

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

SAMA BEATRIZ KUHN

Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)

SAMA BEATRIZ KUHN

Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

K96e Kuhn, Sama Beatriz
Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR) / Sama Beatriz Kuhn. -- Maringá, 2014. 68 f. : il. col., figs.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, 2014.

1. Anuros - Estrutura genética. 2. Anuros - Heteroplasmia - Marcador mitocondrial (*D-loop*). 3. Anuros - Reprodução - Bromélias. 4. Anuros - ISSR - Diversidade genética - Fluxo gênico. I. Margarido, Vladimir Pavan, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada . III. Título.

CDD 21.ed.597.878

Zss-01488

FOLHA DE APROVAÇÃO

SAMA BEATRIZ KUHN

Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido
Universidade Estadual de Maringá e Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dra. Sônia Maria Alves Pinto Prioli
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2014.

Local de defesa: Sala 214, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para superar todas as dificuldades.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada, pela oportunidade deste trabalho se tornar realidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização para a captura dos anfíbios.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária) e à CAPES, por terem financiado este trabalho.

Ao meu orientador, professor doutor Vladimir Pavan Margarido, pelo seu incentivo, pelos seus ensinamentos, dedicação, confiança, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

À professora Rafaela Maria Moresco, pela dedicação com o meu trabalho (embora não fosse sua obrigação), pelos conselhos, pelas conversas, pela ajuda com as coletas e ensinamento das técnicas. Sempre disposta a ajudar, contribuiu diretamente com a minha formação profissional.

Aos professores, e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Comparada da UEM, em especial ao professor Alberto José Prioli e a professora Sônia Maria Alves Pinto Prioli que abriram as portas do seu laboratório.

Ao professor Thiago Cintra Maniglia, por ter me incentivado a iniciar as pesquisas com Biologia Molecular.

Ainda aos professores Sônia Maria Alves Pinto Prioli e Thiago Cintra Maniglia, que aceitaram compor minha banca de defesa, obrigada pelo tempo dedicado.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular da UEM, pelo carinho com que me receberam, em especial ao Igor Deprá e Luciano Seraphin Gasques pela paciência em me ensinar e à Thaís Fernandes Mendonça, que se tornou uma amiga ao longo desta caminhada.

Às secretárias do PGB, Marcinha e Estela, pela disposição e carinho com que sempre me atenderam.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos menos fáceis. Para não correr o risco de não enumerar algum não vou identificar ninguém, aqueles a quem este agradecimento se dirige sabê-lo-ão, desde já os meus agradecimentos.

Ao Reginaldo Vicente, presente da primeira à última PCR, não mediu esforços para me ajudar em todas as fases de execução deste trabalho. Obrigada pelas conversas, risadas, companheirismo e amizade.

Às amigas Jaqueline Manzatti e Vanessa Tiburcio, pelo apoio que sempre prestaram, vocês tornaram minha estadia em Maringá mais divertida.

À minha família, em especial aos meus pais, Vilson Kuhn e Leonides Maria Kuhn, que nunca mediram amor, dedicação e compreensão, e desde a minha infância incentivaram e ensinaram a importância dos estudos, nada disso seria possível sem o apoio e incentivo de vocês.

Ao meu irmão, Fagner Cazuza Kuhn, pela amizade, pelas conversas, momentos de descontração, amor e paciência.

À minha irmã, Betty Cristiane Kuhn, uma amiga com quem sempre pude contar, me ajudou muito em momentos de dúvida e sempre estava presente para discutir a euforia de novas descobertas.

Ao meu namorado e amigo, Gustavo Gonçalves, pelo amor, compreensão, paciência e apoio durante este período.

E a tantos outros que sempre me acompanharam, meus sinceros agradecimentos.

Estrutura genética de populações de *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) de Bromeliaceae do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)

RESUMO

Os estudos com anuros despertam interesse de diversos pesquisadores devido à presença destes animais em quase todo o planeta, facilidade de manuseio e, principalmente, por eles serem bons indicadores de equilíbrio ecológico. O conhecimento da variabilidade genética e sua distribuição espaço-temporal são fundamentais para uma análise correta da situação e detecção de possíveis ameaças para uma espécie. Nos últimos anos, a integração entre as informações fornecidas por marcadores nucleares e mitocondriais tem se tornado recorrente, já que possuem diferentes taxas de evolução. *Scinax granulatus*, assim como outros anfíbios anuros, tem ampla distribuição e pode ser considerada bioindicadora da qualidade ambiental. Através do uso dos marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e da amplificação do *D-loop* do DNA mitocondrial, este trabalho teve como objetivo determinar a diversidade e estrutura genética de subpopulações de *S. granulatus* de uma lagoa no Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas – PR. Dos 28 indivíduos coletados, os do lado A da lagoa estavam em uma única bromélia (Lado A) (n=8) e os indivíduos do lado B foram divididos em 3 grupos, pois foram coletados em bromélias de diferentes árvores: Lado B – Bromélia 1 (n=10), Lado B – Bromélia 2 (n=5) e Lado B – Bromélia 3 (n=5). A partir da extração do genoma total, o DNA foi analisado pelo marcador nuclear ISSR e o *D-loop* do DNA mitocondrial foi amplificado. O marcador nuclear mostrou-se altamente polimórfico para todas as subpopulações, sendo que 95,02 % da variação genética foi intrapopulacional e 4,98% interpopulacional. Verificou-se a ocorrência de elevado fluxo gênico entre ambos os lados da lagoa, já que não houve diferenciação significativa entre estas subpopulações. O índice de diferenciação genética interpopulacional exibiu valores moderados para a subpopulação Lado B – Bromélia 3 em relação às demais, onde o F_{st} variou de 0,064 a 0,109, o que pode estar relacionado ao comportamento reprodutivo e desenvolvimento destes anfíbios nas bromélias, que constituem excelentes micro-habitats. A amplificação do DNA mitocondrial revelou a existência de três fragmentos com diferentes comprimentos para o *D-loop*, sendo este o primeiro indício da ocorrência de heteroplasmia em anuros neotropicais. Embora ainda sejam necessários estudos mais detalhados, os resultados deste trabalho possibilitarão a elaboração de um plano de manejo adequado para garantir a manutenção dos níveis de diversidade genética de *S. granulatus*.

Palavras-chave: *D-loop*. ISSR. Marcador molecular. Heteroplasmia. Reprodução. Bromélia.

Genetic structure of populations of *Scinax granulatus* (Peters) (Amphibia, Anura) on Bromeliaceae from the Refugio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas (PR)

ABSTRACT

The studies about anuran amphibians have generate interest of several researchers due the presence of these animals in almost the entire planet, its easy handling, and mainly because they are good indicators of ecological balance. The knowledge of the genetic variability status and its spatial and temporal distribution are essential for accurate analysis and detection of potential threats to a species. In the latest years, the integration of information provided by nuclear and mitochondrial markers have become recurrent, since they have different rates of evolution. The *Scinax granulatus*, like other amphibians, is widely distributed and can be considered as bio-indicator of environmental quality. Through the use of molecular markers ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) and amplification of mitochondrial DNA *D-loop*, this study aimed to determine the genetic diversity and population structure of *S. granulatus* on a lagoon at the Refugio de Vida Silvestre dos Campos de Palmas - PR. From the 28 sampled individuals, those one`s from A-side of the lagoon formed a single group (Side A) (n=8), and side B individuals were divided into 3 groups, as they were collected in bromeliads on different tree: Side B - Bromeliad 1 (n= 0), Side B - Bromeliad 2 (n=5) and Side B - Bromeliad 3 (n=5). The total DNA was purified and analyzed by nuclear ISSR marker and the mitochondrial DNA *D-loop* was amplified. The nuclear marker was highly polymorphic in all subpopulations, whereas 95.02% of the genetic variation was intrapopulation and 4.98% interpopulation. There was a high occurrence of gene flow between both sides of the lagoon, since there was no significant differentiation between these subpopulations. The index of interpopulation genetic differentiation exhibited moderate values for the population Side B - Bromeliad 3 in relation to the others, where *Fst* ranged 0.064-0.109, which may be related to reproductive behavior and development of these amphibians in bromeliads, which are excellent micro-habitats. The amplification of mitochondrial DNA *D-loop* showed three fragments of different lengths, which is the first indication of the occurrence of heteroplasmy in neotropical frogs. Although it still need more detailed studies, the results of this research will enable the development of an appropriate management plan in order to ensure the maintenance of the levels of genetic diversity of *S. granulatus*.

Keywords: *D-loop*. ISSR. Molecular marker. Heteroplasmy. Reproduction. Bromeliad.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 Características e aplicações dos principais marcadores mitocondriais.....	21
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 <i>Primers</i> utilizados.....	56
--	----

Tabela 2 Comparação por pares de populações de <i>Scinax granulatus</i> baseada em loci ISSR.....	57
--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 Cadeia respiratória (esquema superior) e DNA mitocondrial humano (esquema inferior). No esquema superior, as moléculas representadas na cor cinza correspondem a subunidades codificadas pelo genoma nuclear, enquanto as que estão indicadas em cores diferentes mostram a correlação com o genoma mitocondrial: subunidades do complexo I = azul; subunidade do complexo III = verde; subunidades do complexo IV = vermelho; subunidades do complexo V = amarelo. Pi = fosfato inorgânico; Cyt c = citocromo c; CoQ = coenzima Q. No esquema inferior, o genoma mitocondrial representando seus genes em cores diferentes: genes para o Complexo I = azul; Cytb, Complexo III = verde; Complexo IV = vermelho; Complexo V = amarelo; tRNA = cinza; rRNA = roxo. Cit b = citocromo b; COI = Complexo I; COII = Complexo II; COIII = Complexo III (ZEVIANI; DONATO, 2004)..... 17

Figura 2 Esquema do DNA mitocondrial de um anfíbio anuro (ZHANG et al., 2009)... 18

Capítulo 2

Figure 1 Gel de agarose com os resultados do marcador ISSR para os 4 *primers*. a: *primer* (ACA)₅G; b: *primer* (GGAC)₄; c: *primer* (GGAC)₃C e *primer* (GGAC)₃T..... 58

Figure 2 Dendograma Neighbor-joining baseado no índice de similariedade de Jaccard com 10.000 permutações..... 59

Figure 3 Gráfico de dispersão com as principais coordenadas baseadas no índice de similaridade de Jaccard. 60

Figura 4 Gel de agarose com o padrão de bandas resultado da amplificação do *D-loop* de *Scinax granulatus*. 61

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
Resumo	13
Introdução	14
Discussão	16
Estrutura da mitocôndria	16
Genoma mitocondrial	18
Desafios na utilização do mtDNA	23
Anuros neotropicais	25
Anuros neotropicais e os marcadores mitocondriais	26
Considerações Finais	29
Referências	31
CAPÍTULO 2	41
Resumo	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	45
Resultados	47
Resultados ISSR	47
Resultados da amplificação do <i>D-loop</i> do mtDNA	47
Discussão	48
Referências	52
ANEXO 1	62
Instruções para autores: Conservation Genetics	62

CAPÍTULO 1

Análises do mtDNA em anuros neotropicais (Amphibia: Anura): estudos evolutivos e populacionais

ANÁLISES DO mtDNA EM ANUROS NEOTROPICAIS (AMPHIBIA: ANURA): ESTUDOS EVOLUTIVOS E POPULACIONAIS

Resumo

Os anfíbios anuros são considerados importantes modelos para entender os efeitos das atividades antrópicas sobre os ecossistemas naturais. A partir da constatação de um declínio global de suas populações, a comunidade científica entrou em estado de alerta, e os estudos com estes organismos se intensificaram. Na região Neotropical, onde exibem sua maior diversidade, ainda persistem muitas lacunas de conhecimento acerca de aspectos filogenéticos, filogeográficos, sistemática e diversidade genética. Graças aos avanços no entendimento do DNA mitocondrial (mtDNA), muitos pesquisadores tem se voltado a conhecer melhor esta biodiversidade através do emprego desta molécula. O mtDNA é uma molécula relativamente simples, mas que possui diversas características que o tornam um marcador molecular excelente. Uma delas é a existência, no mesmo genoma, de regiões com diferentes taxas evolutivas. A escolha do marcador mitocondrial a ser empregado depende do tipo de estudo a ser realizado. De uma forma simplista, as regiões codificantes (COI, 12S e 16S rRNA e *Cytb*) são mais conservadas e fornecem importantes informações para análises filogenéticas e filogeográficas (inclusive entre *taxa* superiores), enquanto regiões mais variáveis, como o *D-loop*, uma das únicas regiões não codificantes do genoma mitocondrial, cuja taxa de substituição de nucleotídeos é a maior em comparação com os outros marcadores, é capaz de revelar a existência de diversidade intra e interpopulacional. Após ser escolhida a região adequada e tomados os devidos cuidados na interpretação dos dados fornecidos pelo sequenciamento do mtDNA, esta ferramenta pode fornecer dados importantes para o conhecimento do real *status* de variabilidade genética e biodiversidade dos anuros, o que é fundamental para garantir a tomada das medidas adequadas para a sua conservação.

Palavras-chave: Heteroplasmia. NUMTs. COI. *Cytb*. 12S. 16S. *D-loop*. Anura. Hylidae.

Introdução

A região Neotropical compreende o território que se inicia no México e se estende até o sul da América do Sul. Sua formação geológica ocorreu de forma lenta, com períodos de aquecimento e resfriamento gradativos do planeta no decorrer de milhares de anos, permitindo que os mecanismos do processo evolutivo atuassem. Este processo de formação está intimamente relacionado aos elevados índices de diversidade de espécies encontrados em países como Brasil, Colômbia Peru e Equador, considerados megadiversos (JOLY, 2007).

Embora a região Neotropical destaque-se por concentrar a maior biodiversidade do planeta (JOLY, 2007), as ações antrópicas têm sido extremamente degradantes e implacáveis na redução da biodiversidade, o que representa um prejuízo incalculável à fauna e à flora mundial. Para mitigar os efeitos das ações humanas e garantir a manutenção da biodiversidade, os estudos voltados à elaboração de planos de manejo e conservação de espécies têm sido cada vez mais frequentes.

Dentre os animais, um grupo que têm ganhado destaque neste tipo de estudo são os anfíbios, uma vez que apresentam características anatômicas, fisiológicas e comportamentais que os tornam excelentes bioindicadores da qualidade ambiental (MAZZOTTI et al., 2007; WAKE; VREDENBURG, 2008). Dentre estas características pode-se evidenciar o ciclo de vida bifásico, com parte de seu desenvolvimento em ambiente aquático e parte em ambiente terrestre, a dependência da água para a reprodução, ovos altamente suscetíveis à dessecação, necessidade de micro-habitat para a reprodução e pele semipermeável, atributos estes que os tornam extremamente sensíveis a alterações ambientais (BLAUSTEIN et al., 1994; BLAUSTEIN; WAKE, 1995; ARZABE, 1999).

Em razão desta sensibilidade, os anfíbios têm sido utilizados como um termômetro para avaliar os resultados das ações humanas sobre os ecossistemas. A ordem Anura, que compreende espécies de anfíbios cosmopolitas que revelam sua maior diversidade na região Neotropical (BRUSCHI, 2010), tem sido alvo de diversos estudos com diferentes abordagens: estudos de levantamentos faunísticos (COLOMBO et al., 2008; RIBEIRO-JÚNIOR; BERTOLUCI, 2009; MAFFEI; UBAID; JIM, 2011), estudos comportamentais (BEVIER et al., 2008; MAFFEI et al., 2011; DABÉS et al., 2012; MORESCO, 2013), análises histológicas (SANTOS; OLIVEIRA, 2007; MORESCO, 2013) e, com destaque nos últimos anos, a análise molecular (CHEK et al., 2001; FAIVOVICH et al., 2010; WIENS et al., 2010; GVOZDIK et al., 2010; COX et al., 2012).

Muitos destes estudos moleculares só foram possíveis após o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MULLIS et al., 1986), que levou a

avanços científicos significativos, pois permite a replicação *in vitro* do DNA a partir de quantidades mínimas de material genético e, de forma extremamente rápida.

As atuais metodologias para a análise do DNA fazem com que ele seja uma ferramenta poderosa no estudo da biodiversidade, pois permite inferir sobre as relações filogenéticas existentes entre os indivíduos, caracterização de espécies, classificação sistemática, além de fornecer dados importantes à cerca da diversidade genética intra e interpopulacional.

A partir de 1963, quando Nass e Nass (1963) encontraram algumas fibras na matriz mitocondrial e as caracterizaram como ácidos nucleicos, muitos foram os avanços em relação ao conhecimento do DNA mitocondrial (mtDNA), sendo amplo o conhecimento sobre sua estrutura, função, forma de herdabilidade e evolução.

O mtDNA animal tem tamanho reduzido, entre 15 e 20Kb e organiza-se de maneira relativamente simples. Como cada mitocôndria possui uma molécula de DNA, e cada célula possui uma quantidade grande desta organela, uma única célula possui diversas cópias do mtDNA (WALLACE, 2000), o que facilita seu isolamento. A herança do mtDNA é predominantemente materna, portanto, trata-se de um DNA haplóide e em razão disso não ocorre recombinação (CAVALLI-SFORZA, 1998; BOORE, 1999; RANTANEN; LARSON, 2000); no entanto, sua taxa de evolução é superior à do DNA nuclear, o que pode ser explicado pela ocorrência de erros durante a replicação, a exposição contínua aos efeitos mutagênicos de radicais de oxigênio, que tem a capacidade de comprometer o DNA, aliados à falta de histonas de proteção e um sistema de reparo ineficiente (MIYAZONO et al., 2002; NELSON; COX, 2011).

Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas para estudos genéticos de populações naturais, sendo informativas em comparações intra e interespecíficas (BIGNOTTO, 2010). Entretanto, é preciso considerar as diferenças existentes entre os marcadores mitocondriais para garantir a escolha da região adequada ao tipo de análise que se pretende realizar.

Através de levantamento bibliográfico, o objetivo deste trabalho foi de caracterizar estruturalmente o DNA mitocondrial, bem como relacionar a particularidade de seus genes com os diferentes enfoques das análises genéticas: sistemática e taxonomia, filogenia, filogeografia e diversidade genética e suas aplicações no estudo de anfíbios anuros neotropicais.

Discussão

Estrutura da mitocôndria

A mitocôndria é uma organela importante para o metabolismo celular. Com forma arredondada ou alongada, está presente no citoplasma das células eucariontes, e participa da respiração aeróbia e de diversas outras funções (LOGAN, 2006; NELSON; COX, 2011). São mais numerosas nas células com metabolismo energético alto, como as células musculares estriadas. Em muitas células as mitocôndrias se distribuem por todo o citoplasma, mudando constantemente de posição pela atividade de proteínas motoras do citoesqueleto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As mitocôndrias apresentam duas membranas que envolvem um espaço interno, onde se localiza a matriz mitocondrial (ALBERTS et al., 2007). As membranas mitocondriais são bicamadas de fosfolipídios, sendo que a membrana externa é lisa e muito permeável a pequenas moléculas e íons, enquanto a membrana interna é praticamente impermeável. Esta última apresenta invaginações que formam cristas, que aumentam sua superfície, e contém a cadeia transportadora de elétrons, ou cadeia respiratória, ADP-ATP-translocase e ATP sintase, responsáveis pela respiração celular, além de outros transportadores de membrana (NELSON; COX, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A cadeia transportadora de elétrons é constituída por: Complexo I ou NADH-desidrogenase; Complexo II ou succinato-desidrogenase; Complexo III ou Ubiquinona: citocromo c-oxirredutase e Complexo IV ou citocromo-oxidase. Além destas moléculas, faz parte da cadeia respiratória o citocromo c, que se move entre os Complexos III e IV como uma proteína livremente solúvel. A transferência de elétrons por esta cadeia libera a força próton-motriz que impulsiona a síntese de ATP, à medida que os prótons fluem passivamente de volta à matriz, através de um poro para prótons associado com a ATP-sintase (Complexo V) (ZEVIANI; DONATO, 2004; NELSON; COX, 2011).

A gênese da cadeia respiratória, assim como a produção de outras proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial, está sob o controle de dois sistemas genéticos separados: o genoma nuclear e o genoma mitocondrial (ALBERTS et al., 2007; ZEVIANI; DONATO, 2004).

A partir de sua descoberta (NASS; NASS, 1963), diversas pesquisas levaram a um avanço no entendimento da estrutura, funcionamento e evolução do genoma mitocondrial (BERMINGHAM et al, 1986; CANN et al., 1987; CAVALLI-SFORZA, 1998). Os sistemas genéticos mitocondriais consistem em DNA e a maquinaria molecular. A maquinaria inclui as macromoléculas necessárias para transcrição e tradução (ALBERTS, 2007; NELSON; COX,

2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Muitas das macromoléculas são codificadas por genes mitocondriais, mas algumas são codificadas por genes nucleares e, portanto, necessitam ser importadas do citosol (SNUSTAD; SIMONS, 2010). Na Figura 01 pode-se observar um esquema da cadeia transportadora de elétrons e quais das suas moléculas constituintes são sintetizadas a partir das informações contidas no genoma mitocondrial. Em particular, quatro dos cinco complexos da cadeia respiratória (I, III, IV e V) contêm ambos os polipeptídeos: nucleares e mitocondriais (ZEVIANI; DONATO, 2004).

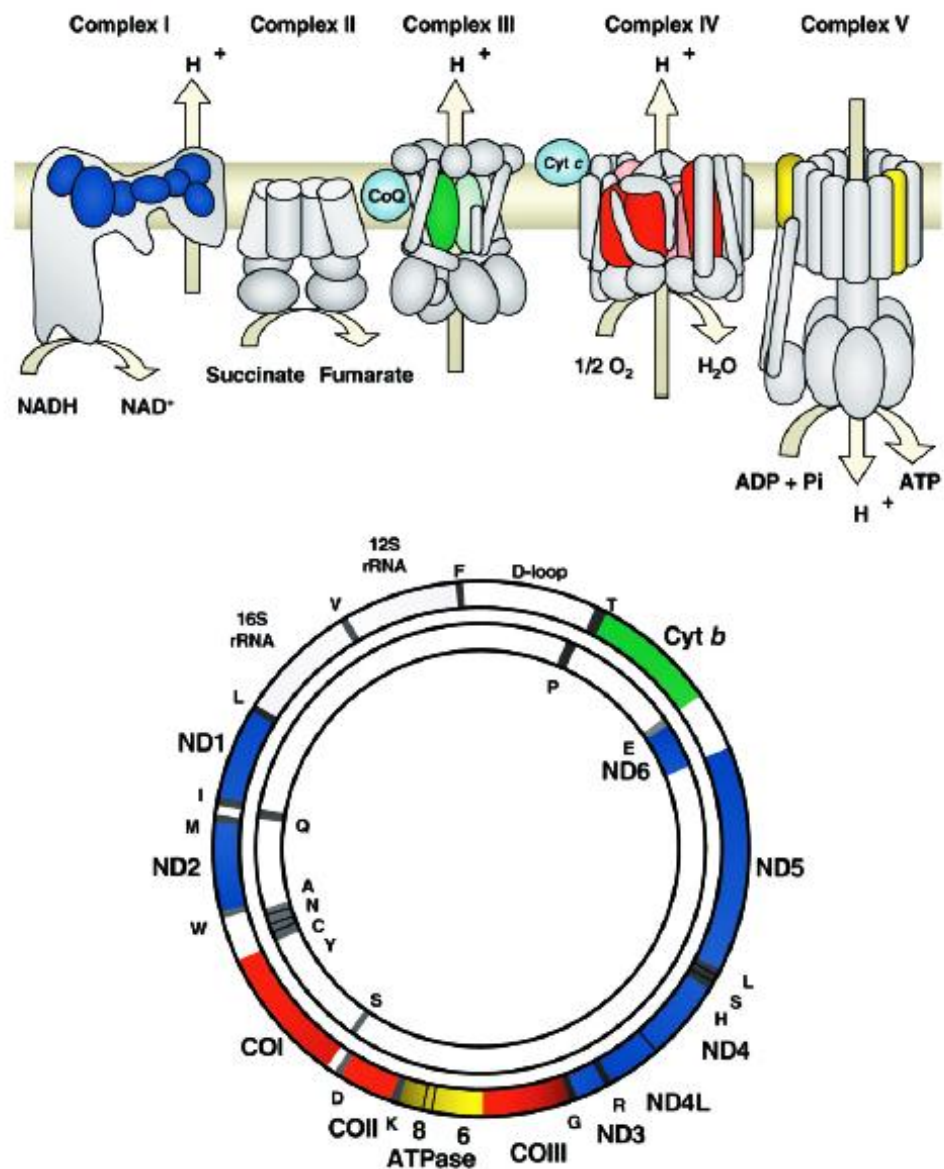


Figura 1. Cadeia respiratória (esquema superior) e DNA mitocondrial humano (esquema inferior). No esquema superior, as moléculas representadas na cor cinza correspondem a subunidades codificadas pelo genoma nuclear, enquanto as que estão indicadas em cores diferentes mostram a correlação com o genoma mitocondrial: subunidades do complexo I = azul; subunidade do complexo III = verde; subunidades do complexo IV = vermelho; subunidades do complexo V = amarelo. Pi = fosfato inorgânico; Cyt c = citocromo c; CoQ = coenzima Q. No esquema inferior, o genoma mitocondrial representando seus genes em cores diferentes: genes para o Complexo I = azul; Cytb, Complexo III = verde; Complexo IV = vermelho; Complexo V = amarelo; tRNA = cinza; rRNA = roxo. Cyt b = citocromo b; COI = Complexo I; COII = Complexo II; COIII = Complexo III (ZEVIANI; DONATO, 2004).

Genoma mitocondrial

O mtDNA tem estrutura relativamente simples, sendo constituído por uma única molécula de DNA circular de fita dupla, formada por duas cadeias: a cadeia interna ou cadeia leve (L) e a externa ou cadeia pesada (H), verifica-se uma diferença de densidade entre ambas, ocasionada pela distribuição assimétrica de guaninas e citosinas, desta forma, a primeira é constituída maioritariamente por pirimidinas, e a segunda, é rica em purinas (CAVALLI-SFORZA, 1998; SNUSTAD; SIMONS, 2010; NELSON; COX, 2011, MORAIS, 2013).

O mtDNA não possui íntrons, todas as sequências codificantes são contíguas, no entanto, existem duas zonas não codificantes, uma região com aproximadamente 1Kb que contém a origem de replicação da cadeia pesada: *D-loop*, ou Região Controle, e uma região com 30 nucleotídeos que serve como origem de replicação da cadeia leve, sendo o restante composto por regiões codificantes, que na grande maioria dos animais, correspondem a 37 genes, sendo 2 para rRNAs, 13 que codificam subunidades de proteínas da cadeia respiratória e 22 para tRNAs (CAVALLI-SFORZA, 1998; BOORE, 1999, NELSON; COX, 2011; Figura 02). Os tRNAs e os rRNAs codificados pelo mtDNA são utilizados exclusivamente na síntese de proteínas mitocondriais.

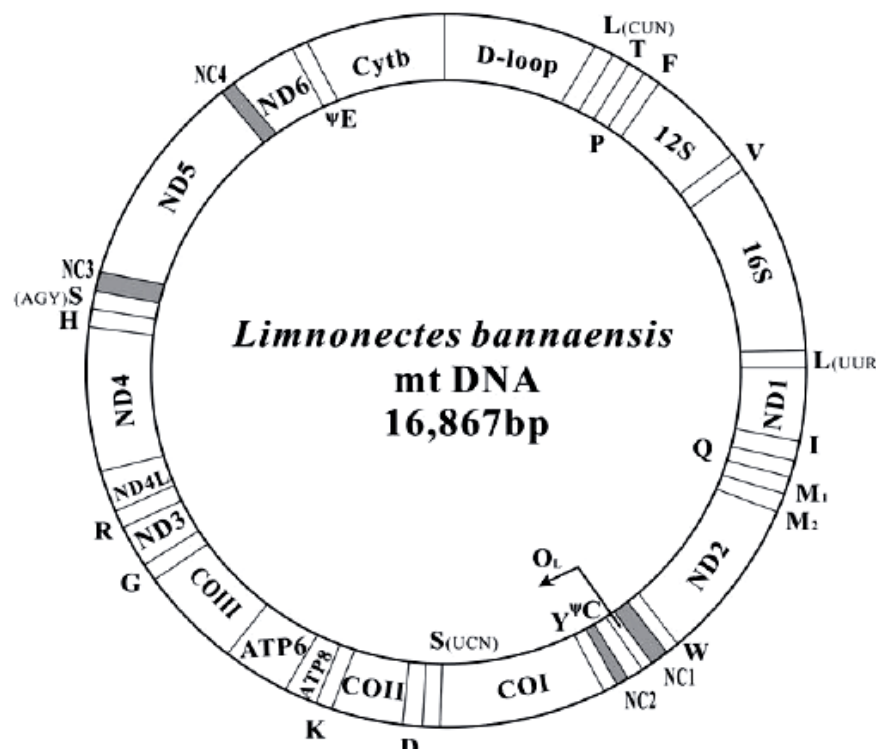


Figura 2 Esquema do DNA mitocondrial de um anfíbio anuro (ZHANG et al., 2009)

O mtDNA possui algumas particularidades que o tornam excelente em estudos de populações. Entre elas está a herança predominantemente materna, a ausência de

recombinação (por se tratar de um DNA haplóide), elevada taxa de evolução, tamanho reduzido e organização relativamente simples (uma única molécula de DNA circular de fita dupla), além de ser facilmente isolado e apresentar várias cópias nas células (CLAYTON et al., 1974; CAVALLI-SFORZA, 1998; BOORE, 1999; WALLACE, 2000; ALBERTS, 2007).

Verifica-se uma elevada taxa mutacional no mtDNA, que estima-se ser 10 vezes maior que a observada no DNA nuclear (GALTIER et al., 2006; HOWELL et al., 2007; VAN OVEN; KAYSER, 2009). Algumas das características do genoma mitocondrial que parecem ser responsáveis por esta alta variação são: sua proximidade à cadeia respiratória, que corresponde à principal fonte celular de radicais livres de oxigênio, que são gerados pela fosforilação oxidativa, além disso, muitas enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos e xenobióticos também estão associadas à membrana interna e podem contribuir para o aumento da taxa de mutações no mtDNA. A ausência de histonas, que tem um efeito protetor no DNA nuclear, e mecanismos de reparo pouco eficientes são outros fatores determinantes para a ocorrência de um elevado polimorfismo no DNA mitocondrial (MIYAZONO et al., 2002; AVISE, 2004; DI MAURO, 2004; NELSON; COX, 2011).

A molécula do mtDNA provou ser um eficiente marcador para estudos de evolução animal, assim como de filogeografia, filogenia e genética populacional (BIGNOTTO, 2010). A comparação de suas sequências têm se tornado um importante instrumento para análises intra e interespecíficas, com aplicações em diversos tipos de estudos relacionados à história biogeográfica (GONÇALVES et al., 2007, TEDESCHI, 2013), relações filogenéticas e taxonômicas (MIRANDA, 2012; BRUSCHI et al., 2013; DINELLI, 2013; TEDESCHI, 2013), estimativas do nível de variabilidade genética, caracterização da estrutura populacional e estudos de genética de conservação (DUMONT et al., 2009; LUI et al., 2012).

Uma característica interessante desta molécula é a combinação de regiões mais conservadas com regiões que apresentam altas taxas de substituição (FRANCISCO et al., 2001). A análise dos polimorfismos do mtDNA corresponde à principal fonte de informação em estudos filogeográficos e filogenéticos durante as últimas décadas. Entretanto, a escolha da sequência do genoma mitocondrial a ser considerada depende da problemática a ser resolvida (ANANIAS, 2002), pois cada gene do mtDNA exibe características singulares, já que a pressão evolutiva atua de forma diferenciada dentro do próprio genoma mitocondrial, onde as sequências não-codificadoras normalmente apresentam maior variabilidade do que o DNA codificador. Sob este prisma, as regiões mais variáveis são favoráveis para determinar as relações existentes entre espécies próximas e para identificar o *status* da variabilidade genética intra e interpopulacional, enquanto as regiões mais conservadas, que correspondem às regiões transcritas, são recomendadas para examinar as relações filogenéticas entre os *taxa*

superiores, como gêneros e famílias (AUSTIN, 2002; FROST, 2006; MOTA, 2010; MIRANDA, 2012; BRUSCHI et al., 2013).

Entre os marcadores moleculares mitocondriais mais utilizados estão o Citocromo b (*Cytb*), Citocromo c oxidase subunidade I (COI), 12S e 16S (rRNA) e o *D-loop* ou Região Controle, cujas características estão apresentadas na tabela 01.

O citocromo oxidase b é um dos genes codificadores de proteínas com maior importância no mtDNA, ele contém alguns códons com evolução rápida e outros com evolução lenta, ou seja, tanto regiões mais conservadas como mais variáveis, em razão disso, tem sido empregado na construção de relações filogenéticas tanto em níveis intra ou interespecíficos (DREW et al., 2010; THANGARAJ; LIPTON, 2011) como em níveis filogenéticos mais elevados (HARDMAN; LUNDBERG, 2007). Graças a este amplo espectro de aplicação, corresponde a um dos genes mais sequenciados em vertebrados, além de ser um gene bem conhecido com relação à sua dinâmica evolutiva e atividade do seu produto gênico (ESPOSTI et al., 1993).

De acordo com Calcagnotto (In: MATIOLI; FERNANDES, 2012), a comparação entre a quantidade de substituições de nucleotídeos em algumas proteínas com o tempo de divergência de algumas espécies, revela que, no exame de *taxa* cada vez mais distantes, o número de substituições aumenta de forma quase constante. Algumas proteínas passaram a ser utilizadas como uma espécie de cronômetro para a estimativa do tempo de divergência entre os *taxa*, como um “relógio molecular” e dentro do genoma mitocondrial, a região gênica empregada nesta finalidade é o *Cytb* (IRWIN et al., 1991).

Na tentativa de facilitar a identificação e diferenciação de espécies, criou-se o conceito de DNA *Barcode* (“código de barras”), um sistema de identificação de espécies através do sequenciamento de uma pequena região do genoma. A região proposta para esta finalidade em todos os grupos de animais é o citocromo c oxidase subunidade I (COI), que está se mostrando altamente eficaz na identificação de diversas espécies. Com cerca de 650pb, corresponde a uma região curta o suficiente para ser sequenciada rapidamente, e por um custo baixo, e longa o suficiente para revelar alterações entre as espécies (BORISENKO et al., 2009; STRUTZENBERGER et al., 2010).

Costa et al. (2007) observaram que os níveis de divergência da sequência de nucleotídeos em crustáceos foram de 19 a 48 vezes maior entre as espécies que entre os

Tabela 1. Características e aplicações dos principais marcadores mitocondriais

Região/Gene	Sigla	Tamanho (pb)*	Taxa de mutação	Número de hits**	Aplicação
Citocromo b oxidase	<i>Cytb</i>	1000	média	357	Construção de relações filogenéticas tanto em níveis intra ou interespecíficos, como em níveis mais elevados filogeneticamente.
Citocromo c oxidase subunidade I	COI	730	baixa	4007	DNA <i>barcode</i> ; Análises filogenéticas e filogeográficas.
12S rRNA	12S	950	baixa	13758	Útil tanto na resolução de divergências genéticas profundas quanto no esclarecimento das relações filogenéticas de <i>taxa</i> mais relacionados.
16S rRNA	16S	500	baixa	29085	DNA <i>barcode</i> para os anfíbios, além de análises filogenéticas e filogeográficas tanto entre taxa relacionados como em maiores divergências.
Região Controle ou <i>D-loop</i>	<i>D-loop</i>	1000	alta	2982	Estudos de diversidade genética intra e interpopulacional, assim como entre espécies relacionadas; análise da variabilidade genética e estrutura de populações.

* Tamanho aproximado de acordo com as sequências depositadas no GenBank para anuros. **Número de sequências (completas e parciais) depositadas no GenBank para anfíbios anuros até o dia 22 de Janeiro de 2014.

indivíduos de uma mesma espécie e concluiu que a variação de sequência COI foi eficaz para discriminar as espécies deste grupo. Hebert et al. (2004) constataram grandes diferenças entre a sequência COI de diferentes espécies de pássaros, em comparação com pequenas diferenças intraespecíficas, confirmando a eficácia do código de barras COI também na identificação de espécies de aves.

Para Jimbo et al. (2011), o DNA *Barcode* pode ser utilizado como um protocolo oficial para a identificação de insetos e outros grupos, não como um competidor da taxonomia tradicional, mas como uma ferramenta de auxílio para a descoberta e descrição de novos *taxa*.

Os RNAs ribossômicos (rRNA) têm um importante papel na síntese proteica, como as mitocôndrias são organelas com intensa atividade metabólica, apresentam seus próprios genes para esta molécula: um para a subunidade maior e outro para a subunidade menor. O gene 16S codifica a subunidade maior dos ribossomos mitocondriais, e corresponde a uma das sequências mais estudadas dentre os marcadores mitocondriais, sendo extensamente utilizada em estudos filogenéticos. Vences et al. (2005), trabalhando com anfíbios, verificaram que este gene é suficientemente variável para identificar inequivocamente espécies, assim como COI, além disso, os autores consideraram que os *primers* usados por eles podem ser considerados universais e recomendaram o uso do 16S como um marcador de “código de barras” adicional para os vertebrados. Souza (2010) sugeriu este gene como marcador para abelhas, uma vez que ele mostrou grande capacidade na diferenciação de espécies de *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigona*, pois se trata de um marcador mitocondrial altamente conservado, mas as mutações são comuns em algumas regiões variáveis, que correspondem a laços na estrutura do RNA ribossomal, o que garante uma quantidade suficiente de mutações entre as espécies.

O gene 12S codifica a subunidade menor dos ribossomos mitocondriais e, assim como o 16S, corresponde a uma região bastante conservada, com ampla utilização no entendimento das relações filogenéticas e filogeográficas. Muitos estudos utilizam as informações destes dois genes de forma integrada (AUSTIN, 2002; RON et al., 2006; FAIVOVICH et al., 2010; VIEIRA, 2010), de acordo com Vences et al. (2005), os genes 12S e 16S rRNA podem ser considerados marcadores padrão para a reconstrução da filogenia em anfíbios. Além dos anfíbios, o gene 12S rRNA tem sido aplicado em análises filogenéticas de diferentes grupos animais, como peixes (WANG et al., 2001), répteis (VAN DER KUYL et al., 2002), aves (DIMCHEFF et al., 2002) e moluscos (BARUCCA et al., 2004).

Outra região do genoma mitocondrial muito estudada atualmente é o *D-loop*. Com aproximadamente 1Kb, é uma das únicas regiões não transcritas do mtDNA, no entanto, não pode ser considerada uma região não-funcional, pois nela localizam-se o ponto de origem de replicação e os principais promotores de transcrição do mtDNA, desta forma, a replicação se

inicia nesta região e resulta na formação de uma alça de deslocamento com a cadeia pesada recém sintetizada (TAKAMATSU, 2002), o que explica o seu nome “alça em D” (*Displacement Loop*).

Além das sequências do promotor, compõe o *D-loop* três pequenas regiões conhecidas como regiões hipervariáveis I, II e III (HVI, HVII e HVIII) (SNUSTAD; SIMONS, 2010). As taxas de mutação em HVI e HVII são especialmente elevadas, conferindo ao *D-loop* uma taxa mutacional de 2 a 5 vezes maior do que para todos os genes mitocondriais codificantes de proteínas; logo, corresponde à região mais variável deste genoma. Em razão disso, é frequente utilizada em estudos de diversidade genética intrapopulacional, pois é mais sensível do que loci protéicos como um marcador de estruturação filogeográfica de muitos organismos sob escalas micro evolucionárias de tempo, já que mostra uma rápida substituição de nucleotídeos e alto nível de polimorfismos intraespecíficos (MCMILLAN; PALUMBI, 1995; AVISE, 2000; ROLDÁN et al., 2009).

Desafios na utilização do mtDNA

Embora a utilização do mtDNA seja crucial para elucidar alguns aspectos concernentes às relações evolutivas, sistemáticas e ecológicas dos seres vivos, alguns cuidados devem ser tomados para evitar falsas interpretações. Entre as possibilidades que devem ser consideradas durante a sua utilização estão: herança biparental (em alguns casos), heteroplasmia, relógio molecular variável, regiões gênicas sob pressão de seleção purificadora e presença de cópias de partes de seus genes localizadas no genoma nuclear como pseudogenes (NUMTs) (De-XING; HEWITT, 1996). Dentre estes, merecem destaque a heteroplasmia e os NUMTs, pois podem levar a maiores falhas de interpretação caso não sejam detectados.

Heteroplasmia

A maioria dos seres vivos possui genoma mitocondrial homoplásmico, ou seja, apresentam um único genótipo mitocondrial (AVISE; LANSMAN, 1983). Na condição oposta, a heteroplasmia, se observa a existência de mais do que um genótipo de mtDNA em um mesmo indivíduo, no entanto, esta condição é considerada rara, já que existem poucos relatos bem documentados sobre esta condição em animais superiores (BERMINGHAM et al., 1986; NELSON; COX, 2011).

As consequências das mutações no mtDNA heteroplásmico são dependentes do tipo e da localização das mutações, taxa de replicação da célula e segregação de mtDNA (MUNWES et al., 2011). Além disso, pode se apresentar de duas maneiras: heteroplasmia de

sequência e heteroplasmia de comprimento, onde na primeira as sequências apresentam diferentes nucleotídeos em uma posição determinada e na segunda as sequências apresentam diferentes tamanhos devido a inserções e/ou deleções.

Acredita-se que, durante a replicação do mtDNA, erros da polimerase do mtDNA, promovem a síntese de uma cadeia complementar com variação no tamanho em relação à sequência original, num processo denominado “deslize de replicação” (*replication slippage*), gerando cópias heteroplásmicas do mtDNA (FUMAGALLI et al., 1995). Grandes diferenças no comprimento do *D-loop* ou próximo a ele, têm sido atribuídas a variações no número de cópias das repetições em *tandem* nesta região. Para Munwes et al. (2011), o menor comprimento das repetições em *tandem* e a ocorrência de um número menor de cópias heteroplásmicas do DNA mitocondrial estão relacionados à funções mitocondriais mais eficientes, o que pode estar associado a uma melhor sobrevivência sob condições extremas.

Os fatores relacionados com esta condição ainda são controversos. Para Calloway et al. (2000), a frequência de heteroplasmia aumenta com a idade, e pode ser uma condição hereditária ou um fenômeno de natureza somática. Entretanto, Lagerström-Fermér et al. (2001) monitoraram 4 mulheres com heteroplasmia durante uma década e demonstraram que a heteroplasmia no *D-loop* é herdada e mantém-se em níveis estáveis ao longo do tempo, inexistindo relação com o aumento da idade. Corroborando esta última hipótese, os dados de Camargo et al. (2011) apontam para a ausência de correlação entre a idade, sexo e etnia com a ocorrência de heteroplasmia em seres humanos.

Além dos relatos bem documentados referindo-se a ocorrência de heteroplasmia em seres humanos (LAGERSTRÖM-FERMÉR et al., 2001; DOOSTI; CAMARGO et al., 2011; DEHKORDI, 2011; MORAIS, 2013), esta condição já foi observada também em *Drosophila mauritiana* (SOLIGNAC et al., 1983), morcegos (WILKINSON; CHAPMAN, 1991), peixes (BERMINGHAM et al., 1986) e em algumas espécies de anfíbios (BERMINGHAM et al., 1986; MATSON et al., 2006; MUNWES et al., 2011).

Ainda são necessários maiores estudos para entender sua etiologia e implicações. Além disso, nenhum trabalho relatando a ocorrência de heteroplasmia em anuros neotrópicos foi publicado até o momento.

Pseudogenes mitocondriais (NUMTs)

Os pseudogenes, também conhecidos como cópias mitocondriais no DNA nuclear (NUMTs), são cópias não funcionais de sequências do mtDNA incorporadas ao genoma nuclear (LEITE, 2012). A transferência de genes mitocondriais para o genoma nuclear pode

acontecer por transferência direta, ou pode ser mediada por RNAs, em casos em que se acredita na participação de elementos virais (SONG et al., 2008).

Durante a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), em alguns casos, os *primers* utilizados se anelam à sequência do NUMT tão bem como, e às vezes até melhor que nas sequências mitocondriais de interesse. Se esta sequência for confundida com a sequência mitocondrial do gene alvo, pode ser um problema na obtenção de hipóteses filogenéticas e análises populacionais, já que possuem taxas de substituição de bases desiguais e, conseqüentemente, histórias evolutivas distintas (WILLIAMS; KNOWLTON, 2001; MIRANDA, 2012). De acordo com Strugnell e Lindgren (2007), quando transferidos para o núcleo, os genes mitocondriais perdem sua função original, e ficam livres para acumular mutações, embora a taxa de mutação do DNA nuclear seja menor do que a do mtDNA.

De acordo com Williams e Knowlton (2001), existem quatro possibilidades para a observação de múltiplas cópias de um gene mitocondrial: a contaminação por outros organismos ou DNA exógeno no laboratório, heteroplasmia, vazamento parental e duplicação de genes mitocondriais. Eliminando a possibilidade de ocorrência das três primeiras opções, têm-se a confirmação da existência dos NUMTs. Entretanto, sua identificação é simplificada quando se segue o *Checklist* sugerido por Cristiano et al. (2012), onde a presença de regiões sobrepostas, presença de códons putativos de terminação, inserções e deleções de 1 ou 2 pb e indícios de ausência de seleção (substituições aleatórias), são considerados fortes indicativos da existência de fragmentos do genoma mitocondrial integrados ao genoma nuclear.

Muitas destas regiões já foram identificadas em diversos grupos de organismos, incluindo artrópodes, fungos, plantas, protozoários e vertebrados (BENSASSON et al., 2001; RICHLI; LEISTER, 2004; HAZKANI-COVO et al., 2010). Quando identificadas e avaliadas da maneira adequada, fornecem informações valiosas sobre o passado evolutivo dos seres vivos.

Anuros neotropicais

A Classe Amphibia compreende três ordens: Ordem Anura, que inclui os sapos, rãs e pererecas, Ordem Caudata, que compreende as salamandras e Ordem Gymnophiona, que inclui as cecílias (FROST, 2014). Os estudos com anuros despertam o interesse devido à presença destes animais em quase todo o planeta, a facilidade de manuseio e, principalmente, por serem bons indicadores do equilíbrio ecológico (DIXON et al., 2011).

A Ordem Anura abrange espécies de anfíbios cosmopolitas e na região Neotropical ocorre sua maior diversidade (BRUSCHI, 2010). Dentro de Anura, Hylidae é atualmente a mais numerosa, sendo constituída por 936 espécies (FROST, 2014) que se destacam pela

ampla distribuição, o que as tornam convenientes para estudos comparativos (MORESCO, 2013), representando bons modelos para estudos sobre comportamento reprodutivo, migratório e aspectos evolutivos (HADDAD, 1987); em razão disso, a maioria dos trabalhos envolvendo anfíbios referem-se a esta família.

Ciclo de vida bifásico, com dependência da água no período inicial de desenvolvimento, necessidade de micro-habitat para reprodução, pele semipermeável a alguns gases e líquidos e a migração restrita a pequenas distâncias estão entre as características anatômicas, fisiológicas e comportamentais dos anuros que fizeram com que fossem considerados possíveis bioindicadores da qualidade ambiental (BLAUSTEIN; WAKE, 1995; ARZABE, 1999; MAZZOTTI et al., 2007; WAKE; VREDENBURG, 2008).

Além do mais, são comprovadamente mais sensíveis a exposição à radiação UV-B (BLAUSTEIN et al., 1994), fragmentação de habitats (ARMSTRONG; CONTE, 2010), mudanças climáticas (POUNDS, 1994), contaminação por produtos químicos (BRIDGES; SEMLITSH, 2000) e aumento de doenças infecciosas (BRIGGS et al., 2005), sendo inclusive relatado nos últimos anos um declínio global de suas populações (YOUNG et al., 2001; CAREY et al., 2001; KIESECKER et al., 2001; BIEK et al., 2002; WAKE; VREDENBURG, 2008; DIXON et al., 2011).

Embora a função como bioindicador não esteja completamente esclarecida, Sousa et al. (2008) sugerem que, possivelmente, os anuros podem funcionar como bioindicadores da diversidade de outros grupos da biota, inclusive de invertebrados, ou então grupos diferentes da fauna podem responder de forma semelhante aos efeitos da perturbação e sucessão.

Anuros neotropicais e os marcadores mitocondriais

Os anfíbios neotropicais são conhecidos por exibir notável estrutura filogeográfica e divergências genéticas profundas, sendo necessária grande quantidade de tempo para que diferenças fenotípicas possam evoluir (LOUGHEED et al., 2006).

O emprego dos marcadores mitocondriais em seu estudo exhibe especial importância por fornecer dados relevantes para o esclarecimento das questões taxonômicas e filogenéticas deste grupo morfológicamente muito conservado (DAWOOD et al., 2002; FOUQUET et al., 2007), correspondendo a grande parte das inferências realizadas até então para representantes da família Hylidae (CHEK et al., 2001; DARST; CANNATELLA, 2004; MORIARTY; CANNATELLA, 2004; FAIVOVICH et al., 2005; WIENS, 2005; GOMEZ-MESTRE et al., 2008; FAIVOVICH et al., 2010; WIENS et al., 2010, GVOZDIK et al., 2010).

Segundo Salducci et al. (2005), o nível de homoplasia em dados morfológicos, ecológicos e fisiológicos para o clado Neobatrachia ainda é subestimado, já que a sistemática

de anfíbios ainda se baseia, em grande parte, na morfologia. Reforçando a importância da utilização integrada dos marcadores mitocondriais e nucleares.

Os anfíbios representam um desafio quanto à obtenção de sequências *barcode*, pois em muitos indivíduos o gene COI varia de maneira muito significativa de um indivíduo para outro e não pode ser utilizado de forma confiável para diferenciar espécies (MARSHALL, 2005). Frente a isso, Vences et al. (2005) apresentaram evidências de que o gene mitocondrial 16S rRNA pode ser considerado o DNA *barcoding* universal para os anfíbios, sendo inclusive mais eficiente que o COI na identificação deste grupo de animais.

Lougheed (2006) observou a diferenciação intraespecífica de *Dendropsophus leucophylatus* (= *Hyla leucophilata*) através da análise conjunta de dados morfológicos, ecológicos e genéticos (região 16S do mtDNA), relatando divisão filogenética dentro desta espécie, porém com uma pequena estruturação geográfica. Outro estudo que integra os dados biogeográficos com dados moleculares da região 16S é o de Funk (2007), que constatou que o rio Madre de Dios (Peru) pode estar atuando como uma barreira geográfica para o fluxo gênico entre populações de *Engystomops petersi*.

Faivovich et al. (2010) realizaram uma reclassificação sistemática envolvendo sequências mitocondriais e nucleares, suas análises resultaram em uma hipótese genética bem suportada para Phyllomedusinae, onde encontraram padrões interessantes de diversidade de sequências dentro de *Phyllomedusa*, com casos de divergência de sequências muito baixa entre espécies reconhecidas (*P. centralis* e *P. oreades*), bem como alta divergência entre populações atualmente considerados da mesma espécie (por exemplo: *P. nordestina* e *P. tomopterna*). Ainda, propuseram uma hipótese filogenética que fornece um quadro histórico para uma discussão da evolução dos caracteres associados à biologia reprodutiva, a fisiologia do controle da perda de água e a produção de peptídeos bioativos. Mota (2010) empregou o uso do mtDNA através do sequenciamento do *D-loop* e 16S para o estudo de diferentes populações de *Philomedusa bicolor* da Amazônia, onde verificou um padrão de diferenciação mediado pelo isolamento por distância, tendo em vista as grandes distâncias geográficas encontradas entre as localidades de coleta.

Ron et al. (2006) propuseram a filogenia dos anuros tropicais do gênero *Engystomops* que pertencem ao grupo de espécies *Physalaemus pustulosus*, utilizando 12S e 16S rRNA. A análise filogenética, que incluiu todos os *taxa* conhecidos e duas espécies ainda não descritas, revelou a ocorrência de monofiletismo para o gênero, sendo *Engystomops* filogeneticamente muito relacionado com *Physalaemus*, o que esclarece o porquê de ambos terem sido agrupados em um único gênero (*Physalaemus*) até recentemente. A filogenia proposta pelos autores foi equivalente a revisões sistemáticas realizadas anteriormente que se basearam em

outros caracteres moleculares e também com características morfológicas. Austin (2002) inferiu sobre as relações evolutivas de *Allophryne ruthveni*, também pelas informações obtidas com o sequenciamento dos genes mitocondriais 12S e 16S, indicando que a espécie tem maior afinidade filogenética com espécies da família Centrolenidae.

Ananias (2002) testou o relacionamento filogenético entre populações de *Hypsiboas semiguttatus* e espécies relacionadas através do sequenciamento do *D-loop* e citocromo b e verificou que as populações estudadas possuem estoques gênicos diferentes e que eventos cladogênicos, provavelmente relacionados à especiação de hílideos neotropicais, estão em andamento.

Através da integração entre marcadores mitocondriais, 12S e 16S rRNA, e nucleares, tirosinase e rodopsina, Vieira (2010) verificou a ocorrência de monofiletismo para os genes mitocondriais e diferenças significativas para os genes nucleares e, a partir destes dados, demonstrou a existência de 13 linhagens dentro do complexo de espécies *Rhinella margaritifera* (considerado um dos mais complexos dentre os anuros neotropicais) e ainda relacionou os dados moleculares à aspectos ecológicos e evolucionários: muitas das linhagens identificadas ocorrem em simpatria, têm pequena distribuição e, muitas vezes, são contíguas.

Outro trabalho interessante foi o de Salducci et al. (2002), que analisaram filogeneticamente algumas espécies de Hylidae da Guiana Francesa, sugerindo que o gênero *Scinax* possui um alto nível de diferenciação dentro da família Hylidae. De acordo com Grant e Bowen (1998), níveis elevados de diversidade genética são, geralmente, indicativos de uma história evolutiva longa e estável, ou pode ser resultado de contato secundário de populações diferentes. Entretanto, baixos níveis de diversidade genética podem ser indicativos da ocorrência do efeito gargalo ou de recentes eventos de encontro.

O sequenciamento do genoma mitocondrial tem fornecido valiosas informações para o entendimento das relações de parentesco e da genética de populações existentes na ordem Anura (ANANIAS, 2002; AUSTIN, 2002; DARST; CANATELLA, 2004; FAIVOVICH et al., 2005; WIENS et al., 2005; GOMEZ-MESTRE et al., 2008; FAIVOVICH et al., 2010; FOUQUET et al., 2007, 2010; 2013). Através destes dados tem sido elucidada de forma consistente, a história evolutiva dos anfíbios. O DNA mitocondrial corresponde a uma importante ferramenta para a avaliação do *status* de conservação de diferentes espécies, possibilitando a elaboração de medidas de conservação e manejo de populações em risco, haja vista a influência negativa das ações antrópicas sobre populações naturais. A análise de filogenias moleculares dos anfíbios neotropicais pode levar ao reconhecimento de um grande número de espécies, pois estes ainda são subentendidos (RON et al., 2006).

Considerações Finais

Considerando que marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução distintas, o genoma mitocondrial apresenta um grande potencial para estudos genético-populacionais, pois permite a identificação da variabilidade em dois níveis básicos, sendo o primeiro as diferenças intraespecífica, interpopulacional, ou entre espécies muito relacionadas e o segundo, a variabilidade entre espécies, gêneros e famílias. Enquanto a região hipervariável do *D-loop* é mais usual em análises do primeiro nível, as regiões mais conservadas, que são as regiões codificantes COI, *Cytb*, 12S e 16S rRNA, tem maior empregabilidade no que concerne ao segundo nível de variabilidade.

O DNA mitocondrial tornou-se uma ferramenta bem estabelecida e valiosa para o estudo da estrutura genética de populações, análises filogenéticas e suas relações evolutivas (BIGNOTTO, 2010). Ou seja, através da utilização do marcador mitocondrial adequado, e da adoção dos devidos cuidados para verificar a existência de NUMTs e a ocorrência de heteroplasmia, é possível, por meio do mtDNA, chegar a respostas confiáveis em relação a parentesco, distância genética, variabilidade genética, caracterização da estrutura e tamanho efetivo das populações.

Quanto aos anuros neotropicais, muitas lacunas no conhecimento sistemático, filogenético e da variabilidade genética deste grupo já foram preenchidas graças a este marcador. A maioria dos estudos publicados até agora na literatura especializada referem-se a aspectos sistemáticos e filogenéticos, embasados nos marcadores mitocondriais COI, *Cytb*, 12S e 16S rRNA e *D-loop* (RUVINSKY; MAXSON, 1996; SALDUCCI et al., 2002; FAIVOVICH et al., 2010).

No entanto, frente aos debates à cerca da ocorrência de um declínio global das populações de anfíbios nos últimos anos (YOUNG et al., 2000; CAREY et al., 2001; KIESECKER et al., 2001; BIEK et al., 2002; WAKE; VREDENBURG, 2008; DIXON et al., 2011), a análise da variabilidade genética das populações de anuros neotropicais tem ganhado destaque nos estudos recentes, já que a manutenção de uma elevada diversidade genética em uma população é um fator chave para a sua manutenção no ambiente, e muitos deles passaram a incorporar os dados de variabilidade genética aos estudos filogenéticos (SALDUCCI et al., 2005; FUNK, 2007; MOTA, 2010).

Como consequência da elevada biodiversidade de anuros neotropicais, restam ainda muitas perguntas a serem respondidas. Segundo Salducci et al. (2005), será muito difícil protegê-los de forma eficiente, enquanto a maior parte das análises filogenéticas e taxonômicas se basearem apenas em dados morfológicos e apenas alguns clados forem

validados utilizando marcadores moleculares, o que reforça a importância da análise do mtDNA como peça fundamental para a elaboração de planos de manejo e conservação dos anuros neotropicais.

Referências

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 5 ed, 2007.
- ANANIAS, F. **Análise citogenética e do DNA mitocondrial de populações de *Hyla semiguttata* (Anura, Hylidae) e espécies relacionadas**. Campinas: UNICAMP, 2002, 123p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2002.
- ARMSTRONG, C. G.; CONTE, C. E. Taxocenose de anuros (Amphibia: Anura) em uma área de Floresta Ombrófila Densa no Sul do Brasil. **Biota Neotropica**. v. 10, n. 1, p. 39-46, 2010.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 16, n. 3, p. 851-864, 1999.
- AUSTIN, J. D.; LOUGHEED, S. C.; TANNER, K.; CHEK, A. A.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic Neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. **Zoological Journal of the Linnaean Society**. v.134, p. 335:346, 2002.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Massachusetts: Sinauer, 2 ed, 2004.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and Formation of the Species**. Cambridge, Mass: Harvard University Press, 2000.
- AVISE, J. C.; LANSMAN, R. A. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: NEI, M.; KOEHN, R. K. **Evolution of Genes and Proteins**. Massachusetts: Sinauer, Sunderland, Mass, p. 147-164, 1983.
- BARUCCA, M.; OLMO, E.; SCHIAPARELLI, S.; CANAPA, A. Molecular phylogeny of the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S and 12S rRNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 31, n. 1, p. 89-95, 2004.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D.; HARTL, D. L.; HEWITT, G. M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 16, n. 6, p. 314-321, 2001.
- BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; AVISE, J. C. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **The Journal of Heredity**. v. 77, p. 249-252, 1986.
- BEVIER, C. R.; GOMES, F. R.; NAVAS, C. A. Variation in Call Structure and Calling Behavior in Treefrogs of the Genus *Scinax*. **South American Journal of Herpetology**. v. 3, n. 3, p. 196-206, 2008.
- BIEK, R.; FUNK, W. C.; MAXELL, B. A.; MILLS, L. S. What is missing in amphibian decline research: insights from exological sensitivity analysis. **Conservation Biology**. v. 16, n. 3, p. 728-734, 2002.
- BIGNOTTO, T. S. **Comparação molecular de piranhas dos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* (Characiformes, Serrasalminidae) das bacias do alto rio Paraná, alto rio Paraguai, rio Tocantins e rio São Francisco**. Maringá: UEM, 2010. 172 p. Tese (Doutorado)

- Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

BLAUSTEIN, A. R.; HOFFMAN, P. D.; HOKIT, D. G.; KIESECKER, J. M.; WALLS, S. C.; HAYS, J. B. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, n. 5, p. 1791–1795, 1994.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**. v. 272, n. 4, p. 5-56, 1995.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**. v. 27, n. 22, p. 1767-1780, 1999.

BORISENKO, A. V.; SONES, J. E.; HEBERT, P. D. N. The frontend logistics of DNA barcoding: challenges and prospects. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 27-34, 2009.

BRIDGES, C. M.; SEMLITSCH, R. D. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. **Conservation Biology**. v. 14, n. 5, p. 1490-1499, 2000.

BRIGGS, C. J.; VREDENBURG, V. T.; KNAPP, R. A.; RACHOWICZ, L. J. Investigating the population-level effects of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. **Ecology**. v. 86, n. 12, p. 3149–3159, 2005.

BRUSCHI, D. P. **Relações inter e intraespecíficas no grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): Estudo citogenético e de DNA mitocondrial**. Campinas: UNICAMP, 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

BRUSCHI, D. P.; BUSIN, C. S.; TOLEDO, L. F.; VASCONCELLOS, G. A.; STRUSSMANN, C.; WEBER, L. N.; LIMA, A. P.; LIMA, J. D.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. **BMC Genetics**. v. 14, n. 70, 2013.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e relógios moleculares. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2 ed. 2012.

CALLOWAY, C. D.; REYNOLDS, R. L.; HERRIN, G. L.; & ANDERSON, W. W. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. **American Journal of Human Genetics**. v. 66, n. 4, p. 1384-1397, 2000.

CAMARGO, M. A.; PANETO, G. G.; DE MELLO, A. C. O.; MARTINS, J. A.; BARCELLOS, W.; CICARELLI, R. M. B. No relationship found between point heteroplasmy in mitochondrial DNA control region and age range, sex and haplogroup in human hairs. **Molecular Biology Reports**. v. 38, p. 1219-1223, 2011.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**. v. 325, p. 31-36, 1987.

CAREY, C.; HEYER, R. W.; WILKINSON, J.; ALFORD, R. A.; ARNTZEN, J. W.; HALLIDAY, T.; HUNGERFORD, L.; LIPS, K. R.; MIDDLETON, E.; ORCHARD, S. A.; RAND, A. R. Amphibian declines and environmental changes: use of remote-sensing data to identify environmental correlates. **Conservation Biology**. v. 15. n. 4, p. 903-013, 2001.

CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. **Trends in Genetics**. v. 14, n. 2, p. 60-65, 1998.

CHEK, A. A.; LOUGHEED, S. C.; BORGAT, J. T.; BOAG, P. T. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of Neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 18, n. 3, p. 370-385, 2001.

CLAYTON, D. A.; DODA, J. N.; FRIEDBERG, E. C. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 71, p. 2777-2781, 1974.

COLOMBO, P.; KINDEL, A.; VINCIPROVA, G.; KRAUSE, L. Composição e ameaças à conservação dos anfíbios anuros do Parque Estadual de Itapeva, município de Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotropica**. v. 8, n. 3, p. 229-240, 2008.

COSTA, F. O.; DEWAARD, J. R.; BOUTILLIER, J.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R. T.; HAJIBABAEI, M.; HEBERT, P. D. N. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 64, n. 272-295, 2007.

COX, C. L.; STREICHER, J. W.; SHEEHY, C. M.; CAMPBELL, J. A.; CHIPPINDALE, P. T. Patterns of genetic differentiation among populations of *Smilisca fodiens*. **Herpetologica**. v. 68, n. 2, p. 226–235, 2012.

CRISTIANO, M. P.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; YOTOKO, K. S. C. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. **Apidologie**. v. 43, p. 527-538, 2012.

DABÉS, L.; GOMES, V. M. B.; NAPOLI, M. F.; KLEIN, W. Water balance and spatial distribution of an anuran community from Brazil. **Herpetologica**. v. 68, n. 4, p. 443-445, 2012.

DARST, C. R.; CANNATELLA, D. C. Novel relationships among hylid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 31, p. 462-475, 2004.

DAWOOD, A.; CHANNING, A.; BORGAT, J. P. A molecular phylogeny of the frog genus *Tomopterna* in southern Africa: examining species boundaries with mitochondrial 12S rRNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 22, p. 407-413, 2002.

DE-XING, Z.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 11, n. 6, p. 247-251, 1996.

DIMAURO, S. Mitochondrial medicine. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 107– 114, 2004.

DIMCHEFF, D. E.; DROVETSKI, S. V.; MINDELL, D. P. Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 24, n. 2, p. 203-215, 2002.

DINELLI, L. L. **Três espécies crípticas em *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae): evidências baseadas no genoma mitocondrial.** Vitória: UFES, 2013. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

DIXON, A. D.; COX, W. R.; EVERHAM, E. M.; CEILLEY, D. W. Anurans as Biological Indicators of Restoration Success in the Greater Everglades Ecosystem. **Southeastern Naturalist**. v. 10, n. 4, p. 629-646, 2011.

DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. Genetic Polymorphisms of Mitochondrial Genome *D-loop* Region in Bakhtiarian Population by PCR-RFLP. **International Journal of Biology**. v. 3, n. 4; 2011.

DREW, J. A.; ALLEN, G. R.; ERDMANN, M. V. Congruence between mitochondrial genes and color morphs in a coral reef fish: population variability in the Indo-Pacific damselfish *Chrysiptera rex* (Snyder, 1909). **Coral Reefs**. v. 29, p. 439-444, 2010.

DUMONT, L. C.; HWANG, G.; MACLEAN, N. The mtDNA control region of the barbaçu shrimp *Artemesia longinaris* (Decapoda: Penaeidae) and its potential use as a marker for population analysis. **Atlantica**. v. 31, n. 2, p. 199-207, 2009.

ESPOSTI, M. D.; VRIES, S. D.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T. & MEYER, A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1143, p. 243-271, 1993.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. A systematics review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae, a phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 294, p. 1-240, 2005.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; BAËTA, D.; JUNGFER, K. H.; ÁLVARES, G. F. R. A.; BRANDÃO, R. A.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, L. S.; BARRIO-AMÓS, C. L.; CRUZ, C. A. G.; WHEELER, W. C. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics**. v. 25, p. 1-35, 2010.

FOUQUET, A.; BLOTTO, B. L.; MARONNA, M. M.; VERDADE, V. K.; JUNCÁ, F. A.; DE SÁ, R.; RODRIGUES, M. T. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 67, p. 445-457, 2013.

FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M.; GEMMELL, N. J. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. **Plos One**. v. 2, n. 10, p. 1101-1110, 2007.

FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M. D.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 43, p. 567-582, 2001.

FOUQUET, A.; VENCES, M.; SALDUCCI, M.; MEYER, A.; MARTY, C.; BLANC, M.; GILLES, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 43, p. 567-582, 2007.

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**. v. 32, n. 4, p. 323-332, 2001.

FROST D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. **The Amphibian Tree Of Life**, Bulletin of the American Museum of Natural History, n. 297, 2006.

FROST, D. R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. New York, USA: Natural History. Electronic Database. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. American Museum of. Acesso em: 23 Jan. 2014.

FUMAGALLI, L.; TABERLET, P.; FAVRE, L.; HAUSSE, J. Origin and Evolution of Homologous Repeated Sequences in the Mitochondrial DNA Control Region of Shrews. **Oxford Journals**. p. 31-46, 1995.

FUNK, W. C.; CALDWELL, J. P.; PEDEN, C. E.; PADIAL, J. M.; DE LA RIVA, I.; CANNATELLA, D. C. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian Forest frog, *Physalaemus petersi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, p. 825-837, 2007.

GALTIER, N.; ENARD, D.; & RADONDY, Y. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Research**. v. 16, p. 215-222, 2006.

GALTIER, N.; ENARD, D.; RADONDY, Y.; BAZIN, E.; BELKHIR, K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Research**. v. 16, p. 215-222, 2006.

GOMES-MESTRE, I.; WIENS, J. J.; WARKENTIN, K. M., Evolution of adaptive plasticity: risk-sensitive hatching in Neotropical leaf-breeding treefrogs. **Ecological Monographs**. v. 78, n. 2, p. 205-224, 2008.

GONÇALVES, H.; MARTÍNEZ-SOLANO, I.; FERRAND, N.; GARCÍA-PARÍS, M. Conflicting phylogenetic signal of nuclear vs mitochondrial DNA markers in midwife toads (Anura, Discoglossidae, Alytes): deep coalescence or ancestral hybridization? **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, p. 494-500, 2007.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **The Journal of Heredity**. v. 89, p. 415-426, 1998.

GVOZDIK, V.; MORAVEC, J.; KLÜTSCH, C.; KOTLIK, P., Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 55, p. 1146-1166, 2010.

HADDAD, C. F. B. **Comportamento reprodutivo e comunicação sonora de *Hyla minuta* Peters, 1982 (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Campinas: UNICAMP, 1987. 140 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

- HARDMAN, M.; LUNDBERG, J. G. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “*phractocephaline*” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 40, p. 410-418, 2006.
- HAZKANI-COVO, E.; ZELLER, R. M.; MARTIN, W. Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (NUMTs) in sequenced nuclear genomes. **PLOS Genetics**. v. 6, 2010.
- HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **Plos Biology**. v. 2, n. 10, p. 1657-1663, 2004.
- HOWELL, N.; ELSON, J. L.; HOWELL, C., & TURNBULL, D. M. Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, n. 10, 2213-2221, 2007.
- IRWIN, D. M.; KOCHER, T. H.; WILSON, A. C. evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**. v. 32, p. 138-144, 1991.
- JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**. v. 14, n. 2, p.107-124, 2011.
- JOLY, C. A. Biodiversidade e mudanças climáticas: contexto evolutivo, histórico e político. **Ambiente & Sociedade**. v. 10, n. 1, p. 169-172, 2007.
- JUNQUEIRA E CARNEIRO. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9 ed. 2013.
- KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R. & BELDEN, L. K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**. v. 410, p. 681-684, 2001.
- LAGERSTRÖM-FERMÉR, M.; OLSSON, C.; FORSGREN, L.; & SYVÄNEN, C. Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant during life. **American Journal of Human Genetics**. v. 68, n. 5, p. 1299-1301, 2001.
- LEITE, L. A. R. L. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. **Biota Neotropica**. v. 12, n. 3, p. 301-307, 2012.
- LOGAN, D. C. The mitochondrial compartment. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 6, p. 1225-1243, 2006.
- LOUGHEED, S. C.; AUSTIN, J. D.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T.; CHEK, A. A. Multicharacter perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a Neotropical hylid frog. **Evolutionary Biology**. v. 6, n. 23, 2006.
- LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MARGARIDO, V. P.; KUHN, G. C. S.; GOMES, V. N.; PRIOLI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. A recent transposition of river involving Parana´ and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the Neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). **Mitochondrial DNA**. 2012.
- MAFFEI, F.; UBAID, F. K. & JIM, J. Anurofauna em área de cerrado aberto no município de Borebi, estado de São Paulo, Sudeste do Brasil: uso do habitat, abundância e variação sazonal. **Biota Neotropica**. v.11, n. 2, p. 221-233, 2011.

MARSHALL, E. Will DNA bar codes breathe life into classification? **Science**. v. 307, p. 1037, 2005.

MATSON, C. W.; LAMBERT, M. M.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; DONNELLY, K. C.; ISLAMZADEH, A.; POLITOV, D. I.; BICKHAM, J. W. Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, n. 4, 2006.

MAZZOTTI, F. J. et al. Stressor-response model for Southwest Florida amphibians. **Report for ecological modeling support for the evaluation of alternatives for the Southwest Florida feasibility study**. University of Florida. Gainesville, FL, 2007.

MCMILLAN, W. O. & PALUMBI, S. R. Concordant evolutionary patterns among Indo-West Pacific butterflyfishes. **Proceedings of the Royal Society**. v. 260, p. 229-236, 1995.

MIRANDA, A. F. **Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: filogenia e cromossomo B**. Viçosa: UFV, 2012. 71 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MIYAZONO, F.; SCHNEIDER, P. M.; METZGER, R.; WARNECKE-EBERZ, U.; BALDUS, S. E.; DIENES, H. P.; AIKOU, T.; HOELSCHER, A. H. Mutations in the mitochondrial DNA *D-Loop* region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **Oncogene**. v. 21, n. 23, p. 3780-3783, 2002.

MOORE, W. S. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. **Evolution**. v. 49, n. 4, p. 718-726, 1995.

MORAIS, P. J. S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa: Contributo para o conhecimento da origem e evolução da população de um território integrado no ex-Império Colonial Português durante 500 anos**. Lisboa: Egas Moniz, 2013. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Lisboa, 2013.

MORESCO, R. M. **Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em populações de biomas distintos**. São José do Rio Preto: UNESP, 2013. 133p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

MORIARTY, E. C.; CANNATELLA, D. C. Phylogenetic relationships of the North American chorus frogs (*Pseudacris*: Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 30, p. 409-420, 2004.

MOTA, E. P. **Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura; Hylidae) na Amazônia brasileira**. Manaus: INPA\UFAM, 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In vitro*: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**. v. 51, p. 263-273, 1986.

MUNWES, i.; GEFFEN, e.; FRIEDMANN, a.; TIKOCHINSKI, y.; GAFNY, s. Variation in repeat length and heteroplasmy of the mitochondrial DNA control region along a core–edge gradient in the eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*). **Molecular Ecology**. v. 20, p. 2878-2887, 2011.

NASS, M. M. K.; NASS, S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. **The Journal of Cell Biology**. v. 19, 1963.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artes Médicas, 5 ed., 2011.

POUNDS, J. A.; CRUMP, M. L. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. **Conservation Biology**. v. 8, n. 1, p. 72-85, 1994.

RANTANEN, A.; LARSON, N. G. Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. **Humam Reproduction**. v. 15, n. 2, p. 86-91, 2000.

RIBEIRO-JÚNIOR, J. W. & BERTOLUCI, J. Anuros do cerrado da Estação Ecológica e da Floresta Estadual de Assis, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**. v. 9, n. 1, p. 207-216, 2009.

RICHLY, E., LEISTER, D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. **Molecular Biology and Evolution**. v. 21, p. 1081-1084, 2004.

ROLDÁN, M. I.; HERAS, S.; PATELLANI, R. & MALTAGLIATI, F. Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. **Genética**. v. 136, p. 1-4, 2009.

RON, S. R.; SANTOS, J. C.; CANNATELLA, D. C. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (*Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 39, p. 392-403, 2006.

RUVINSKY, I.; MAXSON, L. R. Phylogenetic Relationships among Bufonoid Frogs (Anura: Neobatrachia) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 5, n. 3, p. 533-547, 1996.

SALDUCCI, M. D.; MARTY, C.; CHAPPAZ, R.; GILLES, A. Molecular phylogeny of French Guiana Hylinae: implications for systematics and biodiversity of the Neotropical frogs. **Comptes Rendus Biologies**. v. 325, p. 141-153, 2002.

SALDUCCI, M. D.; MARTY, C.; FOUQUET, A.; GILLES, A. Phylogenetic relationships and biodiversity in Hylids (Anura: Hylidae) from French Guiana . **Comptes Rendus Biologies**. v. 328, p. 1009-1024, 2005.

SANTOS, L. R. S. & OLIVEIRA, C. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*. v. 24, n. 1, p. 64-70, 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMONS, M. J. **Fundamentos da Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., 2010.

SOLIGNAC; M.; MONNEROT, M.; MOUNLOU, J. C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 80, p. 6942-6943, 1983.

SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, p. 13486-13491, 2008.

SOUZA, V. M.; SOUZA, M. B.; MORATO, E. F. Efeitos da sucessão florestal sobre a anurofauna (Amphibia: Anura) da Reserva Catuaba e seu entorno, Acre, Amazônia sul-ocidental. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 25, n. 1, p. 49-57, 2008.

STRUGNELL, J. M.; LINDGREN, A. R. A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 17, p. 337-344, 2007.

STRUTZENBERGER, P.; BREHM, G.; FIEDLER, K. DNA barcoding-based species delimitation increases species count of *Eois* (Geometridae) moths in a well-studied tropical mountain forest by up to 50%. **Journal of Insect Science**. v. 18, p. 349-362, 2010.

TAKAMATSU, C.; UMEDA, S.; OHSATO, T.; OHNO, T.; ABE, Y.; FUKUOH, A.; SHINAGAWA, H.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Regulation of the mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. **Embo reports**. v. 3, n. 5, p. 451-456, 2002.

TEDESCHI, L. G. **Filogenia molecular e biogeografia de *Psomophis* Myers & Cadle 1994 e a história da diagonal de áreas abertas Neotropicais**. Brasília: UnB, 2013. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Animal, 2013.

THANGARAJ, M.; LIPTON, A. P. Assessment of genetic variation in closely related seahorse species (Genus: *Hippocampus*) using mtDNA marker. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 140-142, 2011.

VAN DER KUYL, A. C.; PH. B. D. L.; DEKKER, J. T.; MAAS, J.; WILLEMSSEN, R. E.; GOUDSMIT, J. Phylogenetic Relationships among the Species of the Genus Testudo (Testudines: Testudinidae) Inferred from Mitochondrial 12S rRNA Gene Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 22, n. 2, p. 174-183, 2002.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human Mutation**. v. 30, n. 2, p. 386-394, 2009.

VENCES, M.; THOMAS, M.; MEIJDEN, A. V. D.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**. v. 2, n. 5, p. 1-12, 2005.

VIEIRA, D. M. L. **Taxonomia e filogenia molecular de *Rhinella margaritifera* (Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia Brasileira**. Manaus: INPA/UFAM 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, n. 1, p. 11466-11473, 2008.

- WALLACE, D. C. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. **American Heart Journal**. v. 139, p. 70-85, 2000.
- WANG, H.; TSAI, M.; DEAN, J.; LEE, S. Molecular Phylogeny of Gobioid Fishes (Perciformes: Gobioidae) Based on Mitochondrial 12S rRNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 20, n. 3, p. 390-408, 2001.
- WIENS, J. J.; FETZNER, J. W.; PARKINSON, C. L.; REEDER, T. W. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. **Systems Biology**. v. 54, n. 5, p. 778-807, 2005.
- WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; HUA, X.; MOEN, D. S. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 55, p. 871-882, 2010.
- WILKINSON, G. S.; CHAPMAN, A. M. Length and Sequence Variation in Evening Bat *D-loop* mtDNA. **Genetics**. v. 128, p. 607-617, 1991.
- WILLIAMS, S. T.; KNOWLTON, N. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. **Molecular Biology and Evolution**. n. 18, v. 8, p. 1484-1493, 2001.
- YOUNG, B. E.; LIPS, K. R.; REASER, J. K.; IBÁÑEZ, R.; SALAS, A. W.; CEDEÑO, J. R.; COLOMA, L. A.; RON, S.; LA MARCA, E.; MEYER, J. R.; MUÑOS, A.; BOLAÑOS, F.; CHAVES, G.; ROMO, D. Complex causes of amphibian population declines. **Conservation Biology**. v. 15, n. 5, p. 1213-1223, 2001.
- ZEVIANI, Z.; DI-DONATO, S. Mitochondrial disorders. **Brain**. v. 127, p. 2153-2172, 2004.
- ZHANG, J.; NIE, L.; WANG, Y.; HU, L. The complete mitochondrial genome of the large-headed frog, *Limnonectes bannaensis* (Amphibia: Anura), and a novel gene organization in the vertebrate mtDNA. **Gene**. v. 442, p. 119-127, 2009.

CAPÍTULO 2

Aspectos genéticos e ecológicos de *Scinax granulatus* (Anura: Hylidae) baseados na análise do DNA nuclear e mitocondrial

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Conservation Genetics*.

ASPECTOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS DE *Scinax granulatus* (ANURA: HYLIDAE) BASEADOS NA ANÁLISE DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL

Resumo

Os anfíbios constituem um grupo de animais extremamente sensíveis a alterações ambientais. Uma das consequências desta sensibilidade é a ocorrência de um declínio global de suas populações, provavelmente causado pelas ações antrópicas. Em razão disso, os estudos voltados ao conhecimento dos níveis de variabilidade genética de populações naturais têm especial importância, já que a diversidade genética é um fator primordial para a adaptação dos indivíduos frente às condições adversas e, em longo prazo, para a manutenção da espécie. O objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade e estrutura genética de uma população de *Scinax granulatus* do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas – PR. Para tanto, foram coletados 28 indivíduos, separados de acordo com a distribuição espacial. Os indivíduos do lado A da lagoa foram coletados em uma única bromélia, constituindo um único grupo (Lado A) (n=8) e os indivíduos do lado B foram divididos em 3 grupos, coletados em bromélias de diferentes árvores: Lado B – Bromélia 1 (n=10), Lado B – Bromélia 2 (n=5) e Lado B – Bromélia 3 (n=5). A partir da extração do genoma total, o DNA foi analisado pelo marcador nuclear ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e pela amplificação do *D-loop* do DNA mitocondrial. Dos 105 loci encontrados, 83 foram polimórficos para a população de indivíduos coletados no lado A da lagoa, 86 para os do Lado B - Bromélia 1, 67 para Lado B - Bromélia 2 e 66 para Lado B - Bromélia 3, com 95,02 % de variação intrapopulacional e 4,98% de variação interpopulacional. O índice de diferenciação genética interpopulacional exibiu valores moderados para a subpopulação Lado B – Bromélia 3 em relação às demais, com valores de F_{st} variando entre 0.064 e 0.109, o que pode estar relacionado ao comportamento reprodutivo e desenvolvimento destes anfíbios nas bromélias que constituem excelentes micro-habitats, já que não existem barreiras físicas entre este grupo e os demais. A dissimilaridade genética não indicou isolamento por distância. A amplificação do DNA mitocondrial revelou a existência de três fragmentos com diferentes comprimentos para o *D-loop*, que pode ser considerado o primeiro indício da ocorrência de heteroplasmia em anuros neotropicais.

Palavras-chave: mtDNA. *D-loop*. ISSR. Marcador molecular. Mata Atlântica.

Introdução

A Classe Amphibia compreende três ordens: Anura inclui os sapos, rãs e pererecas, Caudata, corresponde às salamandras e Gymnophiona, compreende as cecílias (Frost 2014). Os anuros estão presentes em quase todo o planeta, têm fácil manuseio e, por apresentar elevada sensibilidade a alterações em seu habitat, são considerados indicadores de equilíbrio ecológico (Dixon et al. 2011), sendo alvo de diversos estudos nos últimos anos.

Dentro de Anura, Hylidae é a família mais numerosa, com 936 espécies (Frost 2014). Nesta família encontram-se os anuros arborícolas conhecidos como pererecas, que comumente têm cabeça e olhos grandes, cintura delgada, patas longas e discos digitais aumentados (Pough et al. 1998).

Scinax granulatus (Peters 1871), pertencente à Hylidae, subfamília Hylinae que, de acordo com Frost (2014), já foi registrada no nordeste da Argentina, ao sul da Província de Buenos Aires, sul do Paraguai, no Uruguai, e no do sul Brasil, onde distribui-se pelo Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Com cerca de 35 a 45 mm; sua pele, com estrutura granular, tem coloração que varia do verde amarelado até o marrom, algumas manchas claras e linhas longitudinais escuras (Moresco et al. 2009). *Scinax granulatus* tem habitats variados, que incluem áreas abertas, arbustivas e florestais (Moresco et al. 2009; Wachlevski e Rocha 2010, Conte et al. 2010). Durante o período reprodutivo, são encontradas com frequência em habitats lânticos, onde depositam seus ovos sobre plantas aquáticas, e em outras épocas do ano concentram-se sobre as árvores (Moresco et al. 2009), na maioria das vezes, em bromélias, e em razão disso é conhecida popularmente como perereca-do-gravatá.

Os estudos realizados com esta espécie até então se restringem a relatos de descrição morfológica, vocalização e distribuição (Alcalde e Rosset 2003; Solé et al. 2005; Canavero et al. 2008; Colombo et al. 2008; Moresco et al. 2009; Conte et al. 2010; Fonte 2010; Wachlevski e Rocha 2010; Trindade et al. 2010; Cardozo et al. 2011.). Frente à constatação de um declínio global das populações de anfíbios (Young et al. 2001; Carey et al. 2001; Kiesecker et al. 2001; Biek et al. 2002; Wake e Vredenburg 2008; Dixon et al. 2011), os estudos que objetivam acessar as informações contidas no DNA têm ganhado destaque nos últimos anos, já que a redução contínua no tamanho das populações está associada com a perda de variabilidade genética por deriva genética e por endogamia, o que tem por consequência a redução de futuras opções evolutivas, sendo que tais reduções podem resultar num declínio da aptidão e eventual extinção (Carvalho e Hauser 1998; Chen et al. 2012).

Atualmente, a integração entre as informações fornecidas por marcadores nucleares e mitocondriais ganharam destaque, uma vez que permitem uma análise mais precisa acerca da

história evolutiva das espécies, já que possuem diferentes taxas de mutações: lenta para o DNA nuclear (nDNA) e rápida para o DNA mitocondrial (mtDNA) (Faivovich et al. 2010; Vieira 2010; Casu et al. 2011).

O marcador *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (Zietkiewicz et al. 1994) é amplificado a partir de uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas, ou seja, ele amplifica a região existente entre dois locos de microssatélites, para isto utiliza-se um único *primer* (Wolfe 2005). Algumas das vantagens em sua utilização são: o fato de que não é necessário o conhecimento prévio de sequências de DNA da espécie-alvo (Wolfe 2005), o que facilita a sua aplicação em espécies ainda não estudadas; os fragmentos produzidos têm grande reprodutibilidade, elevado polimorfismo, requer pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos (Zietkiewicz et al. 1994; Bornet e Branchard 2001; Casu et al. 2011) e oferece uma abordagem dinâmica para estudar variações genômicas, com potencial para uso em genética molecular de populações, taxonomia, mapeamento do genoma, bem como para o rastreamento de mutações somáticas (Zietkiewicz et al. 1994).

Em contraste com o nDNA, o mtDNA tem uma estrutura simples. Trata-se de uma única molécula de DNA circular de fita dupla, com tamanho reduzido (cerca de 15 a 20Kb nos animais), composta por duas cadeias: a cadeia interna ou cadeia leve (L) e a externa ou cadeia pesada (H); tem herança predominantemente materna (trata-se de um DNA haplóide), logo, não há recombinação, e além disso, apresenta várias cópias nas células, o que facilita seu isolamento (Cavalli-Sforza 1998; Nelson e Cox 2011).

D-loop é uma das únicas regiões não codificantes do genoma mitocondrial, e possui taxas de mutação especialmente elevadas, de 2 a 5 vezes maiores do que para todos os genes mitocondriais. Esta característica peculiar faz com que seja o marcador mitocondrial mais indicado para os estudos de diversidade genética intrapopulacional, pois é mais sensível do que loci protéicos como um marcador de estruturação filogeográfica sob escalas micro evolucionárias de tempo, já que mostra uma rápida substituição de nucleotídeos e alto nível de polimorfismos intraespecíficos (McMillan e Palumbi 1995; Avise 2000; Roldán et al. 2009).

Sabendo-se que para garantir a manutenção da biodiversidade é necessária a existência de níveis elevados de diversidade genética e este tipo de análise nunca foi realizada para *S. granulatus*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente uma população desta espécie em diferentes bromélias de ambos os lados de uma lagoa natural do Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas - PR, por meio da integração entre os dados fornecidos pela análise do genoma nuclear (ISSR) e mitocondrial (*D-loop*), sendo que os resultados obtidos poderão ser utilizados para nortear futuras propostas de manejo e conservação.

Materiais e Métodos

Foram realizadas visitas noturnas nas margens de uma lagoa localizada no Refúgio da Vida Silvestre dos Campos de Palmas – PR e através de visualização e reconhecimento da vocalização da espécie foram coletados manualmente 28 indivíduos, que correspondem a 8 indivíduos coletados em uma bromélia do lado A da lagoa e o restante no lado B, estes últimos foram ainda separados por bromélias: Bromélia 1 a 3, com 10 indivíduos para a bromélia 1 e 5 indivíduos nas bromélias 2 e 3. A coleta dos exemplares desta espécie é amparada pela licença temporária SISBIO 31060-1 e o sacrifício foi realizado por submersão corporal completa em etanol 20% (Comitê de Ética na Experimentação Animal a Aulas Práticas - CEEAAP/Unioeste - Protocolo nº 66/10). As coletas foram realizadas nos meses de janeiro a abril em 2012 e 2013, pois durante os demais meses a temperatura é muito baixa na região, o que inviabiliza a coleta, já que a espécie possui baixa atividade neste período.

Para a extração de DNA utilizou-se o tecido hepático para ambas as análises (ISSR e *D-loop*). Todos os animais fixados foram depositados na Coleção Científica de Anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica da IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, como material testemunho.

A extração do DNA total do tecido hepático preservado em etanol 100% foi realizada com o *Kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8%, utilizando a comparação com o peso molecular do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen Life Technologies Corporation, Grand Island, New York, USA). Após a quantificação, o DNA foi diluído a uma concentração final de 10 ng/μl.

Fragmentos de DNA ISSR foram amplificados a partir de amostras de DNA genômico dos indivíduos. Para isso, foram utilizados 4 *primers* (Tabela 1), e as condições de amplificação do DNA, utilizando PCR, foram as recomendadas por Fernandes-Matioli et al. (2000), com modificações. Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, corados em brometo de etídeo, visualizados e fotografados em um transiluminador de luz UV, com sistema de imagem Quantum ST4 v16.04 e câmera digital 1.4 megapixels através do software Quantum-capt.

Os fragmentos foram lidos para a presença (1) e ausência (0) para a obtenção de uma matriz binária. A matriz de distância genética entre pares foi obtida pelo índice de similariedade de Jaccard, para construir o dendograma *Neighbor-Joining*, utilizou-se o programa FreeTree e Mega 3.1. As principais coordenadas de dispersão (*scatter plot*) foram obtidas utilizando os programas DistPCoA e Statistica 7.1. A diferenciação genética foi

examinada através da aplicação do teste de Mantel, com 10.000 permutações para a matriz de similaridade Jaccard utilizando o programa Mantel-Struct 1.0. A análise da variância molecular (AMOVA), heterozigosidade esperada (H_e) e o índice de diferenciação genética (F_{ST}) foram obtidos pelo programa Arlequin 3.5.1.2. Por meio de AMOVA, a variação genética foi separada em dois níveis: por bromélia (intrapopulacional) e entre bromélias (interpopulacional).

Para a amplificação do *D-loop* do mtDNA, foram utilizados os *primers* Control IP-H e Control Wrev-L (Tabela 01), ambos descritos por Goebel et al. (1999). A solução de reação continha 6 μ l de tampão 10X da reação de PCR (Invitrogen), 3mM de $MgCl_2$, 4,6 mM de dNTPs, 0,6mM de cada *primer*, 2U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 10 ng/ μ l de DNA molde, para um volume final de 30 μ l. A PCR foi realizada em termociclador programado com as seguintes condições: 94°C (1 min), 36 ciclos de 94°C (1 min), 48°C (40 s), 72°C (1 min e 30 s), seguidos por 72°C (7 min). O produto final da PCR foi aplicado em um gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo, submetido à eletroforese por 4 h, a 85V, e posteriormente visualizados em um transiluminador de luz UV e fotografados com uma câmera digital.

Resultados

Resultados ISSR

Dos 105 loci encontrados, 83 foram polimórficos para a subpopulação de indivíduos coletados no lado A da lagoa, 86 para os do Labo B - Bromélia 1, 67 para lado B - Bromélia 2 e 66 para Lado B - Bromélia 3, com 95.02% de variação intrapopulacional e 4.98% de variação interpopulacional. Os fragmentos amplificados estavam entre 150 e 2000pb (Figura 1).

A análise do dendograma revela que existe fluxo gênico entre o Lado A e o Lado B da lagoa, pois não constatou-se uma diferenciação entre os indivíduos de ambos os lados entretanto, indica uma suave separação dos indivíduos do Lado B – Bromélia 3 em relação aos demais (Figura 2).

O gráfico de dispersão construído com os três principais vetores (0.095, 0.090 e 0.082 de variação, respectivamente), também obtido pelo Índice de Similaridade de Jaccard (Figura 3), corrobora o dendograma, pois mostra que a subpopulação da Bromélia 3 do Lado B da lagoa está sutilmente separada das demais populações.

Através do teste de Mantel foram obtidos os valores da dissimilaridade genética, que é a variabilidade genética dentro e entre as subpopulações, mostrando que estas subpopulações possuem elevada diversidade genética (Tabela 2). A dissimilaridade genética intrapopulacional foi 0.679 no Lado A, 0.638 no Lado B – Bromélia 1, 0.647 no Lado B – Bromélia 2 e 0.626 no Lado B – Bromélia 3. A heterozigosidade esperada (H_e) foi quase a mesma para todas as subpopulações 0.348 ± 0.208 no Lado A, 0.328 ± 0.199 no Lado B – Bromélia 1, 0.316 ± 0.252 no Lado B – Bromélia 2 e 0.312 ± 0.254 no Lado B – Bromélia 3. O índice de fixação molecular foi baixo entre as subpopulações do Lado A, Lado B – Bromélia 1 e Lado B – Bromélia 2 ($F_{st} < 0.05$) e moderado entre a subpopulação do Lado B – Bromélia 3 com relação à Lado A e Lado B – Bromélia 2 e Lado B – Bromélia 1 ($0.25 > F_{st} \geq 0.05$). Estes resultados corroboram a diferenciação genética existente entre a subpopulação Lado B – Bromélia 3 e as demais subpopulações analisadas.

Resultados da amplificação do *D-loop* do mtDNA

Verificou-se a amplificação de três fragmentos para a região do *D-loop* em *Scinax granulatus*, com aproximadamente 600pb (banda 1), 650 pb (banda 2) e 700pb (banda 3), indicando a ocorrência de heteroplasmia (Figura 4).

Discussão

As duas análises (Figura 2 e 3) foram congruentes quanto aos resultados, evidenciando uma diferenciação parcial da subpopulação Lado B – Bromélia 3 em relação às demais. Como não existe barreira geográfica entre esta subpopulação e as demais, sua composição parece ser a responsável por esta sutil diferenciação, já que é composta por 4 indivíduos juvenis e 1 fêmea adulta que se encontravam em uma mesma bromélia, indicando a provável ocorrência de reprodução e manutenção da prole enquanto juvenil em seu interior, que parece funcionar como um micro-habitat até a fase adulta de *S. granulatus*. Em *Scinax* esta associação já foi estudada por Sabagh et al. (2012) que analisaram a dieta de girinos de *S. littoreus* e *S. perpusillus* que se desenvolvem no fitotelma da *Alcantarea glaziouana* (Bromeliaceae), e verificaram que a dieta destas espécies, durante esta fase do ciclo de vida, inclui basicamente algas, fungos e protozoários, enquanto copépodes e ácaros são raros na dieta de ambos os girinos. Para Schineider e Teixeira (2001), é provável que as bromélias possam oferecer um abrigo melhor no que se refere às defesas naturais contra os predadores diurnos.

A associação de anfíbios com bromélias é frequentemente observada em toda a região Neotropical (Schineider e Teixeira 2001; Andrade et al. 2009). Algumas espécies de anuros se adaptaram de tal maneira às bromélias-tanque que passaram a utilizar as axilas das plantas durante todo o ciclo de vida, desenvolvendo estratégias avançadas relacionadas com o modo reprodutivo (Duellman, 1985). Esta associação pode ficar tão estrita, que muitas vezes as bromélias correspondem ao único local de reprodução (Lannoo et al. 1987; Peixoto 1995). Os marcadores moleculares comprovaram ser ferramentas eficazes para o entendimento de características comportamentais de anfíbios. Seppä e Laurilla (1999) caracterizaram *Rana temporaria* e *Bufo bufo* como espécies com baixa mobilidade e fidelidade ao local de reprodução, pois populações distantes destas espécies apresentaram altas taxas de diferenciação genética entre si.

A existência de variabilidade genética é um fator-chave para a manutenção das espécies quando as populações são submetidas a condições adversas. Pode-se dizer então que as populações de *S. granulatus* analisadas neste estudo não estão sob risco eminente, uma vez que revelaram possuir níveis elevados de diversidade genética. Esta é uma constatação relevante quando é considerada a existência de um declínio global das populações de anfíbios nos últimos anos, fenômeno este observado no mundo todo (Young et al. 2001; Carey et al. 2001; Kiesecker et al. 2001; Biek et al. 2002; Wake e Vredenburg 2008; Dixon et al. 2011). A anurofauna é um indicador significativo da saúde dos ecossistemas em razão de sua vulnerabilidade a estresses ambientais; logo, mediante alterações ambientais desfavoráveis,

estes organismos exibem os efeitos de estresses mais cedo do que os outros (Mazzotti et al. 2007; Wake e Vredenburg 2008). Um fator que pode ter contribuído para a manutenção da diversidade genética nesta população foi a criação do Refúgio da Vida dos Campos de Palmas, em 2006, que engloba todas as áreas de coleta deste estudo, o que reforça a importância da criação de Unidades de Conservação.

A diversidade genética pode ser produzida por mutação, deriva genética e seleção, mas a diferenciação entre populações tende a aumentar com a ausência de fluxo gênico (Varvio et al. 1986). A análise de variância molecular mostrou que 95,02% da variância molecular total pode ser atribuída a diferenças intrapopulacionais e que os 4,98% restantes podem ser atribuídos a diferenças interpopulacionais, dados estes que comprovam a existência de intenso fluxo gênico. A distância geográfica existente entre um lado e outro da lagoa não é suficiente para promover o isolamento das populações de ambos os lados, e neste caso os indivíduos migram sem restrições, e o fluxo gênico não sofre barreiras. Resultados semelhantes foram encontrados por Newman e Squire (2001) que avaliaram populações de *Lithobates sylvaticus* (citado como *Rana sylvatica*) localizadas entre distâncias menores que 2 km e não verificaram subdivisão populacional indicando um alto fluxo gênico.

Em relação à heterozigosidade esperada (H_e), os valores encontrados variaram entre 0.348 a 0.312, resultado semelhante ao obtido por Conte et al. (2011), que identificaram valores elevados de heterozigosidade observada (H_o) (entre 0,31-0,59) e H_e de 0,30-0,58, através da utilização de marcadores microsatélites em populações de *Physalaemus cuvieri*. Moresco et al (2013) estudando esta mesma espécie, utilizaram o marcador ISSR e obtiveram valores um pouco mais elevados de H_e (de 0.46 a 0.51) e provaram que este marcador é útil e eficaz para o diagnóstico preliminar da diversidade genética em populações de anfíbios, além de apresentar vantagens adicionais, como o baixo custo, alta repetibilidade e rapidez na produção dos resultados, já que não requer conhecimento prévio da sequência a ser amplificada.

Casu et al. (2011) utilizaram ISSR e três marcadores de DNA mitocondrial para investigar a estrutura genética populacional em *Patella ferruginea*. As sequências de mtDNA mostraram níveis muito baixos de diferenciação genética e o marcador ISSR mostrou a presença de duas populações geneticamente estruturadas, sendo que para estas populações, o fluxo genético é restrito em função da existência de barreiras.

Os três fragmentos amplificados para o *D-loop* mitocondrial indicam a ocorrência de heteroplasmia em *Scinax granulatus*. Na heteroplasmia verifica-se a presença de mais do que um genótipo de mtDNA em um mesmo indivíduo, e existem poucos relatos bem documentados sobre esta condição em animais superiores (Bermingham et al. 1986; Nelson e

Cox 2011). Variações substanciais no comprimento na Região Controle do mtDNA, ou próximo a ela, têm sido atribuídas a variações no número de cópias das repetições em *tandem* nesta região.

Birmingham et al. (1986) demonstraram a existência de heteroplasmia de tamanho no mtDNA de *Hyla cinerea* e *H. gratiosa*. Para Munwes et al. (2011), o menor comprimento de repetições em *tandem* e a existência de menos cópias heteroplásmicas de DNA mitocondrial estão associados com funções mitocondriais mais eficientes, o que pode estar relacionado a uma melhor sobrevivência ambiental sob condições extremas.

Scinax granulatus é uma espécie de pequeno porte, e sua associação com bromélias para a reprodução requer um ciclo de vida rápido, com adaptações fisiológicas que proporcionem aos girinos um rápido processo de metamorfose (Gomes et al. 2007). Concomitantemente, se há restrições temporais para o término do desenvolvimento ou do ciclo de vida, as taxas de atividade metabólica devem aumentar (Dunbrack e Giguere 1987). Hirayama et al. (2010) sugeriram que alterações no comprimento de regiões repetidas em *tandem* no *D-loop* do mtDNA podem influenciar a expressão gênica e, provavelmente, estão relacionadas com a adaptação a um determinado ambiente.

Os fatores relacionados à heteroplasmia ainda são controversos, e faz-se necessária a realização de estudos mais detalhados para a obtenção de maiores informações a este respeito. No entanto, acredita-se que a heteroplasmia esteja associada com variações nas repetições em *tandem* do *D-loop* do mtDNA, como uma estratégia para aumentar a eficiência das funções mitocondriais.

Enfim, a diferenciação da subpopulação coletada na Bromélia 3 do lado B da lagoa (Lado B – Bromélia 3) em relação às demais, permite supor que as bromélias funcionam como um micro-habitat para a reprodução e conclusão do ciclo de vida, sendo esta uma importante constatação acerca do comportamento de *S. granulatus*. Outra informação relevante é a existência de níveis elevados de diversidade genética e alto nível de fluxo gênico entre as subpopulações analisadas, o que reitera os benefícios da criação de Unidades de Conservação para garantir a preservação dos anfíbios. A amplificação do DNA mitocondrial revelou a existência de três fragmentos para o *D-loop*, o que pode ser considerado o primeiro indício da ocorrência de heteroplasmia em anuros neotropicais; entretanto, ainda são necessários maiores estudos para entender sua etiologia e implicações para o organismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização da captura de anfíbios (SISBIO 10522-1). Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Alcalde L, Rosset SD (2003) Descripción y comparación del condrocraqueo em larvas de *Hyla raniceps* (Cope, 1862), *Scinax granulatus* (Peters, 1871) y *Scinax squalirostris* (Lutz, 1925) (Anura: Hylidae). Cuad Herpetol 17:33-49
- Andrade EVE, Albertim M, Moura GJB (2009) Primeiro registro do uso de Bromeliaceae por *Elachistocleis ovalis* (Schneider, 1799) (Anura: icrohylidae). Biota Neotrop 9:257-259
- Avice JC (2000) Phylogeography: The history and Formation of the Species. Harvard University Press, Cambridge
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. Mol Ecol 17:3754-3774
- Bermingham E, Lamb T, Avice JC (1986) Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. J Heredity 77:249-252
- Bert TM, Seyoum S, Tringali MD, McMillen-Jackson A (2002) Methodologies For Conservation Assessments Of The Genetic Biodiversity Of Aquatic Macro-Organisms. Braz J Biol 62:387-408
- Biek R, Funk WC, Maxell BA, Mills LS (2002) What is missing in amphibian decline research: insights from ecological sensitivity analysis. Conserv Biol 16:728-734
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res 27:1767-1780
- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. Plant Mol Biol Report 19:209-215
- Canavero A, Arim M, Naya DE, Camargo A, Rosa I, Maneyro R (2008) Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. N-West J Zool 4:29-41
- Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB (2011) Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): Diversity and Informative Variation. Copeia 2:251-263
- Carey C, Heyer RW, Wilkinson J, Alford RA, Arntzen JW, Halliday T, Hungerford L, Lips KR, Middleton E, Orchard SA, Rand AR (2001) Amphibian declines and environmental changes: use of remote-sensing data to identify environmental correlates. Conserv Biol 15:903-1013
- Carvalho GR, Hauser L (1998) Advances in the molecular analysis of fish population structure. Ital J Zool 65:21-33
- Casu M, Rivera-Ingraham GA, Cossu P, Lai T, Sanna D, Dedola GL, Sussarellu R, Sella G, Cristo B, Curini-Galletti M, García-Gómez JC, Espinosa F (2011) Patterns of spatial genetic structuring in the endangered limpet *Patella ferruginea*: implications for the conservation of a Mediterranean endemic. Genetica 139:1293-1308

- Cavalli-Sforza LL, (1998) The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet* 14:60-65
- Chen SY, Zhang Y, Wang X, Sun J, Xue Y, Zhang P, Zhou H, Qu L (2012) Extremely Low Genetic Diversity Indicating the Endangered Status of *Ranodon sibiricus* (Amphibia: Caudata) and Implications for Phylogeography. *Plos One* 7:1-11
- Colombo P, Kindel A, Vinciprova G, Krause L (2008) Composição e ameaças à conservação dos anfíbios anuros do Parque Estadual de Itapeva, município de Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop* 8:229-240
- Conte CE, Nomura F, Machado RA, Kwet A, Lingnau R, Rossa-Feres DC (2010) New records in the geographic distribution range of the anurans of the Araucaria Forest and considerations on their vocalizations. *Biota Neotrop* 10:201-224
- Conte M, Zucchi MI, Andrade GV, Souza AP, Recco-Pimentel SM (2011) Study of closely related species within the *Physalaemus cuvieri* group (Anura): contribution of microsatellite markers. *Genet Mol Res* 10:1434-1444
- Dixon AD, Cox WR, Everham EM, Ceilley DW (2011) Anurans as Biological Indicators of Restoration Success in the Greater Everglades Ecosystem. *Southeast Nat* 10:629-646
- Duellman WE (1985) Reproductive modes in anuran amphibians: phylogenetic significance of adaptive strategies. *S Afr J Scie* 81:174-178
- Dunbrack RL, Giguere LA (1987) Adaptive responses to accelerating costs of movement: a bioenergetic basis for the type-III functional response. *Am Nat* 130:147-160.
- Faivovich J, Haddad CFB, Baêta D, Jungfer KH, Álvares GFRA, Brandão RA, Sheil C, Barrientos LS, Barrio-Amós CL, Cruz CAG, Wheeler WC (2010) The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistics* 25:1-35
- Fernandes-Matioli FMC, Matioli SR, Almeida-Toledo, LF (2000) Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genet Mol Biol* 23, 803 - 807.
- Fonte LFM (2010) Variação morfológica e na estrutura do canto em *Scinax granulatus* (Peters, 1871) (Anura, Hylidae). Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Frost DR (2014) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Accessed 29 jan 2014
- Goebel AM, Donnelly JM, Atz ME (1999) PCR Primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, COI e cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol Phylogenet Evol* 11:163-199
- Gomes FBR, Junqueira AFB, Martins IA, Rossa-Feres DC (2007) Comunidade de girinos em poças temporárias no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, MG*

- Hirayama M, Mukai T, Miya M, Murata Y, Sekiya Y, Yamashita T, Nishida M, Watabe S, Oda S, Mitani H (2010) Intraspecific variation in the mitochondrial genome among local populations of Medaka *Oryzias latipes*. *Gene* 457:13–24
- Kiesecker JM, Blaustein AR, Belden LK (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:682-684
- Lannoo MJ, Townsend DS, Wassersug RJ (1987) Larval life in the leaves: arboreal tadpole types, with special attention to the morphology, ecology and behavior of the oophagous *Osteopilus brunneus* (Hylidae) larva. *Fieldiana Zool* 38:1-31
- Litt M, Luty LA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44(3)398-401
- Mazzotti FJ, Pearlstine LG, Chamberlain R, Barnes T, Chartier K, DeAngelis D (2007) Stressor-response model for Southwest Florida amphibians. Report for ecological modeling support for the evaluation of alternatives for the Southwest Florida feasibility study. University of Florida. Gainesville, FL. JEM Tech Report
- McMillan WO, Palumbi SR (1995) Concordant evolutionary patterns among Indo-West Pacific butterflyfishes. *Proc R Soc* 260:229-236
- Miller, M. (1999) Mantel-Struct 1.0 A program for the detection of population structure through the use of Mantel tests. Northern Arizona University
- Moresco RM (2013) Pigmentação testicular e ciclo reprodutivo anual de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 em populações de biomas distintos. Tese, Universidade Estadual Paulista
- Moresco RM, Margarido VP, Nazario D, Schmit RA, Treco FR (2009) Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax granulatus*: Distribution extension. *Check List* 5:086-088
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA *In vitro*: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 51:263-273
- Munwes I, Geffen E, Friedmann A, Tikochinski Y, Gafny S (2011) Variation in repeat length and heteroplasmy of the mitochondrial DNA control region along a core-edge gradient in the eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*). *Mol Ecol* 20:2878-2887
- Nelson DL, Cox MM (2011) Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5rd edn. Artes Médicas, Porto Alegre
- Newman RA, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the Wood frog (*Rana sylvatica*). *Mol Ecol* 10:1087-1100
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi, MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294-307
- Peixoto OL (1995) Associação de anuros a bromeliáceas na Mata Atlântica. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida* 17:75-83
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818

- Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH, Wells KD (1998) Herpetology as a field of study. In: Pough FH. Herpetology. Prentice-Hall
- Roldán MI, Heras S, Patellani R, Maltagliati F (2009) Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica* 136:1-4
- Sabagh LT, Ferreira GL, Branco CWC, Rocha CFD, Dias YD (2012) Larval Diet in Bromeliad Pools: A Case Study of Tadpoles of Two Species in the Genus *Scinax* (Hylidae). *Copeia* 4:683-689
- Schneider JAP, Teixeira RL (2001) Relacionamento entre anfíbios anuros e bromélias da restinga de Regência, Linhares, Espírito Santo, Brasil. *Iheringia Zool* 91:41-48
- Seppä P, Laurilla A (1999) Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* 82:309-317
- Solé M, Beckmann O, Pelz B, Kwet A, Engels W (2005) Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in Araucaria forests, southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna E* 40:23-28
- Trindade AO, Oliveira SV, Cappellari LH (2010) Anfíbios anuros de uma área da serra do sudeste, Rio Grande do Sul (Caçapava do Sul). *Biodivers Pampeana* 8:19-24
- Varvio SL, Chakraborty R, Nei M (1986) Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. *Heredity* 57:189-198
- Vieira DML (2010) Taxonomia e filogenia molecular de *Rhinella margaritifera* (Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia Brasileira. Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- Wachlewski M, Rocha CFD (2010) Amphibia, Anura, restinga of Baixada do Maciambu, municipality of Palhoça, state of Santa Catarina, southern Brazil. *Check List* 6:602-604
- Wake DB, Vredenburg T (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc Natl Acad Sci* 105:11466-11473
- Wolfe AD (2005) ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Methods Enzymol* 395:134-144
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibáñez AWS, Cedeño JR, Coloma SR, La Marca E, Meyer JR, Muños A, Bolaños F, Chaves G, Romo D (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Conserv Biol* 15:1213-1223
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183

Tabela 1 *Primers* utilizados

<i>Primer</i>	Sequência (P5' → 3'OH)	Aplicação
(GGAC) ₃ C	GGACGGACGGACC	ISSR
(GGAC) ₃ T	GGACGGACGGACT	ISSR
(GGAC) ₄	GGACGGACGGACGGAC	ISSR
(ACA) ₅ G	ACAACAACAACAACAG	ISSR
Control IP-H	GTCCAGATTCASTTCCGTCAG	mtDNA
Control Wrev- L	GACATAYTATGTATAAATCGAGCATT	mtDNA

Tabela 2 Comparação por pares de populações de *Scinax granulatus* baseada em loci ISSR

Pairwise Comparisons	F_{ST}	$p(F_{ST})$	p	R	Z	$Z_{10\ 000}$	Dissimilariedade Genética
Lado A x Lado B – Bromélia 1	0.021	0.095	0.043*	0.126	53.447	52.912	0.668
Lado A x Lado B – Bromélia 2	0.040	0.083	0.162	0.104	27.346	27.103	0.684
Lado A x Lado B – Bromélia 3	0.064	0.014*	0.063	0.175	27.415	27.028	0.685
Lado B – Bromélia 1 x Lado B – Bromélia 2	0.041	0.056	0.025*	0.201	33.076	32.510	0.661
Lado B – Bromélia 1 x Lado B – Bromélia 3	0.069	0.002*	0.002*	0.281	33.276	32.507	0.665
Lado B – Bromélia 2 x Lado B – Bromélia 3	0.109	0.008*	0.009*	0.511	17.227	16.648	0.689

Distância aproximada (m), Índice de Diferenciação Genética Interpopulacional (F_{ST}), nível de significância para o F_{ST} ($p(F_{ST})$), nível de significância para a dissimilariedade genética (p), correlação entre duas matrizes (r), robustês relacionada aos dados originais (Z), e depois de 10.000 permutações ($Z_{10\ 000}$), dissimilariedade genética utilizando o Coeficiente Jaccard. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$).

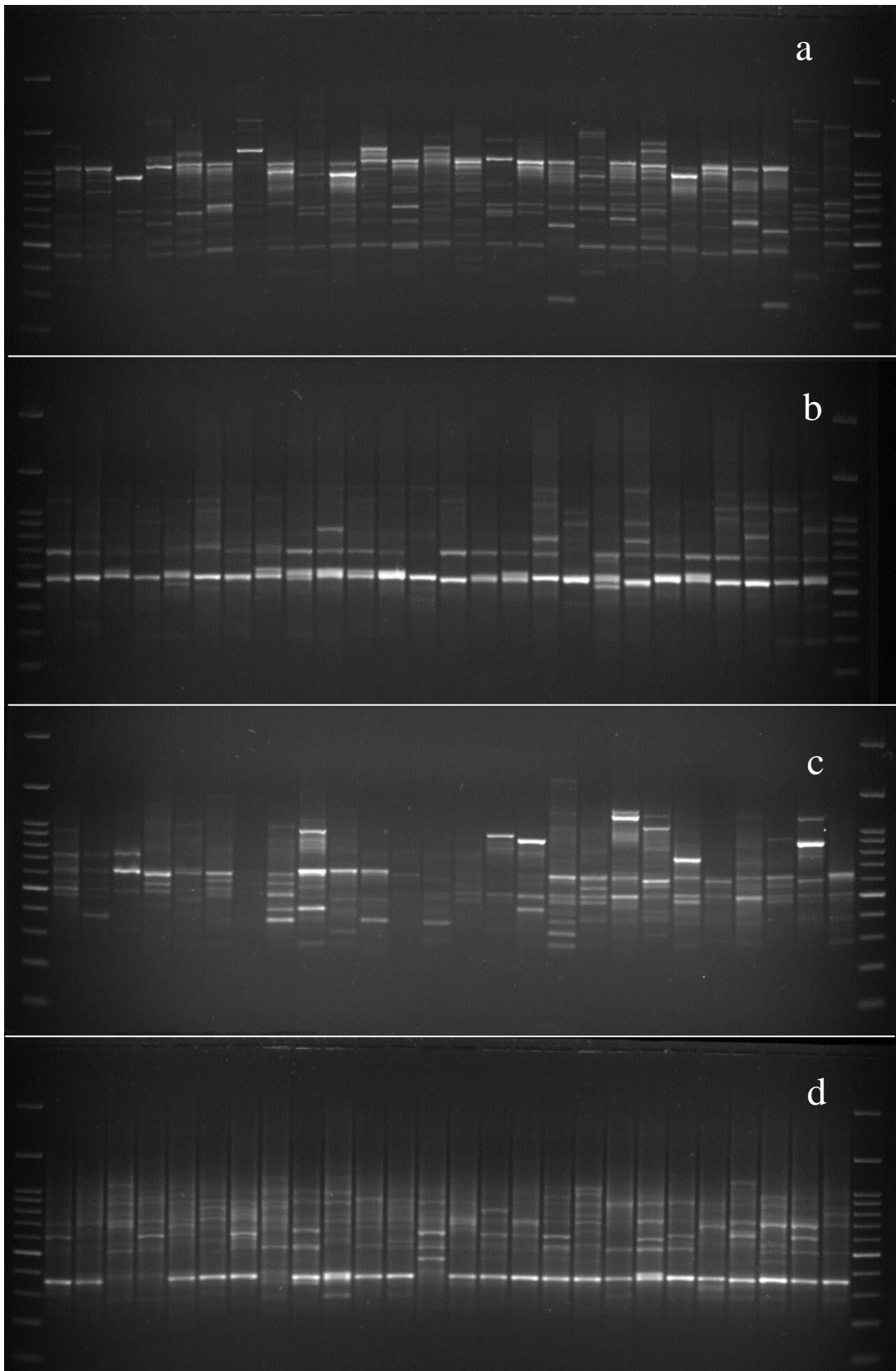


Figura 1 Gel de agarose com os resultados do marcador ISSR para os 4 *primers*. a: *primer* (ACA)₅G; b: *primer* (GGAC)₄; c: *primer* (GGAC)₃C e d: *primer* (GGAC)₃T.

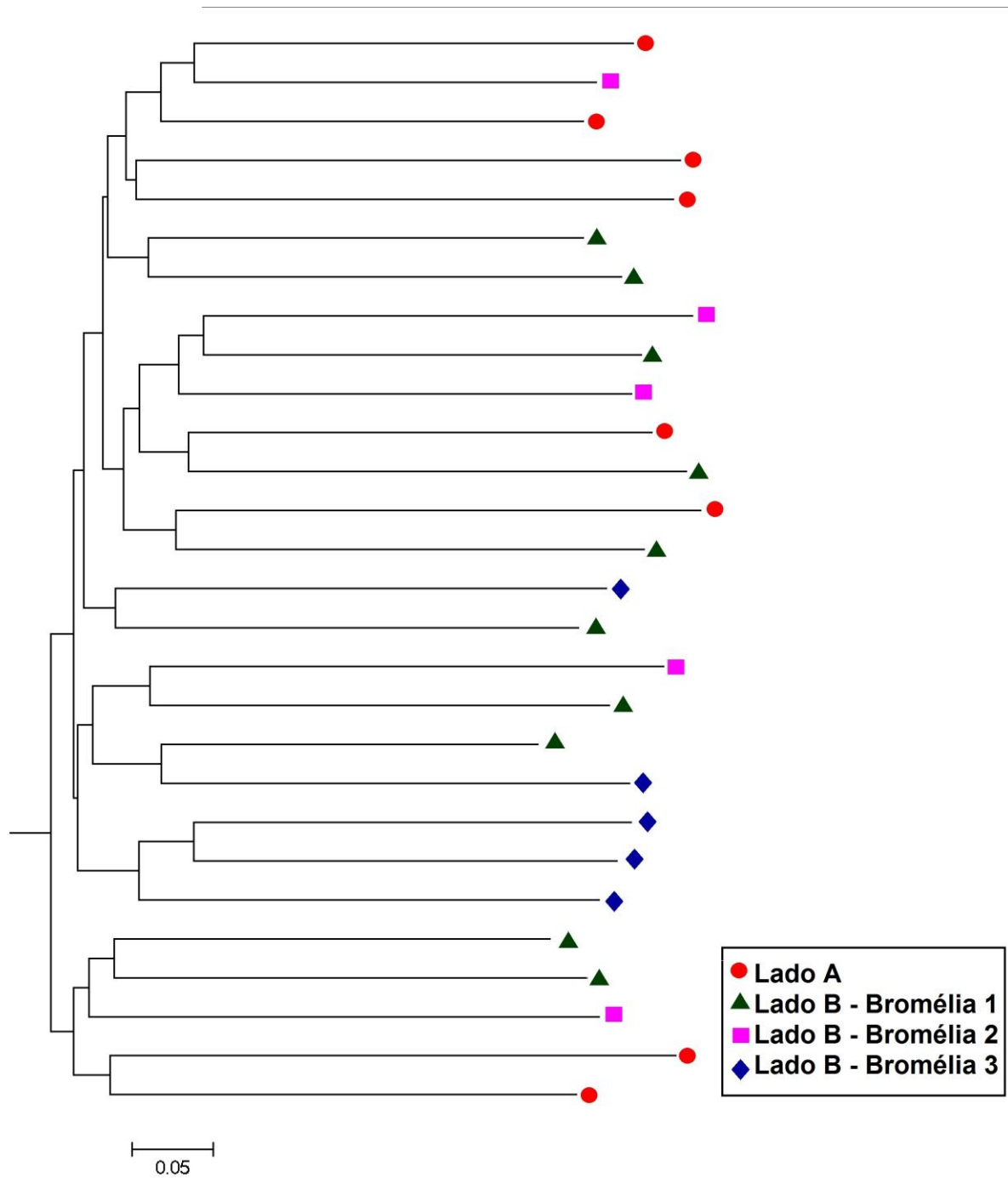


Figure 2 Dendrograma Neighbor-joining baseado no índice de similaridade de Jaccard com 10.000 permutações.

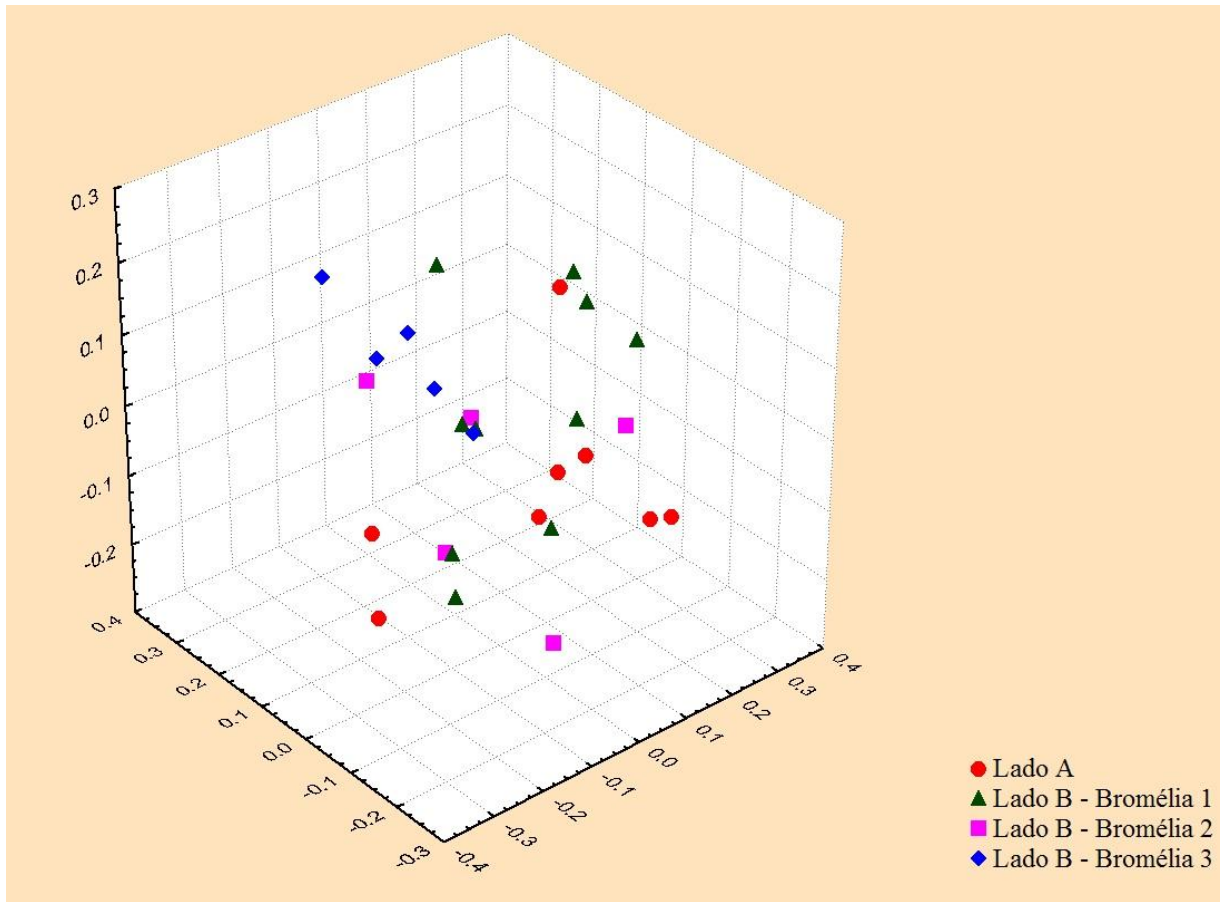


Figure 3 Gráfico de dispersão com as principais coordenadas baseadas no índice de similaridade de Jaccard.

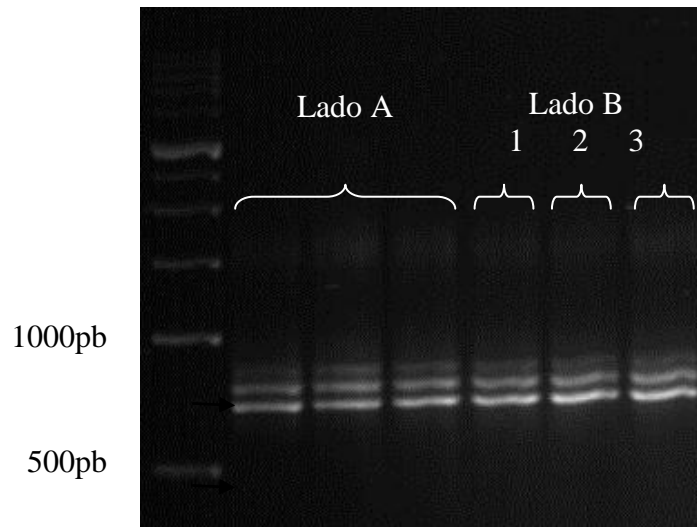


Figura 4 Gel de agarose com o padrão de bandas resultado da amplificação do *D-loop* de *Scinax granulatus*.

Anexo 1

Instruções para autores: Conservation Genetics

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

ARTICLE TYPES

Appropriate subjects for papers in Conservation Genetics are described in the section on ‘aims and scope’ (and see note appended below on dominant markers).

Original research papers are typically no longer than 6,000 words. The writing style should be concise and consistently relevant. Manuscripts should be structured as follows. The title page should be organized as described in the section ‘title page’. This should be followed by the Abstract (typically 200-250 words), Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion sections. These sections can be divided into subsections, as appropriate. Both print and online appendices are allowed (online versions encouraged for large appendices). Further specific information on the formatting of the text and nature of the acknowledgements (which follow the text and precede the references) is given in the section on ‘text’. Referencing format is described in the section on ‘references’. References should be followed by the figure captions, figures and tables, in that order.

Short communications of a maximum 2,000 words, 30 references and three display items will also be considered. These should normally follow the above format, though results and discussion sections can be combined if preferred.

Review Articles and Perspectives are typically solicited by the editors, but can be submitted after an initial contact with the editor in chief. Reviews will be concise reports on an area of interest in conservation genetics and should be no more than 7,000 words long. They are not expected to adhere to a strict format, though they should include the title page and abstract as described above. Perspectives can provide personal viewpoints, promote discussion on current topics, or propose new areas of conservation genetic research, application or development. They must meet the normal standards of scientific objectivity and will be subjected to peer review. These should be no longer than 3,000 words.

Important note on RAPDs, ISSRs and similar dominant markers:

We do not send for review papers that use only RAPD (or similar) markers when using different markers, or other markers in addition would be more appropriate. This holds for all studies looking at population structure in sexual species, given the problems with dominance and interpretation. There are exceptional circumstances for which RAPDs (or similar) may work well (e.g. with clonal species), and we therefore don't exclude their inclusion entirely, but discourage their exclusive use in all cases, and when used, require rigorous assessment of the repeatability of the genotypes.

The word count should include title, abstract, keywords, body of the text, figures, and tables but excluding authors affiliations, references and on-line supplementary material.

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they

should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished Works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

• Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.