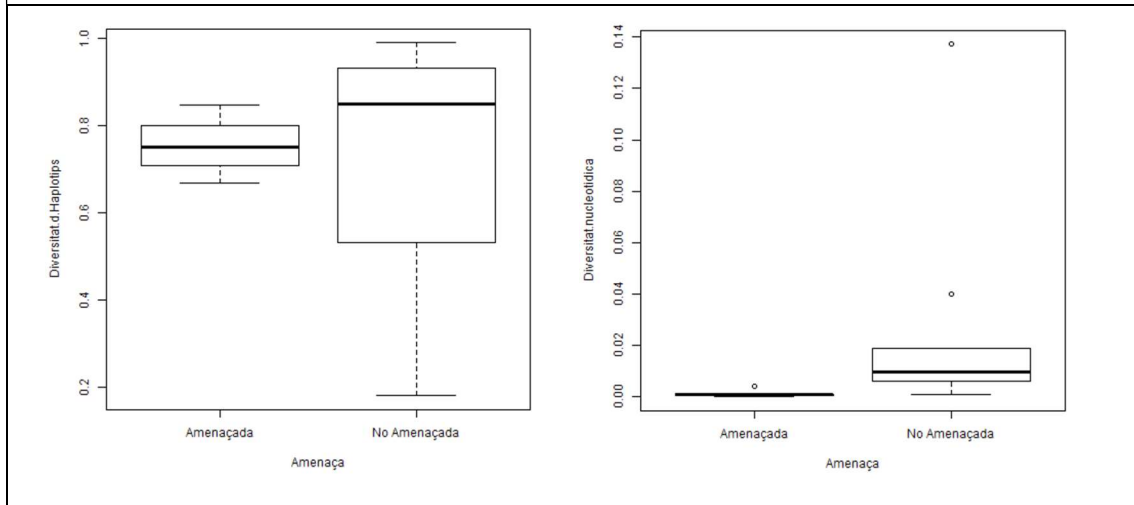


### 5.3.2 ARN Ribosòmic

També s'han treballat independent les dades obtingudes en els treballs que fan servir els gens de rRNA ribosòmic per comparar els índex de diversitat entre els grups d'espècies amenaçades i no amenaçades. Hi ha 9 espècies en el grup de no amenaçades i 6 en el grup d'amenaçades. La mida mostral i el nombre d'haplotips observats estan també en aquest cas correlacionats ( $t=3.9229$ ,  $df=10$ ,  $p\text{-value}=0.002853$ ) i, per tant, tampoc s'ha usat el nombre d'haplotips com a índex de diversitat.

La diversitat d'haplotips presenten en ambdós grups una distribucions normals (Amenaçades  $p\text{-value}=0.907$ , No amenaçades  $p\text{-valor}=0.1828$ ) i amb homogeneïtat de variàncies ( $F=0.085557$ ,  $\text{num } df=2$ ,  $\text{denom } df=6$ ,  $p\text{-value}=0.1618$ ). El test t va indicar que les mitjanes en els dos grups no eren significativament diferents, tot i que les no amenaçades mostraven una distribució de dades notablement més ampla (Figura 11). La diversitat nucleotídica en cap dels dos grups presentava una distribució normal (Amenaçades  $p\text{-valor}=0.0130$ , no amenaçades  $p\text{-valor}=0.0014$ ). El test Wilcoxon va detectar que els grups eren significativament diferents ( $W=5$ ,  $p\text{-value}=0.007592$ ), sent major la diversitat nucleotídica en el grup d'espècies no amenaçades (Figura 11).

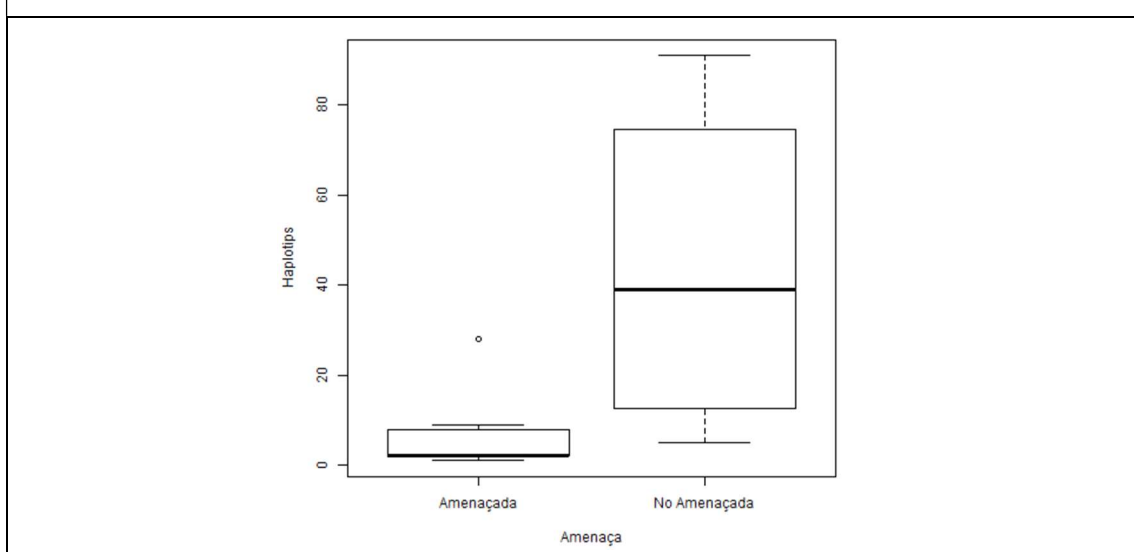
**Figura 11:** Distribucions dels índex de diversitat haplotípica (esquerra) i diversitat nucleotídica (dreta) per a les dades de rRNA en funció del grup d'amenaça.



### 5.3.3 Regió control

Finalment, es van treballar de manera independent les dades obtingudes dels treballs que analitzaven variació en la regió de control o D-Loop, per comparar els índex de diversitat entre les espècies amenaçades i no amenaçades. Hi havia 5 espècies en el grup de no amenaçades i 7 en el grup d'amenaçades. Com que en aquest cas la mida mostral i el nombre d'haplotips no estaven correlacionades ( $t=1.5295$ ,  $df=9$ ,  $p\text{-value}=0.1605$ ) es va afegir el nombre d'haplotips als índexs de diversitat. Aquest índex, nombre d'haplotips (H), va presentar una distribució normal pel grup no amenaçades ( $p\text{-value}=0.7288$ ), però no pel grup d'amenaçades ( $p\text{-value}=0.0066$ ). El test de Wilcoxon no va detectar diferències en el nombre d'haplotips entre les espècies amenaçades i no amenaçades ( $W=4$ ,  $p\text{-value}=0.07$ ), tot i que el grup de no amenaçades tenia una distribució de dades més ampla i una mitjana superior (Figura 12).

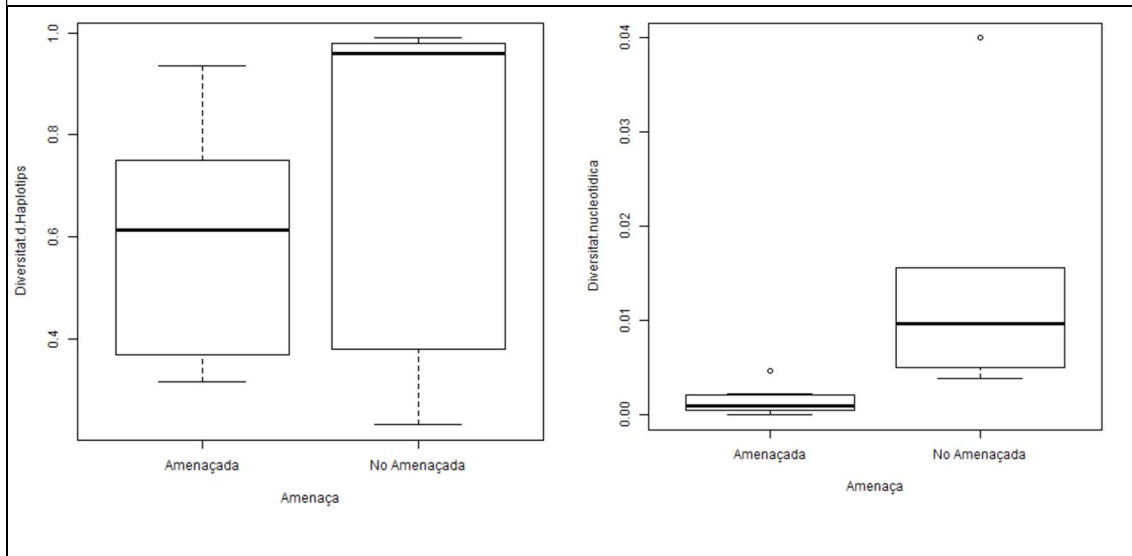
**Figura 12:** Distribució del nombre de Haplotips per a les dades de CR en funció del seu grup d'amenaça.



Respecte la diversitat d'haplotips, ambdós grups presenten distribucions normals (Amenaçades  $p\text{-value}=0.8406$ , No amenaçades  $p\text{-valor}=0.0774$ ) i homogeneïtat de variàncies ( $F=0.3993$ , num

df=5, denom df=4, p-value=0.3413). El test t va determinar que no eren significativament diferents ( $t=-0.58937$ , df=9, p-value=0.5701), tot i que és major la mitjana del grup No amenaçades (Figura 13). Per la diversitat nucleotídica, també ambdós grups presentaven distribucions normals (Amenaçades p-valor=0.1756, No amenaçades p-valor=0.1756) i homogeneïtat de variàncies ( $F=0.39934$ , num df=5, denom df=4, p-value=0.3413). Però per aquest índex, el test t va determinar que els grups eren significativament diferents ( $t=-2.403$ , df=10, p-value=0.03713), sent major la diversitat nucleotídica en les espècies no amenaçades, a més de presentar una distribució de valors més àmplia (Figura 13).

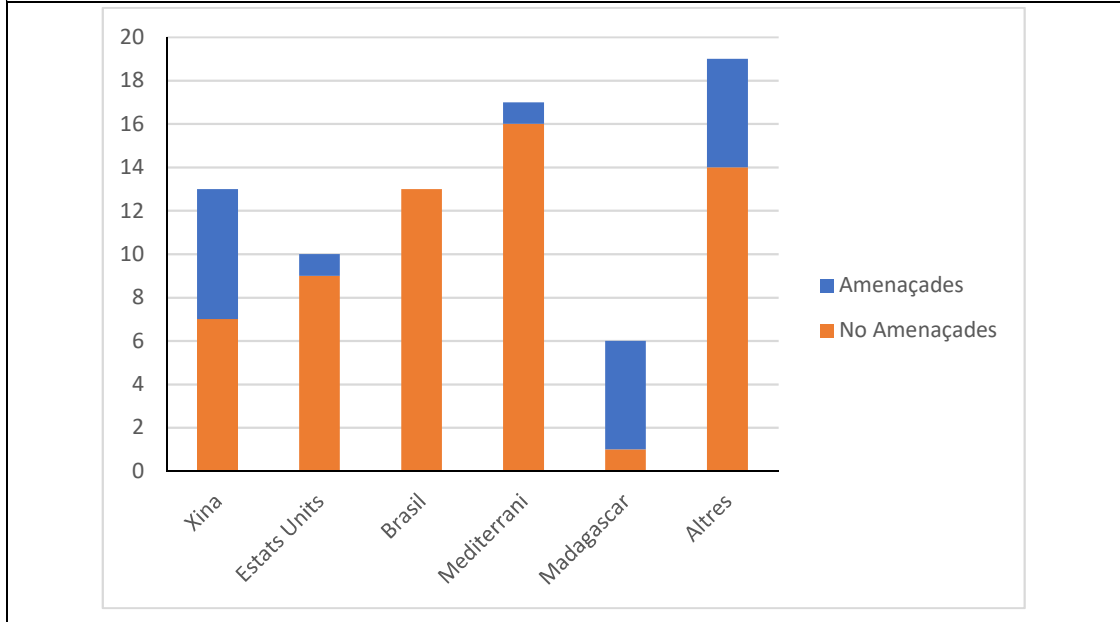
**Figura 13:** Distribucions dels índex de diversitat diversitat haplotípica (esquerra) i diversitat nucleotídica (dreta) per a les dades de CR en funció del grup d'amenaça.



#### 5.4 Comparació per països

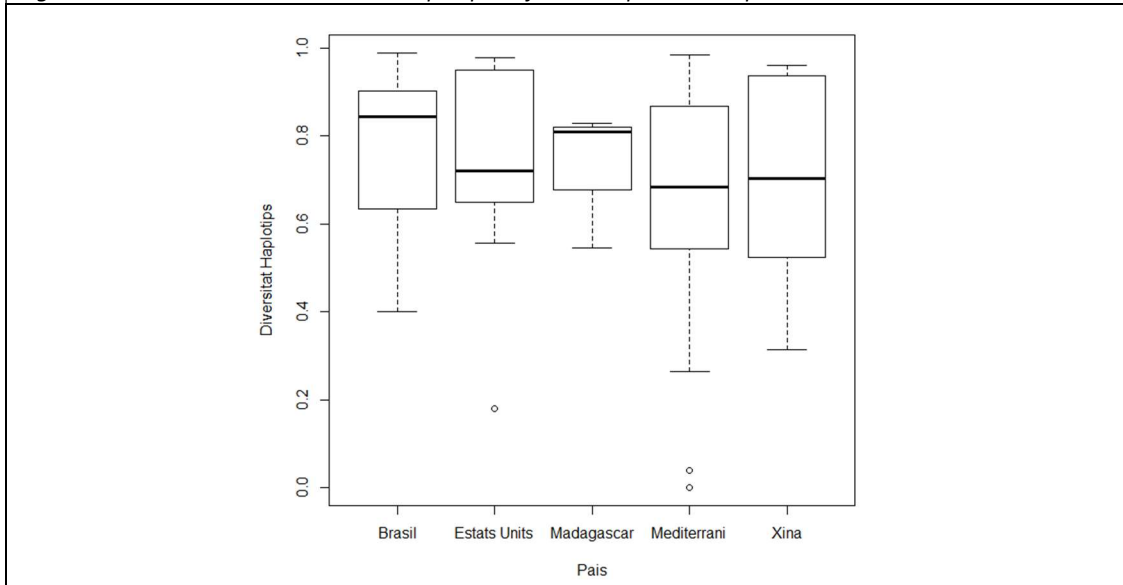
Les dades revisades sobre diversitat en espècies d'amfibis provenen de 21 països diferents (Taula 2). La zona del Mediterrani (inclou: Tunísia, Grècia, Itàlia, França, Azerbaidjan i la zona dels Balcans) és capdavantera amb 17 espècies estudiades, però només una d'amenaçada (Figura 14). El test Khi-quadrat suggereix que no tots els països distribueixen per igual els estudis entre espècies amenaçades i no amenaçades ( $\chi^2$ -squared=23.741, df=5, p-value=0.0002434). Així, per exemple, els països amb major nombre d'espècies estudiades han estat la Xina i el Brasil amb 13 espècies, però només la Xina presenta un nombre similar de dades per espècies amenaçades (6) i no amenaçades (7). Madagascar és el país amb la proporció més alta d'espècies amenaçades estudiades, 5 de les 6.

**Figura 14:** Nombre d'espècies estudiades en els principals països, discriminant per el seu estat d'amenaça. Dins el grup altres s'inclouen els següents països: Azerbaidjan, Canada, Xile, Costa Rica, Equador, Iran, Japó, Corea, Mèxic, Portugal, Puerto Rico i Sud Àfrica.



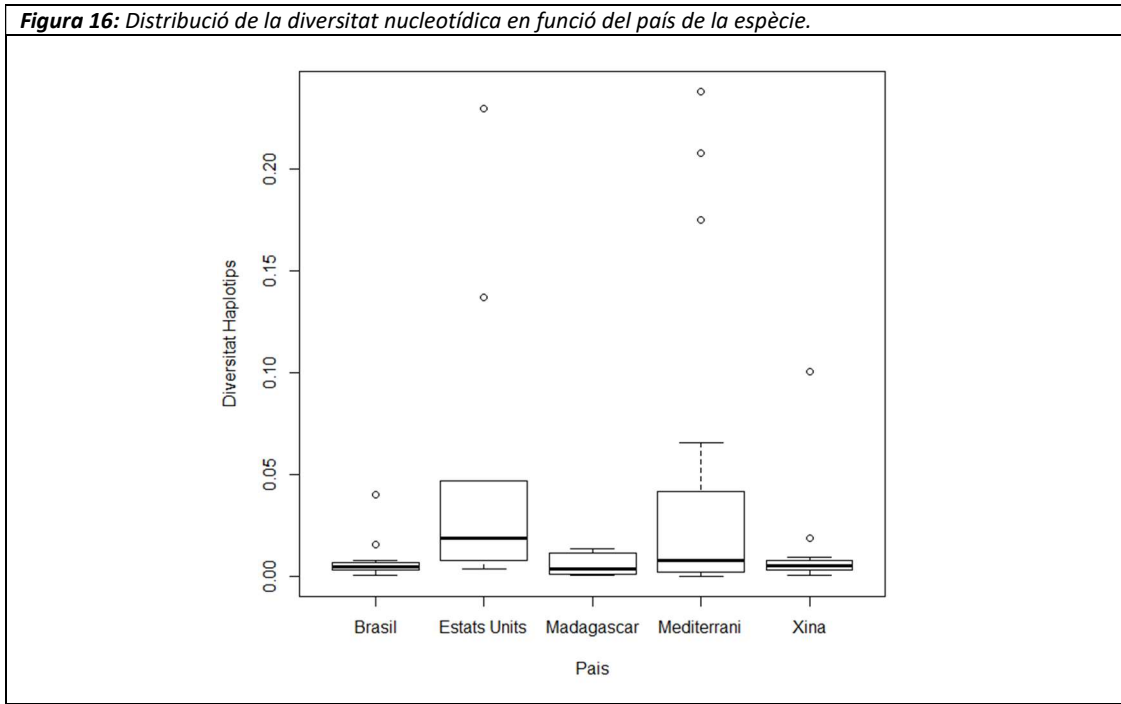
La diversitat haplotípica presentava una distribució normal per a tots els països (Brasil p-valor=0.235, Estats Units p-valor=0.235, Madagascar p-valor=0.235, Mediterrani p-valor=0.166, Xina p-valor=0.235 (p-valors ajustats segons el mètode de Holm)). El test de Bertlett per la homogeneïtat de variàncies va indicar homogeneïtat de variàncies en tots aquests territoris (Bartlett's K-squared = 2.923, df = 4, p-value = 0.5708) i l'ANOVA va determinar que tots ells presentaven una diversitat haplotípica (Figura 15) semblant (df=4, F-value=0,49, p-value=0.743).

**Figura 15:** Distribució de la diversitat d'haplotips en funció del país de la espècie.



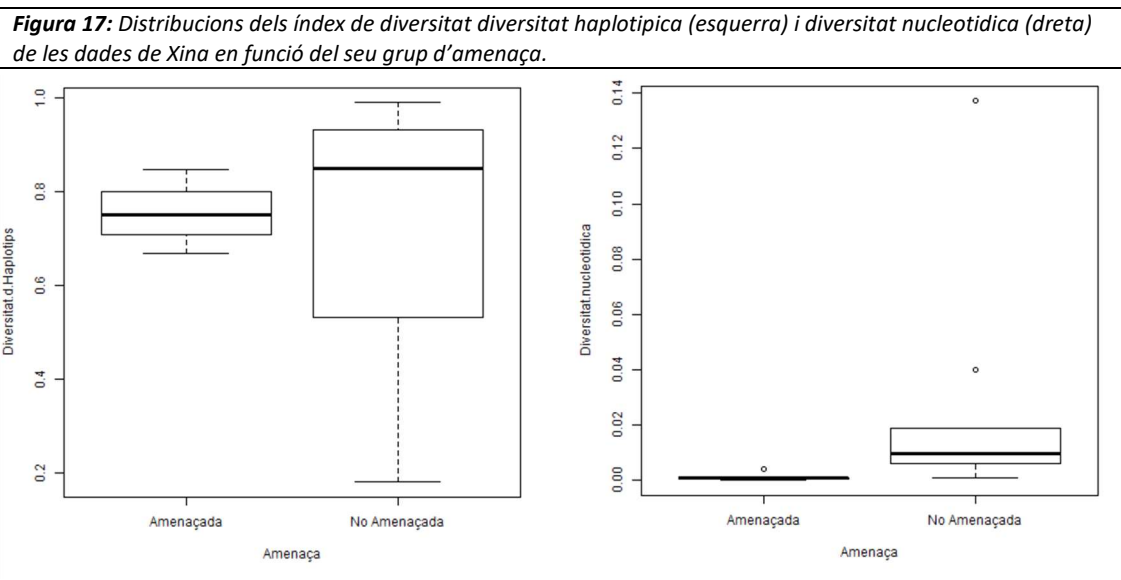
En relació a la diversitat, els test de Shapiro-Wilk només van indicar ajustament a la distribució normal a les dades de les espècies de Madagascar (p-valor=0.1819), mentre que els demés no la presenten (Brasil p-valor=0.0003, Estats Units p-valor=0.00364, Mediterrani p-valor=0.00014, Xina p-valor<0.0001). El test de Kruskal-Wallis va determina que la diversitat nucleotídica

tampoc era significativament diferent entre els territoris (Figura 16) (Kruskal-Wallis  $\chi^2$ -squared = 6.9727, df = 4, p-value = 0.1373).



### 5.4.1 Xina

La Xina era l'únic territori amb un nombre petit, però suficient, d'espècies amenaçades i no amenaçades per poder fer comparacions entre aquest dos grups en relació als índexs de diversitat. Els resultats confirmen el patró general, la diversitat d'haplòtíps no era significativament diferent entre espècies amenaçades i no amenaçades ( $t=-1.2338$ ,  $df=11$ ,  $p$ -value=0.243), però la diversitat nucleotídica era superior per les espècies no amenaçades ( $W=6$ ,  $p$ -value=0.03497) (Figura 17).



## 6. Discussió

Els amfibis són el grups d'animals cordats del que més espècies s'han extingit aquestes últimes dècades (Baillie et al., 2004; Beebee & Griffiths, 2005) i l'IUCN estima que un 40% de les espècies d'amfibis estan amenaçades. Tot i això, de la revisió efectuada dels treballs publicats fins al 2018 que fan servir variació en el mtDNA, només un 25% de les espècies estudiades estaven catalogades dins de la categoria d'amenaçades.

Quan el nombre d'espècies, de les que es disposaven dades, era gran, el nombre d'haplotips (H) ha estat sempre correlacionat amb la mida mostral de forma que no s'ha utilitzat com a indicador per comparar la diversitat genètica degut a que les conclusions podrien estar esbiaixades per les diferències en la grandària mostral entre els diferents treballs revisats. En les anàlisis amb grups més petits, com el dels treballs que fan servir variació en la regió de control, no s'ha detectat correlació entre ambdues variables i s'ha pogut fer la comparació amb aquest índex, que no ha detectat diferències entre espècies llistades com amenaçades i no amenaçades a la llista vermella de la IUCN.

Tenint en compte totes les dades de la revisió, l'índex de diversitat haplotípica no és significativament diferent entre el grup d'espècies amenaçades i no amenaçades, tot i que el grup d'espècies no amenaçades presenta rangs de valors i mitjanes superiors. Algunes espècies llistades com no amenaçades tenen molts baixos nivells de diversitat haplotípica, el que suggereix una alta sensibilitat a futures perturbacions. La diversitat nucleotídica sí que ha estat significativament inferior en les espècies amenaçades. Aquests patró de no diferenciació en la diversitat haplotípica però sí en la nucleotídica, sembla complir-se per tots els gens mitocondrial, independentment de si la seva funció és codificar per proteïnes (cas de la *Cytb*), per gens ribosomals o per la regió de control, que és una regió del mtDNA amb regions hipervariables (Howell et al., 2007). En aquest sentit, sorprèn que la regió de control presenti en aquesta revisió una distribució de valors més estreta i amb menys atípics que les altres regions estudiades (Figura 13). Aquest resultat podria ser degut a que, en proporció, la regió de control té menys dades que les altres i, en particular, molt poques són d'espècies no amenaçades.

La degradació i pèrdua d'habitat és l'amenaça que afecta de forma majoritària a amfibis (WWF, 2018) i redueix les poblacions i les aïlla. Les poblacions reduïdes pateixen un coll d'ampolla i són, per tant, propenses a la pèrdua de diversitat genètica; alhora, l'aïllament no permet l'entrada de material genètic des de les altres poblacions. D'altra banda, situacions com la fragmentació de poblacions, altes mortalitats per malalties i catàstrofes, o la introducció d'espècies invasores poden reduir dràsticament la població provocant nous colls d'ampolla que redueixen encara més la diversitat genètica. La menor diversitat nucleotídica de les espècies amenaçades podria ser explicada per aquest factor i suggereix que aquest índex és més sensible als colls d'ampolla que la diversitat haplotípica.

El càlcul de diversitat haplotípica incorpora exclusivament les freqüències dels haplotips. Els colls d'ampolla provoquen la pèrdua d'al·lels, però els al·lels que es mantenen després del coll d'ampolla augmenten la seva freqüència i com ha resultat, índexs com la diversitat haplotípica o la heterozigosi esperada, són poc sensibles a la pèrdua dels al·lels (Leberg, 1992). La diversitat nucleotídica considera no només les freqüències dels haplotips, sinó també les diferències nucleotídiques entre ells. El fet que aquest índex sigui menor en les espècies amenaçades suggereix que les pèrdues d'haplotips han estat importants i només hi trobem aquells que es van mantenir. També en podem trobar de nous produïts per un o pocs canvis nucleotídics respecte dels que es van mantenir després del coll d'ampolla. Les espècies no amenaçades



incorporen haplotips produïts al llarg de tota la història evolutiva de les seves poblacions que poden presentar moltes més substitucions nucleotídiques.

Els països i territoris que presentaven major nombre d'espècies estudiades (Figura 14) coincideixen amb els països on habiten més nombre d'espècies d'amfibis segons les dades de la IUCN. El Mediterrani és la regió amb més espècies estudiades, tot i això només una d'amenaçada. Xina i Brasil estan, ambdues, al capdavant en nombre d'espècies treballades. Ambdós països tenen zones d'alta biodiversitat com són la selva amazònica (Ortiz et al., 2018; Simões et al., 2012) o l'altiplà tibetà (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2013). En la nostra revisió, Madagascar és capdavantera en l'estudi d'espècies amenaçades; tot i això, només s'han realitzat estudis de 5 de les 145 espècies amenaçades d'amfibis que s'atribueixen només a aquest país (IUCN, 2019). En cap dels països revisats, els amfibis presentaven major diversitat haplotípica o nucleotídica. Això suggereix que, tot i les diferents espècies d'amfibis que els habiten, les seves històries evolutives són semblants, el que implica que les amenaces, tot i poder ser diferents a cada territori, els han afectat de manera similar.

### 6.1 Reflexió ètica

Aquest Treball Final de Grau és una revisió dels treballs publicats sobre els nivells de diversitat genètica en les poblacions d'amfibis. Com a treball de revisió bibliogràfica s'han emmagatzemat i consultat tots els articles digitalment, estalviant al màxim el consum de paper durant l'execució del treball. En quant als resultats del treball, i considerant que la major part dels treballs publicats que s'han revisat són posteriors al 2004 -any en que els amfibis van a passar a ser el grup animal amb major proporció d'espècies llistades com a amenaçades a la UICN (40% aproximadament)-, sorprèn que només 21 (25%) de les 62 espècies estudiades en aquesta revisió siguin amenaçades. Països econòmicament importants com els Estats Units, França i Itàlia (en la regió mediterrània), o que contenen *hot-spots* de diversitat com el Brasil, han estudiat sobretot la diversitat genètica en espècies no amenaçades. Sembla que no s'estigui donant atenció a les espècies que més ho requereixen. Tanmateix, les tècniques actuals per l'estudi del DNA permeten obtenir dades de diversitat de forma poc invasiva. És per aquest motiu que es poden estudiar espècies amenaçades sense que el nombre d'efectius de les poblacions vulnerables es vegi afectat. Crec que per tot això s'haurien de dedicar recursos i estudis futurs sobre aquestes espècies.

## 7. Conclusions

Despite amphibians are the *Cordata* group with the highest proportion of endangered species (40%), in this review on already available genetic diversity for amphibian species from mtDNA markers, the proportion of threatened species studied so far is low (25%).

The number of haplotypes was related with the sample size of the studied populations; therefore, this index is unsuitable to compare genetic diversity levels among studies.

According to this review, the nucleotide diversity is more sensitive to population declines than haplotype diversity. Lower nucleotide diversity was observed in threatened amphibian species, irrespective of the applied mtDNA marker or studied country.

Even if the average diversity is high in non-threatened species, the distribution of values is wide, implying that there are some species not listed as threatened that may be easily threatened by future perturbations.

## 8. Bibliografia

- Baillie, J. E. M., Hilton-taylor, C., & Stuart, S. N. (2004). *ICUN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment*. Cambridge, UK: IUCN Publications Services Unit.
- Barker, B. S., Waide, R. B., & Cook, J. A. (2011). Deep intra-island divergence of a montane forest endemic: Phylogeography of the Puerto Rican frog *Eleutherodactylus portoricensis* (Anura: Eleutherodactylidae). *Journal of Biogeography*, *38*(12), 2311-2325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02578.x>
- Bayer, C. S. O., Sackman, A. M., Bezold, K., Cabe, P. R., & Marsh, D. M. (2012). Conservation genetics of an endemic mountaintop salamander with an extremely limited range. *Conservation Genetics*, *13*(2), 443-454. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0297-7>
- Beddek, M., Zenboudji-Beddek, S., Geniez, P., Fathalla, R., Sourouille, P. et al. (2018). Comparative phylogeography of amphibians and reptiles in Algeria suggests common causes for the east-west phylogeographic breaks in the maghreb. *PLoS ONE*, *13*(8), 1-26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201218>
- Beebee, T., & Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, *125*(3), 271-285. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>
- Beebee, T. J. C. (2005). Conservation genetics of amphibians. *Heredity*, *95*(6), 423-427. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800736>
- Bisconti, R., Canestrelli, D., Colangelo, P., & Nascetti, G. (2011). Multiple lines of evidence for demographic and range expansion of a temperate species (*Hyla sarda*) during the last glaciation. *Molecular Ecology*, *20*(24), 5313-5327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05363.x>
- Bisconti, R., Canestrelli, D., & Nascetti, G. (2013). Has Living on Islands Been So Simple? Insights from the Insular Endemic Frog *Discoglossus montalentii*. *PLoS ONE*, *8*(2), e55735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055735>
- Bisconti, R., Canestrelli, D., Salvi, D., & Nascetti, G. (2013). A geographic mosaic of evolutionary lineages within the insular endemic newt *Euproctus montanus*. *Molecular Ecology*, *22*(1), 143-156. <https://doi.org/10.1111/mec.12085>
- Brown, T. A. (2008). *Genomas*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Brunes, T. O., Sequeira, F., Haddad, C. F. B., & Alexandrino, J. (2010). Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *57*(3), 1120-1133. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2010.08.026>
- Brusquetti, F., Netto, F., Baldo, D., & Haddad, C. F. B. (2018). What happened in the South American Gran Chaco? Diversification of the endemic frog genus *Lepidobatrachus* Budgett, 1899 (Anura: Ceratophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *123*(February), 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.010>
- Canestrelli, D., Bisconti, R., Sacco, F., & Nascetti, G. (2014). What triggers the rising of an intraspecific biodiversity hotspot? Hints from the agile frog. *Scientific Reports*, *4*, 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep05042>
- Canestrelli, D., & Nascetti, G. (2008). Phylogeography of the pool frog *Rana* (*Pelophylax*) *lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography*, *35*(10), 1923-1936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01946.x>

- Canestrelli, D., Sacco, F., & Nascetti, G. (2012). On glacial refugia, genetic diversity, and microevolutionary processes: Deep phylogeographical structure in the endemic newt *Lissotriton italicus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, *105*(1), 42-55. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01767.x>
- Chen, S. Y., Zhang, Y. J., Wang, X. L., Sun, J. Y., Xue, Y. et al. (2012). Extremely low genetic diversity indicating the endangered status of *Ranodon sibiricus* (amphibia: Caudata) and implications for phylogeography. *PLoS ONE*, *7*(3), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033378>
- Chiocchio, A., Bisconti, R., Zampiglia, M., Nascetti, G., & Canestrelli, D. (2017). Quaternary history, population genetic structure and diversity of the cold-adapted Alpine newt *Ichthyosaura alpestris* in peninsular Italy. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-12. <https://doi.org/10.11263/jsotp1982.2.107>
- Crawford, A. J. (2003). Huge populations and old species of Costa Rican and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, *12*(10), 2525-2540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01910.x>
- D'Aoust-Messier, A. M., & Lesbarrères, D. (2015). A peripheral view: Post-glacial history and genetic diversity of an amphibian in northern landscapes. *Journal of Biogeography*, *42*(11), 2078-2088. <https://doi.org/10.1111/jbi.12578>
- Dufresnes, C., Lymberakis, P., Kornilios, P., Savary, R., Perrin, N., & Stöck, M. (2018). Phylogeography of Aegean green toads (*Bufo viridis* subgroup): Continental hybrid swarm vs. insular diversification with discovery of a new island endemic. *BMC Evolutionary Biology*, *18*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1179-0>
- Elmer, K. R., Dávila, J. A., & Loughheed, S. C. (2007). Applying new inter-individual approaches to assess fine-scale population genetic diversity in a neotropical frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. *Heredity*, *99*, 506-515. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801025>
- Evans, B. J., Morales, J. C., Picker, M. D., Kelley, D. B., & Melnick, D. J. (1997). Comparative molecular phylogeography of two *Xenopus* species, *X. gilli* and *X. laevis*, in the south-western Cape Province, South Africa. *Molecular Ecology*, *6*(4), 333-343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00198.x>
- Fijarczyk, A., Nadachowska, K., Hofman, S., Litvinchuk, S. N., Babik, W. et al. (2011). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Molecular Ecology*, *20*(16), 3381-3398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05175.x>
- Fitzpatrick, S. W., Brasileiro, C. A., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2009). Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, *18*(13), 2877-2896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04245.x>
- Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, *14*(9), 1-42.
- Fox, J., & Bouchet-Valat, M. (2019). Rcmdr: R Commander.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, *126*(2), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. New York : Cambridge University Press.
- Freake, M., O'Neill, E., Unger, S., Spear, S., & Routman, E. (2018). Conservation genetics of

- eastern hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis* in the Tennessee Valley. *Conservation Genetics*, 19(3), 571-585. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1033-8>
- Gallardo, C. E., Hernández, H. J., Diniz-Filho, J. A. F., Palma, R. E., Méndez, M. A., & Gallardo, A. L. (2011). *Relationship between the genetic structure of the Andean toad *Rhinella spinuloda* (Anura: Bufonidae) and the northern Chile landscape*. *Revista Chilena de Historia Natural* (Vol. 84). Recuperat de [https://repositorio.bc.ufg.br/xmlui/bitstream/handle/ri/11761/Artigo - Carolina E. Gallardo - 2011.pdf?sequence=5&isAllowed=y](https://repositorio.bc.ufg.br/xmlui/bitstream/handle/ri/11761/Artigo%20-%20Carolina%20E.%20Gallardo%20-%202011.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
- Griffiths, A. J. F. (2008). *Genética* (9a ed.). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Hauswaldt, J. S., Angelini, C., Gehara, M., Benavides, E., Polok, A., & Steinfartz, S. (2014). From species divergence to population structure: A multimarker approach on the most basal lineage of Salamandridae, the spectacled salamanders (genus *Salamandrina*) from Italy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.08.015>
- Hendrix, R., Fleck, J., Schneider, W., Schneider, C., Geller, D. et al. (2014). First comprehensive insights into nuclear and mitochondrial DNA based population structure of Near East mountain brook newts (Salamandridae: Genus *Neurergus*) suggest the resurrection of *Neurergus derjugini*. *Amphibia Reptilia*, 35(2), 173-187. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002939>
- Howell, N., Elson, J. L., Howell, C., & Turnbull, D. M. (2007). Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 24(10), 2213-2221. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm147>
- Huang, Z. S., Yu, F. L., Gong, H. S., Song, Y. L., Zeng, Z. G., & Zhang, Q. (2017). Phylogeographical structure and demographic expansion in the endemic alpine stream salamander (Hynobiidae: *Batrachuperus*) of the Qinling Mountains. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01799-w>
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. Recuperat 21 maig 2019, de [https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Summary Tables](https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Summary%20Tables)
- Iwai, N., & Shoda-Kagaya, E. (2012). Population structure of an endangered frog (*Babina subaspera*) endemic to the Amami Islands: Possible impacts of invasive predators on gene flow. *Conservation Genetics*, 13(3), 717-725. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0320-7>
- Jancovich, J. K., Davidson, E. W., Frank Morado, J., Jacobs, B. L., & Collins, J. P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(3), 161-167. <https://doi.org/10.3354/dao031161>
- Jang, Y., Hahm, E. H., Lee, H.-J., Park, S., Won, Y.-J., & Choe, J. C. (2011). Geographic Variation in Advertisement Calls in a Tree Frog Species: Gene Flow and Selection Hypotheses. *PLoS ONE*, 6(8), e23297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023297>
- Kakehashi, R., Igawa, T., & Sumida, M. (2015). Genetic population structure and demographic history of an endangered frog, *Babina holsti*. *Conservation Genetics*, 16(4), 987-1000. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0718-0>
- Kuchta, S. R., Brown, A. D., Converse, P. E., & Highton, R. (2016). Multilocus phylogeography and species delimitation in the Cumberland plateau salamander, *Plethodon kentucki*: Incongruence among data sets and methods. *PLoS ONE*, 11(3), e0150022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150022>
- Leberg, P. L. (1992). Effects of Population Bottlenecks on Genetic Diversity as Measured By Allozyme. *Evolution*, 46(2), 477-494.

- Li, J., Zhao, M., Wei, S., Luo, Z., & Wu, H. (2015). Geologic events coupled with Pleistocene climatic oscillations drove genetic variation of Omei treefrog (*Rhacophorus omeimontis*) in southern China. *BMC Evolutionary Biology*, *15*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0572-1>
- Li, Y., Wu, X., Zhang, H., Yan, P., Xue, H., & Wu, X. (2015). Vicariance and its impact on the molecular ecology of a Chinese ranid frog species-complex (*Odorrana schmackeri*, Ranidae). *PLoS ONE*, *10*(9), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138757>
- Liu, J., Wang, C., Fu, D., Hu, X., Xie, X. et al. (2015). Phylogeography of *Nanorana parkeri* (Anura: Ranidae) and multiple refugia on the Tibetan Plateau revealed by mitochondrial and nuclear DNA. *Scientific Reports*, *5*, 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep09857>
- Lobos, G., Mendez, M. A., & Cattán, P. (2014). Studies on Neotropical Fauna and Environment Low genetic diversity of the successful invasive African clawed frog *Xenopus laevis* ( Pipidae ) in Chile, *49*(March 2015), 37-41. <https://doi.org/10.1080/01650521.2014.912865>
- Makowsky, R., Chesser, J., & Rissler, L. J. (2009). A striking lack of genetic diversity across the wide-ranging amphibian *Gastrophryne carolinensis* (Anura: Microhylidae). *Genetica*, *135*(2), 169-183. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9267-5>
- Martínez-Solano, I., & Lawson, R. (2009). Escape to Alcatraz: evolutionary history of slender salamanders (*Batrachoseps*) on the islands of San Francisco Bay, *9*(38). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-38>
- Matson, C. W., Lambert, M. M., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L. et al. (2006). Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environmental Health Perspectives*, *114*(4), 547-552. <https://doi.org/10.1289/ehp.8404>
- Measey, G. J., & Tolley, K. A. (2011). Investigating the cause of the disjunct distribution of *Amietophrynus pantherinus*, the Endangered South African western leopard toad. *Conservation Genetics*, *12*(1), 61-70. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9989-7>
- Menezes, L., Canedo, C., Batalha-Filho, H., Garda, A. A., Gehara, M., & Napoli, M. F. (2016). Multilocus phylogeography of the treefrog *scinax eurydice* (Anura, Hylidae) reveals a plio-pleistocene diversification in the atlantic forest. *PLoS ONE*, *11*(6), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154626>
- Meng, H., Li, X., & Qiao, P. (2014). Population structure, historical biogeography and demographic history of the alpine toad *Scutigera ningshanensis* in the tsinling mountains of central China. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100729>
- Nascimento, A. C., Chaves, A. V., Fortes Leite, F. S., 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*(11), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206732>
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York : Columbia University Press.
- Newman, C. E., & Rissler, L. J. (2011). Phylogeographic analyses of the southern leopard frog: the impact of geography and climate on the distribution of genetic lineages vs. subspecies. *Molecular Ecology*, *20*(24), 5295-5312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05353.x>
- Oliveira, E. F., Gehara, M., São-Pedro, V. A., Costa, G. C., Burbrink, F. T. et al. (2018). Phylogeography of Muller's termite frog suggests the vicariant role of the Central Brazilian Plateau. *Journal of Biogeography*, *45*(11), 2508-2519. <https://doi.org/10.1111/jbi.13427>

- Ortiz, D. A., Lima, A. P., & Werneck, F. P. (2018). Environmental transition zone and rivers shape intraspecific population structure and genetic diversity of an Amazonian rain forest tree frog. *Evolutionary Ecology*, 32(4), 359-378. <https://doi.org/10.1007/s10682-018-9939-2>
- Pabijan, M., Wollenberg, K. C., & Vences, M. (2012). Small body size increases the regional differentiation of populations of tropical mantellid frogs (Anura: Mantellidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 25(11), 2310-2324. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02613.x>
- Pabijan, M., Brown, J. L., Chan, L. M., Rakotondravony, H. A., Raselimanana, A. P. et al. (2015). Phylogeography of the arid-adapted Malagasy bullfrog, *Laliostoma labrosum*, influenced by past connectivity and habitat stability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.05.018>
- Pan, T., Wang, H., Hu, C.C., Shi, W.B., Zhao, K., Huang, X., & Zhang, B.W. (2014). Range-wide phylogeography and conservation genetics of a narrowly endemic stream salamander, *Pachyhynobius shangchengensis* (Caudata, Hynobiidae): implications for conservation. *Genetics and Molecular Research*, 13(AOP), 2873-2885. <https://doi.org/10.4238/2014.February.13.9>
- Parra-Olea, G., Windfield, J. C., Velo-Antón, G., & Zamudio, K. R. (2012). Isolation in habitat refugia promotes rapid diversification in a montane tropical salamander. *Journal of Biogeography*, 39(2), 353-370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02593.x>
- Prado, C. P. A., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2012). Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular Ecology*, 21(4), 921-941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05409.x>
- Pröhl, H., Ron, S. R., & Ryan, M. J. (2010). Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American tngara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 6-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-146>
- Reis, D. M., Cunha, R. L., Patrão, C., Rebelo, R., & Castilho, R. (2011). *Salamandra salamandra* (Amphibia: Caudata: Salamandridae) in Portugal: not all black and yellow. *Genetica*, 139(9), 1095-1105. <https://doi.org/10.1007/s10709-011-9609-6>
- Riberon, A., Sotiriou, E., Miaud, C., Andeone, F., & Taberlet, P. (2002). Lack of Genetic Diversity in *Salamandra lanzai* Revealed by Cytochrome B Gene Sequences. *Copeia*, 2002(1), 229-232. [https://doi.org/https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0229:LOGDIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0229:LOGDIS]2.0.CO;2)
- Simões, P. I., Lima, A. P., & Farias, I. P. (2012). Restricted natural hybridization between two species of litter frogs on a threatened landscape in southwestern Brazilian Amazonia. *Conservation Genetics*, 13(4), 1145-1159. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0362-x>
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Team, R. C. (2019). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Vences, M., Chiari, Y., Raharivololoniaina, L., & Meyer, A. (2004). High mitochondrial diversity within and among populations of Malagasy poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2), 295-307. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00217-3](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00217-3)
- Vidal, M. A., Ibáñez, S., Moreno, P. I., & Poulin, E. (2016). Phylogeography of a Patagonian lizard and frog: Congruent signature of southern glacial refuges. *Austral Ecology*, 41(4), 405-414. <https://doi.org/10.1111/aec.12325>
- Walker, S. F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T. W. J., Cunningham, A. A. et al. (2010). Factors driving

- pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, 13(3), 372-382. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01434.x>
- Wang, H., Luo, X., Meng, S., Bei, Y., Song, T. et al. (2015). The phylogeography and population demography of the Yunnan caecilian (*Ichthyophis bannanicus*): Massive rivers as barriers to gene flow. *PLoS ONE*, 10(4), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125770>
- Wang, S., Fan, L., Liu, C., Li, J., Gao, X., Zhu, W., & Li, Y. (2017). The origin of invasion of an alien frog species in Tibet, China. *Current Zoology*, 63(6), 615-621. <https://doi.org/10.1093/cz/zow117>
- Wood, D. A., Vandergast, A. G., Barr, K. R., Inman, R. D., Esque, T. C., Nussear, K. E., & Fisher, R. N. (2013). Comparative phylogeography reveals deep lineages and regional evolutionary hotspots in the Mojave and Sonoran Deserts. *Diversity and Distributions*, 19(7), 722-737. <https://doi.org/10.1111/ddi.12022>
- Wooten, J. A., & Rissler, L. J. (2011). Ecological associations and genetic divergence in *Desmognathus quadramaculatus*. *Acta Herpetologica*, 6(2), 175-208. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13128/Acta\\_Herpetol-9317](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9317)
- WWF. (2018). *Living Planet Report 2018: Aiming higher*. WWF International, England
- WWF International. (2016). *Living Planet Report 2016: Risk and resilience in a new era*. WWF International, England.
- Yang, J., Chen, C. S., Chen, S. H., Ding, P., Fan, Z. Y. et al. (2016). Population genetic structure of critically endangered salamander (*Hynobius amjiensis*) in China: recommendations for conservation. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-13. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027733>
- Yu, G., Zhang, M., Rao, D., & Yang, J. (2013). Effect of Pleistocene Climatic Oscillations on the Phylogeography and Demography of Red Knobby Newt (*Tylototriton shanjing*) from Southwestern China. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056066>
- Zhang, M., Yu, G., Yang, M., Li, Y., Wei, J. et al. (2013). Mitochondrial phylogeography of the red-tailed knobby newt (*Tylototriton kweichowensis*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.08.008>
- Zhou, W., Yan, F., Fu, J., Wu, S., Murphy, R. W., Che, J., & Zhang, Y. (2013). River islands, refugia and genetic structuring in the endemic brown frog *Rana kukunoris* (Anura, Ranidae) of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molecular Ecology*, 22(1), 130-142. <https://doi.org/10.1111/mec.12087>