



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Anna Carolina da Silva Chaves

**Análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial em  
anuros da Mata Atlântica**

Rio de Janeiro

2014

Anna Carolina da Silva Chaves

**Análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial em anuros da  
Mata Atlântica**



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C512 Chaves, Anna Carolina da Silva.  
Análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial em anuros da Mata Atlântica / Anna Carolina da Silva Chaves. – 2014.  
84 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

Orientador: Elizeu Fagundes de Carvalho.  
Coorientadora: Dayse Aparecida da Silva.

1. Anfíbios - Teses. 2. Anuros - Teses. 3. Mata Atlântica - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 3. Reserva Ecológica de Guapiaçu (Brasil) - Teses. 5. DNA Mitocondrial - Teses. I. Carvalho, Elizeu Fagundes de. II. Silva, Dayse Aparecida da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 597.8

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Anna Carolina da Silva Chaves

**Análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial em anuros da  
Mata Atlântica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 11 de março de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana de Almeida Simão  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Duarte da Rocha  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Dra. Clarissa Coimbra Canedo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

## DEDICATÓRIA

A Deus, meus pais Lucia e Evando, meus irmãos Jane Claudia, Paula e Junior e meu amado Thiago.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lucia Regina, que, em todos esses anos de formação, nunca deixou de acreditar no meu potencial e de apoiar minhas escolhas. Exemplo de mãe e de mulher batalhadora. Saiba que esta é só mais uma conquista de muitas outras que virão e que iremos comemorar juntas. Obrigada por tudo sempre. Amo você.

Aos meus irmãos Ana Paula, Jane Claudia e Junior, por serem os melhores que alguém pode ter. Sem vocês por perto, duvido que mais esta etapa fosse concluída. Obrigada por acreditarem sempre nas minhas escolhas, por enfrentarem, ao meu lado, minhas batalhas, por todo amor e cumplicidade que só bons irmãos e amigos têm. Todo agradecimento não caberiam em poucas linhas. Amo vocês.

À minha tia-madrinha, Aparecida, por sempre demonstrar tamanho orgulho das minhas escolhas, por toda torcida e ajuda. E também às minhas primas Desiree e Nathalie.

Ao meu príncipe amado Thiago, por tudo. Obrigada por todo apoio que sempre me deu, por suportar meus dias de mau-humor, por cuidar de mim, pelas risadas, pela companhia, pelas viagens e por todo amor maior do mundo. Obrigada por me ajudar nos índices, tabelas, figuras e tudo mais que essa dissertação exigiu. Muito de você está nessas linhas. Estamos juntos vencendo a etapa do mestrado e vamos juntos vencendo tudo o mais que aparecer. Amo você.

Ao professor Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pela orientação, pela paciência e por acreditar em meu trabalho.

À professora Dra. Dayse Aparecida da Silva, por toda dedicação e por todos os ensinamentos que tive nesses dois anos de mestrado.

Ao professor Dr. Carlos Frederico Rocha e ao Vitor Néilson Borges-Júnior, por nos confiarem suas amostras de anfíbios para que este trabalho fosse realizado.

À Dra. Mariana Lúcio Lyra, que gentilmente nos cedeu material, conhecimento, e me abrigou em sua casa para uma semana de intenso aprendizado. Muito do que aprendi sobre *barcode* de anfíbios devo a você.

Ao amigo Chuck, ou Cesar Amaral para os mais chegados, que clareou minhas ideias e me ajudou um tanto na preparação e análise dos resultados deste

trabalho. Muitas linhas desta escrita vieram de boas conversas e risadas. Sua empolgação pela Biologia é realmente bonita de ver. Obrigada sempre.

Aos meus Hermanos amados, Afonso, Felipe, Flora, Leo, Nobru e Tai por serem sempre tão lindos. E a Nanda, uma hermana postiça tão amada quanto. A torcida que vocês sempre me deram, as mensagens de estímulo todas as manhãs, as boas histórias e cervejinhas do dia-a-dia enchem meu coração de amor. Saibam e sintam que parte disso tudo tem um pedacinho de todo apoio de vocês. Amo vocês, minha família escolhida.

Aos amigos-irmãos Antonio e Valter, por estarem sempre na torcida. A convivência diária fez com que virássemos cúmplices, companheiros de trabalho, de vida. Amo vocês. Obrigada pelas revisões desta escrita.

À Fernanda, Juliana Gozi, Januzzi e Rose por todos os momentos de descontração (ou não) que vivemos no LDD. As risadas sem fim, os almoços no bandeirão, os desabafos, as fofocas. Obrigada por serem sempre tão queridas e tão amadas. Admito com orgulho que fiz amizades especiais nesse tempo. E não esqueçam nunca que estamos juntas nessa, e sigo na torcida por vocês. Tudo de melhor pra nós sempre.

À Andrea e Leonor, por todas as boas risadas e ajuda que recebi das duas. São de fato mulheres incríveis. E a Márcia Cristina, que está sempre pronta para o que vier, seja para ouvir desabafos, ou para uma boa farra. Obrigada mesmo.

Aos amados colegas que fiz no LDD, Alexandre, Celso, Cris, Fernanda Miranda, Esther, Holly, João, Monique, Patrícia, Rossana, Saulo, Silvia, Yasmin, e outros que posso ter esquecido (desculpe por isso). Obrigada pelas histórias, pelo companheirismo, pelas risadas, pelas compras na China e pela amizade. E João, quando será nossa próxima viagem mesmo?

Em especial, meus companheiros no estudo em biodiversidade no LDD, Bruna, Chuck, Eduardo, Kleyton, Rodrigo e Vanusca. O tanto que aprendemos juntos é imensurável. Obrigada por tudo.

A toda equipe do LDD, obrigada sempre.

Ao Cnpq pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

A todos aqueles que acreditaram neste projeto, meu mais sincero agradecimento.

Ora, se não sou eu quem mais  
vai decidir o que é bom pra mim?  
Dispensar a previsão!  
Ah, se o que eu sou é também  
o que eu escolhi ser  
aceito a condição.

O velho e o Moço, *Los Hermanos*.



## RESUMO

CHAVES, Anna Carolina da Silva. **Análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial em anuros da Mata Atlântica**. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A Mata Atlântica brasileira concentra uma das maiores diversidades biológicas da Terra com cerca de 7% das espécies animais e vegetais do planeta. Esse bioma abriga atualmente mais de 50% das espécies de anuros do Brasil (c.a. 500 espécies), mas sofre intensa perda e fragmentação de habitat. Um dos principais fragmentos da Mata Atlântica, a Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA) abriga vasta anurofauna, com cerca de 71 espécies já descritas. Acredita-se, porém, que muitas ainda precisam ser identificadas e estudadas. A identificação de espécies baseada em caracteres moleculares vem se mostrando uma alternativa para dar suporte à identificação morfológica, e dentro deste contexto os genes de DNA mitocondrial, como o 16S, são utilizados para a realização de *barcode*. O objetivo deste estudo foi testar a metodologia de identificação molecular de espécies (DNA *barcode*) na comunidade de anfíbios anuros da REGUA utilizando o gene mitocondrial 16S. Para isso, foram coletados tecidos de 99 indivíduos, entre adultos e girinos de 23 espécies, agrupados em seis famílias distintas. Desses 99 indivíduos, 88 foram amplificados corretamente para o gene em referência e foram realizadas, com sucesso, a determinação de espécies de 84 anuros (95,45%) da REGUA. As espécies de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes*, cujas identificações haviam sido determinadas com base em critérios morfológicos, agruparam em clados de mesmo gênero, porém de espécies diferentes quando analisadas pelas metodologias *neighbor-joining* e *maximum-likelihood*. Além de altos valores de distância intraespecífica (2,18%, 3,49% e 3,77%, respectivamente) e distâncias interespecíficas nulas (0%) temos a indicação de possíveis equívocos em determinações de espécies feitas exclusivamente por critérios morfológicos. Nesse caso, as discordâncias morfológica e molecular são exclusivamente de girinos, demonstrando a dificuldade na identificação morfológica e a escassez de chaves de identificação dessas espécies em estágio larval. Os resultados mostram que o gene mitocondrial 16S teve seu uso na identificação de anuros da REGUA confirmada e apontam que, em casos de estudos com indivíduos em estágios larvais, como em girinos, a metodologia de *barcode*, quando complementada a identificação morfológica, suporta a correta identificação das espécies de anfíbios anuros.

Palavras-chaves: Anfíbios. Mata Atlântica. REGUA. DNA mitochondrial. DNA *barcode*. 16S.

## ABSTRACT

CHAVES, Anna Carolina da Silva. **Analysis of molecular markers of mitochondrial DNA in Atlantic Rainforest Anurans.** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The Brazilian Atlantic Forest focuses one of the greatest biological diversity of the Earth with about 7% of the planet's animal and plant species. This biome is currently home to more than 50% of anurans species from Brazil (c.a. 500 species), but it suffers severe loss and fragmentation of habitat. One of the main fragments of the Atlantic Forest, the *Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA)* houses a wide anuran fauna, with about 71 species had already described. It is believed, however, that lots of them still need to be identified and studied. The identification of these species based on molecular characters has proven to be an alternative to support a morphological identification, and in this context the mitochondrial DNA genes, such as 16S are used to perform *barcode*. The goal of this study was to test the methodology for molecular identification (DNA barcode) in anurans of *REGUA* community using 16S mitochondrial gene. For this, tissues of 99 individuals, including adults and tadpoles of 23 species, grouped into six different families were collected. Of these 99 individuals, 88 were amplified correctly to the reference gene and were successful determination of 84 species of anurans (95.45%) of the *REGUA*. *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* and *Hylodes charadranaetes* species whose identifications had been determined based on morphological criteria, grouped into clades of the same gender, but different species when analyzed by methodologies neighbor-joining and maximum-likelihood. In addition to high intraspecific distances (2,18%, 3,49% and 3,77% respectively) and interspecific distances to nil (0%), we have an indication of possible mistakes of species determinations made by a morphological criterion. In this case, the morphological and molecular disagreements are exclusively on tadpoles, demonstrating the difficulty of morphological identification and the shortage of identification of these species larval stage. The results show that the 16S mitochondrial gene had its use in identifying the anurans *REGUA* confirmed and indicate that the case studies with individuals in larval stages, as in tadpoles, the methodology of the barcode when complemented morphological identification, supports the correct identification of species of anurans amphibians.

Keywords: Amphibians. Atlantic Forest. REGUA. Mitochondrial DNA. DNA *barcode*. 16S.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de cobertura vegetal brasileira do bioma Mata Atlântica no Brasil.....	20
Figura 2 – Representação esquemática da molécula de DNA mitocondrial em <i>Xenopus laevis</i> .....	27
Figura 3 – Produtos de amplificação por PCR da região CytB do DNA mitocondrial.....	48
Figura 4 – Produtos de amplificação por PCR da região COI do DNA mitocondrial.....	49
Figura 5 – Produtos de amplificação por PCR da região 16S do DNA mitocondrial.....	50
Figura 6 – Eletroferograma representativo da sequência Forward da região 16S do DNA mitocondrial (orientação 5'-3') de indivíduo da espécie <i>Hylodes pipilans</i> com produtos de amplificação purificados pelo método ExoSAP-IT.....	51
Figura 7 – Eletroferograma representativo da sequência Forward da região 16S do DNA mitocondrial (orientação 5'-3') de indivíduo da espécie <i>Hylodes pipilans</i> com produtos de amplificação purificados pelo método coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).....	52
Figura 8 – Árvore de <i>neighbor-joining</i> construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.....	59
Figura 9 – Trecho da árvore de <i>neighbor-joining</i> construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.....	60
Figura 10 – Trecho da árvore de <i>neighbor-joining</i> construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.....	61

Figura 11 – Gráfico de saturação entre as sequências da região 16S do mtDNA de anuros da REGUA.....	63
Figura 12 – Árvore de <i>neighbor-joining</i> construída com a retirada da terceira base dos códons das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 10000 réplicas.....	64
Figura 13 – Árvore de <i>maximum-likelihood</i> construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA utilizando o modelo GTR+G+I simultaneamente a uma análise de bootstrap com 10000 réplicas.....	66
Figura 14 – Árvore de <i>neighbor-joining</i> construída a partir do gene COI do mtDNA de anfíbios anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Lista de material coletado na REGUA utilizadas para análises moleculares.....	34
Tabela 2 –	Iniciadores utilizados na amplificação de três regiões distintas do DNA mitocondrial de anuros.....	38
Tabela 3 –	Condições termocíclicas para a amplificação da região citocromo b do mtDNA de anuros.....	39
Tabela 4 –	Condições termocíclicas para a amplificação da região citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) do mtDNA de anuros.....	40
Tabela 5 -	Condições termocíclicas para a amplificação da região 16S do mtDNA de anuros.....	41
Tabela 6 –	Iniciadores utilizados para sequenciamento da região COI do mtDNA de anuros.....	43
Tabela 7 –	Fluoróforos utilizados para reação de sequenciamento do mtDNA e indicação da cor atribuída a sua análise.....	43
Tabela 8 –	Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de anuros.....	43
Tabela 9 –	Total de indivíduos classificados morfologicamente sequenciados para o gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA.....	54
Tabela 10 –	Valores de distância intraespecífica em sequências do gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.....	56
Tabela 11 –	Valores de distância interespecífica em sequências do gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.....	57
Tabela12 –	Concordância entre identificação morfológica e identificação molecular realizada com o gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIC	Akayke
AL	Tampão de lise
ATE	Tampão de eluição
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATL	<i>Tissue Lysis Buffer</i>
AW	<i>Wash buffer</i>
BOLD	<i>Barcode of Life databases</i>
C	Citosina
c.a.	Com aproximadamente
CFBH	Coleção Célio F. B. Haddad
COI	Citocromo oxidase subunidade I
COII	Citocromo oxidase subunidade II
CytB	Citocromo b
DdATP	Didesoxiadenosina trifosfato
DdCTP	Didesoxicitidina trifostato
DdGTP	Didesoxiguanosina trifosfato
DdTTP	Didesoxitimidina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dntp	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EXO I	Exonuclease I
G	Guanina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
K2P	Kimura 2 parâmetros
K80	Kimura, 1980
KV	Quilovolts
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA

mtDNA	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
p/v	Peso por volume
P.A.	Puro absoluto
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SBE	Extensão de base única
SBH	Sociedade Brasileira de Herpetologia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TLH	Tampão de lise de hemácias
tRNA	RNA transportador
Ts	Tranversões
Tv	Transições
U	Unidade de enzima
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
ha	Hectare
®	Marca registrada
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mg	Miligrama
°C	Graus Celsius
X g	Unidade de centrifugação
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
µM	Micromolar
V	Volts
g	gramas



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	32
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	32
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1	<b>Amostras biológicas</b> .....	33
2.2	<b>Extração de DNA</b> .....	35
2.2.1	<u>Extração por método orgânico/ Fenol-Clorofórmio/ filtro microcon®</u> .....	35
2.2.2	<u>Extração e purificação de DNA com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)</u> .....	36
2.2.3	<u>Extração e purificação por método semi-automatizado Maxwell® 16 (Promega Corporation)</u> .....	37
2.3	<b>Lista de tampões utilizados</b> .....	37
2.4	<b>Determinação da concentração de DNA</b> .....	38
2.5	<b>Metodologia utilizada para análise do mtDNA de anuros</b> .....	38
2.5.1	<u>Amplificação dos genes de mtDNA</u> .....	39
2.5.1.1	Amplificação do gene citocromo b.....	39
2.5.1.2	Amplificação do gene citocromo c subunidade 1.....	39
2.5.1.3	Amplificação do gene 16S.....	40
2.5.1.4	Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose.....	41
2.5.2	<u>Purificação do produto amplificado da PCR</u> .....	41
2.5.2.1	Purificação pelo complexo ExoSAP-IT.....	42
2.5.2.2	Purificação através de coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).....	42
2.5.3	<u>Sequenciamento das regiões de mtDNA de anuros</u> .....	42
2.5.4	<u>Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina Sephadex G-50</u> .....	44
2.6	<b>Eletroforese capilar</b> .....	44
2.6.1	<u>Preparação das amostras</u> .....	44

2.6.2	<u>Eletrforese capilar e detecção</u> .....	45
2.6.3	<u>Alinhamento e análise das sequências</u> .....	45
3	<b>RESULTADOS</b> .....	47
3.1	<b>Padronização das condições de análise de marcadores de DNA mitocondrial para estudos de anfíbios anuros</b> .....	47
3.1.1	<u>Extração de DNA e análise dos produtos de amplificação em gel de agarose</u> .....	47
3.1.1.1	Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene citocromo b (CytB) a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias.....	47
3.1.1.2	Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene citocromo c subunidade 1 (COI) a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias.....	48
3.1.1.3	Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene 16S a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias.....	49
3.1.2	<u>Sequenciamento do gene 16S do DNA mitocondrial a partir de produtos de PCR purificados por distintas metodologias</u> .....	50
3.2	<b>Análise de sequências do gene 16S em anfíbios anuros da REGUA</b> .....	53
3.2.1	<u>Cálculo de distâncias intra e interespecíficas através de 16S <i>barcode</i></u> .....	55
3.2.2	<u>Análise filogenética de espécies de anuros da REGUA através do gene 16S de mtDNA</u> .....	58
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
4.1	<b>Aplicação dos genes COI e 16S do mtDNA para <i>barcode</i> de anuros da REGUA</b> .....	68
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

## INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica brasileira concentra uma das maiores diversidades biológicas da Terra, com cerca de 7% das espécies animais e vegetais do planeta (Quintela, 1990; Myers, 2000). Este bioma tem sofrido degradação do habitat e fragmentação intensa, deixando sua diversidade biológica particularmente vulnerável (Myers, 2000), o que provavelmente resultará em uma perda de espécies animais e vegetais (Pimm & Askins, 1995; Whitmore, 1997; Rocha *et al.*, 2000). Com toda perda e fragmentação de habitat, a Mata Atlântica é um dos 34 *hotspots* (do inglês, pontos quentes) de biodiversidade do mundo e, portanto, alvo prioritário para ações conservacionistas (Mittermeier, 2005).

É sabido que o bioma da Mata Atlântica abriga atualmente mais de 50% das espécies de anuros do Brasil (Almeida-Gomes, 2011). Entretanto, mesmo com números já tão expressivos, existe a previsão de que um elevado número de espécies de anfíbios, ainda não descritas, poderá ser encontrada nos próximos anos (Pimm *et al.*, 2010).

Como um dos fragmentos de Mata Atlântica na região sudeste, a Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), uma reserva ecológica particular localizada no município de Cachoeiras de Macacu no Estado do Rio de Janeiro, é um importante remanescente de Mata Atlântica no sudeste do Brasil (Rocha *et al.*, 2007), abrigando grande variedade de espécies da fauna brasileira, incluindo vasta anurofauna. Setenta e uma espécies de anfíbios já foram identificadas na região da REGUA (Almeida-Gomes, em preparação), dentre as quais três destas estão presentes na lista de espécies ameaçadas (Almeida-Gomes, em preparação).

Todos os fundamentos clássicos de identificação, classificação e comparação de espécies e demais grupos taxonômicos baseiam-se nas características morfológicas exibidas pelos indivíduos. Na maior parte das vezes, tratam-se de características exibidas apenas em indivíduos adultos. Não raro, a identificação de espécies necessita de um especialista em taxonomia (Bowles, 1996). A identificação molecular, por outro lado, baseada em sequências nucleotídicas, pode ser feita utilizando qualquer fragmento de tecido, seja de indivíduos adultos ou juvenis (Branicki *et al.*, 2003).

Para identificação em anfíbios, os genes da subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase (COI) e 16S são indicados para realização de *barcode* (Vences 2005a, b, 2012), um sistema de identificação mitogenômica que permite a determinação da espécie dos organismos a partir da análise de pequenos segmentos do genoma.

Neste trabalho, serão apresentados os resultados obtidos na análise do marcador mitocondrial 16S para confirmação de espécie e filogenia em indivíduos anuros da região da REGUA, colaborando, assim, com a estruturação espécie-específica dos anfíbios desta região da Mata Atlântica.

## **Mata Atlântica**

A Mata Atlântica é considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano (Galindo-Leal & Câmara, 2003). No passado cobria mais de 1,5 milhões de km<sup>2</sup>, com 92% desta área no Brasil (Tabarelli *et al.*, 2005), estendendo-se por quase toda região leste do país, entre os estados do Ceará e Rio Grande do Sul, e se interiorizando sem interrupções, atingindo então pequenas porções dos territórios da Argentina e Paraguai (Câmara *et al.*, 2001; Capobianco, 2001).

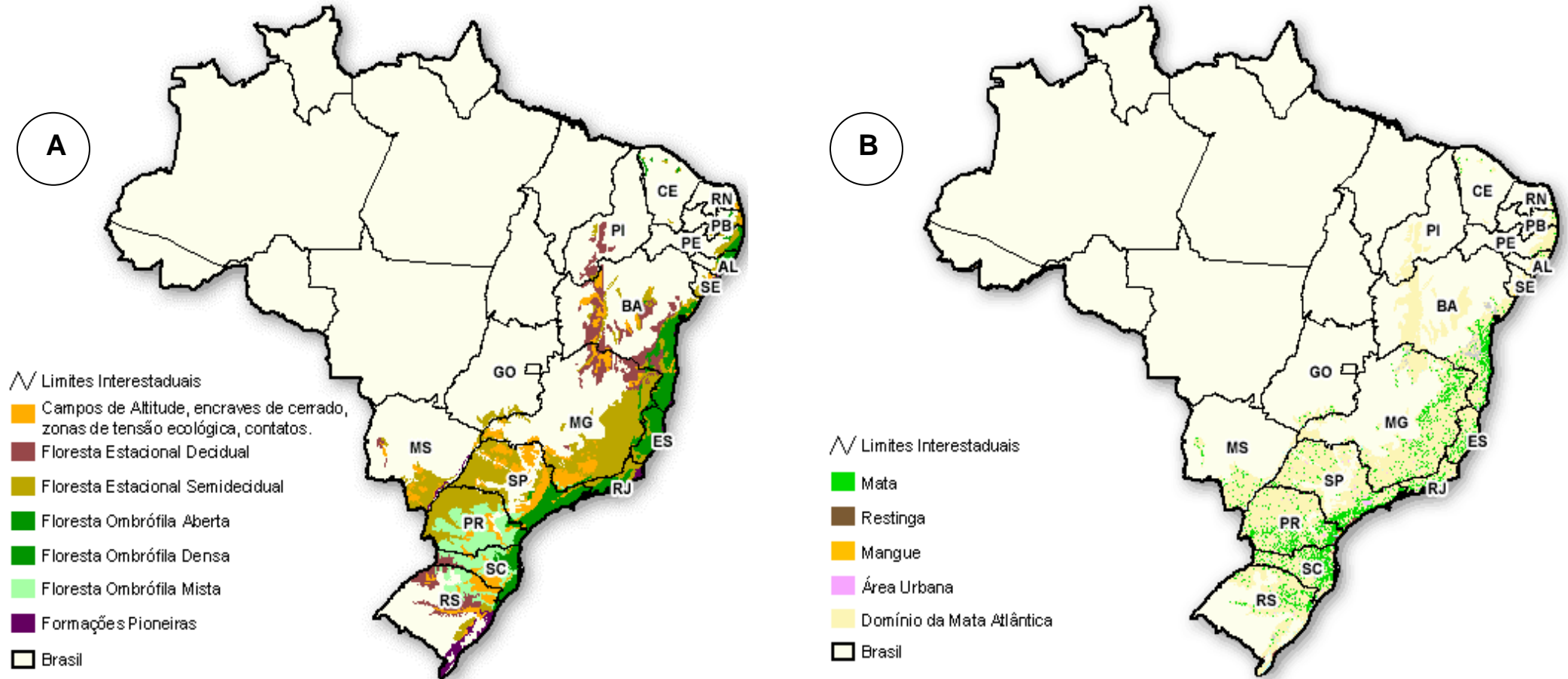
Devido à perda da maior parte de sua área original e a existência de mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Myers *et al.*, 2000), a Mata Atlântica está inserida entre os 34 *hotspots* mundiais de biodiversidade, com alto grau de endemismo (Mittermeier *et al.*, 2005). Mesmo com a redução drástica de sua área original (c.a. 12,5 %) (Myers *et al.*, 2000) e tendo cerca de 42% de sua área atual representada por fragmentos menores de 250 ha, a Mata Atlântica ainda contém significativa porção de diversidade biológica global (Mittermeier *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2009). Em algumas áreas de endemismo, tudo o que restou foram arquipélagos de fragmentos minúsculos e muito espaçados (Tabarelli *et al.*, 2005).

Por conta de sua localização, a Mata Atlântica foi o primeiro bioma brasileiro que os colonizadores europeus tiveram contato e puderam explorar economicamente (Dean, 1996). Esta situação é responsável pelas estatísticas atuais

que apontam para uma proporção superior a 70% da população brasileira vivendo dentro do domínio deste bioma (Capobianco, 2001). Desde o início do processo de colonização, a relação dos europeus com a Mata Atlântica foi predominantemente predatória, situação que continuou após a independência do Brasil e se mantém até os dias atuais (Dean, 1996; SOS Mata Atlântica & Instituto de Pesquisas Espaciais, 2013).

A destruição total deste bioma resultaria na perda de uma porção considerável da biodiversidade brasileira, principalmente pelo elevado número de espécies endêmicas (Goerck, 2001). Existem várias iniciativas de preservação e proteção dos remanescentes florestais na região da Mata Atlântica, no entanto, tais programas somente terão êxito caso ainda persistam áreas remanescentes que abriguem as espécies ameaçadas, e que funcionem como fonte de material genético. Portanto, a proteção dos fragmentos remanescentes (Figura 1) é da maior urgência para a conservação das espécies que ali ocorrem, especialmente para as espécies ameaçadas de extinção (Goerck, 2001), como é o caso dos anfíbios (Pimm *et al.*, 2010).

Figura 1 - Mapa de cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica no Brasil.



Legenda: A: composição vegetal original do Bioma Mata Atlântica; B: fragmentos vegetais remanescentes do bioma Mata Atlântica.  
 Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto de Pesquisas Espaciais, 2013.

## **Classe *Amphibia***

Os anfíbios colonizaram o meio terrestre no período Devoniano há cerca de 350 milhões de anos. Apresentam a maior diversidade de modos de vida do que qualquer outro grupo de vertebrados (Duellman & Trueb, 1994). As três linhagens de anfíbios viventes compartilham inúmeras características, apresentando diferenças significativas apenas nas especializações locomotoras: os anuros (Ordem Anura) possuem patas posteriores alongadas e corpo inflexível, que não se dobra quando caminham; as salamandras (Ordem Caudata) possuem patas anteriores e posteriores de igual tamanho e movem-se por ondulações laterais; e as cecílias (Ordem Gymnophiona) são ápodes e empregam a locomoção serpentina (Pough *et al.*, 1999).

A destruição e fragmentação de habitats são consideradas uma das maiores ameaças à conservação da biodiversidade e uma das principais responsáveis pelo declínio de populações de anfíbios em todo o planeta (Alford & Richards, 1999; Cushman, 2006). Os anfíbios constituem um dos organismos mais negativamente afetados pela perda e fragmentação de habitats, em grande parte em função de particularidades fisiológicas e ecológicas destes animais (Marsh & Pearman, 1997; Silva *et al.*, 2003; Cushman, 2006). Dentre estas características destacam-se: fisiologia ectotérmica, com capacidade limitada para realização de atividades; a sua pele permeável, vulnerável a diversos agentes biológicos, químicos e a dessecação; baixa capacidade de dispersão; e um complexo ciclo de vida, onde grande parte das espécies de anfíbios possui um ciclo de vida com uma fase larval (denominada de girinos) aquática e uma fase adulta terrestre, o que faz com que estes animais sejam afetados pela degradação, tanto de ambientes terrestres, quanto de ambientes aquáticos (Duellman & Trueb, 1986; Becker *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2010). Essas características fazem do grupo um importante indicador ecológico da qualidade do ambiente (Beebee, 1996), quando comparados aos demais vertebrados (Wells, 2007). O declínio de populações de anfíbios tem sido reportado em todo o planeta e muitos fatores bióticos e abióticos têm sido associados e testados como suas causas (Lannoo, 2005; Collins & Crump, 2009). No Brasil, pouco se conhece a respeito das causas de declínio das populações dos anfíbios em relação às observadas mundialmente (Silvano & Segalla, 2005). Para isso, ainda são

necessários estudos das mesmas em maior detalhe, de modo a verificar suas condições de vida, gerar dados ecológicos para conservação, além do desenvolvimento e implementação de estudos de longa-duração (Eterovick *et al.*, 2004; Gascon *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm associado o fungo quitrídio (*Batrachochytrium dendrobatidis*) ao declínio de diversas populações de anfíbios ao redor do mundo (Collins & Storfer, 2003). Recentemente, a presença desse fungo foi relatada no Brasil (Carnaval *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2007), entretanto o conhecimento ainda é incipiente. Os registros de declínio no Brasil estão associados à perda de habitat (Juncá, 2001; Eterovick *et al.*, 2004), que é a maior ameaça à diversidade biológica (Primack & Rodrigues, 2001). A fragmentação de habitat pode levar à rápida perda das espécies, uma vez que cria barreiras para o processo normal de dispersão, colonização e alimentação (Primack & Rodrigues, 2001).

Os anfíbios são onipresentes, com exceção de extremas latitudes do norte, Antártica e a maioria das ilhas oceânicas, sendo conhecidas atualmente 7217 espécies e a cada ano novas espécies são descritas (Vences, 2012). Os anuros são os maiores representantes com 6347 espécies, seguidos das salamandras com 671 espécies e cecílias com 199 espécies (Vences, 2012). O Brasil é o país mais rico em anfíbios com 821 espécies de anuros, uma de salamandra e 27 de cecílias, sendo que nos últimos 4 anos foram descritas mais de 50 novas espécies (SBH, 2010).

A Mata Atlântica possui atualmente mais de 500 espécies de anfíbios, dentre as quais 380 são endêmicas (76%), e por isso este é o bioma brasileiro mais rico em espécies de anfíbios, com mais de 50% das espécies que ocorrem no Brasil (Cruz & Feio, 2007).

### **Anfíbios do Estado do Rio de Janeiro**

O Estado do Rio de Janeiro, apesar de possuir uma área relativamente pequena (c.a. 43.700 Km<sup>2</sup>), possui grande diversidade e altas taxas de endemismo para diversos grupos da fauna e flora, inclusive para anfíbios (Rocha *et al.*, 2003; Van Sluys *et al.*, 2009). Rocha *et al.* (2004), reportaram para o estado a ocorrência de 166 espécies de anfíbios, sendo 32 endêmicas. Estudos posteriores com a



ampliação da distribuição geográfica de espécies e validação de subespécies existentes apontam para a ocorrência de aproximadamente 187 espécies de anfíbios, 43 delas endêmicas (Caramaschi, 2010; Pombal, 2010).

Inserida neste quadro, a região da Reserva Ecológica de Guapiçu (REGUA), área de estudo do nosso trabalho, tem registrado atualmente 71 espécies de anfíbios, sendo 69 anuros e 2 cecílias. Esses dados representam, aproximadamente, 33% de todas as espécies de anfíbios do Estado do Rio de Janeiro (Almeida-Gomes, em preparação).

Estudos que abordem a composição e distribuição das espécies, bem como aspectos ecológicos básicos, são fundamentais para esforços de conservação tanto para as espécies quanto para as áreas onde as mesmas ocorrem (Rocha *et al.* 2003). Embora o número de estudos de anfíbios em áreas de Mata Atlântica tenha aumentado nos últimos anos (Conte & Rossa-Feres, 2007; Rocha *et al.*, 2007; Almeida-Gomes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2009; Camurugi *et al.*, 2010), ainda há lacunas de informação para várias áreas que necessitam ser inventariadas, uma vez que a grande maioria dos trabalhos feitos concentra-se nas regiões sul e sudeste do Brasil. Para o Estado do Rio de Janeiro, que possui uma rica herpetofauna, tem havido um considerável incremento de trabalhos sobre a composição de espécies de anfíbios nos seus remanescentes florestais (Rocha *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2001; Rocha & Van Sluys, 2006; Almeida-Gomes *et al.*, 2008; Carvalho-e-Silva *et al.*, 2008; Salles *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2009; Almeida-Gomes *et al.*, 2010; Silva-Soares *et al.*, 2010). Entretanto, ainda há grandes extensões do estado onde o conhecimento básico sobre a composição das espécies de anfíbios é escasso ou mesmo inexistente (Rocha *et al.*, 2003; Carvalho-e-Silva *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009; Van Sluys *et al.*, 2009).

### **Problemática do estudo com girinos**

Os girinos correspondem a fase larval de grande parte dos anfíbios. Possuem uma cabeça e corpo únicos, uma cauda musculosa desprovida de vértebras e nadadeiras dorsal e ventral sem sustentação óssea (McDiarmid & Altig, 1999).

Mesmo apresentando um plano e uma organização corporal tão simples, os girinos apresentam uma considerável diversidade de estruturas morfológicas que refletem tanto a filogenia, como adaptações a diferentes tipos de ambiente. Eles são diversos e abundantes nos sistemas aquáticos tropicais e exercem fortes influências sobre diversos componentes dos ambientes aquáticos (Colón-Gaud *et al.*, 2010).

Das 69 espécies de anuros presentes na REGUA, 48 apresentam a fase de girinos e 8 espécies se desenvolvem exclusivamente em riachos (Almeida-Gomes, 2011). O pesquisador que escolhe o girino como instrumento de trabalho para responder questões ecológicas tem a difícil tarefa de confirmar a identificação destes indivíduos a partir de uma literatura escassa em descrições apropriadas (McDiarmid & Altig, 1999) e em chaves de identificação (Hero, 1990). Neste contexto, o uso de técnicas moleculares surge como uma promissora e útil ferramenta para realização em estudos em biodiversidade (Arif & Khan, 2009)

Existem duas formas de se confirmar a espécie de um girino. A primeira é utilizando trabalhos de descrição morfológica disponíveis na literatura para comparação com o espécime que desejamos identificar. Porém, esses trabalhos são escassos e os girinos de muitas espécies ainda não foram descritos (McDiarmid & Altig, 1999). O último caso é particularmente mais acentuado em áreas de elevada biodiversidade, como o Brasil. A segunda forma consiste em criar o girino até que o mesmo realize a metamorfose e atinja o tamanho necessário para que a espécie possa ser identificada por um especialista. Criar o girino até que atinja o tamanho necessário para identificação não é uma tarefa simples. Não existem protocolos gerais ou específicos para a criação de girinos e crescimento de recém metamorfoseados (exceto para a rã *Lithobates catesbeianus*, uma espécie de interesse comercial). A tarefa torna-se ainda mais complicada para girinos que crescem em riachos. Portanto, estudos ecológicos e morfológicos são fundamentais para auxiliarem no reconhecimento e descrição de novas espécies endêmicas e da diversidade dos indivíduos, porém atualmente conta-se também com a utilização da biologia molecular, que surge como mais uma metodologia de caracterização das espécies em questão.

## Caracterização molecular das espécies

Os marcadores moleculares são amplamente empregados para estimar parâmetros genéticos, assim como o fluxo gênico e o grau de diferenciação dentro e entre as populações (Bert, 2002).

A identificação baseada em caracteres moleculares vem se mostrando uma alternativa na identificação de espécies, uma vez que as técnicas que utilizam marcadores genéticos excluem a necessidade de diferentes especialistas, anos de prática para a identificação taxonômica confiável das espécies e, além disso, podem ser feitas a partir de pequenos fragmentos de tecido.

O argumento anterior não pretende propor a biologia molecular como ferramenta única de identificação de indivíduos, pelo contrário, o enfoque que se procura é aquele utilizado por vários autores em estudos recentes: a chamada taxonomia integrativa (DeSalle *et al.*, 2005; Hebert & Gregory, 2005; Miotto *et al.*, 2007, Amaral *et al.*, 2013), no qual espera-se utilizar marcadores genéticos como apoio nas pesquisas para conseguir uma correta identificação da espécie.

Dentro dessa abordagem, uma metodologia destacada na biologia molecular para identificação de espécies de maneira rápida e precisa é a do DNA *barcode*. Esta técnica consiste na análise de fragmentos específicos de DNA que fornece informações de pequenas variações em uma sequência genética conservada, de maneira que é possível identificar o status taxonômico de um indivíduo baseando-se em marcas internas de cada espécie (Hebert & Gregory, 2005). É conhecido como DNA *barcode* porque faz uma analogia aos códigos de barras utilizados para reconhecer os produtos oferecidos nos mercados.

Para conseguir identificações de espécies através do DNA *barcode*, o gene alvo utilizado deve apresentar monofilia recíproca - membros de cada espécie estudada compartilham um ancestral comum exclusivo (Meyer e Paulay, 2005) - num grande número de espécies (Avice, 2000; Hickerson *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2009) e deve apresentar suficientes regiões conservadas de flanking permitindo o desenho de iniciadores universais (Ficetola, 2010).

Os genes utilizados preferencialmente em metazoários para estas análises são os mitocondriais, devido a sua eficiência em limitar grupos taxonômicos, uma vez que o DNA mitocondrial (mtDNA) é menos susceptível a recombinação gênica,

apresenta modo de herança materna (Hwang & Kim, 1999) e maiores taxas de substituição nucleotídica comparadas com as de genes nucleares (Brown *et al.*, 1979; Moore, 1995). Essas vantagens resultam em acúmulo de diferenças entre espécies, (Hayasaka *et al.*, 1988) revelando sua eficácia para resolver relações dentro e entre as mesmas (Folmer, 1994; Avise & Walker, 1999; Hebert, 2003a, b).

## **DNA mitocondrial**

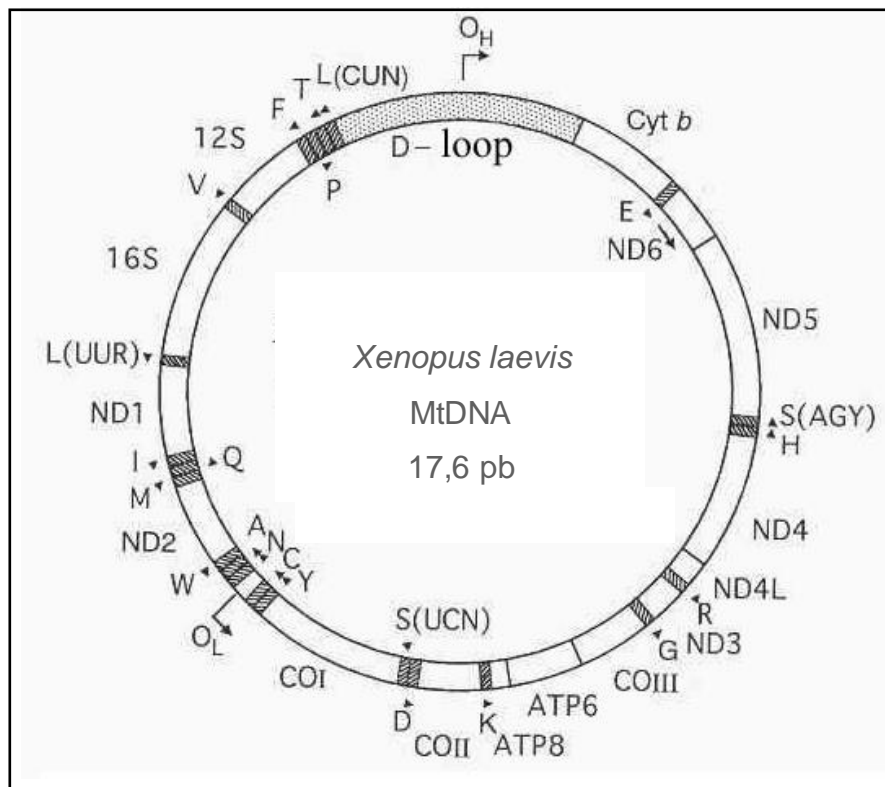
As mitocôndrias são organelas encontradas no citoplasma celular cujas funções são: gerar suprimento energético para a célula, respiração celular, produzir calor e mediar a apoptose celular (Finsterer, 2004). Seu número varia significativamente de acordo com o tipo e função biológica da célula, podendo chegar a mais de 5.000 unidades dessa organela em uma única unidade celular (Butler, 2005)

Acredita-se que há cerca de 1,5 bilhões de anos um procarioto (a mitocôndria) iniciou uma relação de simbiose com um organismo eucarioto. Vale ressaltar que, durante a evolução destas organelas, vários genes foram perdidos e outros foram transferidos para o genoma nuclear (Burger *et al.*, 2003).

De acordo com Avise e Lansman (1983), o genoma mitocondrial é maternalmente herdado em todos os eucariotos. Em *Xenopus* (David & Blakler, 1972), *Drosophila* (Reilly & Thomas, 1980), *Rana nigromaculata* e *Rana brevipoda* (Sumida, 1997a) foi comprovada a herança predominantemente materna do mtDNA.

O mtDNA é uma molécula formada por uma dupla fita circular composta por duas cadeias: uma cadeia pesada (H, ou heavy), rica em guanina, e uma cadeia leve (L, ou light), rica em citosina, com aproximadamente 16-20 Kb de tamanho (Avise, 1986). Em geral, contém 2 pares de genes para RNAs ribossomais (12S e 16S), 22 genes para RNAs transportadores, 13 genes para RNAs mensageiros e uma região controle que marca o início da replicação (Brown, 1985; Wolstenholme, 1992; Lewin, 2000) (Figura 2).

Figura 2- Representação esquemática da molécula de DNA mitocondrial em *Xenopus laevis*.



Fonte: Cordonnier *et al.*, 1982

As características que tornam os genes mitocondriais bons marcadores são: a herança uniparental clonal, raramente ocorrendo recombinação por se tratar de um DNA haploide; ausência de íntrons, o arranjo dos genes é geralmente conservado; e taxas evolutivas 5 a 10 vezes mais altas ( $1 \times 10^{-8}$  substituição / sítio / geração) que o genoma nuclear (Brown *et al.*, 1982; Li, 1997), sendo a maioria das substituições de bases simples e inserções/deleções de um ou poucos nucleotídeos (Awise, 1986; 1987). O mtDNA também é muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno (Ray & Densmore, 2002) e por sua organização simples (Awise, 1994).

Em anfíbios anuros, a caracterização do genoma mitocondrial se restringe a poucos estudos. Cordonnier *et al.* (1982) mapearam o genoma mitocondrial de *Xenopus laevis* usando 19 enzimas de restrição diferentes e encontraram um tamanho de 17,6 Kb e uma estrutura semelhante a outros DNAs mitocondriais de vertebrados (Clayton, 1982). Wong e colaboradores (1983) sequenciaram 2.398 pb do mtDNA que incluiu a região controle e os tRNAs codificadores de treolina, prolina

e fenilalanina. Dunon-Bluteau e colaboradores (1985) acrescentaram em suas análises o sequenciamento do citocromo b e, no mesmo ano, Roe e colaboradores (1985) descreveram a sequência completa do genoma mitocondrial de *Xenopus laevis*, com 17.553 pb.

Em *Rana japonica*, Sumida (1997b) encontrou três tamanhos de genoma mitocondrial: 18,5 Kb, 20,0 Kb e 21,5 Kb. Nuñez e colaboradores (1999) analisaram populações de *Eupsophus calcaratus* e *E. roseus* e estimaram o tamanho de aproximadamente 17,7 Kb do genoma mitocondrial destas duas espécies. Em hílideos, Bermingham e colaboradores (1986) estimaram um tamanho do DNA mitocondrial de 15,5 Kb a 18,4 Kb.

A variação no tamanho do genoma mitocondrial em diferentes espécies de anfíbios anuros parece não ser uma regra para a ordem. Variações foram encontradas em outros grupos e estão relacionadas com o tamanho e o número de cópias de sequências repetidas na região controle (Brown *et al.*, 1996; Härlid *et al.*, 1998).

### **Genes mitocondriais e sua utilização em estudos com anfíbios**

A escolha da sequência do DNA mitocondrial a ser analisada depende do foco do estudo. Os genes ribossomais mitocondriais podem ser usados para análise filogenética (Hillis & Dixon, 1991), por serem moléculas muito mais simples do que os genes rRNA nuclear, e não contém regiões espaçadoras (Simon *et al.*, 1994). A análise destes genes é usada geralmente para solucionar divergências profundas, como entre famílias e gêneros (Woese, 1987; Cedergren *et al.*, 1988) e, em alguns casos, entre taxa muito próximos (Reeder, 1995).

O gene da subunidade 1 da enzima citocromo c oxidase (COI), que possui uma taxa de evolução mais rápida entre todos os genes codificadores de proteínas (Simon *et al.*, 1994), também pode ser informativo quando se tem casos de profunda divergência (Yokobori *et al.*, 1994, Cummings *et al.*, 1995) ou para análise das relações entre espécies de anuros relacionadas (Mable & Roberts, 1997).

Pelos motivos anteriormente apresentados, o gene mitocondrial COI foi selecionado para estabelecer *barcodes* das espécies (Folmer *et al.*, 1994). O COI

mostrou-se uma ferramenta útil na descrição de novas espécies (Hebert *et al.*, 2004b), revelando espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004a; Smith *et al.*, 2007, Amaral *et al.*, 2013), relacionando morfotipos juvenis com adultos (Stoeckle, 2003), identificando espécies de diferentes grupos taxonômicos, incluindo grupos de insetos (Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003a, ), peixes (Mabragaña *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2013), anuros (Vences *et al.*, 2005a,b; Simth *et al.*, 2008), aves (Hebert *et al.*, 2004, Kerr *et al.*, 2009) e mamíferos (Clare *et al.*, 2007; Borisenko *et al.*, 2008).

Entretanto, tem sido discutido que não existe um único gene universal para *barcode* que seja conservado para todos os domínios da vida e apresente suficiente divergência para discriminação de espécies (Stoeckle, 2003). Desta maneira, diferentes marcadores são sugeridos para adicionar informações, levando à individualização das amostras e permitindo estabelecer com maior certeza o status taxonômico de todos os indivíduos (Stoeckle, 2003).

Outro gene utilizado com sucesso em *barcode* genético de vertebrados é o 16S descrito por Palumbi e colaboradores (1991), o qual é sugerido como *locus* alternativo em vertebrados (Vences *et al.*, 2005a, b, 2012) e proposto como suporte ao gene COI em identificações moleculares, especialmente em anfíbios (Smith *et al.*, 2007), visto que apresenta uma região mais conservada, o que favorece o uso de iniciadores universais.

Embora em alguns estudos defendam que o gene 16S apresenta uma taxa de evolução molecular muito baixa e não mantém suficiente variação para a correta identificação de espécies (Hebert *et al.* 2003a), Ficetola e colaboradores (2010) sugeriram que, ao menos em vertebrados, o 16S apresenta a mesma capacidade de resolução que o gene COI. Nesse estudo, os autores testaram diferentes fragmentos de genes mitocondriais para avaliar suas efetividades como DNA *barcode*. Os iniciadores que apresentaram os percentuais mais altos de espécies amplificadas foram o COI e o 16S, com valores de 95 e 90%, respectivamente. Os autores argumentaram que DNA *barcode* com tamanhos entre 500 e 600 pb, como os obtidos para os genes COI e 16S, têm alta capacidade de resolução e são considerados candidatos ideais.

Vences *et al.* (2005a, b) mostraram que tanto o gene 16S quanto o COI são eficientes na identificação de espécies de anuros de Madagascar, demonstrando ainda que a utilização do gene 16S apresenta vantagens sobre a do gene COI como maior acurácia na determinação das relações filogenéticas e com menor variação

intrapopulacional. Os autores também demonstraram que a elevada variabilidade nos sítios de anelamento dos iniciadores e a elevada variação intraespecífica conferem menor efetividade ao gene COI quando comparado com o gene 16S e, por isso, sugerem o gene 16S para o DNA *barcode* de anfíbios.

Pelas vantagens descritas anteriormente para genes mitocondriais, principalmente por permitir identificar espécies a partir de pequenas amostras de tecido, em especial para o caso dos genes COI e 16S, o DNA *barcode* tornou-se uma ferramenta útil, eficiente e confiável para a identificação das espécies.

Estudos envolvendo sequências de genes que codificam as subunidades do RNA ribossomal do mtDNA demonstraram que a evolução destes genes ocorreu em taxas consideradas rápidas para gerar variação necessária para solucionar problemas de inferência filogenética em anuros (Hedges & Maxson, 1993; Hay *et al.*, 1995; Ruvinsky & Maxson, 1996; Graybeal, 1997; Austin, 2002). Portanto, o gene 16S pode ser bastante útil tanto na determinação de divergências genéticas profundas quanto no esclarecimento das relações filogenéticas de táxons mais relacionados (Goebel *et al.*, 1999).

Lougheed e colaboradores (2006) avaliaram a diferenciação intraespecífica do hilídeo neotropical *Dendropsophus leucophylatus* utilizando o gene 16S, juntamente com dados ecológicos e morfológicos. Assim, foi possível observar uma divisão filogenética dentro dessa espécie.

Outro trabalho recente utilizou o 16S para testar a hipóteses de rios como barreiras geográficas e de gradiente elevacional em *Physalaemus petersi*, o que foi comprovado com a análise deste gene (Funk *et al.* 2007). Também na região amazônica, Austin e colaboradores (2001), usando dados genéticos compilados das regiões 12S e 16S do mtDNA, avaliaram as relações evolutivas da espécie *Allophryne ruthveni*. Os resultados indicaram que a espécie tem maior afinidade filogenética com espécies da família *Centrolenidae*.

Diante de tais estudos é possível observar que a região do mtDNA que expressa o gene ribossomal 16S pode ser usada em estudos filogenéticos, filogeográficos, de identificação e genética populacional em anuros.

Apesar dos estudos apresentados acima serem relacionados a anfíbios anuros de regiões neotropicais, a maioria dos estudos publicados são relacionados a anuros da região holoártica. Apesar de autores como Check e colaboradores (2001) assumirem que a região neotropical possui a maior concentração de espécies de



anuros do mundo, as mesmas são pouco estudadas e por isso têm contribuído menos para gerar modelos que expliquem a evolução dessa ordem.

Uma das características dos anfíbios anuros neotropicais é possuir, de um modo geral, um padrão morfológico conservativo (Cherry *et al.*, 1978; Maxson, 1984; Hass *et al.*, 1995; Richards & Moore, 1996), o que acarreta algumas consequências para estudos filogenéticos, pois fornece poucos caracteres informativos, sendo difícil de inferir sobre as relações entre as populações. Como em outros grupos, os anuros neotropicais são incluídos em modelos de especiação recente, ocorrida no Pleistoceno (Duellman & Crump, 1974; Duellman, 1982; Check *et al.*, 2001) nos quais as espécies formam complexos caracterizados pela grande semelhança morfológica. Além disso, as relações de distribuição das espécies atuais de anfíbios neotropicais são muito pouco conhecidas, exceto para alguns grupos (da Silva & Patton, 1998).

Dado os fatos anteriormente apresentados, este trabalho tem o intuito de testar a metodologia de identificação molecular de espécies (DNA *barcode*) na comunidade de anfíbios anuros da REGUA, por meio do gene 16S.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da identificação de espécies de anfíbios anuros através da aplicação de marcadores de DNA mitocondrial (DNA *barcode*), visando uma melhor compreensão da riqueza de espécies de anfíbios anuros da região da REGUA.

### 1.2 Objetivos específicos

1. Padronizar as condições de análise de marcadores de DNA mitocondrial para estudos da biodiversidade.
2. Identificar espécies através de marcadores genéticos polimórficos no genoma mitocondrial de anfíbios encontrados na região da REGUA.
3. Testar o uso do gene mitocondrial 16S para identificação de espécies em anfíbios anuros adultos e girinos.
4. Associar a identificação das espécies realizada com marcadores genéticos polimórficos do genoma mitocondrial à identificação morfológica dos anuros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras biológicas

As amostras de anfíbios anuros utilizadas neste estudo foram coletadas na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA; 22°24' S, 42°44' W), localizada no município de Cachoeiras de Macacu, Estado do Rio de Janeiro, sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) com o número: ICMBio-18684.

A Reserva Ecológica de Guapiaçu é uma propriedade privada, com cerca de 7.000 ha de área coberta por Mata Atlântica em diferentes níveis de conservação, desde florestas secundárias em estágios iniciais de sucessão até áreas de florestas pouco perturbadas, nas partes mais altas e de difícil acesso da reserva (Rocha *et al.*, 2007; Bernardo, 2010). A REGUA, juntamente com o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e o Parque Estadual dos Três Picos, está inserida em um extenso remanescente florestal estratégico para conservação, por proteger a bacia hidrográfica da Baía de Guanabara (Rocha *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2007). Parte da REGUA está inserida no decreto do Parque Estadual dos Três Picos (Decreto no 31.343, de 06/06/02).

Para este estudo, foram coletados tecidos de 99 indivíduos (47 adultos e 52 girinos), de 23 espécies agrupados em seis famílias distintas (Tabela 1) de acordo com prévia identificação morfológica, realizada no Laboratório de Ecologia de Anfíbios e Répteis, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Tabela 1- Lista de material coletado na REGUA utilizadas para análises moleculares

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Girinos</b>	<b>Adultos</b>
<b><i>Bufonidae</i></b>				
	<i>Rhinella ornata</i>	7	5	2
<b><i>Cycloramphidae</i></b>				
	<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	1	-	1
	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	4	2	2
	<i>Proceratophrys boiei</i>	5	4	1
	<i>Thoropa miliaris</i>	1	-	1
<b><i>Hylidae</i></b>				
	<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	5	4	1
	<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	2	-	2
	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	2	-	2
	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	-	3
	<i>Hypsiboas secedens</i>	1	-	1
	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	7	4	3
	<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	3	-	3
	<i>Scinax albicans</i>	9	5	4
	<i>Scinax flavoguttatus</i>	7	3	4
	<i>Scinax humilis</i>	1	-	1
<b><i>Hylodidae</i></b>				
	<i>Crossodactylus aeneus</i>	14	8	6
	<i>Hylodes asper</i>	1	1	-
	<i>Hylodes charadranaetes</i>	11	5	6
	<i>Hylodes lateristrigatus</i>	7	5	2
	<i>Hylodes pipilans</i>	2	1	1
	<i>Megaelosia goeldii</i>	1	-	1
<b><i>Leiuperidae</i></b>				
	<i>Physalaemus signifer</i>	2	-	2
<b><i>Leptodactylidae</i></b>				
	<i>Adenomera marmoratus</i>	3	-	3
<b>Total de indivíduos</b>		<b>99</b>	<b>47</b>	<b>52</b>

Foram coletados tecidos de anfíbios anuros adultos e girinos. Dos adultos, eram retirados pequenos fragmentos de fígado e de musculatura da perna; já dos

girinos, amostras de ponta de cauda e musculatura eram retiradas. Todas as amostras foram armazenadas em tubos com álcool puro absoluto (P.A). Os tecidos das espécies *Adenomera marmoratus*, *Phylomedusa burmeisteri* e *Thoropa miliaris* foram gentilmente cedidos pela coleção de CFBH, do Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

## 2.2 Extração de DNA

Inicialmente, três metodologias distintas de extração de DNA foram testadas: extração por método orgânico, com a utilização de Fenol-Clorofórmio e purificação por filtro microcon®, extração e purificação de DNA com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), e extração e purificação por método semi-automatizado Maxwell® 16 (Promega Corporation). Para cada uma das metodologias, um pedaço de 0,5mm<sup>2</sup> de tecido foi extraído de uma amostra da espécie *Hylodes pipilans*. O controle positivo utilizado nos testes de extração foi o DNA de um anuro adulto da espécie *Proceratophrys boiei*, também coletado na REGUA.

### 2.2.1 Extração por método orgânico / Fenol-Clorofórmio / filtro microcon®

A amostra de tecido era macerada com auxílio de um bisturi, lavada em tampão de eluição TE-4 e acondicionada em tubos de microcentrifuga, tipo Eppendorf, de 1,5 mL. Após a adição de 500 µL de tampão SEB 1x, 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 15 µL de DTT, a preparação era incubada durante 16 horas a 56°C. Após a digestão, eram adicionados 450 µL de fenol-clorofórmio, sendo a preparação centrifugada por 5 minutos a 12.000 x g (centrífuga centrimicro modelo 212). A fase aquosa superior era transferida para um filtro microcon® (Amicon) e centrifugada, por 10 minutos, a 5.000 x g. Ao filtro, eram adicionados 500 µL de água miliQ autoclavada e centrifugado, por 10 minutos, a 5.000 x g. Esse procedimento era repetido duas vezes. O filtro era então invertido, transferido para

um novo tubo de 1,5 mL e centrifugado a 12.000 x g, por 5 minutos, com a finalidade de recuperar o DNA purificado e concentrado retido na membrana.

### 2.2.2 Extração e purificação de DNA com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)

A amostra de tecido era macerada com auxílio de um bisturi, lavada em tampão de eluição TE-4 e acondicionada em tubos de microcentrífuga, tipo Eppendorf, de 1,5 mL. Após a adição de 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K, a preparação era incubada durante 16 horas a 56°C. Após a digestão, eram adicionados 200 µL do tampão AL, sendo a preparação agitada (Thermolyne 37600 Mixer). Era então adicionado à preparação, 200 µL de etanol absoluto, seguido de mais uma agitação e posterior centrifugação de 2 minutos a 5.000 x g (centrífuga centrimicro modelo 212).

O lisado era transferido para coluna de filtração apropriada acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado por 1 minuto a 5.000 x g, sendo posteriormente transferido a um novo tubo coletor. Eram então adicionados 500 µL de tampão AW1, seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 x g, e de 500 µL de tampão AW2, novamente centrifugado nas mesmas condições.

Ao final do processo, era realizada uma nova centrifugação por 3 minutos a 12.000 x g, seguida de transferência da coluna para um tubo de 1,5 µL, onde eram adicionados 100 µL de tampão ATE. A amostra era então incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, seguida de centrifugação final por 1 minuto a 12.000 x g.

Os tampões utilizados nesta metodologia de extração de DNA, com exceção do TE-4, são fornecidos pelo fabricante e acompanham o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit, segundo protocolo específico do fabricante (Qiagen).

### 2.2.3 Extração e purificação por método semi-automatizado Maxwell ® 16 (Promega Corporation)

A amostra de tecido era macerada com auxílio de um bisturi, lavada em tampão de eluição TE-4 e acondicionada em tubo tipos Eppendorf de 1,5 mL. Após a adição de 472 µL de solução *bone incubation* (Promega) e 28 µL de proteinase K (18 mg/mL), a preparação era incubada por 16 horas a 56°C, seguida de centrifugação por 5 minutos a 5.000 x g (centrífuga centrímetro modelo 212). Os 500 µL da fase aquosa superior eram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL, onde eram adicionados 346,5 µL de tampão de lise e 3,5 µL de DTT. A amostra era então transferida para os tubos apropriados do kit para o sistema Maxwell ® 16, segundo protocolo específico do aparelho (Promega Corporation).

### 2.3 Lista de tampões utilizados

<b>Tampão TE-4 (pH 7,6)</b>	
Tris-Cl pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8,0	1mM

<b>Tampão de extração SEB (pH 8,0)</b>	
EDTA pH 8,0	10 mM
NaCl	100 mM
Tris-Cl pH 8,0	10mM
SDS	2%

## 2.4 Determinação da concentração de DNA

A concentração do DNA extraído era determinada por espectrofotometria. O equipamento utilizado para a leitura foi o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que utiliza um sistema de retenção e medição do volume da amostra diretamente em um pedestal óptico com um espectro de 190 a 840 nm.

## 2.5 Metodologia utilizada para análise do mtDNA de anuros

Para amplificação de DNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados pares de iniciadores para três regiões distintas: citocromo b (CytB), citocromo c subunidade 1(COI) e 16S. Os pares de iniciadores da PCR são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação de três regiões distintas do DNA mitocondrial de anuros

Marcador	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referências
<b>Citocromo b</b>		
L14816	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	Burbrink <i>et al.</i> , 2000
H15173	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Burbrink <i>et al.</i> , 2000
<b>Citocromo c subunidade 1</b>		
AnF1	HAA YCAYSSSGAYATYGG	Lyra, em preparação
AnR1	CCRAARAATCARAADARRTGTTG	Lyra, em preparação
<b>16S</b>		
16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Palumbi, 1996



## 2.5.1 Amplificação dos genes de mtDNA

### 2.5.1.1 Amplificação do gene citocromo b

Alíquota contendo 2 ng de DNA total era transferida para tubo estéril apropriado para a reação de PCR. A reação era composta por 5,0 µL de tampão Platinum 4X (Applied Biosystems), 0,2 µL de Taq Platinum (1U), 10 µM de cada iniciador e água miliQ para completar o volume final de 20 µL.

Os termocicladores utilizados nas reações de amplificação foram o *GeneAmp* 9700 e Veriti (Applied Biosystems). As condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições termocíclicas para a amplificação da região citocromo b do mtDNA de anuros

Ciclos	Temperatura	Duração
	94° C	2 min
35 ciclos	94° C	40 seg
	55° C	40 seg
	72° C	40 seg
	72° C	5 min

### 2.5.1.2 Amplificação do gene citocromo c subunidade 1

Alíquota contendo 4 ng de DNA total era transferida para tubo estéril apropriado para a reação de PCR. A reação era composta por 5,5 µL de tampão Platinum 4X (Applied Biosystems), 0,2 µL de Taq Platinum (1U), 5 µM de cada iniciador, e água miliQ para completar o volume final de 25 µL.

Os termocicladores utilizados nas reações de amplificação foram o *GeneAmp* 9700 e Veriti (Applied Biosystems). As condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Condições termocíclicas para a amplificação da região citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) do mtDNA de anuros

Ciclos	Temperatura	Duração
	95° C	3 min
5 ciclos	95° C	30 seg
	48° C	30 seg
	60° C	1 min
	95° C	30 seg
30 ciclos	50° C	30 seg
	60° C	1 min
	60° C	5 min
	60° C	5 min

### 2.5.1.3 Amplificação do gene 16S

Alíquotas contendo 2 ng de DNA total era transferida para tubo estéril apropriado para a reação de PCR. A reação era composta por 5,0 µL de tampão Platinum 4X (Applied Biosystems), 0,2 µL de Taq Platinum (1U ), 10 µM de cada iniciador e água miliQ para completar o volume final de 20 µL.

Os termocicladores utilizados nas reações de amplificação foram o *GeneAmp* 9700 e Veriti (Applied Biosystems). As condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições termocíclicas para a amplificação da região 16S do mtDNA de anuros

Ciclos	Temperatura	Duração
	94° C	2 min
35 ciclos	94° C	30 seg
	52° C	40 seg
	72° C	1 min
	72° C	10 min

#### 2.5.1.4 Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose

Os produtos de amplificação por PCR dos genes de mtDNA eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tensão média de 110 V, por 30 minutos, e, após coloração em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 15 minutos, eram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (256 nm). Para o registro da imagem, foi utilizado o leitor de fluorescência FMBIO II (Hitachi, Co).

#### 2.5.2 Purificação do produto amplificado da PCR

A purificação do produto amplificado da PCR serve para evitar que reagentes, como iniciadores e dNTPs, que não foram utilizados na PCR, interfiram nas reações seguintes. Para isto, duas metodologias de purificação foram utilizadas: o complexo *ExoSAP-IT* e a coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).

### 2.5.2.1 Purificação pelo complexo *ExoSAP-IT*

Através desta metodologia, os produtos amplificados eram purificados através da ação de duas enzimas - Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), ambas disponíveis em conjunto em *ExoSAP-IT®* (usb®) (Onofri *et al.*, 2006; Brion *et al.*, 2005). A enzima Exo I degrada os iniciadores e DNA de cadeia simples enquanto a SAP desfosforila os dNTPs em solução.

Após as reações de PCR, 2,0 µL do complexo *ExoSAP-IT®* (volume sugerido pelo fabricante) eram adicionadas a 5 µL do produto amplificado, sendo a mistura incubada a 37°C, por 15 minutos, seguindo-se de uma incubação por 15 minutos, a 85°C, para promover a inativação das enzimas, de acordo com as indicações do fabricante. As incubações eram realizadas no termociclador *GeneAmp 9700* da Applied Biosystems.

### 2.5.2.2 Purificação através de coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).

Através desta metodologia, os produtos amplificados eram purificados através da coluna MicroSpin™ (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.5.3 Sequenciamento das regiões de mtDNA de anuros

Após a etapa de purificação, o produto de amplificação era sequenciado pelo método cíclico de terminação de cadeia. Com exceção do marcador COI onde os iniciadores eram distintos, como mostra a tabela 6, os mesmos pares de iniciadores usados na reação de PCR são utilizados individualmente para dirigir a síntese de uma nova fita. Os dideoxirribonucleotídeos (ddNTPs) utilizados para a terminação da reação de polimerização eram marcados com distintos corantes fluorescentes (Tabela 7).

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para sequenciamento da região COI do mtDNA de anuros

Iniciadores	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referências
<b>M13F</b>	TGTAAAACGACGGCCAGT	Messing, 1983
<b>M13R</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing, 1983

Tabela 7 - Fluoróforos utilizados para reação de sequenciamento do mtDNA e indicação da cor atribuída a sua análise.

Ddntp	Fluorocromo	Cor dos dados analisados
A	JOE	Verde
T	ROX	Vermelho
C	6-FAM	Azul
G	NED	Amarelo*

Nota: \*Para melhor visualização, nos eletroferogramas a sua cor é preta.

Nesta etapa foi utilizado o *kit* comercial *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0*, (*Applied Biosystems*, Co). A mistura da reação era realizada em microtubos, sendo composta por: 2,5 µL do produto de amplificação purificado, 1 µM do iniciador a e 2 µL da solução de reação (kit 1:1) em um volume final de 5 µL. As reações de sequenciamento eram procedidas nos termocicladores 9700 e Veriti (*Applied Biosystems*), nas condições descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de anuros

Ciclos	Temperatura	Duração
	95° C	10 seg
25 ciclos }	50° C	5 min
	60° C	4 min

#### 2.5.4 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina *Sephadex* G-50

Após a reação, o produto de sequenciamento era purificado em resina *Sephadex* G-50. Esse método é baseado na separação das moléculas de ácidos nucléicos de tamanhos diferentes por exclusão em resina de *Sephadex* (Sambrook *et al*, 1989).

Para o preparo da resina, 750  $\mu$ L de mistura contendo 10 g de *Sephadex* em 150 mL de água miliQ eram aplicados em uma coluna de purificação. Esta era colocada dentro de um tubo de 1,5 mL e centrifugada a 5.000 x g, por 1 minuto e 30 segundos (Centrifuga Centrimicro 242 - FANEM). O filtrado era descartado e a coluna, após a centrifugação nas mesmas condições, era então transferida para um novo tubo de 1,5 mL, sendo a ela adicionado o volume total da reação de sequenciamento, seguindo-se de nova centrifugação a 5.000 x g, por 3 minutos. O filtrado era então imediatamente utilizado para a reação de eletroforese capilar.

### 2.6 **Eletroforese capilar**

A separação dos produtos da PCR era realizada através da eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3500 Genetic Analyser Instrument (Applied Biosystems).

#### 2.6.1 Preparação das amostras

Ao filtrado, após a purificação em resina *Sephadex* G-50, eram adicionados 12  $\mu$ L de formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems). Da mistura, 12  $\mu$ L eram aplicados em um poço da placa do sequenciador, que era centrifugada a 1.000 x g, por 1 minuto (*Laboratory Centrifuge* 2-16P Sigma). Em seguida, as amostras eram desnaturadas por incubação por 5 minutos, a 95°C, e posteriormente mantidas em

banho de gelo, por 5 minutos, ou até o início da eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3500 (Applied Biosystems)*, com a utilização do polímero POP-7™ (*Applied Biosystems, Co*) e de capilares de 50 cm. A desnaturação das amostras era realizada nos poços da placa do sequenciador.

### 2.6.2 Eletroforese capilar e detecção

Para eletroforese capilar foi utilizado o capilar *Avant Capillary Array 50 cm (Applied Biosystems)* preenchido com o polímero POP-7™ (*Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems)*). Os dideoxirribonucleotídeos são marcados com diferentes fluoróforos que, quando excitado por uma fonte de alta energia, emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda. O resultado é representado por um eletroferograma onde são observados picos resultantes do processo de emissão, detecção e transformação do sinal luminoso, que são visualizados em unidades relativas de fluorescência (RFU).

### 2.6.3 Alinhamento e análise das sequências

Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do software *Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems)* para a determinação da qualidade das sequências. O alinhamento e edição das mesmas foram feitos com a utilização dos softwares *BioEdit 7.053 (Hall, 1999)* e *Mega 5.2 (Tamura et al., 2011)*, ambos utilizando o recurso *ClustalW (Thompson et al., 1994)*.

As distâncias intraespecífica e interespecíficas das espécies foram calculadas utilizando o modelo *Kimura 2 parâmetros (K2P, Kimura, 1980)* no programa *Mega 5.2*.

Com o auxílio do programa *Mega 5.2*, foram construídas árvores de *neighbor-joining* para verificação de similaridade entre as sequências obtidas dos marcadores 16S e COI. Para tal, foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica *K2P* com

bootstrap de 1.000 réplicas para obter suporte entre os agrupamentos (Felsenstein, 1985).

Para investigar a saturação das sequências em cada um dos alinhamentos construídos foram plotados o número de transições (Ts) e transversões (Tv) pela distância (p) entre cada par de sequências, através do software DAMBE v5.2.61 (Xia & Xie, 2001) utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 1980 (K80).

Após o alinhamento das sequências feito com o software Mega 5.2, vários modelos de substituição de nucleotídeos foram determinados com base no critério de seleção de AKAYKE (AIC).

Com o modelo de substituição de nucleotídeos adequado, foi realizada uma análise de maximum-likelihood simultaneamente a uma análise de bootstrap com 10.000 réplicas, sendo construída uma árvore para análise do marcador 16S com o software Mega 5.2.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Padronização das condições de análise de marcadores de DNA mitocondrial para estudos de anfíbios anuros

##### 3.1.1 Extração de DNA e análise dos produtos de amplificação em gel de agarose

Com o objetivo de padronizar metodologias para estudos de biodiversidade pelo Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD), mais precisamente para estudos com anfíbios anuros, os resultados apresentados nessa seção se referem à escolha do método de extração mais eficaz e dos iniciadores que melhor respondessem à questão acerca da pergunta inicial do trabalho que é verificar a capacidade de marcadores no DNA mitocondrial identificarem espécies de anfíbios anuros.

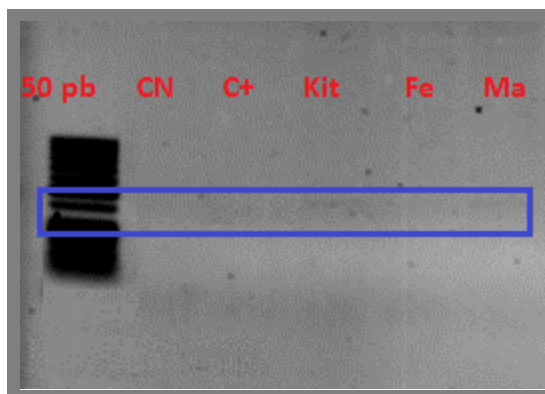
##### 3.1.1.1 Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene citocromo b (CytB) a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias

Para esta verificação, os métodos de extração de DNA utilizados foram: método orgânico, com a utilização de Fenol-Clorofórmio; kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen); e método semi-automatizado Maxwell® 16 (Promega Corporation).

Alíquotas contendo 2 ng de DNA extraídos por métodos distintos foram amplificadas com o par de iniciadores L14816 e H15173 da região CytB do mtDNA, sendo os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, conforme descrito no item 2.4.1.4.

Como produto da amplificação do gene CytB era esperado um fragmento de 358 pb, conforme mostrado na figura 3. Observou-se que nenhuma das metodologias de extração de DNA adotadas se correlacionou com a amplificação do gene CytB.

Figura 3 - Produtos de amplificação por PCR da região CytB do DNA mitocondrial



Legenda: Kit - amplificação a partir de DNA extraído com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen); Fe - amplificação a partir de DNA extraído pelo método orgânico; Ma - amplificação a partir de DNA extraído pelo método semi-automatizado Maxwell® 16; CN - controle negativo da reação de PCR; C+ - controle positivo (DNA de indivíduo adulto de *Proceratophrys boiei* extraído com Kit) da reação de PCR; 50 pb - padrão de peso molecular.

Nota: Em azul, encontra-se destacada a região do gel relacionada com a migração eletroforética de aproximadamente 358 pb.

Fonte: Chaves, 2014.

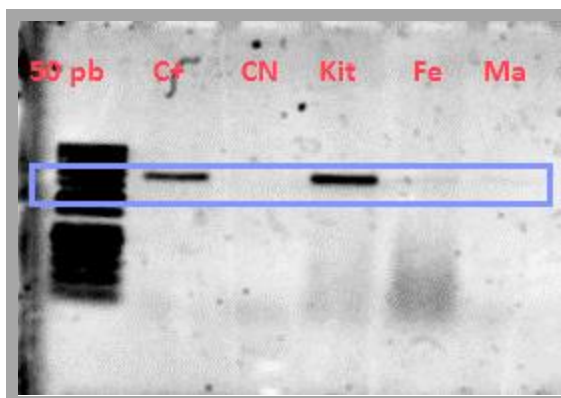
### 3.1.1.2 Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene citocromo c subunidade 1 (COI) a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias

Para esta avaliação foram utilizados os mesmos métodos de extração empregados no item 3.1.1.1.

Alíquotas contendo 4 ng de DNA extraídos por métodos distintos foram amplificadas com o par de iniciadores AnF1 e AnR1 da região COI do mtDNA, sendo os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, conforme descrito no item 2.4.1.4.

Como produto da amplificação do gene COI era esperado um fragmento de 658 pb, conforme mostrado na figura 4. Observou-se que tanto a metodologia de extração pelo método semi-automatizado Maxwell® 16 (Promega Corporation) quanto o método de extração orgânica, apresentaram resultado positivo, porém os fragmentos gerados não puderam ser visualizados adequadamente. A partir de DNA extraído pelo kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) verificou-se uma maior eficiência da amplificação por PCR do gene COI com o par de iniciadores específico.

Figura 4 - Produtos de amplificação por PCR da região COI do DNA mitocondrial



Legenda: Kit - amplificação a partir de DNA extraído com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen); Fe - amplificação a partir de DNA extraído pelo método orgânico; Ma - amplificação a partir de DNA extraído pelo método semi-automatizado Maxwell® 16; CN - controle negativo da reação de PCR; C+ - controle positivo (DNA de indivíduo adulto de *Proceratophrys boiei* extraído com Kit) da reação de PCR; 50 pb - padrão de peso molecular.

Nota: Em azul, encontra-se destacada a região do gel relacionada com a migração eletroforética de aproximadamente 658pb.

Fonte: Chaves, 2014.

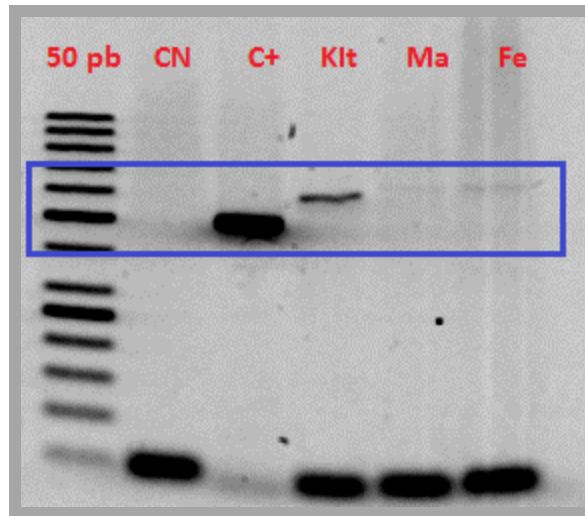
### 3.1.1.3 Avaliação da eficiência da amplificação por PCR do gene 16S a partir de DNA total extraído por diferentes metodologias

Para esta avaliação foram utilizados os mesmos métodos de extração empregados no item 3.1.1.1.

Alíquotas contendo 2 ng de DNA extraídos por métodos distintos foram amplificadas com o par de iniciadores 16Sar e 16Sbr da região 16S do mtDNA, sendo os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, conforme descrito no item 2.4.1.4.

Como produto da amplificação do gene 16S era esperado um fragmento de 560 pb, conforme mostrado na figura 5. Observou-se que, assim como na avaliação do gene COI, tanto a metodologia de extração pelo método semi-automatizado Maxwell® 16 (Promega Corporation) quanto o método de extração orgânica, apresentaram resultado positivo, porém os fragmentos gerados não puderam ser visualizados adequadamente. A partir de DNA extraído pelo kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) verificou-se uma maior eficiência da amplificação por PCR do gene COI com o par e iniciadores específico.

Figura 5 - Produtos de amplificação por PCR da região 16S do DNA mitocondrial



Legenda: Kit - amplificação a partir de DNA extraído com o kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen); Fe - amplificação a partir de DNA extraído pelo método orgânico; Ma - amplificação a partir de DNA extraído pelo método semi-automatizado Maxwell® 16; CN - controle negativo da reação de PCR; C+ - controle positivo (DNA de indivíduo adulto de *Proceratophrys boiei* extraído com Kit) da reação de PCR; 50 pb - padrão de peso molecular.

Nota: Em azul, encontra-se destacada a região do gel relacionada com a migração eletroforética de aproximadamente 560 pb.

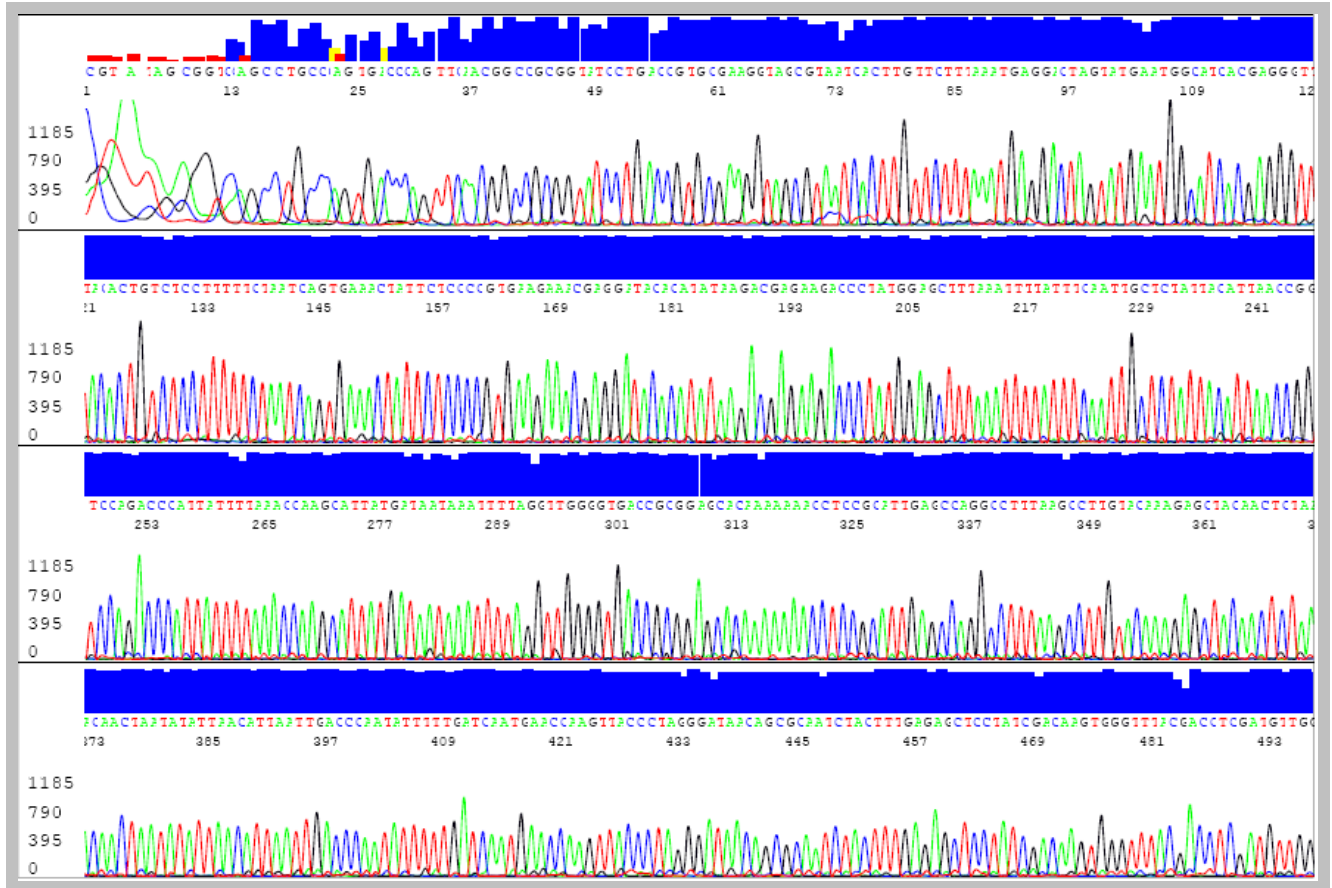
Fonte: Chaves, 2014.

Os resultados anteriores indicaram ser a extração de DNA pelo kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) a metodologia mais apropriada à realização de estudos relacionados à biodiversidade no Laboratório de Diagnósticos por DNA. Os marcadores escolhidos para o estudo de anfíbios anuros da região da REGUA foram os genes 16S e COI, embora somente as análises realizadas com o gene 16S sejam apresentadas neste trabalho. As análises feitas para o marcador COI fazem parte da tese de doutoramento de Vitor Néilson Teixeira Borges-Júnior.

### 3.1.2 Sequenciamento do gene 16S do DNA mitocondrial a partir de produtos de PCR purificados por distintas metodologias

Eletroferogramas de sequenciamentos (sequência *forward*) da região 16S do mtDNA de um mesmo indivíduo da espécie *Hylodes pipilans* são mostradas nas figuras 6 e 7.

Figura 6 - Eletroferograma representativo da sequência *Forward* da região 16S do DNA mitocondrial (orientação 5'-3') de indivíduo da espécie *Hylodes pipilans* com produtos de amplificação purificados pelo método *ExoSAP-IT*.

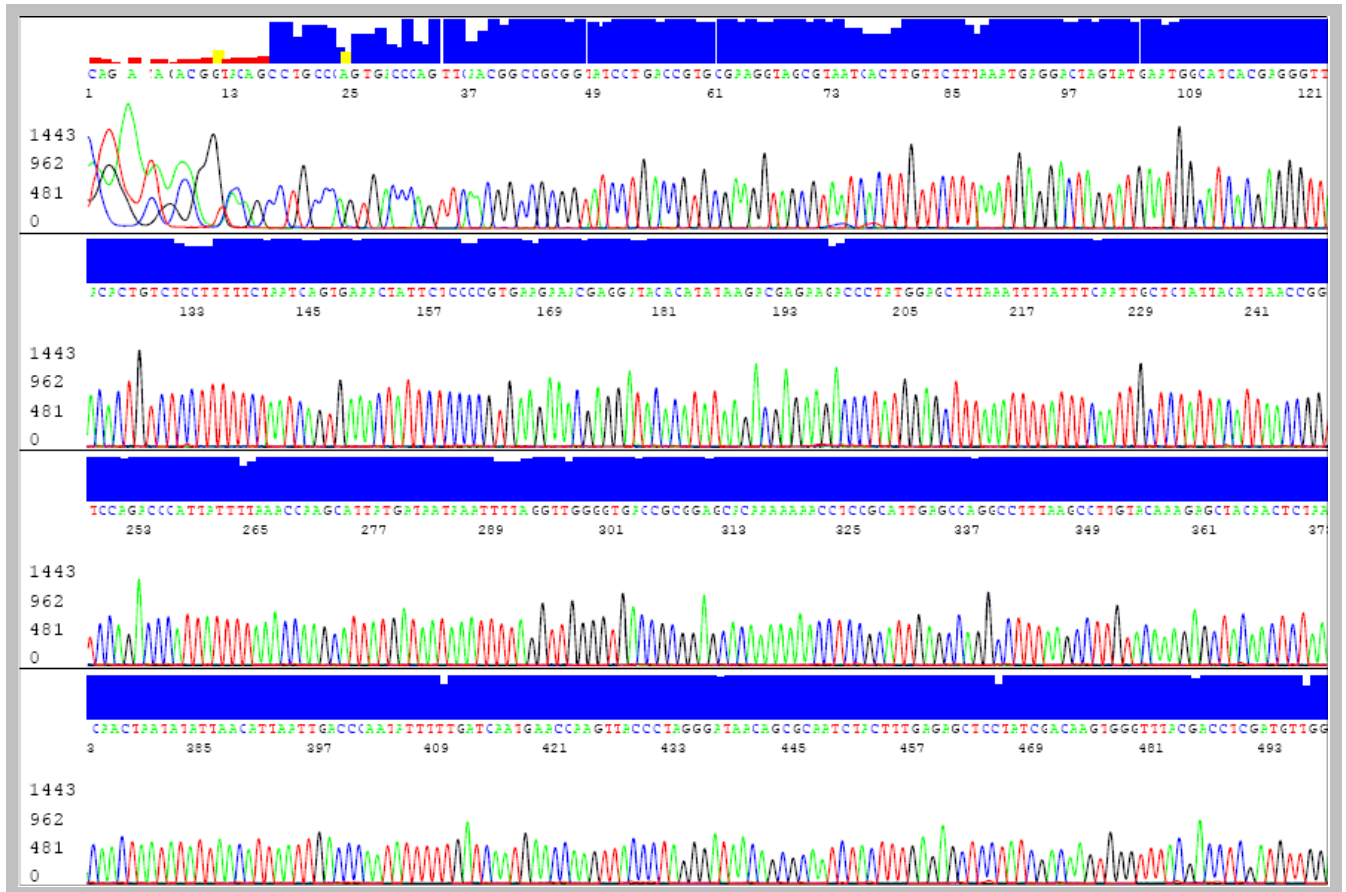


Legenda: T – Timina; A – Adenina; G - Guanina; C – Citosina.

Nota: Após a purificação foram realizadas reações individuais para produtos gerados pelos iniciadores 16Sar e 16Sbr. A sequência de bases foi determinada em leitores de fluorescência ABI3500 durante eletroforese capilar e visualizada com o software Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems).

Fonte: Chaves, 2014.

Figura 7 - Eletroferograma representativo da sequência *Forward* da região 16S do DNA mitocondrial (orientação 5'-3') de indivíduo da espécie *Hylodes pipilans* com produtos de amplificação purificados pelo método coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).



Legenda: T – Timina; A – Adenina; G - Guanina; C – Citosina.

Nota: Após a purificação foram realizadas reações individuais para produtos gerados pelos iniciadores 16Sar e 16Sbr. A sequência de bases foi determinada em leitores de fluorescência ABI3500 durante eletroforese capilar e visualizada com o software Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems).

Fonte: Chaves, 2014.

A figura 6 mostra o eletroferograma de um sequenciamento em que a purificação do produto amplificado da PCR foi feita pelo complexo *ExoSAP-IT*; já a figura 7 mostra o eletroferograma de um sequenciamento em que purificação foi feita pela coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare).

Com base nas imagens, aquelas que apresentaram as melhores sequências com menor número de interferências na leitura foram as que utilizaram a metodologia de purificação pela coluna MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare), e por este motivo, esta metodologia de purificação foi selecionada como padrão.

Após o sequenciamento, os eletroferogramas das sequências foram analisados, onde as regiões de baixa confiabilidade foram marcadas e, após a geração de sequências consenso (*reverse*), alteradas para melhor visualização.

### **3.2 Análise de sequências do gene 16S em anfíbios anuros da REGUA**

Dos 99 indivíduos, foram obtidas sequências do gene em referência a partir de DNA extraído de 88 indivíduos (38 adultos e 50 girinos) de diferentes espécies previamente classificadas morfologicamente, conforme mostrado na tabela 9.

Para as 88 sequências do gene 16S analisadas, a composição média das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) foram de 30,79%, 27,47%, 19,43% e 22,3%, respectivamente. Em sequências que variaram de 546 a 618 pb, o que condiz com o tamanho do fragmento do gene 16S para identificação de espécies, foram detectados 265 sítios polimórficos.

Tabela 9 - Total de indivíduos classificados morfologicamente sequenciados para o gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Girinos</b>	<b>Adultos</b>
<b><i>Bufo</i>nidae</b>				
	<i>Rhinella ornata</i>	7	5	2
<b><i>Cycloramph</i>idae</b>				
	<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	1	-	1
	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	3	1	2
	<i>Proceratophrys boiei</i>	4	3	1
	<i>Thoropa miliaris</i>	1	-	1
<b><i>Hyla</i>idae</b>				
	<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	5	4	1
	<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	2	-	2
	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	2	-	2
	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	-	3
	<i>Hypsiboas secedens</i>	1	-	1
	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	6	3	3
	<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	3	-	3
	<i>Scinax albicans</i>	8	4	4
	<i>Scinax flavoguttatus</i>	5	3	2
	<i>Scinax humilis</i>	1	-	1
<b><i>Hylod</i>idae</b>				
	<i>Crossodactylus aeneus</i>	13	7	6
	<i>Hylodes asper</i>	1	1	-
	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	2	6
	<i>Hylodes lateristrigatus</i>	7	5	2
	<i>Hylodes pipilans</i>	2	1	1
	<i>Megaelosia goeldii</i>	1	-	1
<b><i>Leiuper</i>idae</b>				
	<i>Physalaemus signifer</i>	2	-	2
<b><i>Leptodactyl</i>idae</b>				
	<i>Adenomera marmoratus</i>	3	-	3
<b>Total de indivíduos</b>		<b>88</b>	<b>38</b>	<b>50</b>



### 3.2.1 Cálculo de distâncias intra e interespecíficas através de 16S barcode

As distâncias intraespecíficas foram calculadas apenas para as espécies que apresentavam mais de um indivíduo. Com isso, as espécies *Cycloramphus brasiliensis*, *Thoropa miliaris*, *Hypsiboas secedens*, *Scinax humilis*, *Hylodes asper* e *Megaelosia goeldii* não fazem parte desta análise. Os valores de distância intraespecífica variaram de 0 (zero) a 3,77%, sendo a média de 0,62% (Tabela 10). O maior valor de diversidade intraespecífica foi encontrado na espécie *Hylodes charadranaetes* (3,77%).

As estimativas das distâncias interespecíficas foram realizadas por comparação entre o valor de distância intraespecífica de uma dada espécie com aquele observado para a outra espécie mais próxima filogeneticamente. Os valores de distância interespecífica variaram de 0 (zero) a 13,23%, sendo a média de 6,91% (Tabela 11). O maior valor de diversidade interespecífica foi encontrado entre as espécies *Phyllomedusa burmeisteri* e *Physalaemus signifer*.

As espécies *Phyllomedusa burmeisteri* (3 indivíduos) e *Physalaemus signifer* (2 indivíduos) encontram-se entre as que apresentaram menor distância intraespecífica (0%), enquanto quando comparadas entre si observou-se a maior distância interespecífica (13,23%). As espécies *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* (8, 5 e 8 indivíduos, respectivamente) apresentaram maiores distâncias intraespecíficas (2,18%, 3,49% e 3,77%, respectivamente). Quando cada espécie foi comparada com a espécie próxima do mesmo gênero, foram observadas distâncias interespecíficas de 0%.

Para melhor visualização destes resultados, árvores filogenéticas foram construídas, e serão apresentadas a seguir.

Tabela 10 - Valores de distância intraespecífica em sequências do gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.

Família	Espécie	Distâncias intraespecíficas	Total de indivíduos estudados
<b>Bufonidae</b>	<i>Rhinella ornata</i>	0,08%	7
<b>Cycloramphidae</b>	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	0%	3
	<i>Proceratophrys boiei</i>	0,17%	4
<b>Hylidae</b>	<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	0,18%	5
	<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	0%	2
	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	0%	2
	<i>Dendropsophus meridianus</i>	0%	3
	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	0,09%	6
	<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	0%	3
	<i>Scinax albicans</i>	2,18%	8
	<i>Scinax flavoguttatus</i>	3,49%	5
<b>Hylodidae</b>	<i>Crossodactylus aeneus</i>	0,07%	13
	<i>Hylodes charadranaetes</i>	3,77%	8
	<i>Hylodes lateristrigatus</i>	0,06%	7
	<i>Hylodes pipilans</i>	0,18%	2
<b>Leiuperidae</b>	<i>Physalaemus signifer</i>	0%	2
<b>Leptodactylidae</b>	<i>Adenomera marmoratus</i>	0,22%	3

Legenda: Círculo vermelho: maior valor de distância intraespecífica. Círculo azul: espécies com menor distância intraespecífica.

Tabela 11 - Valores de distância interespecífica em sequências do gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.

Espécie	Número de indivíduos estudados	Espécie mais próxima	Número de indivíduos estudados	Distâncias interespecíficas
<i>Rhinella ornata</i>	7	<i>Crossodactylus aeneus</i>	13	11,96%
<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	1	<i>Thoropa miliaris</i>	1	7,96%
<i>Proceratophrys appendiculata</i>	3	<i>Proceratophrys boiei</i>	4	3,87%
<i>Proceratophrys boiei</i>	4	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	3	3,87%
<i>Thoropa miliaris</i>	1	<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	1	7,96%
<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	5	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	6	13,09%
<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	2	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	10,07%
<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	2	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	5,84%
<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	2	5,84%
<i>Hypsiboas secedens</i>	1	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	6	10,63%
<i>Hypsiboas semilineatus</i>	6	<i>Hypsiboas secedens</i>	1	10,63%
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	3	<i>Physalaemus signifer</i>	2	13,23%
<i>Scinax albicans</i>	8	<i>Scinax flavoguttatus</i>	5	0%
<i>Scinax flavoguttatus</i>	5	<i>Scinax albicans</i>	8	0%
<i>Scinax humilis</i>	1	<i>Scinax albicans</i>	8	6,23%
<i>Crossodactylus aeneus</i>	13	<i>Hylodes asper</i>	1	10,62%
<i>Hylodes asper</i>	1	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	6,17%
<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	<i>Hylodes pipilans</i>	2	0%
<i>Hylodes lateristrigatus</i>	7	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	0%
<i>Hylodes pipilans</i>	2	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	0%
<i>Megaelosia goeldii</i>	1	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	7,65%
<i>Physalaemus signifer</i>	2	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	10,6%
<i>Adenomera marmoratus</i>	3	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	12,62%

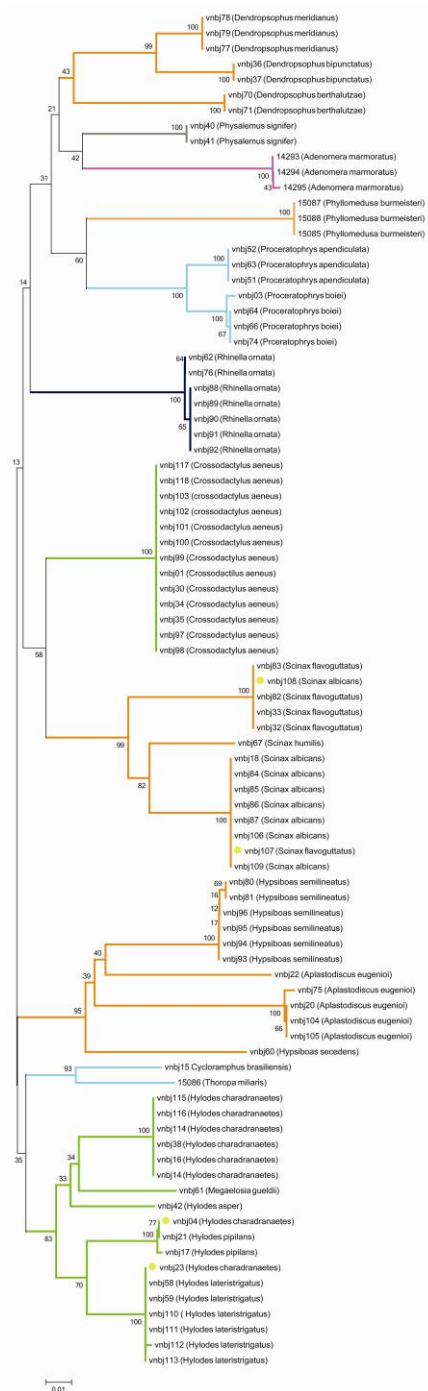
Legenda: Círculo vermelho: maior valor de distância interespecífica. Círculo azul: espécies com menor distância interespecífica.

### 3.2.2 Análise filogenética de espécies de anuros da REGUA através do gene 16S de mtDNA

Após análise das sequências, foi construída uma árvore de neighbor- joining com aplicação do modelo K2P simultaneamente a um bootstrap com 1.000 réplicas (Figura 8).

A maioria dos indivíduos pertencentes a uma mesma espécie agrupou em clados monofiléticos com alto suporte de bootstrap (>99%), o que corrobora o uso do gene 16S para identificação de espécies de anfíbios anuros. Porém, conforme visto anteriormente, indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* apresentaram altos valores de distância intraespecífica e estão agrupados em clados monofiléticos de espécies diferentes daquelas em que foram identificados morfologicamente (Figuras 9 e 10).

Figura 8 - Árvore de neighbor-joining construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.

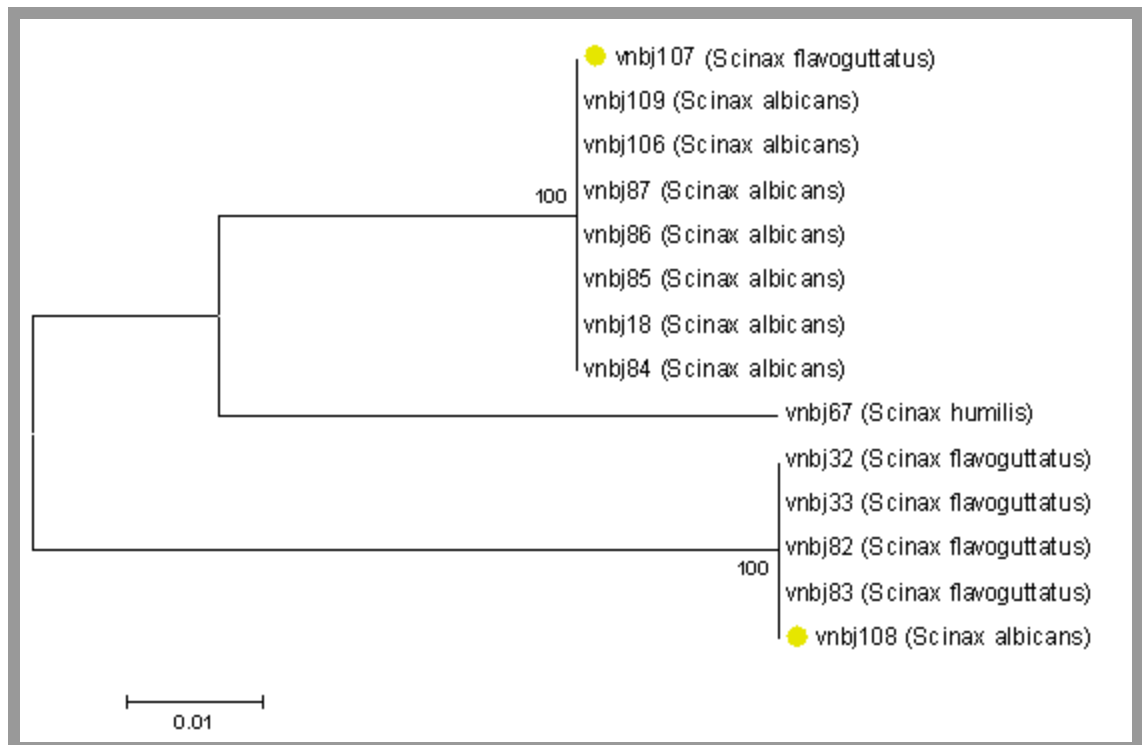


Legenda: Em **amarelo**, indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* que apresentam altos valores de distância intraespecífica; clados em **laranja**: família *Hylidae*; clados em **verde**: família *Hylodidae*; clados em **rosa**: família *Leptodactylidae*; clados em **azul claro**: família *Cycloramphidae*; clados em **azul escuro**: família *Bufonidae*; clados em **cinza**: família *Leiuperidae*.

Nota: Acima dos nós, valores de bootstrap maiores que 50 (BP>50%). A maioria das amostras pertencentes à mesma espécie agrupou em clados monofiléticos com alto suporte de bootstrap (>99%). Nesta análise, as diferentes famílias não agrupam formando grupos parafiléticos.

Fonte: Chaves, 2014

Figura 9 - Trecho da árvore de neighbor-joining construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.



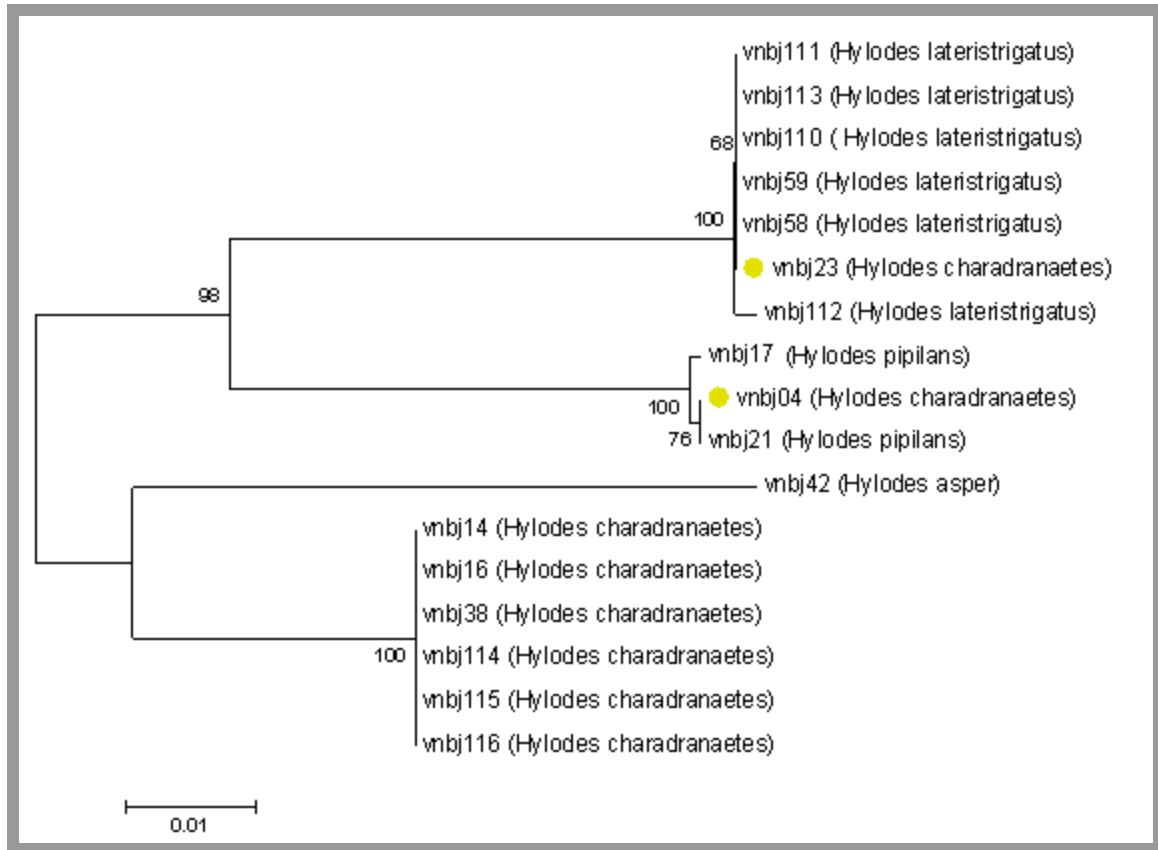
Legenda: Em amarelo os indivíduos das espécies de *Scinax albicans* (vnbj108) e *Scinax flavoguttatus* (vnbj107)

Nota: *Scinax albicans* (vnbj108) e *Scinax flavoguttatus* (vnbj107) agruparam com indivíduos de espécies distintas com suporte de bootstrap de 100%.

Fonte: Chaves, 2014.

Os resultados anteriores apontam para uma discordância entre a identificação morfológica e a realizada pela metodologia de *barcode* com análise do gene 16S para apenas 4 indivíduos de 3 espécies diferentes, em um total de 88, o que representa um índice de concordância de 95,45% (Tabela 12).

Figura 10 - Trecho da árvore de neighbor-joining construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas.



Legenda: Em amarelo os indivíduos das espécies de *Hylodes charadranaetes* (vnbj04 e vnbj23).

Nota: *Hylodes charadranaetes* (vnbj04 e vnbj23) agruparam com indivíduos de espécies distintas com suporte de bootstrap de 100%.

Fonte: Chaves, 2014.

Todas as discordâncias na determinação de espécies foram encontradas em girinos. Em *Hylodes charadranaetes*, nenhum dos girinos sequenciados para o gene 16S teve sua identificação coincidente com a morfológica. Porém em nenhuma das espécies analisadas observou-se discordância para todos os indivíduos estudados.

O gene 16S é também aplicado na recuperação taxonômica de famílias, visto que este gene é conservado em vertebrados, ao contrário do COI que apresenta maior variação polimórfica. A árvore de neighbor-joining apresentada na figura 9 não demonstra o agrupamento correto das famílias, o que poderia sugerir uma saturação das sequências, o que inviabilizaria o estudo.

Tabela 12 - Concordância entre identificação morfológica e identificação molecular realizada com o gene 16S do mtDNA para anuros da REGUA.

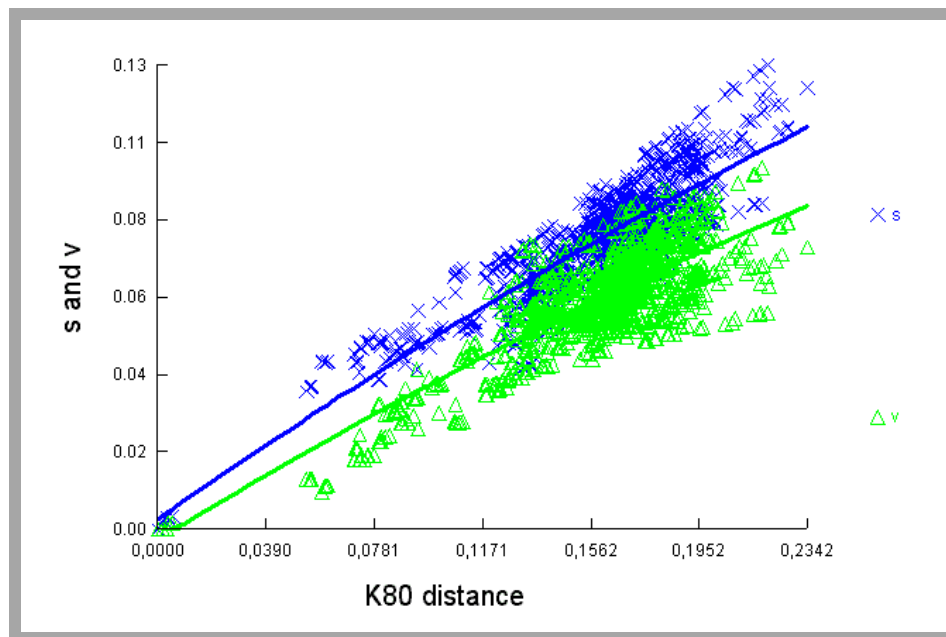
Família	Espécie	Número de indivíduos	Número de girinos *(n°+) (n°-)	Número de adultos *(n°+)	Índice de concordância
<b>Bufonidae</b>					
	<i>Rhinella ornata</i>	7	5 (5+)	2 (2+)	100%
<b>Cycloramphidae</b>					
	<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	1	-	1 (1+)	100%
	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	3	1 (1+)	2 (2+)	100%
	<i>Proceratophrys boiei</i>	4	3 (3+)	1 (1+)	100%
	<i>Thoropa miliaris</i>	1	-	1 (1+)	100%
<b>Hylidae</b>					
	<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	5	4 (4+)	1 (1+)	100%
	<i>Dendropsophus berthalutzae</i>	2	-	2 (2+)	100%
	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	2	-	2 (2+)	100%
	<i>Dendropsophus meridianus</i>	3	-	3 (3+)	100%
	<i>Hypsiboas secedens</i>	1	-	1 (1+)	100%
	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	6	3 (3+)	3 (3+)	100%
	<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	3	-	3 (3+)	100%
	<i>Scinax albicans</i>	8	4 (3+) (1-)	4 (4+)	87,5%
	<i>Scinax flavoguttatus</i>	5	3 (2+) (1-)	2 (2+)	80%
	<i>Scinax humilis</i>	1	-	1 (1+)	100%
<b>Hylodidae</b>					
	<i>Crossodactylus aeneus</i>	13	7 (7+)	6 (6+)	100%
	<i>Hylodes asper</i>	1	1 (1+)	-	100%
	<i>Hylodes charadranaetes</i>	8	2 (0+) (2-)	6 (6+)	75%
	<i>Hylodes lateristrigatus</i>	7	5 (5+)	2 (2+)	100%
	<i>Hylodes pipilans</i>	2	1 (1+)	1 (1+)	100%
	<i>Megaelosia goeldii</i>	1	-	1 (1+)	100%
<b>Leiuperidae</b>					
	<i>Physalaemus signifer</i>	2	-	2 (2+)	100%
<b>Leptodactylidae</b>					
	<i>Adenomera marmoratus</i>	3	-	3 (3+)	100%
<b>Total de concordâncias</b>			<b>38 (34+)</b>	<b>50 (50+)</b>	

Legenda: \*(n°+) = número de indivíduos para os quais foi observado concordância entre as metodologias de identificação; (n°-) = número de indivíduos para os quais não foi observado concordância entre as metodologias de identificação.



A análise de saturação para o gene 16S (Figura 11), conforme esperado, demonstrou que número de transições (Ts) aumentou proporcionalmente com o aumento da distância entre as sequências, assim como o número de transversões (Tv) o que revela saturação no modelo testado (K80).

Figura 11 - Gráfico de saturação entre as sequências da região 16S do mtDNA de anuros da REGUA.

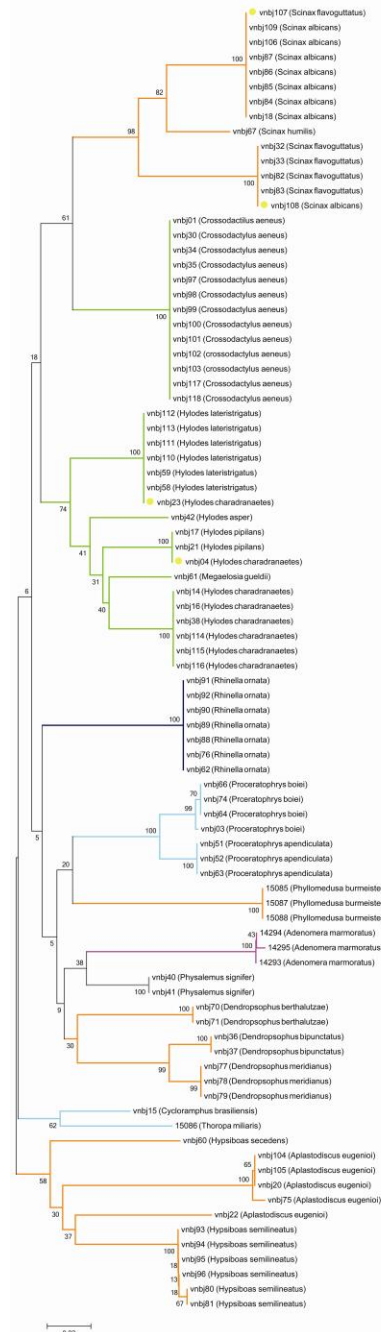


Legenda: Em azul, estão representadas as transições (Ts), e em verde as transversões (Tv) em relação à distância Kimura, 1980 (K80) entre sequências.

Fonte: Chaves, 2014.

Para verificação da saturação das sequências, foi construída uma árvore de neighbor-joining com aplicação do modelo K2P, eliminando a terceira base do códon das sequências para análise (Figura 12), visto que o maior número de polimorfismos é encontrado nesta posição.

Figura 12 - Árvore de neighbor-joining construída com a retirada da terceira base dos códons das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 10000 réplicas.



Legenda: Em **amarelo**, indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranetes* que apresentam altos valores de distância intraespecífica; clados em **laranja**: família *Hylidae*; clados em **verde**: família *Hylodidae*; clados em **rosa**: família *Leptodactylidae*; clados em **azul claro**: família *Cycloramphidae*; clados em **azul escuro**: família *Bufonidae*; clados em **cinza**: família *Leiuperidae*.

Nota: Acima dos nós, valores de bootstrap maiores que 50 (BP>50%). A maioria das amostras pertencentes à mesma espécie agrupou em clados monofiléticos com alto suporte de bootstrap (>99%). Nesta análise, as diferentes famílias analisadas não agrupam em grupos parafiléticos.

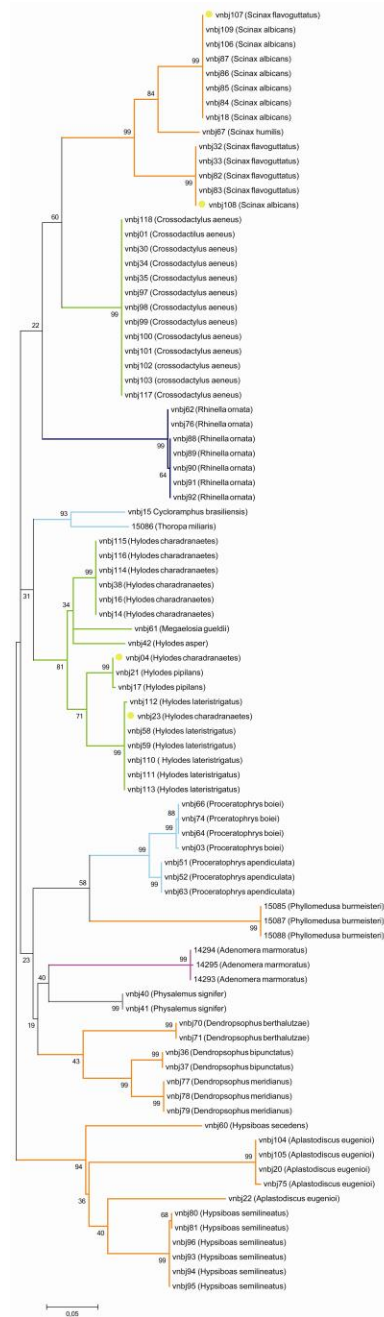
Fonte: Chaves, 2014.

A semelhança das árvores de neighbor-joining das figuras 8 e 12 mostram que, apesar da saturação das sequências sugerida com a análise pelo modelo K80, a retirada da terceira base dos códons não alterou o padrão das mesmas, e por isso, as sequências se mostram confiáveis para este estudo.

Para comprovação dos resultados, uma árvore de maximum-likelihood foi gerada com as sequências obtidas, simultaneamente a um bootstrap com 10.000 réplicas (Figura 13). O modelo GTR+G+I (General Time Reversible + Gamma distribution + Invariable sites) foi o de melhor ajuste, apresentando o menor valor de AKAYKE (AIC).

Assim como na árvore de neighbor-joining, a maioria dos indivíduos pertencentes à mesma espécie agrupou em clados monofiléticos com alto suporte de bootstrap (>99%). Os indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* continuaram se agrupando em clados bem definidos, porém de espécies distintas daquelas atribuídas por critérios exclusivamente morfológicos.

Figura 13 - Árvore de maximum-likelihood construída a partir das sequências do gene 16S do mtDNA de anuros da REGUA utilizando o modelo GTR+G+I simultaneamente a uma análise de bootstrap com 10000 réplicas.



Legenda: Em **amarelo**, indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hyloides charadraeetes* que apresentam altos valores de distância intraespecífica; clados em **laranja**: família *Hyliidae*; clados em **verde**: família *Hyloidae*; clados em **rosa**: família *Leptodactylidae*; clados em **azul claro**: família *Cycloramphidae*; clados em **azul escuro**: família *Bufo*; clados em **cinza**: família *Leiuperidae*.

Nota: Acima dos nós, valores de bootstrap maiores que 50 (BP>50%). A maioria das amostras pertencentes à mesma espécie agrupou em clados monofiléticos com alto suporte de bootstrap (>99%). Nesta análise, as diferentes famílias analisadas não agrupam formando grupos parafiléticos.

Fonte: Chaves, 2014.

## 4 DISCUSSÃO

As análises realizadas neste estudo constituem metodologia complementar para a determinação de espécies de anuros nos estágios larvar e adulto. Para anuros, pesquisa no banco de dados do *Genebank*, na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e no banco de dados do BOLD apontam a existência de inúmeras sequências do gene 16S, porém a grande maioria das espécies referidas não é verificada na região neotropical, o que demonstra a escassez de trabalhos de coleta e/ou identificação molecular nesta região do planeta.

Neste estudo, do total de 23 espécies entre 6 famílias, apenas para 7 se verificou que sequências do gene 16S haviam sido publicadas, que são: *Thoropa miliaris*, *Physalaemus signifer*, *Proceratophrys boiei*, *Proceratophrys appendiculata*, *Megaelosia goeldii*, *Rhinella ornata* e *Aplastodiscus eugenioi*, sendo para as duas últimas as sequências publicadas têm tamanhos inferiores a 250 pb, o que inviabiliza a realização de *barcode* (Hebert, 2003a)

Em concordância com estudos que mostraram a propriedade da utilização do gene 16S como *barcode* de anfíbios (Vences *et al.*, 2005a, b, 2012), neste trabalho se realizou com sucesso a determinação de espécies de 84 anuros (95,45%) da REGUA através da análise das sequências do gene 16S dos respectivos mtDNA, de um total de 88 indivíduos. As espécies de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* (amostras vnbj108, vnbj107, vnbj04 e vnbj23 respectivamente), cujas espécies haviam sido determinadas com base em critérios morfológicos, agruparam em clados de mesmo gênero, porém de espécies diferentes, quando das análises de neighbor-joining e maximum-likelihood (Figuras 8 e 12), indicando a possível ocorrência de equívocos em determinações de espécies exclusivamente por critérios morfológicos.

Os 4 indivíduos das espécies *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* que apresentaram discordância na identificação morfológica quando comparada à molecular apresentaram altos valores de distância intraespecífica (2,18%, 3,49% e 3,77%, respectivamente) e distâncias interespecíficas nulas (0%). Esses altos valores de distância intraespecífica e baixos valores de distância interespecífica sugerem equívocos na classificação, seja por critério morfológico ou molecular, de indivíduos dentro das espécies em questão.

Considerando o valor máximo para distâncias intraespecíficas de 2% e o valor mínimo para distâncias interespecíficas de 2% sugeridos para a correta determinação de espécies, verificou-se que 82,60%, ou 19 das 23 espécies deste estudo foram classificadas com confiabilidade através das sequências do gene 16S do mtDNA. O valor de 2% foi adotado para permitir a obtenção de resultados mais robustos (Hebert, 2003a).

Os indivíduos que não apresentaram concordância entre a identificação morfológica e a identificação molecular pelo gene 16S do mtDNA são girinos, demonstrando que a determinação de espécies em estágio larval de anuros considerando apenas aspectos morfológicos é um desafio dada a escassez de chaves de identificação e a semelhança entre os indivíduos. Portanto, para a fase larvar a identificação molecular, aliada a morfologia, surge como uma ferramenta adequada e eficiente.

Com isso, nota-se que neste estudo há discordâncias apenas na determinação de espécies em girinos, reforçando a dificuldade na identificação apenas por morfologia destas espécies.

O gene 16S também tem seu uso indicado quando da necessidade de inferências taxonômicas mais profundas, como famílias (Arif & Khan, 2009). Tanto na análise por neighbor-joining, quanto na análise por maximum-likelihood não houve recuperação de famílias, porém o agrupamento bem definido de gêneros e espécies confirma a utilização deste gene para *barcode* em anuros.

#### **4.1 Aplicação dos genes COI e 16S do mtDNA para *barcode* de anuros da REGUA**

A eficiência da utilização do gene 16S do mtDNA para *barcode* em anuros foi comprovada nos indivíduos deste estudo. Contudo, o gene COI é, de fato, o gene implementado para *barcode*, visto seu grande número de polimorfismos. Isso ocorre por este gene ser um codificador de proteínas, o que faz dele mais susceptível a mutações.

Apesar do sucesso no uso do COI para identificação de organismos pertencentes a uma variedade de taxa, a última década foi marcada pelo debate sobre a viabilidade de se aplicar a técnica do DNA *barcode* em anfíbios, com alguns autores apontando restrições ao seu uso. Vences e colaboradores (2005a, b) demonstraram que tanto o gene COI quanto o 16S são eficientes na identificação de espécies de anuros de Madagascar e mostraram que o gene 16S apresenta vantagens sobre o COI, como maior acurácia na recuperação das relações filogenéticas e variação intrapopulacional relativamente inferior. Os autores também demonstraram que a elevada variabilidade nos sítios de anelamento dos iniciadores e a elevada variação intraespecífica do COI representam obstáculos quando comparado com o gene 16S (Vences *et al.*, 2005a).

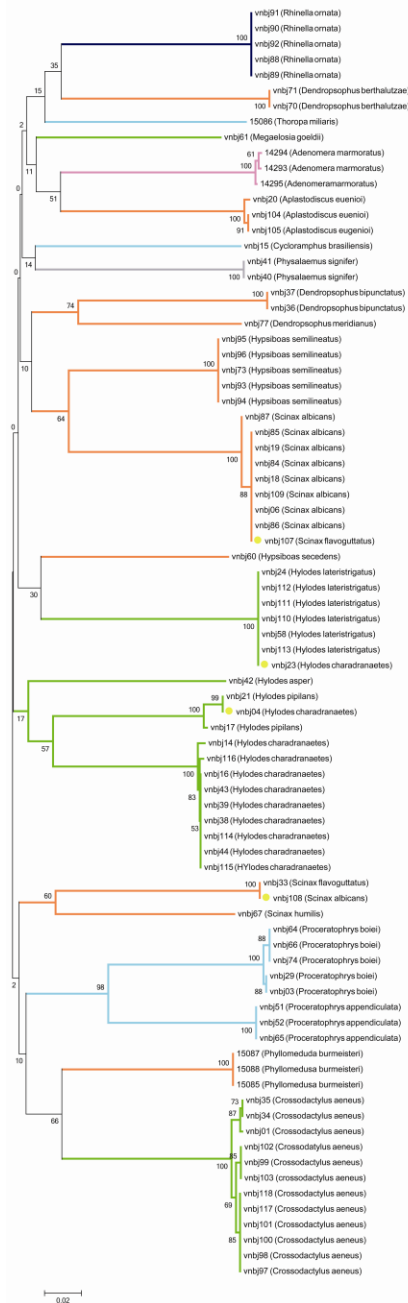
Por outro lado, ao avaliar eficiência do COI em identificar espécies de anfíbios holoárticos, Smith e colaboradores (2007) demonstraram que qualquer sobreposição entre as variações intra e interespecíficas nas suas amostras foram resultados de hibridização introgressiva. Eles argumentam que as taxas de hibridização e de descoberta de espécies em anfíbios não são mais elevadas do que para outros grupos de vertebrados. Portanto, os problemas relacionados ao uso de um único gene mitocondrial para a identificação de espécies não são exclusivos dos anfíbios e, conseqüentemente, o COI apresenta um grande potencial para uso como DNA *barcode* em anfíbios (Smith *et al.*, 2007).

Baseado nesses estudos foi construída uma árvore de neighbor-joining com aplicação do modelo K2P simultaneamente a um bootstrap com 1.000 réplicas para o gene COI do mtDNA. (Figura 14).

Assim como apresentado na árvore de neighbor-joining para o gene 16S do mtDNA, a árvore para o gene COI mostrou as espécies *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* (amostras vnbj108, vnbj107, vnbj04 e vnbj23, respectivamente) agrupando em clados de espécies diferentes, porém do mesmo gênero. Isso corrobora a discordância entre a identificação morfológica e a identificação molecular destes indivíduos.

Ao contrário da árvore de 16S, onde os gêneros agruparam em clados específicos, na árvore de COI algumas espécies dos gêneros *Scinax* e *Dendropsophus* foram recuperados como grupos parafiléticos, inclusive de indivíduos da mesma família, mostrando a alta variação intraespecífica do gene COI.

Figura 14 - Árvore de neighbor-joining construída a partir do gene COI do mtDNA de anfíbios anuros da REGUA, utilizando o modelo K2P simultaneamente a uma análise de bootstrap com 1000 réplicas. Acima dos nós, valores de bootstrap maiores que 50 (BP>50%).



Legenda: Em **amarelo**, indivíduos de *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranetaes* que apresentam valores de distância intraespecífica maiores que 2%.; clados em **laranja**: família *Hylidae*; clados em **verde**: família *Hylodidae*; clados em **rosa**: família *Leptodactylidae*; clados em **azul claro**: família *Cycloramphidae*; clados em **azul escuro**: família *Bufonidae*; clados em **cinza**: família *Leiuperidae*.

Fonte: Chaves, 2014.



Portando, o uso dos genes 16S e COI se mostrou de grande relevância na identificação de espécies de anfíbios anuros da REGUA. A confiabilidade do gene 16S está relacionada com o número de indivíduos para os quais as espécies foram classificadas corretamente, tampouco a discordância fala contra a metodologia molecular de DNA *barcode*, pois esta, se bem aplicada, se sobrepõe ao subjetivismo próprio da classificação exclusivamente morfológica, o que é especialmente importante no que se refere a estágios larvais, como em girinos.

## CONCLUSÕES

- ✓ A padronização das condições de análise de marcadores de mtDNA no Laboratório de Diagnósticos por DNA foi realizada com sucesso. O método de extração de DNA pelo kit Qlamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), bem como a purificação por colunas MicroSpin™ S-300 HR (GE Healthcare) são utilizados em estudos de biodiversidade realizados no laboratório, incluindo identificação de espécies de moluscos, peixes e primatas.
- ✓ Os marcadores para os genes mitocondriais COI e 16S foram os que melhor atenderam os objetivos de identificação molecular das espécies de anfíbios anuros da região da REGUA.
- ✓ O gene mitocondrial 16S teve seu uso na identificação de espécies de anuros da REGUA confirmada neste trabalho, onde 82,60% dos indivíduos tiveram suas espécies definidas corretamente.
- ✓ Os indivíduos das espécies *Scinax albicans*, *Scinax flavoguttatus* e *Hylodes charadranaetes* que agruparam em clados de diferentes espécies, porém do mesmo gênero, indicando a possível ocorrência de equívocos em determinações de espécies exclusivamente por critérios morfológicos, visto a dificuldade na identificação morfológica de espécies na fase larvar, como os girinos.

## REFERÊNCIAS

- Alford RA, Richards SJ. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1999; 30: 133–165.
- Almeida-Gomes M, Vrcibradic D, Siqueira CC, Kiefer MC, Klaion T, Almeida-Santos P, et al. Herpetofauna of an Atlantic rainforest area (Morro São João) in Rio de Janeiro State, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2008; 80 (2): 1-10
- \_\_\_\_\_, Almeida-Santos M, Goyannes-Araújo P, Borges-Júnior VNT, Vrcibradic D, Siqueira CC, et al. Anurofauna of an Atlantic Rainforest fragment and its surroundings in Northern Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 2010; 70(3): 871-877.
- \_\_\_\_\_. Composição e abundância das espécies de anfíbios e répteis em uma paisagem fragmentada de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro [tese]. Rio de Janeiro (RJ). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ. 2010.
- Amaral CR, Brito PM, Silva DA, Carvalho EF. A new cryptic species of South American freshwater pufferfish of the genus *Colomesus* (Tetraodontidae), based on both morphology and DNA data. *PLoS One*. 2013; Sep 11: 8(9):e74397.
- Araújo OGS, Toledo LF, Garcia PCA, Haddad CFB. The amphibians of São Paulo State, Brazil amphibians of São Paulo. *Biota Neotropica*. 2009; 9: 1-13.
- Arif IA, Khan HA. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2009; 32(1), 9–17.
- Austin JD, Loughheed SC, Tanner K, Chek AA, Bogart JP, Boag PT. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2002; 134: 335–346.
- Avise JC, Lansman RA. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. 1983; 147-164.
- \_\_\_\_\_. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York. 1994; 511.
- \_\_\_\_\_. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1986; 312: 325-342.
- \_\_\_\_\_, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1987; 18: 489-522.
- \_\_\_\_\_, Walker D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *PNAS US*. 1999.; 96: 992-995.

\_\_\_\_\_. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA Harvard University Press. 2000; 477.

Baker AJ, Tavares ES, Elbourne RF. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. *Ecology Resources*. 2009; 9 (1): 257-268.

Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science*. 2007; 318: 1775-1777.

\_\_\_\_\_, Fonseca, C.R., Haddad, C.F.B. & Prado, P.I. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. *Cons. Biol.* 2010a; 24:287-294.

Beebee TJC. Ecology and conservation of amphibians. London: Chapman e Hall. 1996.

Bermingham E, Lamb T, Avise JC. Size Polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *J. Heredity*. 1986; 77: 249-252.

Bernardo CSS. Reintrodução de mutuns-do-sudeste *Crax blumenbachii* (Cracidae) na Mata Atlântica da Reserva Ecológica de Guapiaçu (Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil) [tese]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. 2010.

Bert TM, Seyoum S, Tringali MD, Mcmillen-Jackson A. Methodologies for conservation assessments of the genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. *Braz. J. Biol.* 2002; 62(3): 387-408.

Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol. Ecol. Res.* 2008; 8(3): 471–479.

Bowles D. Wildlife trade – a conserver or exploiter? In: Taylor VJ, Dunstone N. The exploitation of mammal populations. Chapman & Hall, London, UK. 1996; 415.

Branicki W, Kupiec T, Pawlowski R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J Forensic Sci.* 2003; 48(1): 83-87.

Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76: 1967-1971.

\_\_\_\_\_, Prager EM, Wang A, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 1982; 18: 225-239.

\_\_\_\_\_. The mitochondrial genome of animals, in *Molecular Evolutionary Genetics* (ed. R.J. MacIntyre), Plenum Press, New York. 1985; 5: 95-130.

- Brown R, Pressley M, Van Meter P, Schuder T. A quasi-experimental validation of transactional strategies instruction with low-achieving second grade readers. *Journal of Educational Psychology*. 1996; 88: 18–37.
- Burbrink FT, Lawson R, Slowinski JB. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American Rat Snake (*Elaphe obsoleta*): A critique of the subspecies concept. *Evolution*. 2000;. 54(6): 2107-2118.
- Burger G, Gray MW, Lang BF. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends genet*. 2003; 19(12) 709-716.
- Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. Elsevier Academic Press. 2005; 2.
- Câmara G, Davis C, Monteiro AMV. Introdução à Ciência da Geoinformação. INPE. 2001.
- Capobianco JP. Dossiê Mata Atlântica 2001. Brasília: Rede de ONGS da Mata Atlântica, Instituto Sociambiental, Sociedade Nordestina de Ecologia. 2001.
- Camurugi F, Lima TM, Mercês EA, Juncá FA. Anurans of the Reserva Ecológica da Michelin, Municipality of Igrapiúna, State of Bahia, Brazil. *Biota Neotropica*. 2010; 10(2): 305-312.
- Caramasch U. Notes on the taxonomic status of *Elachistocleis ovalis* (Schneider 1799) and description of five new species of *Elachistocleis* Parker 1927 (Amphibia, Anura, *Microhylidae*). *Boletim do Museu Nacional*. 2010; 527: 1-30.
- Carnaval AOQC, Toledo LF, Haddad CFB, Britto FB. Chytrid fungus infects high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic rainforest. *Frog Log*. 2005; 70:3-4.
- Carvalho-e-Silva AMPT, Silva GR, Carvalho-e-Silva SP. Anuros da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Biota Neotrop*. 2008; 8(1): 199-209.
- Cedergren R, Gray MW, Abel Y, Sankoff D. The evolutionary relationships among known life forms. *J Mol Evol*. 1988; 28(8) 1-12.
- Cherry L.M, Case SM, Wilson AC. Frog perspective on the morphological difference between humans and chimpanzees. *Science*. 1978; 200:209–211.
- Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*. 2007; 7: 184–190.
- Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982; 28: 693-705.
- Collins JP, Crump ML. Extinction in our times - global amphibian decline. Oxford University Press. 2009; 304.

Collins JP, Storfer A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Divers. Distrib.* 2003; 9: 89-98.

Cólon-Gaud CMR, Whiles MR, Brenes R, Kilham SS, Lips KR, Pringle CM, et al. Potential functional redundancy and resource facilitation between tadpoles and insect grazers in tropical headwater streams. *Freshwater Biology.* 2010; 55: 2077-2088.

Conte CE, Rossa-Feres DC. Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Rev. bras. Zool.* 2006; 3(1): 162-175.

Cordonie AM, Vannier PA, Brun GM. A restriction map of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 1982; 126: 119-127.

Cruz CAG, Feio RN. Endemismos em anfíbios em áreas de altitude na Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *Sociedade Brasileira de Herpetologia.* 2007; 117-126.

Cummings MP, Otto SP, Wakeley J. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 1995; 12: 814-822.

Cushman. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation.* 2006; 128: 231-240.

Da Silva MNF, Patton JL. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology.* 1998; 7: 475-486.

Dawid IB, Blakler AW. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Develop. Biol.* 1972; 29: 152-161.

DeSalle R, Egan MG, Sissall M. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc.* 2005; 360: 1905-1916.

Dean W. A ferro e fogo: A história e a devastação da Mata Atlântica Brasileira. São Paulo: Companhia das Letras. 1996.

Duellman WE, Crump ML. Speciation in frogs of the *Hyla parviceps* group in the upper Amazon Basin. *Occasional papers of the museum of Natural History.* 194; 23: 1-40.

\_\_\_\_\_, Trueb L. *Biology of Amphibians.* McGraw-Hill, New York. 1986.

\_\_\_\_\_. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American tropics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1988; 75:79-104.

\_\_\_\_\_, Trueb L. *Biology of Amphibians.* Baltimore and London: McGraw-Hill. 1994.

Dunon-Bluteau D, Volovitch M, Brun G. Nucleotid sequence of a *Xenopus laevis* mitochondrial DNA fragment containing the D-loop flanking tRNA genes and the apocytochrome b gene. *Gene*. 1985; 36: 65-78.

Eterovick PC, Carnaval ACOQ, Borges-Nojosa DM, Silvano DL, Segalla MV, Sazima I. An overview of amphibian declines in Brazil with new records from Serra do Cipó, State of Minas Gerais. *Biotropica*. 2005; 37(2): 166-179.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39:783-791.

Ficetola GF. An in silico approach or the evaluation of DNA *barcodes*. *Genomics*. 2010. 11: 434.

Finsterer J. Mitochondrial pathies. *Eur J Neuro*. 2004; 11: 163-86.

Folmer O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. 1994; 3: 294-299.

Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2011-2012: relatório técnico. São Paulo. 2013; Disponível em: [http://mapas.sosma.org.br/site\\_media/download/atlas\\_20112012\\_relatorio\\_tecnico\\_2013final.pdf](http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_20112012_relatorio_tecnico_2013final.pdf) (último acesso 12 de dezembro de 2013).

Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padia JMI, De la Riva I, Cannatella DC. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2007; doi:10.1016.

Galindo-Leal C, Câmara IG. Atlantic forest hotspots status: an overview. *In* C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, D.C. 2003; 3-11.

Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson JR. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 2007; 64.

Goerck JM. Programa de áreas importantes para a conservação das aves (IBAs) – uma estratégia global da BirdLife International. *In*: Albuquerque, J. L. B.; Cândido Jr., J. F.; Straube, F. C.; Roos, A. L. (eds) *Ornitologia e Conservação das Ciências às estratégias*. Tubarão: Editora Unisul, Santa Catarina. 2001; 344.

Goebel AM, Donnelly JM, Atz ME. PCR primers and amplification methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome *b* in Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1999; 11: 163–199.

Graybeal A. Phylogenetic relationship of bufonid frogs and tests of alternative macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1997; 119: 297-338.

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp.* 1999; 41: 95-98.

Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*. 1995; 83(7): 1253--1262.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 2003a; 270: 313–321.

\_\_\_\_\_, Ratnasingham S, Dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences amongst closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2003b; 270: 96–99.

\_\_\_\_\_, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004a; 101: 14812–14817.

\_\_\_\_\_, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2004b; 2:1657–1663.

\_\_\_\_\_, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*. 2005; 54 (5): 852-859.

Hedges SB, Nussbaum RA, Maxson LR. Caecilian phylogeny and biogeography inferred from mitochondrial DNA sequences of the 12S rRNA and 16S rRNA genes (Amphibia:Gymnophiona). *Herpetological Monographs*. 1993; 7: 64-76.

Hero JM. An illustrated key to tadpoles occurring in the Central Amazon rainforest, Manaus, Amazonas, Brasil. *Amazoniana*. 1990; 11:201-262.

Hickerson MJ, Meyer V, Moritz C. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biologic*. 2006; 55 (5): 729-739.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol*. 1991; 66:411-453.

Hwang U, Kim W. General properties and phylogenetics utilizes of nuclear ribosomal DNA and mtDNA commonly used in molecular systematics. *The Korean journal of Parasitology*. 1999; 37: 215-228.

Hayasaka K, Gojobori T, Horap S. Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*. 1988; 5 (6): 626.



Härlid A, Árnason Ú. Analyses of mitochondrial DNA nest ratite birds within the Neognathae - supporting a neotenus origin of ratite morphological characters. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 1999; 266: 305-309.

Jim J. Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura) [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, USP. 1980.

Juncá FA. Declínio Mundial das Populações de Anfíbios. *Sitentibus - Série Ciências Biológicas.* 2001; 1 (1): 84-87.

Kerr KCR, Lijtmaer DA, Barreira AS, Hebert PDN, Tubaro PL. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. *PLoS ONE.* 2009; 4: e4379.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 1980; 16:111-120.

Ko HL, Wang Y-T, Chiu T-S, Lee M-A, Leu M-Y, Chang K-Z, et al. Evaluation the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. *PloS one.* 2013; 8: e53451.

Kumazawa Y, Nishida M. Sequence evolution of mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *J. Mol. Evol.* 1993; 37: 380-398.

Lannoo M. Amphibian declines: The conservation status of United States species. University of California Press, Los Angeles, California. 2005; 1115.

Lewin B. *Genes VII.* Oxford University Press and Cell Press. New York, 2000.

Li WH. *Molecular Evolution.* Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland. 1997; 284.

Lougheed SC, Austin JD, Bogart JP, Boag PT, Chek AA. Multicharacter perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog, *Evolutionary Biology.* 2006; 6:23.

Mable BK, Roberts JD. Mitochondrial DNA evolution of tetraploids in the genus *Neobatrachus* (*Anura: Myobatrachidae*). *Copeia.* 1997; 4: 680-689.

Mabragaña E, de Astarloa JM *et al.* DNA barcoding identifies Argentine fishes from marine and brackish waters. 2011. *Plos One;* 6: e28655.

Marques OAV, Pereira DN, Barbo FE, Germano VJ, Sawaya RJ. Reptiles in São Paulo municipality: diversity and ecology of the past and present fauna. *Biota Neotropica.* 2009; 9(2): 139-150.

Marsh DM, Pearman PB. Effects of habitat fragmentation on the abundance of two species of Leptodactylid frog in an andean montane forest. *Conservation Biology.* 1997; 11: 1323-1328.

Maxson LR. Molecular probes of phylogeny and biogeography of toads of the widespread genus *Bufo*. *Molec. Biol. Evol.* 1984; 1:345-356.

McDiarmid RW, Altig R. Tadpoles: The biology of Anuran Larvae. University of Chicago Press. 1999; 444.

Messing J. *Methods Enzymol.* 1983; 101: 20.

Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* 2003; 3:2229–2238.

Miotto RA, Rodrigues FP, Ciocheti G, Galetti Jr. PM. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected cerrado areas in the Brazilian southeast. *Biotropica.* 2007; 39: 647-654.

Mittermeier RA, Gil RP, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, et al. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. University of Chicago Press (Boston): Conservation International. 2005; 2: 392.

Moore WS. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution.* 1995; 49: 718–726.

Myers CG, Duellman WE. A new species of *Hyla* from Cerro Colorado, and other tree frog records and geographical notes from western Panam. *American Museum Novitates.* 1982; 2752: 1-32.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 2000; 403: 853-858.

Núñez JEV, Amaral-Sobrinho NMB, Palmieri F, Mesquita AA. Consequências de diferentes sistemas de preparo do solo sobre a contaminação do solo, sedimentos e água por metais pesados. *R Bras Ci Solo.* 1999; 23: 981-990.

Palumbi SR. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In*: Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Eds) *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts 1996; 205–247.

Pimm SL, Askins R. Forest losses predict bird extinctions in eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 1995; 92: 9343–9347.

\_\_\_\_\_, Jenkins CN, Joppa LN, Roberts DL, Russell GJ. How many endangered species remain to be discovered in Brazil? *Natureza & Conservação.* 2010; 8: 71-77.

Pombal Jr. JP. A posição taxonômica das “variedades” de *Brachycephalus ephippium* (Spix 1824) descritas por Miranda-Ribeiro 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional.* 2010; 526: 1-12.

Pough FH, Heiser JB, McFarland WN. A Vida dos Vertebrados. 2<sup>o</sup> Edição. Atheneu Editora, São Paulo. 1999; 798 p.

Pontes JAL, Pontes RC, Rocha CFD. The snake community of Serra do Mendanha, in Rio de Janeiro State, southeastern Brazil: composition, abundance, richness and diversity in areas with different conservation degrees. *Brazilian Journal of Biology* 2009; 69(3): 795-804.

Primack RB, Rodrigues E. *Biologia da conservação*. Londrina - Paraná: Ed. Vida. 2010; 328p.

Quintela CE. An S.O.S. for Brazil's beleaguered Atlantic Forest. *Nature Conservation Magazine*. 1990; 40: 14-19.

Ray DA, Densmore LD. The crocodilian mitochondrial control region: general structure, conserved sequences and evolutionary implications. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 2002; 334–345.

Reeder TW. Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal RNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1995; 4, 203–222.

Reilly JG, Thomas CA. A length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Plasmid*. 1980; 3: 109-115.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. 2009; 142: 1144-1152.

Richards CM, Moore WS. A phylogeny for the African treefrog family *Hyperoliidae* based on mitochondrial rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996; 5: 522–532.

Rocha CFD, Van Sluys M, Alves MAS, Bergallo HG, Vrcibradic D. Activity of leaf litter frogs: when should frogs be sampled? *Journal of Herpetology*. 2000; 34: 285–287.

\_\_\_\_\_, Van Sluys M, Alves MAS, Bergallo HG, Vrcibradic D. Estimates of forest floor litter frog communities: A comparison of two methods. *Austral Ecology*. 2001; 26: 14–21.

\_\_\_\_\_, Bergallo HG, Alves MAS, Van Sluys M. A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas dos corredores da Mata Atlântica. 1<sup>nd</sup> ed. São Carlos (SP): Rima Editora. 2003; 160 p.

\_\_\_\_\_, Bergallo HG, Pombal Jr. JP, Geise L, Van Sluys M, Fernandes R, et al. Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Publicações Avulsas do Museu Nacional, Rio de Janeiro*. 2004; 104: 1-24.

\_\_\_\_\_, Vrcibradic D, Kiefer MC, Almeida-Gomes M, Borges-Junior VNT, Van Sluys M, et al. A survey of the leaf-litter frog assembly from an Atlantic forest area (Reserva Ecológica de Guapiaçu) in Rio de Janeiro State, Brazil, with an estimate of frog densities. *Tropical Zoology*. 2007; 20: 99-108.

\_\_\_\_\_, Hatano FH, Van Sluys M, Vrcibradic D. Frog species richness, composition and diversity in coastal Brazilian restinga habitats. *Brazilian Journal of Biology*. 2008; 68(1): 109-115.

Roe BA, Ma DP, Wilson RK, Wong FH. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 9759-9774.

Ruvinsky I, Maxson LR. Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura:Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1996; 5:533-547.

Salles ROL, Weber LN, Silva-Soares T. Amphibia, Parque Natural Municipal da Taquara, municipality of Duque de Caxias, state of Rio de Janeiro, Southeastern Brasil. Check List [Internet]. [Citado em 10 de novembro de 2010]. 2009; 5(4): 840-854. Disponível em: [www.checklist.org.br/getpdf?SL132-08](http://www.checklist.org.br/getpdf?SL132-08)

SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2010. Brazilian amphibians – List of species. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br> (último acesso em 31 de outubro de 2013).

Silva JMC, Souza MA, Bieber AGD, Carlos CJ. Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Organizado por Tabarelli, M.; Inara R. Leal & Silva, JMC. Recife: Editora Universitária. 2003.

Silva-Soares T, Hepp F, Costa PN. Anfíbios anuros da RPPN Campo Escoteiro Geraldo Hugo Nunes, Município de Guapimirim, Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* [Internet]. [Citado em 30 de outubro de 2013]. 2010; 10(2): 225-233. Disponível em: [www.biotaneotropica.org.br/v10n2/en/abstract?inventory+bn01210022010](http://www.biotaneotropica.org.br/v10n2/en/abstract?inventory+bn01210022010).

Silvano DL, Segalla MV. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade*. 2005; 1(1).

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 1994; 87: 651–702.

Siqueira CC, Vrcibradic D, Almeida-Gomes M, Borges-Junior VNT, Almeida-Santos P, Almeida-Santos M, et al. Density and richness of leaf litter frogs of an Atlantic Rainforest area in the Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro State, Brazil. *Zoologia*. 2009; 26(1): 97-102.

Stoeckle M. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *BioScience*. 2003; 53: 2–3.

Sumida M. Inheritance of mitochondrial DNAs and allozymes in the female hybrid lineage of two Japanese pond frog species. *Zool. Aci.* 1997a; 14: 277-286.

\_\_\_\_\_. Mitochondrial DNA differentiation in the Japanese Brown frog *Rana japonica* as revealed by restriction endonuclease analysis. *Genes Genet. Sysu.* 1997b; 72: 79-90.

Smith MA, Poyarkov NA Jr, Hebert PD. DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol Ecol Notes.* 2007 Aug; 8(2): 235-46.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JM, Hirota MM, Bedê, LC. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade.* 2005; 1: 132-138.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution.* 2011; 10: 1093.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 1994; 22: 4673-4680

Toledo LF, Brito FB, Araújo OGS, Giasson LOM, Haddad CFB. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology.* 2007; 1(3):185-191.

Van Sluys M, Cruz CAG, Vrcibradic D, Silva HR, Almeida-Gomes M, Rocha CFD. Anfíbios nos remanescentes florestais de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro. In: Bergallo HG, Fidalgo ECC, Rocha CFD, Uzêda MCU, Costa MB, Alves MAS, Van Sluys M, Santos MA, Costa TCC, Cozzolino ACR. Organizadores. *Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro.* 1nd ed. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Biomas. 2009; 175-182.

Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B* 2005a; 360:1859–1868.

\_\_\_\_\_, Thomas M, Van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* 2005b; 2:5.

\_\_\_\_\_, Nagy ZT, Sonet G, Verheyen E. DNA barcoding amphibians and reptiles. *Methods Mol Biol.* 2012; 858:79-107.

Xia X, Xie Z. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity.* 2001; 92(4): 371-373.

Waddle JH. Use of Amphibians as Ecosystem Indicator Species. PhD thesis, University of Florida, Gainesville, FL, USA. 2006.

Wells KD. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press, Chicago. 2007; 1148 p.

Whitmore TC. Tropical forest disturbance, disappearance and species loss. In Laurance WF, Bierregaard RO. Tropical Forest Remnants. Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities. The University of Chicago Press, Chicago. 1997; 3–12

Woess CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 1987; 51:221-271.

Wolstenholme DR, Clary DO. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. Genetics. 1985; 109: 725-744.

Wolstenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 1992; 141: 173-216.

Wong JFH, Ma DP, Wilson RK, Roe BA. DNA sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial heavy and light strand replication origins and flanking tRNA genes. Nucl. Acid. Res. 1983; 14(11): 4977-4995.

Yokobori AI, Hasegawa M, Ueda T, Okada N, Nishikawa K, Watanabe K. Relationship among coelacanths, lungfishes, and tetrapods: a phylogenetic analysis based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences. J. Mol. Evol. 1994; 38:602–609.